



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ITAJUBÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS PARA ENGENHARIA

ALDO DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA A
NANOCOMPARTIMENTAÇÃO DE AGENTES NEUROLÉPTICOS**

TESE DE DOUTORADO

ITAJUBÁ-MG

Dezembro de 2015

ALDO DE OLIVEIRA SILVA

**ESTUDO DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA A
NANOCOMPARTIMENTAÇÃO DE AGENTES NEUROLÉPTICOS**

TESE DE DOUTORADO

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Materiais para Engenharia, Instituto de Física e Química (IFQ), da Universidade Federal de Itajubá, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Doutor em Ciências em Materiais para Engenharia.

Área de concentração: Não Metais

Orientador: Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

ITAJUBÁ-MG

2015

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, e pela oportunidade de realização deste trabalho;

À CAPES pela bolsa de doutoramento concedida como suporte financeiro ao desenvolvimento da pesquisa, à Finep e CNPq pelo apoio financeiro na compra de materiais.

Ao meu Orientador Prof. Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz pela orientação e dedicação no desenvolvimento e realização deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Élcio Rogério Barrak por ceder o laboratório com os equipamentos de Análise Térmica e DSC e ajudar na manutenção dos mesmos durante o período de realização dos experimentos;

À Prof. Dra. Amanda de Carvalho Pereira Moraes, coordenadora do curso de Farmácia da FEPI, Itajubá MG, pela instrução na utilização: dos espectrofotômetros FTIR e UV-Vis, dos equipamentos de Análise Térmica e DSC.

À engenheira elétrica Juliane Soares de Souza, pela ajuda no início deste trabalho, na instalação e operação dos programas de modelagem molecular.

Ao aluno de mestrado e técnico em Química do IFQ, Raphael Felca Glória, que fez junto com a professora Amanda, o MEV das amostras em estudo.

À Profa. Dra. Maria Elena pela ajuda na realização dos experimentos calor de combustão e ângulo de contato.

Ao técnico do IEM, Marcos Cirilo do Santos por fazer o Raio X das amostras.

À Coordenação do Curso e aos demais colaboradores deste trabalho;

Aos meus pais, por tudo que sou e por tudo que fizeram e fazem por mim, aos meus irmãos e a toda família pelo apoio e incentivo;

A meus amigos e colegas de doutorado;

Aos companheiros da Igreja Assembleia de Deus de Itajubá, pela companhia e amizade;

Aos Membros da comissão examinadora.

*“Tu tens um medo de
Acabar.
Não vês que acaba todo o dia.
Que morres no amor.
Na tristeza.
Na dúvida.
No desejo.
Que te renovas todo o dia.
No amor.
Na tristeza.
Na dúvida.
No desejo.
Que és sempre outro.
Que és sempre o mesmo.
Que morrerás por idades imensas.
Até não teres medo de morrer.
E então serás eterno.”*

MEIRELES, C. **Antologia poética**. Rio de Janeiro: Record, 1963 (fragmento).

Sumário

Capítulo 1 – Introdução e Referencial Teórico.....	1
1. Introdução e Referencial Teórico.....	2
1.1. <i>ELECTROSPINNING</i>	2
1.2. SISTEMA DE LIBERAÇÃO PROLONGADA DE FÁRMACOS	3
1.3. A ESTRUTURA SUPRAMOLECULAR DOS DENDRÍMEROS	5
1.4. A ESQUIZOFRENIA COMO UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA MUNDIAL.....	9
1.5. HALOPERIDOL: UM NEUROLÉPTICO MODELO	14
1.6. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	15
Capítulo 2 – Metodologia Experimental.....	16
2. Metodologia Experimental	17
2.1. REAGENTES	17
2.2. SÍNTESE DO CONJUGADO PGA-HLP.....	17
2.2.1. <i>Síntese do núcleo oligomérico</i>	17
2.2.2. <i>Síntese do políglicerol arborescente</i>	20
2.2.3. <i>Incorporação do HLP no PGA</i>	21
2.3. ELETROFIAÇÃO DO CONJUGADO PGA-HLP.....	23
2.4. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	25
2.5. ESTUDO DA LIBERAÇÃO DO HLP DO PGA-HLP ELETROFIADO.....	25
2.6. TÉCNICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE ANÁLISE	26
2.6.1. <i>Análise do núcleo oligomérico por espectrometria de massas</i>	26
2.6.2. <i>Ressonância magnética nuclear</i>	26
2.6.3. <i>Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)</i>	27
2.6.4. <i>Difratometria de raios X</i>	27
2.6.5. <i>Análise térmica</i>	27
2.6.5.1. <i>Análise termogravimétrica</i>	27
2.6.5.2. <i>Calorimetria exploratória diferencial</i>	28
2.6.6. <i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	28
2.7. TÉCNICAS BIOQUÍMICAS DE ANÁLISE <i>IN VITRO</i>	29
2.7.1. <i>Estudo da atividade hemolítica</i>	29
2.7.2. <i>Análise da Citotoxicidade</i>	30
2.8. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS <i>IN SILICO</i>	30
2.8.1. <i>Determinação das propriedades eletrônicas</i>	31
2.8.2. <i>Simulação por dinâmica molecular do núcleo oligomérico do PGA</i>	31
CAPÍTULO 3 – TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	
3. Técnicas experimentais de caracterização e simulação <i>in-sílico</i>	37
3.1. ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	37

3.2.	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	40
3.3.	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADAS DE FOURIER (FTIR)..	41
3.4.	ESPECTROSCOPIA ELETRÔNICA UV-VIS.....	46
3.5.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	47
3.6.	ANÁLISE TÉRMICA	49
3.6.1.	<i>Análise termogravimétrica (ATG)</i>	49
3.6.2.	<i>Calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	51
3.7.	DIFRATOMETRIA DE RAIOS-X	52
3.8.	ELETROFIAÇÃO.....	53
3.9.	APLICAÇÃO DA MODELAGEM MOLECULAR	54
3.9.1.	<i>Métodos ab initio</i>	54
3.9.2.	<i>Métodos semi-empíricos</i>	55
3.9.2.1.	PM3 (Parametric Method 3).....	56
3.9.3.	<i>Os métodos da dinâmica molecular (Gromacs)</i>	57
Capítulo 4 – Resultados Experimentais e Discussão		58
4.	Resultados Experimentais e Discussão	59
4.1.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NÚCLEO OLIGOMÉRICO PGL ₁₀	59
4.2.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO PGA _{G4} E SEU CONJUGADO PGA _{G4} -C-HLP	63
4.3.	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO CONJUGADO PGA _{G4} -C-HLP	69
4.4.	ELETROFIAÇÃO DO CONJUGADO PGA _{G4} -C-HLP E CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	87
4.5.	CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA	90
4.5.1.	<i>Citotoxicidade</i>	90
4.5.2.	<i>Hemocompatibilidade</i>	93
4.6.	PERFIL DE LIBERAÇÃO DO HLP EM MEIO ENZIMÁTICO	94
Capítulo 5 – Resultados e Discussão da Modelagem <i>In Silico</i>		103
5.	Resultados e Discussão da Modelagem <i>In Silico</i>:	104
5.1.	PROPRIEDADES ELETRÔNICAS DETERMINADAS POR MÉTODOS SEMI-EMPÍRICOS	104
5.2.	DINÂMICA MOLECULAR DO PGL	108
5.3.	ESTUDO DA INTERAÇÃO ENTRE O HLP E O PGA.....	117
Capítulo 6 – Conclusões e Perspectivas Futuras		121
6.	Conclusões e Perspectivas Futuras	122
Referências Bibliográficas		124

Lista de Figuras

Figura 1 – Diagrama esquemático da configuração típica do electrospinning – adaptado [1]..2	
Figura 2 – Arquiteturas moleculares dos polímeros: enxentro (a), forma de escova (b), dendrímero (c), hiperramificado (d), arborescente (e) e arquitetura de estrela (f) – [5].4	
Figura 3 – Modelo de sistema de liberação de fármaco (SLF).....4	
Figura 4 – Ilustração da estrutura idealizada de um dendrímero ou macromolécula arborescente. G significa geração.6	
Figura 5 – Ilustração da estrutura idealizada de um dendrímero ou macromolécula arborescente. G significa geração.7	
Figura 6 – Ilustração da estrutura supramolecular de dendrímeros ou macromoléculas arborescentes.7	
Figura 7 – Ilustração de uma membrana celular.8	
Figura 2 – Mapa geográfico sobre a política de saúde mental (OMS-2011) – adaptado. 10	
Figura 2 – Mapa geográfico dos profissionais que trabalham na área de saúde mental (por 100.000 habitantes) - (OMS-2011) – adaptado. 11	
Figura 3 – Mapa mundial da taxa de suicídio do sexo masculino (por 100.000 habitantes) - (OMS-2012) – adaptado. 12	
Figura 4 – Mapa mundial da taxa de suicídio do sexo feminino (por 100.000 habitantes) - (OMS-2012) - adaptado..... 12	
Figura 5 – Mapa mundial da taxa de suicídio de ambos os sexos (por 100.000 habitantes) - (OMS-2012) - adaptado..... 13	
Figura 13 – Haloperidol na sua forma estrutural (a) e na estrutura tridimensional (b)..... 14	
Figura 6 – Ilustração da reação de obtenção do núcleo oligomérico de decaglicerol. Consideram-se somente as reações das hidroxilas primárias na formação do éter oligomérico. 18	
Figura 7 – Ilustração do reator utilizado no processo de síntese do núcleo oligomérico de PGL ₁₀ , PGA e do conjugado PGA-HLP: (1) Balão de três bocas, (2) Manta aquecedora, (3) Termopar, (4) Aquecedor, (5) Trap do condensador, (6) Condensador, (7) Trap fria, (8) Cilindro de nitrogênio gasoso, (9) Bomba de vácuo..... 19	

Figura 8 – Ilustração das reações químicas envolvidas na síntese divergente do PGA_{g4} : (i) Cloreto de alila, Hidróxido de sódio, Brometo de tetra-n-butilamônio; (ii) Tetróxido de ósmio, N-metilmorfolina.	21
Figura 9 – Ilustração da reação de acoplamento entre o HLP e o PGA_{g4}	22
Figura 10 – Foto do equipamento utilizado no processo de eletrofiação do conjugado PGA_{g4} -c-HLP	23
Figura 11 – Ilustração dos estados de energia de spin em função do campo magnético externo B_0	37
Figura 12 – Esquema da formação do sinal das ondas de rádio na obtenção das imagens por RMN. http://www.cerebromente.org.br/n13/tecnologia/ressonancia.htm	38
Figura 13 – Esquema de ilustração do equipamento de HPLC.	40
Figura 14 – Esquema representativo do espectrofotômetro FTIR.....	42
Figura 15 – Foto do espectrofotômetro FTIR.	43
Figura 16 – Exemplo de um espectro FTIR com os modos vibracionais mais comuns da química orgânica.....	43
Figura 17 – Esquema da transposição gráfica obtida através da transformada de Fourier.	45
Figura 18 – Ilustração. Acima: interferômetro de Michelson e abaixo: espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier [68].	45
Figura 19 – Foto do espectrofotômetro UV –Vis.....	47
Figura 20 – Foto do equipamento MEV.....	48
Figura 21 – Foto do equipamento de análise termogravimétrica.	50
Figura 22 – Foto do equipamento de DSC.	51
Figura 23 – Esquema da difração de Raios X.	53
Figura 25 – Mecanismo da eterificação do glicerol catalisado por ácido. Adaptado [103]. ...	59
Figura 26 – Ilustração do processo de formação do oligoéter e dos produtos indesejáveis durante a reação de eterificação direta do glicerol.	60
Figura 27 – Ilustração do possível mecanismo de oligomerização do glicerol catalisado por base. Adaptado [103].....	61
Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da microestrutura do catalisador $\text{K}_2\text{CO}_3\text{:LiOH}$ utilizado nesse trabalho para a reação de oligomerização do glicerol.	62
Figura 29 – Superfície 3-D sobre o efeito das variáveis temperatura e tempo no rendimento de formação do PGL_{10} . O catalisador utilizado foi $\text{K}_2\text{CO}_3\text{:LiOH}$	63

Figura 30 – Ilustração do processo de síntese divergente do PGA_{g4} . Os círculos azuis representam os grupos protetores que devem ser removidos antes da próxima etapa de síntese.	64
Figura 31 – Cromatografia de permeação em gel (GPC) do PGA_{g4} e do núcleo de PGL_{10} , utilizando-se como padrões poli(etileno glicol) (PEG). O solvente utilizado foi dimetilformamida (DMF).	65
Figura 32 - Espectro ^{13}C -RMN do PGA_{g4} (Bruker ARX 300, 75 MHz, D_2O , 25 °C).	66
Figura 33 – Superfície 3-D sobre a influência da massa molar nas variáveis Tg, e $[\eta]$ do PGA.	67
Figura 34 – Ilustração do rendimento da conjugação (RC) do HLP com PGA em função das variáveis tempo e número de geração do dendrímero.	69
Figura 35 – Espectro FTIR-ATR do PGA_{g4} e do $\text{PGA}_{g4}\text{COOH}$	70
Figura 36 – Espectro FTIR do HLP (A) do PGA_{g4} (B) e do $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C).	71
Figura 37 – Espectro ^{13}C -RMN à temperatura ambiente (25 °C) do PGA_{g4} (A), HLP (B) e $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C). Solvente: DMSO-d_6	74
Figura 38 – Difractometria de Raios-X de: HLP(A), PGA_{g4} (B) e $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C).	76
Figura 39 – Curva Termogravimétrica e DTG para o HLP (A), PGA_{g4} (B) e $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C) na velocidade de aquecimento de 10 °C/min e atmosfera inerte de N_2	79
Figura 40 – Curvas termogravimétricas (TGA) e suas respectivas derivadas (DTG) obtidas em atmosfera de N_2 nas velocidades de aquecimento de 5 °C/min, 10 °C/min, 15 °C/min e 20 °C/min para: HLP (A), PGA_{g4} (B) e o conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$. As análises foram efetuadas da temperatura ambiente (25 °C) a até 800 °C.	83
Figura 41 – Gráfico de Kissinger para a decomposição térmica do HLP (A), PGA_{g4} (B) e $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C). T é a temperatura absoluta e ϕ são as taxas de aquecimento a 5 °C, 10 °C, 15 °C e 20 °C/min, e ■= Pico 1, ●= Pico 2 e ▲= Pico 3.	84
Figura 42 – Gráfico de Kissinger para a decomposição.	86
Figura 43 – Foto do processo de eletrofiação do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$: Fonte de alta tensão (20 kV), agulha metálica da seringa (2), região de formação do cone de Taylor (3), jato polimérico alongado e estabilizado pela evaporação do solvente (4), placa coletora das nanofibras formadas (5), aspecto físico macroscópico da membrana de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ obtida (6) e micrografia do microscópio eletrônico de varredura (MEV) da membrana obtida (7). ...	88
Figura 44 – Condições para a formação de fibras do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ na placa coletora. PC: placa coletora. As micrografias MEV indicam a morfologia da microestrutura da membrana	

em cada ponto da superfície 3-D: região onde se inicia a formação das microfibras (1), região de boa formação de microfibras (2), região de formação de fitas (3) e região de má formação de fibras (4).....	89
Figura 45 – Gráfico da distribuição do diâmetro das fibras eletrofiadas de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ em função da tensão aplicada.	90
Figura 46 – Ensaios de viabilidade celular para as membranas eletrofiadas de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (○). Os controles positivo e negativo são o fenol a 0,3% (□) e o polietileno de alta densidade (▲), respectivamente.....	92
Figura 47 – Gráfico 3-D dos ensaios de viabilidade celular para as membranas eletrofiadas de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$, Extrato (A). O controle negativo é fenol a 0,3% (m/m). Em (1) são mostradas a micrografia da microscopia de fluorescência de células CHO vivas e mortas (2). As células foram coradas com DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol).	92
Figura 48 – Resultados obtidos para o ensaio de hemólise do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$	94
Figura 49 – Exemplo de um sistema de entrega de fármaco convencional onde são observadas as oscilações até se atingir a janela terapêutica e o efeito do descumprimento no intervalo entre 6 e 8 (XXX) da medicação.	95
Figura 50 – Curvas de calibração preparadas para o estudo da liberação do HLP das matrizes eletrofiadas de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ nas temperaturas de 21 °C, 35 °C e 40 °C. HLP foi dissolvido em tampão PBS ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7,4 contendo tripsina a 0,25 % (v/v).	97
Figura 51 – Determinação da massa de HLP liberada e avaliação do tipo de transporte “n” do HLP através da membrana eletrofiada.....	100
Figura 52 – Ilustração do cálculo do coeficiente de difusão (A-C) de Fick e da energia de ativação (D) para o processo de liberação do HLP da matriz eletrofiada.	101
Figura 53 – Gráfico 3-D ilustração da relação entre “n”, “D” e a temperatura.....	102
Figura 54 – O orbital HOMO a partir da porção do grupamento terminal hidroxila (a direita) para o dendrímero PGLD e o orbital LUMO da moléculas de Haloperidol (a esquerda), a) Mapa de potencial eletrostático, b) HOMO, c) LUMO.	104
Figura 55 – No topo, aumento das ramificações do dendrímer PGLD, modificado com um Haloperidol, submetido ao cálculo no programa Hyperchem através do método semi-empírico PM3, para determinara o valor da energia do HOMO e sua localização. O gap HOMO-LUMO foi determinado tal como o valor da energia do HOMO foi determinada para cada estrutura do dendrímero, e o LUMO de uma molécula de HLP (-4,61 eV); a) Mapa de potencial eletrostático, b) HOMO, c) LUMO.....	105

Figura 56 – Dependência do HOMO-LUMO com o número de gerações do PGL. PGL _{g2} (a direita) e PGL _{g3} (a esquerda); a) Mapa de potencial eletrostático, b) HOMO, c) LUMO.	106
Figura 57 – Propriedades moleculares determinadas para as gerações de dendrímeros PGL, g1, g2 e g3 ao longo de uma trajetória de 4,8 ns. Raiz quadrada média (RMSD) em Angstroms.	110
Figura 58 – Dinâmica molecular do glicerol.....	111
Figura 59 - Dinâmica molecular do diglicerol	112
Figura 60 - Dinâmica molecular do triglicerol.....	113
Figura 61 – Dinâmica molecular do PGL _{g1} de cadeia lateral.....	114
Figura 62 – Dinâmica molecular do PGL _{g2} de cadeia lateral.....	115
Figura 63 – Dinâmica molecular do PGL _{g3} de cadeia lateral.....	116
Figura 64 – Dinâmica molecular do decaglicerol.....	117
Figura 65 – Mapa de Potencial Eletrostático e localização dos orbitais Homo e Lumo para os diferentes tipos de ligação do PGA _{g2} -Hal a) Haloperidol, b) PGA _{g2} , c) PGA _{g2} -Hal-OH, d) PGA _{g2} -Hal-F, e) PGA _{g2} -Hal-C.....	119

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Algumas propriedades básicas de polímeros lineares, polímeros ramificados e dendrímeros. Adaptado de [105].	68
Tabela 2 – Dados do espectro FTIR do HLP, PGA _{g4} e do conjugado PGA _{g4} -c-HLP.....	72
Tabela 3 – Dados das curvas TGA do HLP, PGA _{g4} e do conjugado PGA _{g4} -c-HLP, na velocidade de aquecimento de 10 °C/min.	78
Tabela 4 – Valores determinados pelo método de Kissinger para o fator pré-exponencial aparente, lnA _{app} e energia de ativação, Ea, para o HLP, PGA _{g4} e PGA _{g4} -c-HLP.	85
Tabela 5 – Dados obtidos a partir do estudo do processo de liberação do HLP nas temperaturas de 21 °C, 35 °C e 40 °C.....	102
Tabela 6 – Valores médios da energia HOMO determinada para o PGL estudado, e diferenças entre o HOMO do dendrímero de geração 3 e o LUMO do HLP (-9,67 eV).....	107
Tabela 7 – Valores médios das energias HOMO e LUMO determinadas para o PGA, e GAP HOMO-LUMO determinadas para o Haloperidol, PGA _{g2} , e PGA _{g2} -Hal.	118

Índice de Abreviações

AFM	<i>Atomic force microscopy</i>
AM1	<i>Austin Model</i>
ATP	Adenina trifosfato
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Col.	Colaboradores
CSIC	Conselho superior de investigações científicas
DCM	Diclorometano
DFT	<i>Density Functional Theory</i>
DMAP	Dimetilaminopiridina (DMAP)
DMF	O solvente utilizado foi dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de Raios – X
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Derivada da curva TGA
Ea	Energia de ativação
EDX	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia
EQZ	Esquizofrenia
ESI	Interface de ionização por <i>electrospray</i>
FMOT	Teoria do Orbital Molecular de Fronteria
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
GPC	cromatografia de permeação em gel
Hb	Hemoglobina
HF	Hartree-Fock
HLP	Haloperidol
HOMO	<i>Highest occupied molecular orbital</i>

ICTAC	Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria
ICTP	Instituto de ciência e tecnologia de polímeros
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
ISO	International Organization for Standardization
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
LAT-EFEI	Laboratório de alta tensão da UNIFEI
Log P	Coeficiente de partição óleo água
LUMO	<i>Lowest unoccupied molecular orbital</i>
LWIR	Long Wavelength Infrared
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MNDO	<i>Modified Neglect of Diatomic Overlap</i>
MPE	Mapa de potencial eletrostático
MWIR	Middle Wavelength Infrared
NMR	Ressonância magnética nuclear
OMS	Organização mundial de saúde
PAMAN	Poli(amidoamina)
PBS	Tampão fosfato
PEAD	Polietileno
PEG	poli(etilenoglicol)
PGA	Poliglicerol arborescente
PGA _{g1}	Poliglicerol arborescente de primeira geração
PGA _{g4}	Poliglicerol arborescente de geração 4
PGA _{g4-c} -HLP	Poliglicerol arborescente de geração 4 conjugado ao Haloperidol
PGA-HLP	Poliglicerol arborescente Haloperidol
PGL	Poliglicerol de cadeia lateral
PGL ₁₀	Decaglicerol
PGL _{g1}	Poliglicerol de cadeia lateral de primeira geração

PHR	polímeros hiper ramificados
PM3	<i>Parametric Method 3</i>
PPID	Poli(propilenoimina)
PTFE	Politetrafluoretileno
RMN	Ressonância Magnética
RMSD	Raiz quadrada média
SCZD	<i>Schizophrenia</i>
SLF	Sistemas de liberação de fármacos
SWIR	Short Wavelength Infrared
TEA	Trietilamina
Tg	Transição vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
UV-Vis	Ultravioleta-visível

RESUMO

ESTUDO DE SISTEMAS SUPRAMOLECULARES PARA A NANOCOMPARTIMENTAÇÃO DE AGENTES NEUROLÉPTICOS

Aldo de Oliveira Silva

Orientador: Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

O presente trabalho descreve a síntese, caracterização físico-química e estudo das propriedades biocompatíveis de membranas eletrofiadas do conjugado poli(glicerol) arborescente de geração 4 com Haloperidol ($\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$). As membranas eletrofiadas foram fabricadas a partir do poliglicerol arborescente de geração 4 (PGA_{g4}), por ser essa uma macromolécula com propriedades promissoras para aplicações biomédicas devido à sua elevada funcionalidade química, propriedades miméticas de proteínas globulares e propriedades de biocompatibilidade. As principais vantagens das membranas de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ eletrofiadas inclui a possibilidade de obtenção de fibras muito finas na ordem de grandeza de nanômetros, grande área superficial, e a possibilidade de ser manipulado e processado para diversas finalidades médicas. Neste sentido, sugere-se que os pacientes poderão obter resultados superiores com melhor aderência à medicação com o HLP utilizando o PGA_{g4} como transportador do fármaco. Em contraste com as formulações farmacêuticas convencionais, as nanofibras de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ podem durar vários dias, proporcionando uma melhoria sintomática por longos períodos de tempo. Além disso, em caso de efeitos colaterais indesejáveis os implantes de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ poderiam ser removidos, oferecendo um grau de reversibilidade não disponível com os veículos farmacêuticos convencionais. Especificamente, o dendrímero de poliglicerol geração quatro, têm vantagens para liberação do HLP tais como o tamanho de 1 a 100 nm, camada exterior hidrofílica, propiciando às fibras eletrofiadas maior tempo de meia-vida *in vivo* e uma natureza biomimética e biocompatível. Neste trabalho um pró-fármaco PGA_{g4} foi sintetizado com o medicamento antipsicótico HLP. O $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ foi caracterizado por ressonância magnética nuclear (^1H , ^{13}C -RMN), espectroscopia de infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR), difração de Raios-X (DRX), microscopia

eletrônica de varredura (MEV) e análise termogravimétrica (TGA, DTG). A membrana de PGA_{g4} -c-HLP eletrofiada foi caracterizada quanto ao seu comportamento de liberação *in vitro* do fármaco HLP utilizando espectroscopia de UV-Vis. A análise físico-química confirmou o acoplamento covalente do HLP à estrutura PGA_{g4} em que o fármaco encontra-se disperso molecularmente na matriz polimérica. Os resultados dos ensaios de biocompatibilidade indicam que as nanofibras eletrofiadas de PGA_{g4} -c-HLP apresentam menor toxicidade contra as células de mamífero e a atividade hemolítica adequada para utilização como dispositivo implantável. A hidrólise do HLP *in vitro* foi promovida pela tripsina nas nanofibras de PGA_{g4} -c-HLP e indica que a liberação do fármaco antipsicótico segue uma cinética de transporte não-Fickiana ou do Caso II de transporte através da matriz polimérica. Assim, conclui-se que as nanofibras eletrofiadas de PGA_{g4} -c-HLP desenvolvidas neste estudo têm características físico-químicas e biocompatíveis adequadas, que as tornam um sistema transportador de HLP com potencial para aplicação na medicina.

Palavras-Chave: Fármacos antipsicóticos, poli(glicerol) arborescente, Sistema de liberação de fármacos, microfibras eletrofiadas.

ABSTRACT

SUPRAMOLECULAR SYSTEMS STUDY FOR NEUROLEPTIC AGENTS NANO SUBDIVISION

Aldo de Oliveira Silva

Orientador: Dr. Alvaro Antonio Alencar de Queiroz

The present work describes the synthesis, physico-chemical characterization and study of the biocompatible properties of electrospun nanofibers of the conjugate poly(glycerol) arborecent macromolecule of four generation –Haloperidol (PGA_{g4}-c-HLP). The electrospun membranes were made from arborescent polyglycerol of four generation (PGA_{g4}), because it is one of the most promising macromolecule due to its chemical functionality, mimetic properties of globular proteins and biocompatibility properties. The main advantages of electrospun PGA_{g4}-c-HLP membranes includes very thin fibers in order of magnitude of some nanometers with a large superficial area, and the possibility to be manipulated and processed for many different medical purposes. At this sense, it is suggested with the aim that patients will have superior outcomes with improved HLP adherence from PGA_{g4} as drug reservoir. In contrast to conventional pharmaceutical formulations the PGA_{g4}-c-HLP nanofibers could last many days, providing symptomatic improvement for long periods of time. Additionally, in the event of undesirable side effects, the PGA_{g4}-c-HLP electrospun nanofibers could be removed, offering a degree of reversibility not available with conventional pharmaceutical vehicles. Specifically, polyglycerol dendrimer generation four, have advantages for HLP delivery such as size of 1 at 100 nm, hydrophilic outer shell that provides for increased *in vivo* half-life imparting a biomimetic nature and biocompatibility to the electrospun nanofibers. In this work a PGA_{g4} prodrug was synthesized with the antipsychotic drug HLP. The PGA_{g4}-c-HLP was characterized by nuclear magnetic resonance (¹H, ¹³C-NMR), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), scanning electron microscopy (SEM) and

thermogravimetric analysis (TGA, DTG). The electrospun $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ were characterized for in vitro release behavior using UV-Vis spectroscopy. The physico-chemical analysis confirmed the covalent coupling of HLP to PGA_{g4} structure in which the drug is molecularly dispersed. The results of biocompatibility assays indicate that the $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ electrospun nanofibers feature lower toxicity against mammalian cells and adequate hemolytic activity for use as implantable device. The in vitro HLP hydrolysis promoted by trypsin of $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ electrospun nanofibers indicates that the antipsychotic drug release following a non-Fickian or Case II transport kinetics. Thus, it is concluded that $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ electrospun nanofibers developed in this study have suitable physicochemical and biocompatible characteristics, which make them a potential HLP delivery systems for medicine.

Keywords: Antipsychotic drugs, Poly(glycerol) arborescent, Drug delivery systems, Electrospun microfibers.

Capítulo 1

Introdução e Referencial Teórico

A esquizofrenia é uma doença complexa e intrigante que tem se constituído em um importante problema de saúde pública em todo o mundo, sendo mais prevalente que a doença de Alzheimer, o diabetes ou a esclerose múltipla. As causas da esquizofrenia ainda não são completamente conhecidas. Entretanto, várias abordagens para reduzir os sintomas da esquizofrenia e melhorar a qualidade de vida do paciente e de sua família tem sido a temática da literatura mundial. Neste capítulo, são apresentados os aspectos epidemiológicos da esquizofrenia no mundo e suas principais abordagens terapêutico-farmacológicas.

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (SLF) tem se intensificado nos últimos anos. Os polímeros representam uma das classes de materiais mais versáteis disponíveis para aplicações no projeto de SLF. Os polímeros com arquitetura arborescente começam a ser amplamente utilizados na indústria farmacêutica com o objetivo de se obter SLF com elevado desempenho. Neste sentido, o presente capítulo visa a revisar e apresentar informações sobre o uso de polímeros em especial os de estrutura arborescente, que poderão ser úteis no planejamento de novos sistemas SLF para a liberação de HLP.

1

Electrospinning

Sistemas de liberação de fármacos (SLF)

A estrutura supramolecular dos dendrímeros

A esquizofrenia como um problema de saúde pública mundial

Haloperidol

Objetivos Gerais e Específicos

1. Introdução e Referencial Teórico

1.1. *Electrospinning*

A eletrofiação, do inglês *electrospinning*, é um processo mais barato e simples para fabricar fibras poliméricas com diâmetros na faixa dos poucos micrômetros até à décima parte de nanômetro são de um interesse considerável para vários tipos de aplicações. O processo da eletrofiação é utilizado para produzir fibras muito finas ao forçar um polímero viscoso através de um campo elétrico para uma solução em gotícula, em geral uma ponta metálica de uma agulha, **Figura 1**. O campo elétrico transforma a gotícula numa estrutura chamada cone de Taylor. Se a tensão de superfície e a viscosidade da solução forem apropriadas, o cone é preservado e um jacto da microfibras permanece estável. A origem do *electrospinning* está na pulverização eletrostática (do inglês *electrospraying*). A técnica de eletrofiação hoje tem sido muito atrativa no processamento de biomateriais poliméricos pois utilizando de equipamentos relativamente simples é possível controlar a morfologia, a porosidade e composição das microfibras [1]. Neste trabalho a técnicas foi aplicada para obter as microfibras do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$.

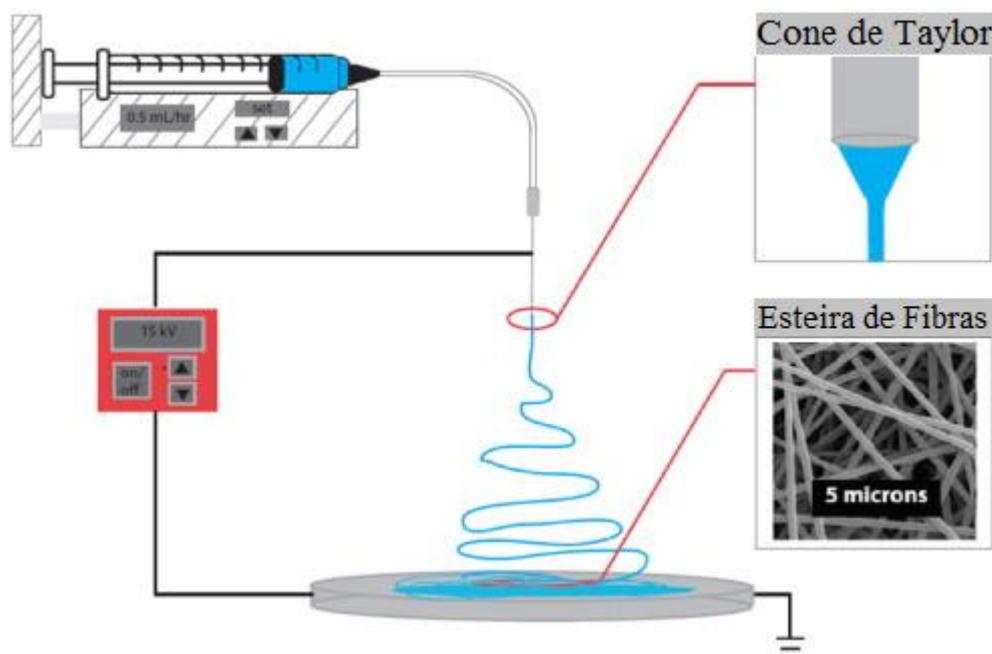


Figura 1 – Diagrama esquemático da configuração típica do *electrospinning*. Adaptado de [1].

Formhals [2], em 1934, patenteou um projeto intitulado “Aparelho e processo para preparar filamentos artificiais” onde num equipamento experimental foi feita produção de filamentos poliméricos a partir de forças eletrostáticas **Figura 1**. O processo é chamado de *electrospinning* quando esta força é usada para misturar as fibras.

1.2. Sistema de liberação prolongada de fármacos

Sistemas de liberação de fármacos (SLF) são dispositivos de administração desenvolvidos para prolongar o tempo de liberação do fármaco no organismo, manter sua concentração plasmática e controlar a localização temporal e espacial das moléculas *in vivo*, através de princípios químicos, biológicos e físicos [3].

Os sistemas de liberação prolongada são projetados para fazer a manutenção do fármaco no organismo por um longo período de tempo. Nos sistemas de liberação controlada é feito o controle da quantidade de fármaco a ser liberada, para isto são utilizados sistemas mais elaborados tais como sistemas que utilizam dendrímeros para o transporte do fármaco.

Desde às últimas décadas pesquisadores vem trabalhado no desenvolvimento de novos sistemas para o transporte de fármacos. Nestes sistemas, o fármaco está ligado a um carregador que é o responsável por contornar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, potencializando o efeito terapêutico (farmacodinâmica), fazendo o controle da absorção e distribuição tecidual (farmacocinética) e reduzindo os efeitos toxicológicos local e sistêmicos dos mesmos. Os dois objetivos principais dos sistemas de liberação controlada são: (i) a manutenção constante da concentração sanguínea de um determinado fármaco, garantindo uma maior biodisponibilidade, e (ii) a redução dos efeitos colaterais, contribuindo para uma melhor adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens requeridas. A eliminação de flutuação na concentração plasmática do fármaco é uma grande vantagem destes sistemas de liberação controlada sobre os sistemas convencionais. Entre as desvantagens destes sistemas de liberação controlada estão: o alto custo dos polímeros biodegradáveis, e a dificuldade de interromper a ação farmacológica de um medicamento administrado pelos sistemas de liberação controlada [4].

No projeto de dispositivos de liberação controlada são utilizados polímeros com arquiteturas moleculares tais como linear, ramificada e dendrítica, **Figura 2** [5].

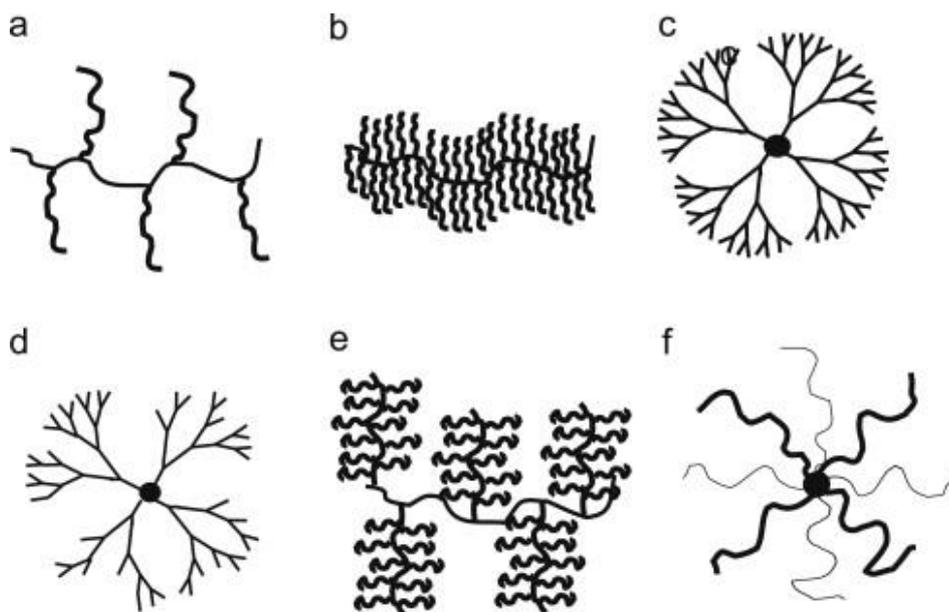


Figura 2 – Arquiteturas moleculares dos polímeros: enxentro (a), forma de escova (b), dendrímero (c), hiperramificado (d), arborescente (e) e arquitetura de estrela (f). Adaptado de [5].

Helmut Ringsdorf [6] foi quem inicialmente sugeriu a ligação covalente de um fármaco a um polímero solúvel em água **Figura 3**.

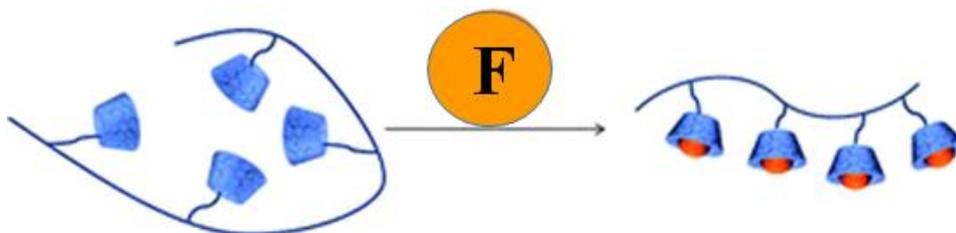


Figura 3 – Modelo de sistema de liberação de fármaco (SLF). Adaptado de [6].

Os conjugados poliméricos são sistemas obtidos através da polimerização direta do polímero com o fármaco que é liberado após a quebra enzimática ou hidrolítica do agregado. Se a formação do conjugado polímero-fármaco envolver a ligação covalente, o sistema pode ser aplicado na administração subcutânea, se o conjugado for uma simples mistura, a administração oral pode ser aplicada [3], pode ocorrer também a interação entre o fármaco e o polímero ser uma ligação de hidrogênio, como acontece com os dendrímeros transportadores de fármacos que são aplicados de diversas formas, desde administração oral, implante subcutâneo, ou implante no local da enfermidade.

1.3. A estrutura supramolecular dos dendrímeros

Dendrímeros são uma classe de compostos poliméricos que podem ser distinguidos a partir de polímeros lineares convencionais por sua arquitetura altamente simétrica e ramificada [7], [8]. As suas características estruturais (dimensões de tamanho nanométrico, tamanho e forma controlam, a multifuncionalidade, topologia globular e presença de cavidades internas) tornam os dendrímeros candidatos interessantes para aplicações tais como transportadores de fármacos e liberação controlada [9], [10].

A ampla faixa de aplicações que está sendo desenvolvida para dendrímeros em áreas como a microencapsulação, liberação de medicamentos, propriedades luminescentes (como marcadores de tecidos biológicos por exemplo), reconhecimento molecular e biocatálise é um resultado destas características marcantes [11].

Os dendrímeros estão sendo frequentemente usados como transportadores de fármacos na medicina, para melhorar o valor terapêutico de diferentes medicamentos solúveis/insolúveis em água e moléculas bioativas por melhorar a biodisponibilidade, a solubilidade e o tempo de retenção reduzindo os gastos do paciente, e os riscos de toxicidade [12], [13] e [14].

O encapsulamento de medicamentos em dendrímeros (nanomedicina) aumenta a eficácia dos medicamentos, a especificidade, a tolerabilidade e o índice terapêutico das respectivas drogas melhorando a proteção, a degradação prematura e interação com o ambiente biológico, o aumento da distribuição correspondente para um tecido selecionado, a biodisponibilidade, o tempo de retenção e a melhora da penetração intracelular [15], [16].

Os dendrímeros são polímeros formados por cadeias com múltiplas ramificações a partir do seu núcleo. A arquitetura globular desses polímeros é bem definida, eles possuem baixa polidispersividade, múltiplas valências, massa molar controlada e elevado grau de ramificação e funcionalização superficial. Entre os polímeros empregados na preparação de dendrímeros estão, o poli(amidoamina) (PAMAM), poli(propilenoimina) (PPID), Poli(Propilenoimina) (PPI) e o dendrímero de poliglicerol (PGA). Estes dendrímeros são aplicáveis no encapsulamento de fármacos assim como o PAMAM [17]. O PPI e o PAMAM por exemplo, apresentam as seguintes desvantagens para aplicação em sistemas de liberação de fármacos controlados: relatos na literatura de toxicidade, ausência de biocompatibilidade, elevado custo e dificuldade em interromper a ação farmacológica. Neste sentido o PGA apresenta-se como uma alternativa viável pois é farmacologicamente inativo, biocompatível e não tóxico.

Os compostos macromoleculares denominados dendrímeros ou macromoléculas arborescentes têm sido intensivamente estudados nas três últimas décadas. O dendrímero é um polímero com estrutura arborescente. Atualmente, mais de 50 famílias de dendrímeros são conhecidas, cada uma com propriedades particulares de funcionalidade superficial e topologia de cavidades que direcionam seu uso específico na medicina [18], [19]. A **Figura 4** mostra um esboço idealizado de um dendrímero arborescente de políglicerol (PGA) de quarta geração (G4), que ilustra a nomenclatura utilizada nesse trabalho. O núcleo é a origem da macromolécula. Um ponto de ramificação é onde os segmentos do dendrímero (ou meros) se dividem para dobrar o número de segmentos. Os grupos terminais representam a periferia do dendrímero ou, onde cessa o crescimento da cadeia.

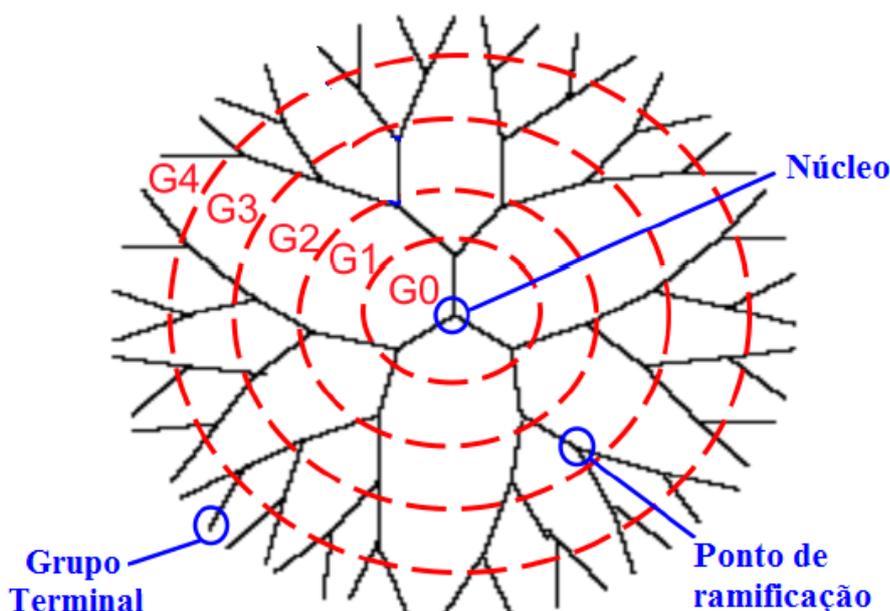


Figura 4 – Ilustração da estrutura idealizada de um dendrímero ou macromolécula arborescente. G significa geração. Adaptado de [20].

A molécula de PGA apresenta as propriedades de um dendrímero tais como as que são mostradas na **Figura 5**. Estas propriedades fazem do PGA uma molécula propícia para ser utilizada em sistemas de liberação de fármacos (SLF), pois o PGA além de não ser tóxico ao organismo apresenta propriedades para aplicações biomédicas como: elevada funcionalidade química, propriedades miméticas de proteínas globulares e biocompatibilidade **Figura 6**.

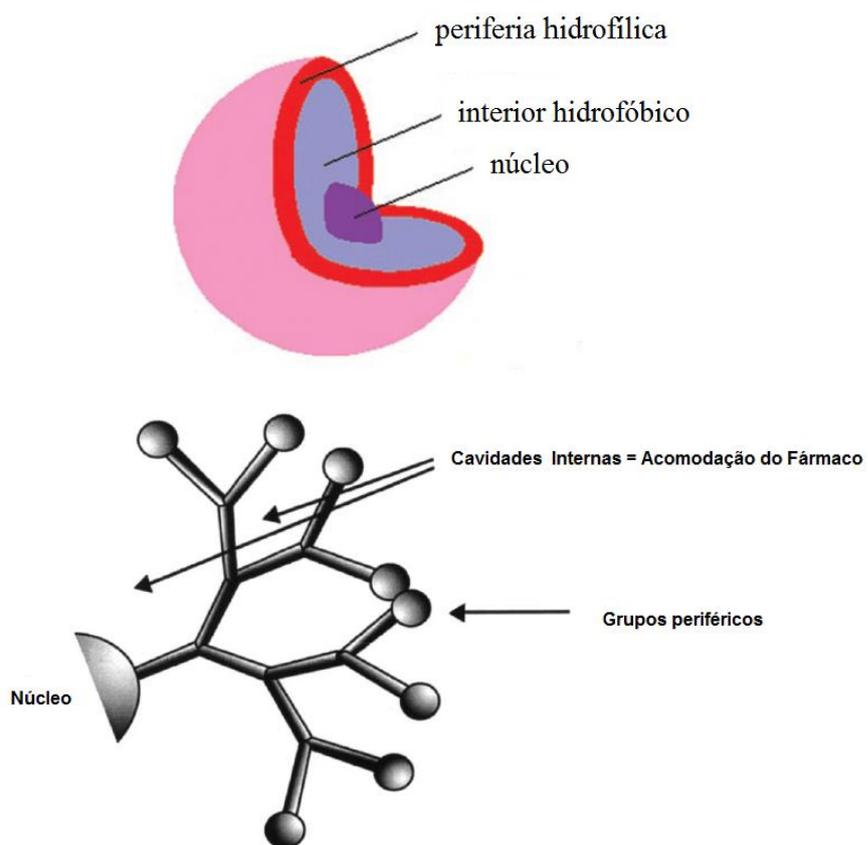


Figura 5 – Ilustração da estrutura idealizada de um dendrímero ou macromolécula arborescente. G significa geração. Fonte: o autor.

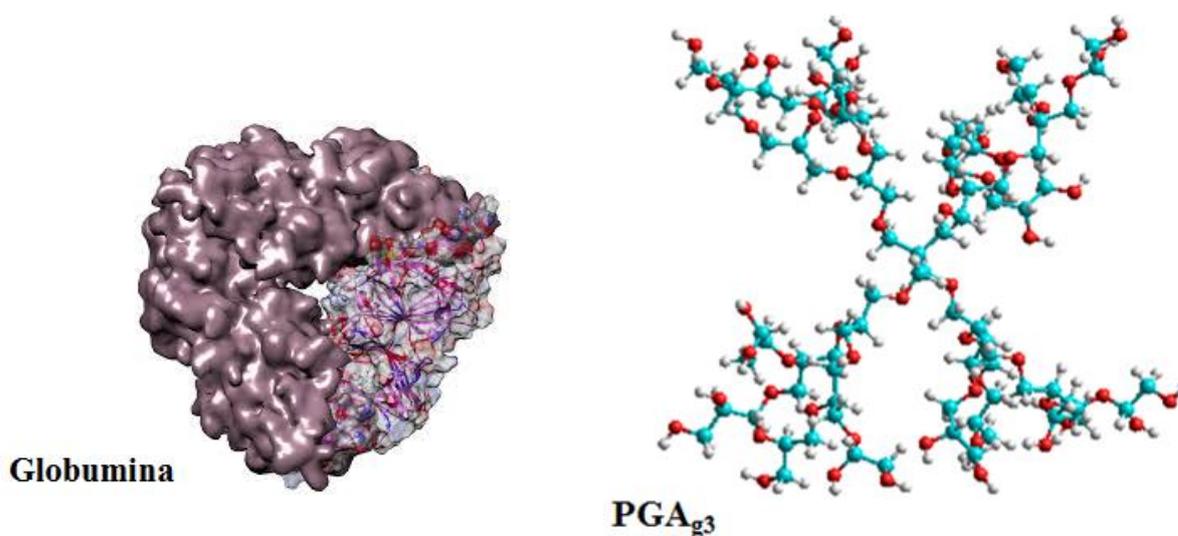


Figura 6 – Ilustração da estrutura supramolecular de globumina feita no programa Marvin, e da macromolécula arborescente PGA_{g3} feita no programa Hyperchem 8.0.

Os dendrímeros apresentam também mimetismo com a estrutura celular, com o caráter hidrofílico e lipofílico das células, **Figura 7**.

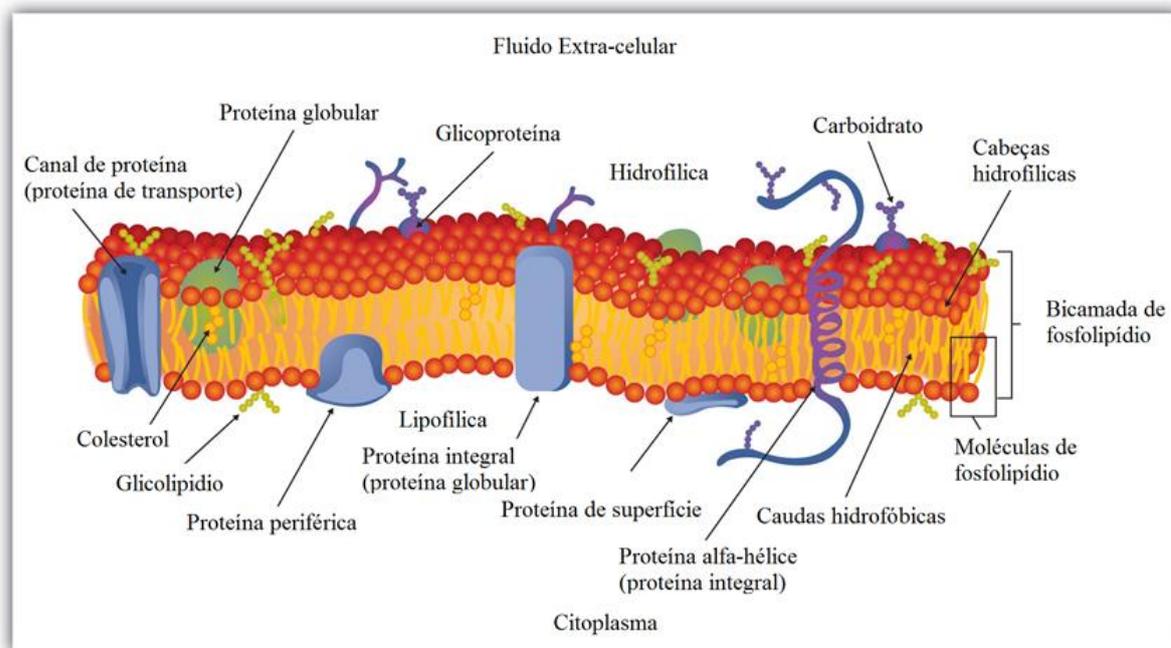


Figura 7 – Ilustração de uma membrana celular. Adaptado de [21].

Os sistemas de liberação de fármacos controlados possui vantagens como: menor variação do fármaco em níveis plasmáticos, administração menos frequente, redução dos efeitos colaterais, maior conveniência e adesão e redução do custo global do tratamento do paciente. Dentre as desvantagens dos SLF controlados estão: fatores fisiológicos variáveis: pH, velocidade de trânsito gástrico, alojamento em lugares inadequados: trato gastrointestinal, fármacos com tempo de meia vida ($t_{1/2}$) curtos e superdosagem: fármacos muito potentes.

Um dos maiores problemas enfrentados no tratamento da esquizofrenia é a baixa adesão ao tratamento devido à necessidade da administração do medicamento em várias doses diárias de forma a se manter a dose terapêutica [22]. Sistemas de nanopartículas, nanoencapsulamento e sistemas supramoleculares como dendrímeros, são estratégias que podem ser utilizadas para melhorar a adesão do paciente ao tratamento da esquizofrenia. De particular importância, e que é a temática deste trabalho, os dendrímeros de poliglicerol (PGA) constituem uma classe de polímeros importante para a obtenção de sistemas de liberação prolongada de haloperidol (HLP).

A utilização de sistemas macromoleculares, tais como dendrímeros de poliglicerol (PGA), para a liberação de neurolépticos no tratamento da esquizofrenia permitirá a eliminação de flutuações nas concentrações plasmáticas e efeitos secundários indesejáveis tais como a sonolência ocasionada normalmente no pico da concentração plasmática do fármaco, recorrência da ansiedade ou os sintomas de abstinência, associados com a baixa concentração plasmática do fármaco.

Dentre os mecanismos aplicados em sistemas poliméricos de liberação de fármacos (SLF) estão: dissolução, particionamento, difusão, osmose, erosão e degradação, e sistemas poliméricos que respondem a fatores como pH, campo magnético e temperatura [23].

Sistemas transdérmicos para liberação de fármacos, são dispositivos feitos com dendrímeros carregadores dos fármacos preparados para a aplicação sobre a pele, que visa a ação sistêmica do fármaco. Tais dispositivos geralmente são projetados como adesivos. Estes adesivos contêm o fármaco disperso em um reservatório ou em uma matriz. São duas as camadas poliméricas do sistema: a externa evita a perda do fármaco e sua exposição ao ambiente, e a camada interna que faz o controle da liberação do medicamento [24]. Neste trabalho foi utilizado o estímulo térmico para a liberação do HLP a partir do conjugado PGA_{g4} -c-HLP.

1.4. A esquizofrenia como um problema de saúde pública mundial

A esquizofrenia (EQZ), no inglês, schizophrenia (SCZD) [25], [26], [27], é uma doença psiquiátrica crônica (também chamada de psicose) com impacto social negativo que influi significativamente na qualidade de vida de seus pacientes [28], além de estar associada a altos custos [29] decorrentes de tratamentos de longa duração e demandas especiais aos serviços de saúde [30].

Embora existam relatos de que a EQZ esteja presente em toda a história da humanidade foi somente no início do século 20 que o psiquiatra alemão Eugen Bleuler [31] criou o nome "esquizofrenia" a partir das palavras gregas "divisão" e "mente" para descrever a doença [32], [33].

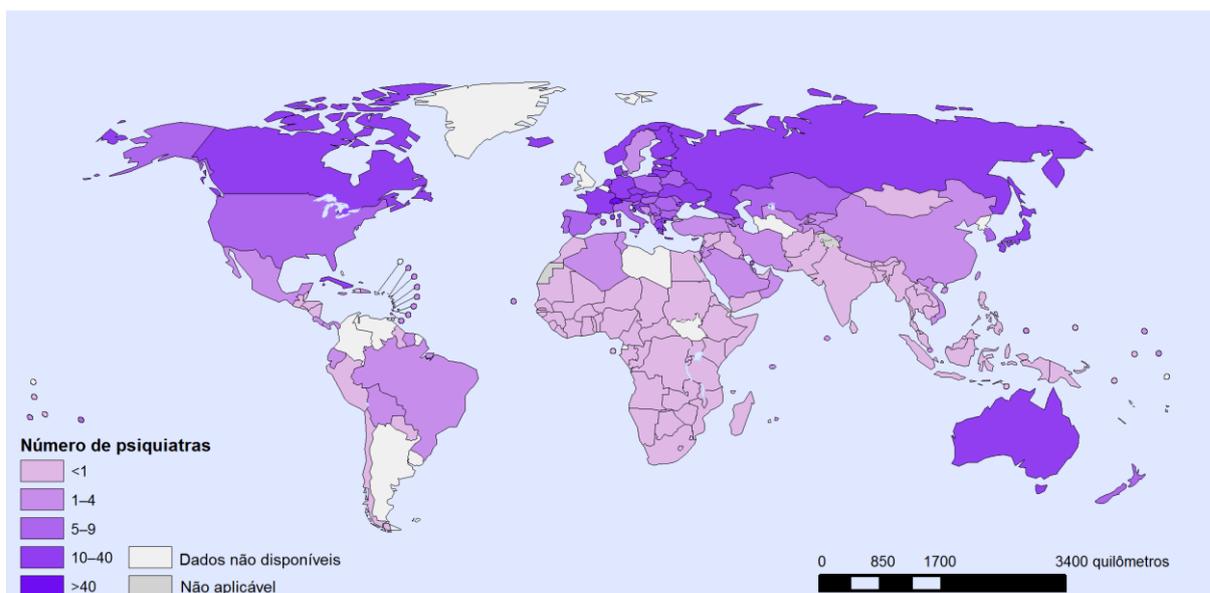


Figura 9 – Mapa geográfico dos profissionais que trabalham na área de saúde mental (por 100.000 habitantes). Adaptado de OMS-2011 [38].

No caso do Brasil, observa-se que há somente cerca de quatro psiquiatras para cada 100 mil habitantes, um número considerado relativamente baixo.

Em 2012 a OMS, fez um levantamento do índice de suicídio por cem mil habitantes devido à esquizofrenia no mundo.

Observa-se que a taxa de suicídio entre os homens (**Figura 10**), mapa mais escuro; é superior a taxa de suicídio entre as mulheres (**Figura 11**), mapa mais claro. No caso da Índia, o índice de suicídio é elevado para os dois gêneros.

Os índices apresentados nos mapas, mostram os casos mais graves da psicose, os quais terminam com a fatalidade do suicídio. A **Figura 12** mostra para cada país a taxa média de pessoas de ambos os sexos que se suicidam no mundo para cada cem mil habitantes por causa da esquizofrenia, um número bastante elevado uma vez que só considera os casos mais críticos da esquizofrenia.

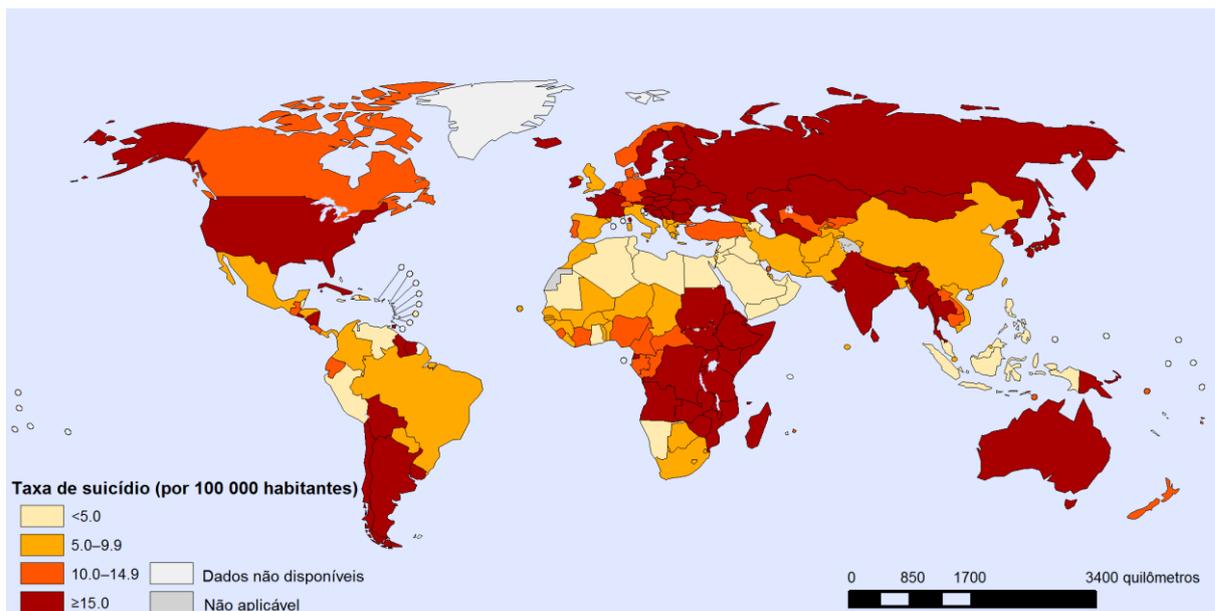


Figura 10 – Mapa mundial da taxa de suicídio do sexo masculino (por 100.000 habitantes). Adaptado de OMS-2012 [38].

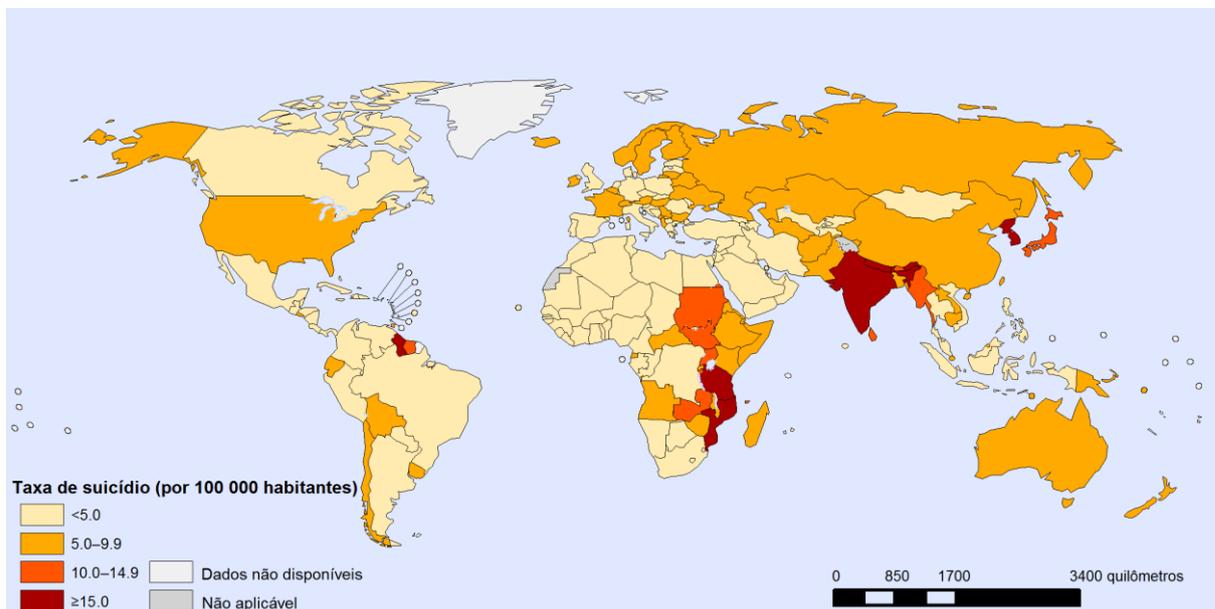


Figura 11 – Mapa mundial da taxa de suicídio do sexo feminino (por 100.000 habitantes). Adaptado de OMS-2012 [38].

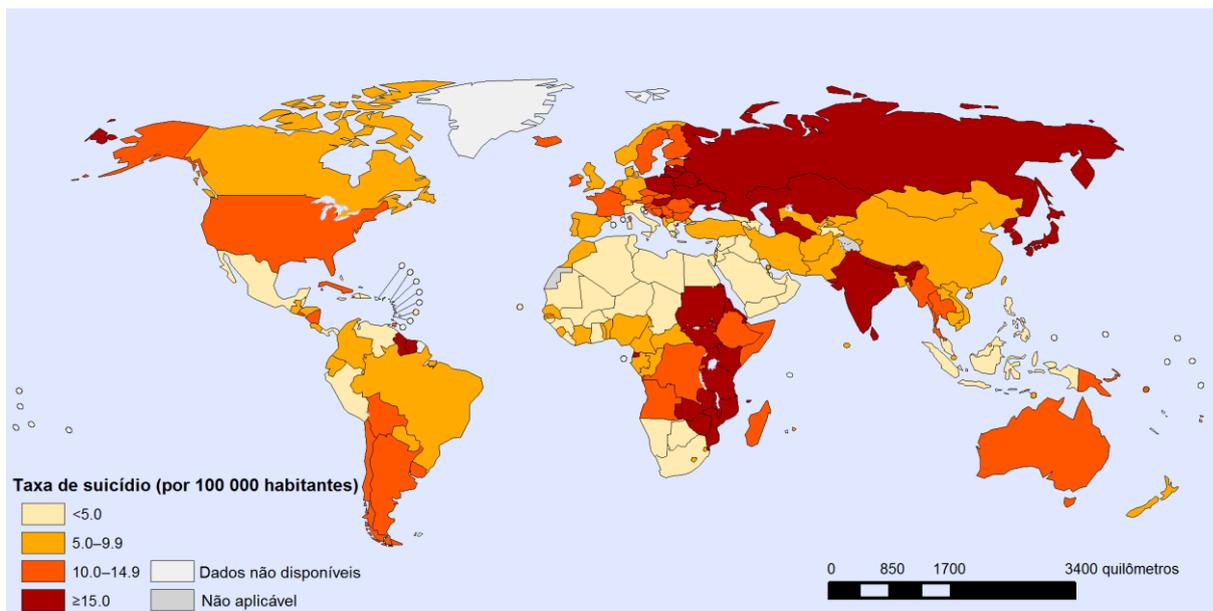


Figura 12 – Mapa mundial da taxa de suicídio de ambos os sexos (por 100.000 habitantes). Adaptado de OMS-2012 [38].

Estes dados da OMS, somados a estudos de outros pesquisadores como Salize e col. [39], e Basu [29], mostram que a esquizofrenia é uma questão de saúde pública grave, de custo elevado, e afeta não só o paciente como também sua família e a sociedade como um todo, pois a psicose deixa o paciente impossibilitado de trabalhar e muitas vezes ele precisa de acompanhamento contínuo, devido a perda da capacidade de discernimento.

O levantamento da taxa de suicídio feito pela OMS, e os índices da esquizofrenia levantados por outros pesquisadores, revelam a gravidade da epidemiologia da esquizofrenia no mundo. Um dos motivos está na baixa eficiência do tratamento que é prolongado, e varia de paciente para paciente, e no fato de que muitos pacientes abandonam o tratamento. Essas pessoas tem um perfil diferente uma vez que grande parte deles não são sequer capazes de tomar os medicamentos no tempo determinado e precisam de um acompanhante durante todo o tempo do tratamento para receber a medicação.

1.5. Haloperidol: um neuroléptico modelo

O haloperidol (HLP) é um derivado da butirofenona e pertence à classe dos antipsicóticos de primeira geração. Seu nome IUPAC é (4-[4-(4-clorofenil)-4-hidroxi-1-piperidil]-1-(4-fluorofenil)-butan-1-ona) **Figura 21**.

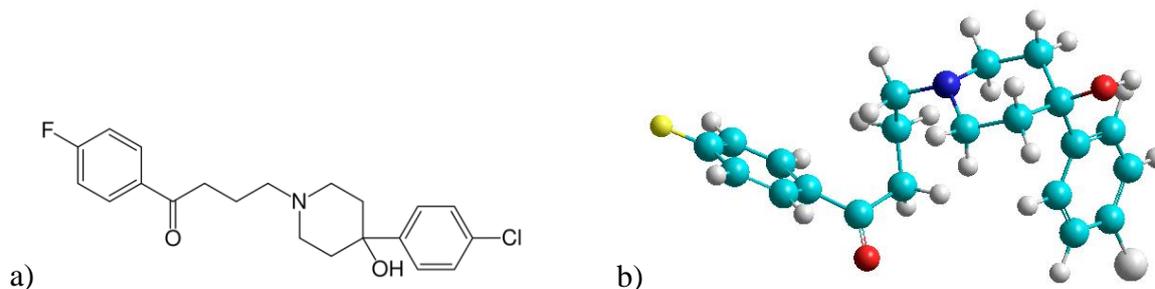


Figura 13 – Haloperidol na sua forma estrutural (a) e na estrutura tridimensional (b).

O haloperidol, neuroléptico que pertence à classe de antipsicóticos de primeira geração foi desenvolvido nos finais da década de 50 pela empresa belga Janssen. Trata-se de um fármaco que é metabolizado no fígado quase que completamente. Seu perfil clínico de atividade é caracterizado por efeitos antipsicóticos, tais como redução de alucinações, distúrbios de personalidade e de raciocínio, inibição psicomotora, tensão afetiva e estados de espírito maníaco. O HLP tem um efeito sedativo que é terapêuticamente benéfico para o paciente. O efeito antipsicótico máximo só é atingido de uma a três semanas após o início do tratamento, enquanto que o efeito inibidor psicomotor é sentido imediatamente.

A absorção do HLP acontece rapidamente, cerca de três horas após a administração oral, e sua biodisponibilidade absoluta é de 60 – 70 %. A concentração plasmática máxima é alcançada entre 3 a 6 horas após a administração oral do fármaco. A conjugação do HLP com polímero arborescente de poliglicerol (PGA), tem a finalidade de tornar a concentração plasmática do medicamento, mais estável, o que faz o tratamento ser mais eficaz; e de fazer com que a concentração plasmática do fármaco no organismo tenha uma maior duração e assim possa haver um maior intervalo de tempo na administração do medicamento, o que facilita a vida do paciente e de quem cuida do paciente, uma vez que paciente com problemas psicóticos necessitam sempre de uma pessoa lhes acompanhando todo o tempo da administração do antipsicótico, já que na maioria dos casos eles são incapazes de fazer uma auto administração do uso do medicamento.

1.6. Objetivos do Trabalho

Um primeiro objetivo desse trabalho compreende a síntese do sistema polimérico derivado do poliglicerol arborescente de geração 4 (PGA_{g4}), de núcleo hidrofóbico baseado no decaglicerol (PGL_{10}) para a imobilização do fármaco psicotrópico haloperidol (HLP), se constituindo em uma das contribuições originais desse trabalho. A caracterização do conjugado PGA_{g4} -c-HLP envolveu técnicas físico-químicas de análise como a espectroscopia no infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e difratometria de Raios-X com a finalidade específica de se confirmar a estrutura do conjugado pretendida.

O segundo objetivo do trabalho foi o processamento do conjugado PGA_{g4} -c-HLP através da técnica de eletrofição a fim de se obter membranas eletrofiadas de elevada área superficial e mimetismo do tecido biológico. A caracterização das membranas eletrofiadas envolveu a determinação de sua microestrutura através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a parametrização dos descritores de eletrofição. Estes dados também contribuíram para a originalidade do presente trabalho, tendo sido submetido ao escritório do Núcleo Tecnológico de Inovação da UNIFEI a solicitação de depósito de patentes.

O outro objetivo consistiu no estudo da biocompatibilidade e acompanhamento da liberação do HLP das membranas de PGL_{g4} -c-HLP em meio enzimático. O método empregado para a dosagem do HLP foi a espectroscopia no ultravioleta (UV). Os dados obtidos também originais constituíram a reivindicação de patente depositada no NIT-UNIFEI.

Capítulo 2

Metodologia Experimental

Este capítulo reúne de forma detalhada as metodologias empregadas para a preparação do poliglicerol arborescente conjugado com haloperidol (PGA_{g4}-c-HLP) assim como sua caracterização físico-química. Também são apresentados os parâmetros físico-químicos utilizados para sua eletrofiação e as condições nas quais foram conduzidas as técnicas de caracterização físico-química e biológicas das membranas de PGA_{g4}-c-HLP eletrofiadas.

2

Reagentes

Síntese do conjugado

PGA-HLP

Eletrofiação do conjugado

Estudo da liberação do HLP do conjugado eletrofiado

Técnicas Físico-Químicas de análise

Técnicas Bioquímicas de análise *in vitro*

Avaliação das propriedades Físico-Químicas *in silico*

2. Metodologia Experimental

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados para a condução dos procedimentos experimentais dessa Tese foram: glicerol P.A. ($C_3H_8O_3$, MM = 92,10 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich), Haloperidol P.A. ($C_{21}H_{23}ClFNO_2$, MM = 375,86 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich), clorofórmio deuterado ($CDCl_3$, MM = 120,38 $g \cdot mol^{-1}$, D= 99,8%, Cambridge Isotope Laboratories); fenolftaleína P.A. ($C_{20}H_{14}O_4$, Reagen, MM = 318,33 $g \cdot mol^{-1}$), carbonato de sódio (Na_2CO_3 , MM = 106,0 $g \cdot mol^{-1}$, Synth), tolueno (C_7H_8 , MM = 92,14 $g \cdot mol^{-1}$), anidrido acético ($C_4H_6O_3$, MM = 102,09 $g \cdot mol^{-1}$, Synth), piridina (C_5H_5N , MM = 79,10 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich), brometo de tetra-n-butilamônio ($C_{16}H_{36}BrN$, MM = 322,368 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich), tetróxido de ósmio (OsO_4 , MM = 254,23 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich), N-metilmorfolina ($C_5H_{11}NO$, MM = 101,15 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich), Anidrido succínico ($C_4H_4O_3$, MM = 100,07 $g \cdot mol^{-1}$, Sigma-Aldrich) e hidróxido de potássio (KOH, MM = 56,1 $g \cdot mol^{-1}$, Synth). Utilizou-se em todos os experimentos água bi-distilada para o preparo das soluções.

2.2. Síntese do conjugado PGA-HLP

2.2.1. Síntese do núcleo oligomérico

O políglicerol arborescente foi sintetizado a partir de um núcleo oligomérico de decaglicerol (PGL₁₀) (**Figura 14**).

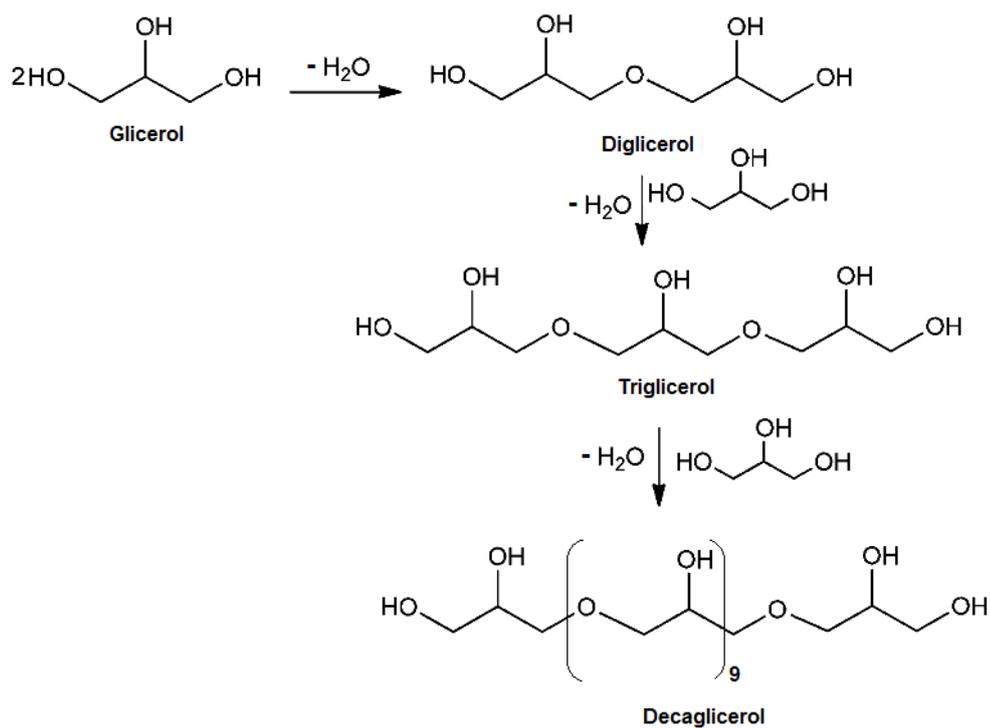


Figura 14 – Ilustração da reação de obtenção do núcleo oligomérico de decaglicerol. Consideram-se somente as reações das hidroxilas primárias na formação do éter oligomérico.

A reação de oligomerização foi realizada em reator em vidro boro silicato do tipo batelada com agitação, e volume útil de 100 mL trabalhando a pressão atmosférica normal e temperaturas de até 200 °C. As reações foram realizadas com agitação de 200 rpm sob atmosfera inerte por fluxo de nitrogênio de 0,5 mL/min a fim de se evitar a oxidação do glicerol e ao mesmo tempo, arrastar a água reacional com o auxílio de uma bomba de vácuo. A ilustração do equipamento de síntese utilizado nesta Tese está ilustrado na **Figura 15**.

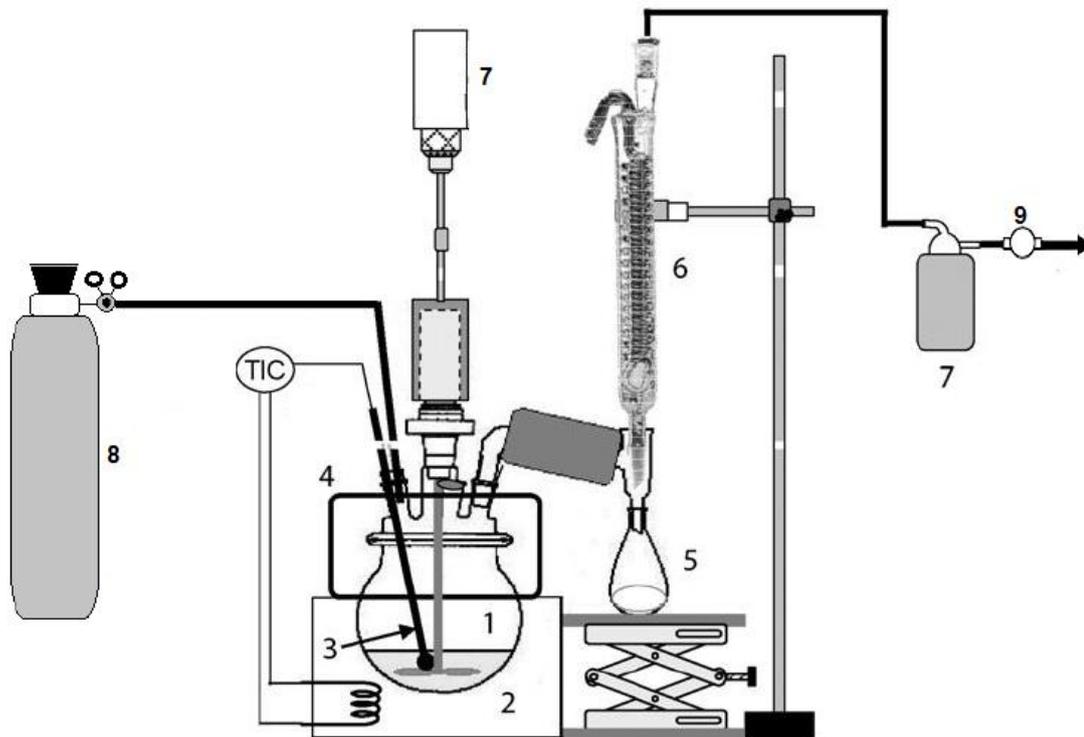


Figura 15 – Ilustração do reator utilizado no processo de síntese do núcleo oligomérico de PGL₁₀, PGA e do conjugado PGA-HLP: (1) Balão de três bocas, (2) Manta aquecedora, (3) Termopar, (4) Aquecedor, (5) Trap do condensador, (6) Condensador, (7) Trap fria, (8) Cilindro de nitrogênio gasoso, (9) Bomba de vácuo.

Uma vez que o número de hidroxilas aumenta proporcionalmente com a massa molecular do oligômero, a reação de oligomerização foi acompanhada através de medidas do índice de hidroxila. O índice de hidroxila (N_{OH}) do PGL₁₀ foi determinado após acetilação do polímero (0,5-0,6 g) com 10 mL de uma solução de anidrido acético/piridina (1:9). Após refluxo por 30 minutos a solução resultante foi titulada com KOH 1,0 molar utilizando-se fenolftaleína como indicador do pH. O N_{OH} foi calculado de acordo com a Equação (1); [40]

$$N_{OH} = \frac{(V_2 - V_1) \times 56,1}{m} + N_A \quad (1)$$

sendo N_{OH} o índice de hidroxila (mg NaOH/g de polímero), V_1 o volume de KOH utilizado na titulação da prova “branca”, V_2 o volume de KOH utilizado na titulação da amostra, m a massa de PGL-10 empregada e 56,1 representa o equivalente-grama do KOH. N_A representa o número (ou índice) de acidez da amostra.

A determinação de N_A foi efetuada após a titulação de 0,2 g de PGL₁₀ previamente dissolvido em mistura de água/etanol (2:1) com solução padronizada de KOH 0,1 M, utilizando-se fenolftaleína como indicador até aparecimento de coloração rosa. Todas as medidas foram determinadas em triplicata e o cálculo de N_A foi efetuado através da Equação (2).

$$N_A = \frac{V_{KOH} \times 1,0 \times 56,1}{m} \quad (2)$$

sendo N_A [mg KOH/g PGL-10] o número de acidez, V_{KOH} [L] é o volume de solução de KOH utilizada na titulação, 56,1 representa o equivalente-grama do KOH e m a massa da amostra.

2.2.2. Síntese do poliglicerol arborescente

O PGA de geração 4 (PGA_{g4}) foi sintetizado no mesmo equipamento apontado na **Figura 15** utilizando o método divergente seguindo-se uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação a partir do núcleo de PGL₁₀, seguindo metodologia da literatura [41], [42] adaptada em nossos laboratórios. A **Figura 16** ilustra parte das reações químicas envolvidas na obtenção do PGA a partir do núcleo de PGL₁₀. A reação de obtenção do PGA_{g4} foi monitorada por ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C. A pureza do PGA_{g4} foi avaliada através da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

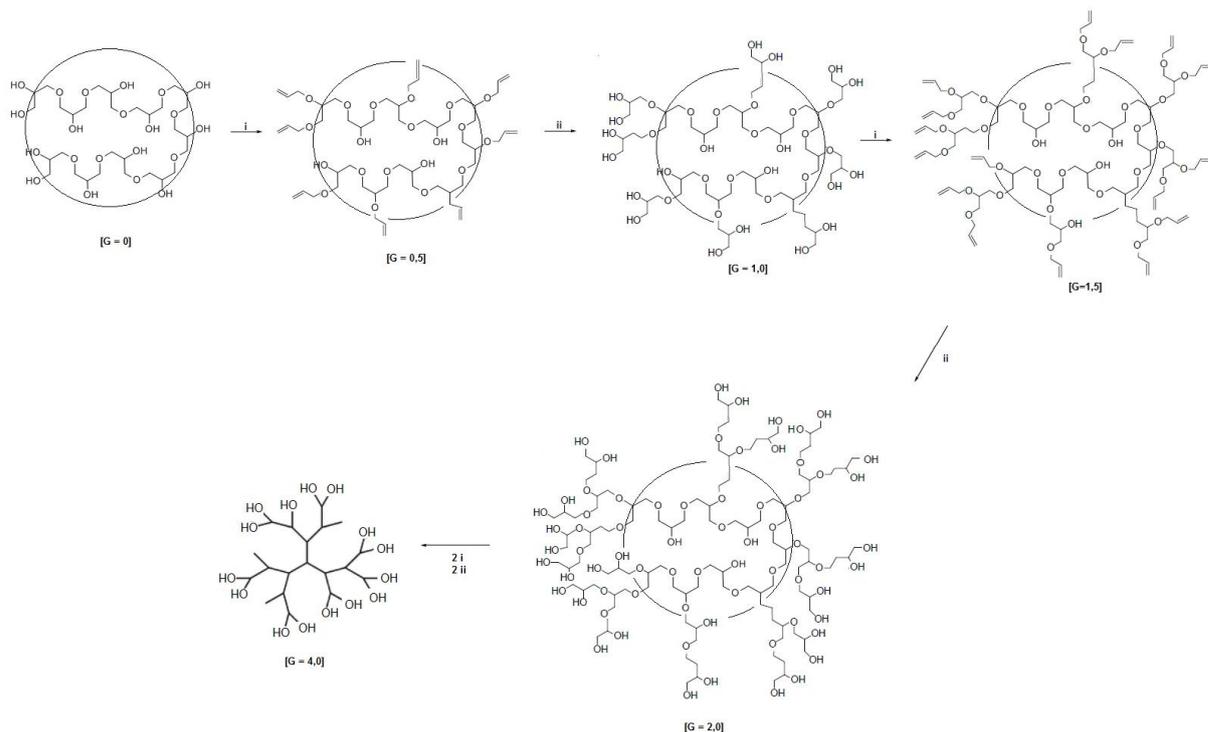


Figura 16 – Ilustração das reações químicas envolvidas na síntese divergente do PGA_{g4} : (i) Cloreto de alila, Hidróxido de sódio, Brometo de tetra-*n*-butilamônio; (ii) Tetróxido de ósmio, *N*-metilmorfolina.

2.2.3. Incorporação do HLP no PGA_{g4}

O dendrímero PGA_{g4} (aproximadamente 10 g) foi succinilado com 3g de anidrido succínico e 50 mL de piridina anidra sob refluxo por 5 horas. Foi mantido um excesso de 10% de anidrido succínico relativamente ao PGA_{g4} . A piridina foi removida por rotaevaporação e o PGA_{g4} succinilado foi lavado com água destilada e deionizada para remoção das impurezas. Após congelamento a $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ o PGA_{g4} foi liofilizado. A espectroscopia FTIR foi utilizada para confirmar a reação de succinilação. A quantidade de HLP incorporada no PGA_{g4} foi analisada através da espectroscopia UV-Vis.

Cerca de 10 g do PGA_{g4} succinilado e Haloperidol foram dissolvidos em 50 mL de diclorometano (DCM) anidro. A razão molar entre o PGA_{g4} succinilado e Haloperidol foi mantida em 1:1. O frasco reacional foi purgado com nitrogênio por 10 minutos. Em seguida

foram adicionados sob fluxo de nitrogênio soluções de bromo(tri-1H-pirrol-1-1)fosfônio (PyBroP) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP) em DCM anidro na proporção de 35 mg.mL⁻¹ e 10 mg.mL⁻¹, respectivamente. Após homogeneização por 5 min adicionou-se 25 µL de trietilamina (TEA) no frasco reacional sob fluxo de nitrogênio constante. A solução foi homogeneizada a 200 rpm por 24 h à temperatura ambiente (25 °C). Em seguida 20 mL de DCM anidro foi adicionado ao frasco reacional e o solvente foi removido por rotaevaporação. O conjugado PGA_{g4}-c-HLP foi lavado com excesso de etanol (300 mL) para remoção do HLP livre. A reação de conjugação entre o PGA_{g4} e HLP foi confirmada por ¹H, ¹³C-NMR utilizando DMSO deuterado. A **Figura 17** ilustra o processo de conjugação entre o HLP e o PGA_{g4}.

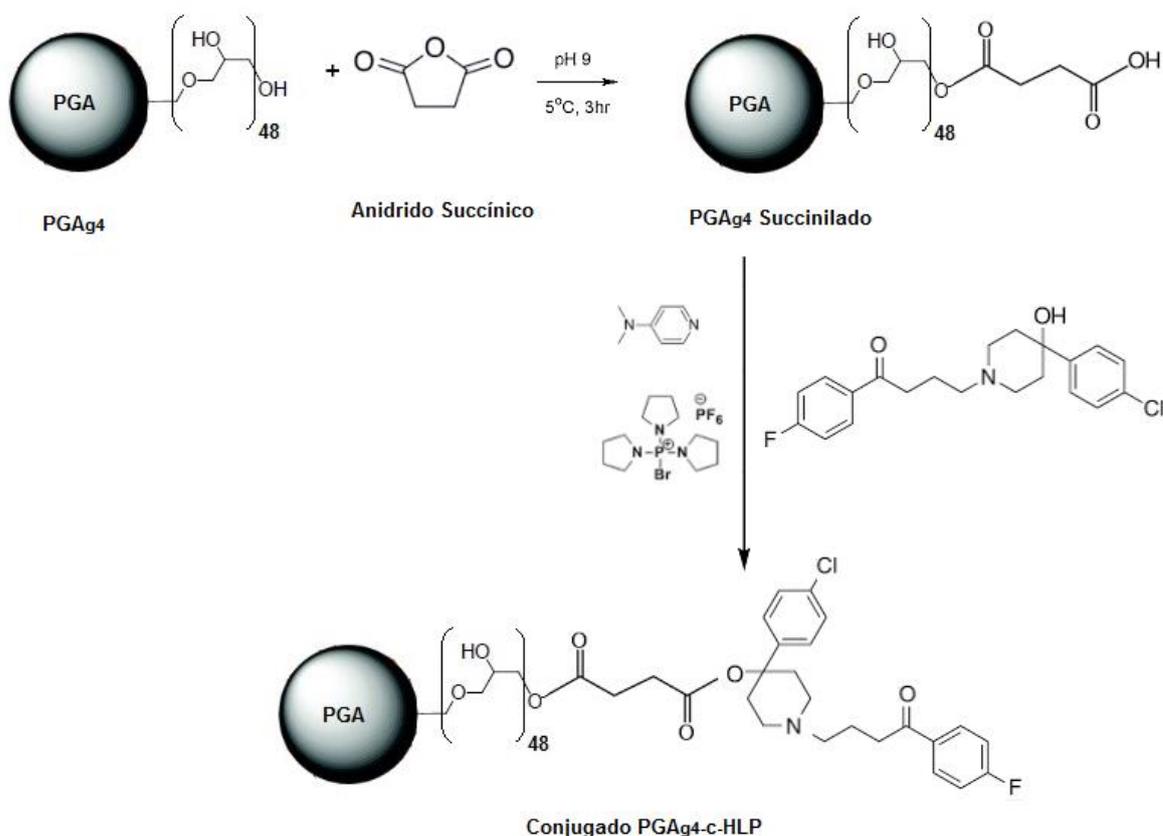


Figura 17 – Ilustração da reação de acoplamento entre o HLP e o PGA_{g4}.

O percentual de HLP incorporado no PGA_{g4} foi avaliado analisando-se a concentração do fármaco livre em meio aquoso e do sobrenadante após o processo de conjugação utilizando-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.3. Eletrofiação do conjugado PGA-HLP

O conjugado PGA-HLP foi eletrofiado à temperatura ambiente (27 °C) em equipamento projetado pelo Laboratório de Alta Tensão da UNIFEI (LAT-EFEI). Ver foto da **Figura 18**. Uma fonte de alta tensão de 0 a 30 kV foi utilizada para gerar o campo elétrico. A solução foi bombeada através de uma seringa utilizando uma bomba de infusão de 5 canais. O alvo consistiu de uma placa metálica aterrada ao pólo negativo e a fonte. A ponta da seringa foi conectada ao pólo positivo, formando uma diferença de potencial entre a ponta da seringa e o alvo. Para a obtenção de membranas eletrofiadas de PGA, preferiu-se o PGA_{g4} uma vez que PGA de gerações inferiores não levaram à obtenção de membranas estáveis, provavelmente devido à sua massa molar mais baixa relativamente à do PGA_{g4} de número de geração maior. A literatura indica que uma das variáveis de processo da eletrofiação de polímeros consiste em se garantir uma massa molecular suficientemente adequada para se atingir níveis de viscosidade de solução que propiciem o entrelaçamento entre as cadeias do polímero [43]. Assim, a massa molecular elevada do PGA_{g4} parece levar a um aumento do nível de entrelaçamento entre as cadeias do polímero, evitando assim a quebra do jato da solução polimérica que está sendo alongada durante o processo de eletrofiação [44].



Figura 18 – Foto do equipamento utilizado no processo de eletrofiação do conjugado PGA_{g4} -c-HLP

No processo de eletrofiação do PGA_{g4} -c-HLP foi utilizada uma mistura de DMF/acetona na proporção 75/25 em volume. A adição da acetona como solvente foi realizada de modo a se obter uma solução volátil o suficiente para facilitar a formação das fibras no processamento de eletrofiação. Uma concentração de 25% em massa de PGA_{g4} -c-HLP foi dissolvida inicialmente

em DMF à temperatura ambiente (25 °C) por 4 horas. Em seguida, adicionou-se acetona e manteve-se sob agitação durante todo o tempo de preparação da solução.

O processo de eletrofição foi realizado à temperatura ambiente (~25°C) e umidade de aproximadamente 50% (desumidificador de ar GR2, Maxlabor). A montagem do equipamento envolveu a utilização de uma bomba infusora com cinco canais, seringa de vidro de 20 mL conectada a uma agulha de aço para raquianestesia de 120 mm de comprimento e 0,53 mm de diâmetro (Braun 25 G).

As condições operacionais de eletrofição favoráveis para a formação de membranas efetuaram-se com base em observações visuais e imagens das membranas obtidas com auxílio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram efetuadas observações quanto à tensão aplicada, distância agulha-coletor e o fluxo da solução. As condições aperfeiçoadas para a obtenção de membranas estáveis mecanicamente são apontadas a seguir.

A distância entre a agulha e o coletor foi de 15 cm. Distâncias inferiores a 15 cm levaram à perda da solução polimérica por deposição fora do coletor.

O fluxo da solução durante o processo de eletrofição foi de 0,5 mL/h pois fluxos inferiores leva à formação de defeitos como estrutura de gotas devido à desestabilização do cone de Taylor.

Aplicou-se valores de tensão de 20 kV para a formação de membranas. Valores inferiores a 20 kV não contribuíram para a formação de membranas estáveis.

As soluções poliméricas foram transferidas para uma seringa de vidro de 20 mL, ligou-se a fonte e aplicou-se a tensão de 20 kV após a formação da primeira gota na agulha. Quando a tensão foi aplicada entre o capilar e o coletor a gota adquiriu a forma do cone de Taylor ocorrendo em seguida à formação de um jato aleatório da solução polimérica que se dirigiu para o coletor revestido de papel alumínio. O solvente evaporou durante a trajetória do jato formando-se uma membrana mecanicamente estável no coletor de alumínio. Em seguida, as membranas foram submetidas à luz UV de 280 nm para cura por 30 min, lavadas com água bidestilada e liofilizadas.

2.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O estudo da incorporação de HLP no PGA_{g4} foi efetuado utilizando o cromatógrafo a líquido Shimadzu série LC-10 com injetor automático, equipado com coluna de fase reversa C18 (15 cm x 4,6 mm ID x 5 µm de partícula), pré coluna C18 (4 cm x 4,6 mm ID x 5 µm de partícula) e detector de UV com leitura em 228 nm. A fase móvel utilizada foi a solução de KH₂PO₄ (Vetec[®]) 0,01 mol L⁻¹, pH 3,5; acetonitrila (EM Science[®]) (69:31, v/v). Foi empregado uma vazão de 1,5 mL min⁻¹, temperatura do forno de 35 °C e volume de injeção de 50 µL.

2.5. Estudo da liberação do HLP do PGA-HLP eletrofiado

Com o objetivo de se analisar quantitativamente a liberação do HLP das membranas eletrofiadas de PGA_{g4}-c-HLP em meio enzimático, as determinações da concentração do agente antipsicótico livre foram feitas através da espectroscopia do ultravioleta visível (UV-Vis). Inicialmente foi determinado o coeficiente de extinção molar do HLP, no comprimento de onda de máxima absorção de 230 nm. Para isso foi obtido uma curva de calibração com a densidade ótica em função das várias concentrações conhecidas de soluções do fármaco em solução tampão fosfato 0,01 M PBS (KH₂PO₄/Na₂HPO₄), pH 7,4 no intervalo de concentração de 10⁻⁴-10⁻⁶ M. À solução 0,01 M de PBS, pH 7,4 foi adicionado tripsina de forma a se obter uma solução de concentração de 0,25 % (m/v) da enzima. Considerando a lei de Lambert-Beer, a absorvância (*A*) da solução está relacionada com o coeficiente de extinção molar através da Equação (3):

$$A = \epsilon \cdot C \cdot l \quad (3)$$

sendo *A* = absorvância, *C* a concentração, ϵ o coeficiente de extinção molar e *l* o caminho ótico (cm) da célula.

A inclinação do gráfico de *A* versus *C* fornece o coeficiente de extinção molar. O experimento da liberação hidrolítica do HLP do conjugado PGA_{g4}-c-HLP envolveu o contato da membrana eletrofiada com 25 mL da solução PBS/Tripsina. Periodicamente foram retiradas alíquotas diretamente dos frascos para as leituras de absorvância.

2.6. Técnicas físico-químicas de análise

2.6.1. Análise do núcleo oligomérico por espectrometria de massas

O monitoramento da reação de oligomerização do glicerol foi realizado utilizando um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos equipado com interface de ionização por electrospray (ESI), operando no modo positivo e localizado na central analítica do IQ-USP/São Carlos. O espectro de massas encontrava-se acoplado a um cromatógrafo líquido de ultra-performance (UPLC) Accela High Speed LC (Thermo Scientific) e a um sistema de nano-LC EASY-nLc II (Thermo Scientific). A voltagem do cone e do extrator foram, respectivamente, 80 e 25 V com varredura na faixa de 50-1000 m/z . As amostras (alíquotas reacionais) foram inseridas na fonte de ionização do instrumento por meio de uma seringa de 500 μL (Hamilton, Reno, NV) com fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. Essas alíquotas foram preparadas através da coleta de 10 μL da reação, nos intervalos de tempo estabelecidos, e diluídos dez vezes com uma mistura de metanol: água (50: 50 v/v).

2.6.2. Ressonância magnética nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C foram realizadas em um equipamento Varian modelo Inova – 300 MHz. As amostras foram preparadas em CDCl_3 utilizando o tetrametilsilano como referência. As análises foram realizadas em colaboração com Dr. Julio San Roman do Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros (ICTP) do Conselho Superior de Investigações Científicas (CSIC), localizado em Marid-Espanha.

2.6.3. Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para essa análise foi utilizado o equipamento FTIR da Perkin Elmer modelo Spectrum One com cristal de ZnSe com diamante e aplicação de torque para a análise diretamente no acessório. A faixa de varredura usada foi de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução espectral de 4,0 cm^{-1} . A técnica foi utilizada para monitorar a transformação nos grupos funcionais durante o processo de conjugação do HLP ao PGA. O equipamento encontra-se no Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologia da UNIFEI.

2.6.4. Difratometria de raios X

Com o intuito de observar a existência de fases cristalinas no PGA antes e após sua conjugação com o HLP foram realizadas medidas de difração de raios-X em difratômetro modelo X'Pert PRO da PANalytical, usando as seguintes condições de varredura: faixa de 2θ de 10 a 90°, com passo de 0,02° e aquisição de 12 segundo por passo, em temperatura ambiente (27 °C) e incidência normal. A indexação dos planos cristalográficos foi feita usando-se o banco de dados *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS). As análises foram feitas no Laboratório de Difração de raios- X da Universidade Federal de Itajubá – UNIFEI.

2.6.5. Análise térmica

2.6.5.1. Análise termogravimétrica

A Análise Termogravimétrica (TGA), foi realizada a fim de se avaliar a estabilidade térmica do PGA e seu conjugado PGA-HLP. Os experimentos foram realizados em uma termobalança Metler modelo TC11, conectada a um computador IBM-PS1, que recebe os dados da análise. As amostras com peso variando entre 2 e 5 miligramas (mg) foram aquecidas em

cadinho aberto de alumina sob atmosfera inerte de N₂ (100 mL/min) desde a temperatura ambiente (25 °C) até 800 °C. As curvas termogravimétricas derivadas (DTG) foram obtidas utilizando-se o *software* do equipamento.

Para o estudo cinético, foram utilizadas as velocidades de aquecimento de 5, 10, 15 e 20 °C/min. A determinação da energia de ativação (E_A) foi determinado através dos métodos numéricos desenvolvidos por Kissinger [45] e Osawa [46].

2.6.5.2. Calorimetria exploratória diferencial

As análises por DSC foram realizadas em um calorímetro exploratório diferencial da Shimadzu, modelo DSC 60. Aproximadamente 5 mg de cada amostra foram colocados em cápsulas de alumínio selada. O material foi submetido ao aquecimento na faixa de temperatura de -80 a 100 °C, com uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min, sob fluxo de nitrogênio de 20 mL/min. Posteriormente, a amostra foi resfriada a uma velocidade de 10 °C/min e novamente aquecida, nas mesmas condições empregadas na primeira etapa de aquecimento. O ciclo de aquecimento/resfriamento foi repetido duas vezes, com a finalidade de eliminar a história térmica do material polimérico. As análises DSC foram realizadas no Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologia da UNIFEI.

2.6.6. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das nanofibras eletrofiadas de PGA-HLP foram feitas através da Microscopia Eletrônica de Verredura (MEV) com filamento de Tungstênio e com acoplamento do detector para Espectroscopia de raios X por dispersão em energia (EDX), modelo SS-550 da Shimadzu. As análises MEV foram realizadas no Centro de Estudos e Inovação em Biomateriais da UNIFEI.

2.7. Técnicas bioquímicas de análise *in vitro*

2.7.1. Estudo da atividade hemolítica

O ensaio da atividade hemolítica do PGA_{g4}-c-HLP foi feito conforme descrito por Henkelman com algumas adaptações [47].

Para a realização dos experimentos foi utilizado o sangue do próprio orientador do trabalho, o qual foi coletado na divisão de Biotecnologia do IPEN, em tubos Vacutainer® com capacidade de 10 mL contendo heparina sódica.

A suspensão de eritrócitos foi preparada, utilizando-se 10 mL de sangue. A amostra de sangue foi centrifugada por 5 minutos a 1000xg utilizando uma centrífuga horizontal (Fanem, modelo 206 BL). O plasma obtido, contendo plaquetas, células brancas e lipídios foi removido por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato (PBS) 5 mM, pH 7,4. Após a repetição consecutiva do processo anterior por três vezes, o concentrado de hemácias obtido foi mantido em refrigeração (4 °C) e utilizado no prazo de 24 horas.

A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada após a incubação das suspensões de eritrócitos nas concentrações de 5 mg.mL⁻¹, 2,5 mg.mL⁻¹, 1,25 mg.mL⁻¹, 0,62 mg.mL⁻¹, 0,31 mg.mL⁻¹, 0,15 mg.mL⁻¹, 0,075 mg.mL⁻¹ e 0 mg.mL⁻¹ foram colocadas em contato com 1 cm² de superfície de PGA_{g4}-c-HLP. Após incubação por 60 minutos a 37°C, a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada a 415 nm.

Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração de suspensão de eritrócitos e para seus controles. Como controles foram utilizados superfícies de PTFE (controle positivo) e vidro (controle negativo). Adicionalmente foram utilizados eritrócitos em PBS como controle de hemólise mecânica (chm) e eritrócitos em água destilada como controle de hemólise total (cht). O percentual de hemólise foi calculado como:

$$\%Hemólise = \frac{A_a - A_{chm}}{A_{cht} - A_{chm}} \cdot 100 \quad (4)$$

sendo A_a , A_{chm} , A_{cht} as absorvâncias relativas aos controles de hemólise mecânica (chm) e controle de hemólise total (cht), respectivamente.

2.7.2. Análise da Citotoxicidade

Os estudos sobre a citotoxicidade do material foram conduzidos segundo a norma ISO 10993 [48], [49] e a técnica aplicada nos experimentos foi a de coloração com o corante supra vital MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2Htetrazólico) e reagente acoplador de elétrons PMS (fenazina metasulfato) .

Foi preparado um extrato do polímero em meio RPMI contendo 10% de SFB (soro fetal bovino), 1% de L-glutamina e 1% de antibiótico/antimicótico, na proporção de 6 cm² da amostra para cada mL de meio extrator. O meio extrator em contato com as amostras foi incubado por 24 horas a 37°C e em seguida filtrado com filtros de seringa com poros de 0,22µm. A solução resultante foi submetida à diluição seriada 1:2 até a concentração de 6,25%. Em uma placa de 96 poços, uma suspensão celular em meio RPMI com soro de 100µL com 1x10⁴ células de linhagem permanente de células de ovário de *hamster* chinês (CHO-K1) foi previamente incubada por 24 horas, antes da exposição com o extrato das amostras. Após este período, 100µL de cada extrato foram pipetados em quadruplicata e 100µL de meio de cultura RPMI com soro pipetado nos poços controle e nos poços do branco. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Posteriormente, uma solução de 80µl de meio RPMI com soro e 20µL da solução 20:1 MTS/PMS foi adicionada em cada poço e as placas incubadas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C por duas horas. Os resultados foram lidos em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Device®) no comprimento de onda 490 nm.

2.8. Avaliação das propriedades físico-químicas *in silico*

Inicialmente foi feita a simulação computacional para o HLP, para o núcleo do dendrímero PGL e PGA, para em seguida calcular as propriedades *in silico* do conjugado PGA_{g4}-c-HLP, na tentativa de entender melhor a interação do fármaco HLP como o dendrímero PGA de gerações 1, 2, 3 e 4. Acontece que como este é um trabalho muito extenso, optou-se por fazer somente os cálculos iniciais, para ajudar no entendimento da interação entre HLP e PGA.

2.8.1. Determinação das propriedades eletrônicas

As propriedades eletrônicas do PGL-HLP foram avaliados utilizando um método semi-empírico PM3, com o algoritmo Polak-Ribiere (uma técnica de gradiente conjugado que utiliza pesquisas unidimensionais) utilizado para as otimizações no pacote de programas do Hyperchem 8.0 [50], [51].

2.8.2. Simulação por dinâmica molecular do núcleo oligomérico do PGA

As estruturas moleculares de PGA-HLP foram geradas no HyperChem e salvas no formato pdb pelo OpenBabel. O arquivo pdb foi usado para fazer a simulação de dinâmica molecular no programa Gromacs para as três gerações de PGA e determinar o log P pelo programa Marvin. Os Programas VMD e Pymol [52] foram usados para visualizar os resultados da dinâmica molecular realizada utilizando o Gromacs. O sistema do dendrímero estava preparado para simulações de dinâmica molecular usando Desmond com solvente explícito [53]. O sistema PGA-HLP foi construído usando o modelo de solvatação SPC e o tamanho da caixa foi determinado automaticamente, criando uma zona tampão ao redor do dendrímero de 10 Å. As etapas de relaxação e minimização das estruturas executadas na simulação por dinâmica molecular [54], [55] foram realizadas para 4.8 ns em 300 K e 1.03 bar. Estruturas instantâneas foram registradas a cada 4,8 ps.

O sistema utilizado para gerar as Coordenadas Atômicas Tridimensionais foi o Hyperchem 8.0. Este sistema cobre todo o processo de criação da estrutura 3D, desde o desenho de sua estrutura química em forma bidimensional, suportado pelo JME Molecule Editor (Peter Ertl), até a obtenção de um modelo final, em três dimensões, fornecendo todas as informações necessárias em um arquivo.hin, o qual pode ser convertido para o um arquivo PDB (Protein Data Bank), através do programa OpenBabel, que é um programa que faz a conversão de um formato de arquivo para outro. O formato de arquivo PDB é compatível com a maioria dos programas de modelagem molecular, tais como o JME Molecule Editor que é um eficiente aplicativo JAVA que permite desenhar e editar moléculas e reações químicas, fornecendo informações para o processamento por outros programas.

Além de gerar o gráfico da estrutura química para o HLP, PGA e PGA-HLP, o programa Hyperchem 8.0 também foi utilizado para fazer a otimização das estruturas na obtenção de uma estrutura molecular de menor energia e calcular as cargas atômicas das moléculas e do conjugado PGA-HLP fazendo-se um ajuste (*fitting*) do potencial eletrostático a partir de cálculos utilizando o método semi empírico PM3, por serem mais rápidos e práticos.

A estrutura tridimensional resultante da otimização de geometria no programa Hyperchem 8.0 foi convertida em arquivos pdb, por meio do programa OpenBabel, como já foi citado, para que assim o arquivo em formato pdb pudesse ser trabalhado no programa de Dinâmica Molecular, GROMACS, instalado no sistema operacional Linux Ubuntu 13.04. O pacote GROMACS foi compilado (instalados) no Ubuntu através do Gerenciador de pacotes Synaptic, programa com uma interface gráfica amigável, que faz o download e a instalação de diversos softwares, sem a necessidade de conhecimentos avançados por parte do usuário.

A instalação do Pymol também foi feita pelo gerenciador de pacotes Synaptic e para a instalação do VMD baixou-se o código fonte e compilou-se o programa. Algumas etapas da simulação proporcionam arquivos para serem utilizados na análise gráfica dos vários resultado da simulação, como por exemplo, o raio de giração, o RMSD, ligações de hidrogênio, etc. A interface utilizada para a visualização desses gráficos é o programa Grace, que foi instalado através do Synaptic.

Os cálculos de Dinâmica molecular das estruturas foram realizados no pacote GROMACS, na versão 4.5.5. O GROMACS consiste em um conjunto de programas capazes de executar todos os passos necessários aos experimentos com dinâmica molecular, desde a preparação dos sistemas até a análise dos resultados obtidos. Os arquivos das topologias das moléculas foram gerados a partir do arquivo pdb no próprio GROMACS [56], utilizado o programa Mktop, software gratuito capaz de construir topologias moleculares para o GROMACS, utilizando o campo de força OPLS-AA. Outros programas como o PRODRG também geram arquivos de topologia das moléculas para o GROMACS.

Durante o processo de criação dos arquivos de topologia, o Mktop avalia automaticamente o estado de protonação dos grupos atômicos presentes na molécula, classifica e adiciona ou remove átomos de hidrogênio quando necessário e determina valores para as cargas de todos os átomos com base em valores pré-definidos de carga para grupos atômicos conhecidos, garantindo a correta distribuição das cargas atômicas individuais para que possa ser executada a simulação utilizando o procedimento conhecido como Grupos de Cargas. Os

arquivos de topologia resultantes desse processo, que contém os valores de carga definidos pelo Mktop, foram utilizados na forma original como um dos modelos.

Para a realização das simulações optou-se por utilizar o pacote GROMACS (na versão 4.5.5), que consiste de um conjunto de programas capazes de executar todos os passos necessários aos experimentos com dinâmica molecular, desde a preparação dos sistemas até a análise dos resultados obtidos.

Foram testados diferentes modelos de água (para gerar uma caixa de água) com a molécula em estudo, sendo eles o Single Point Charge (SPC) e os modelos TIP4P e TIP5P [57]. O modelo escolhido para ser utilizado nesse trabalho foi o TIP4P por apresentar bons resultados comparados aos valores experimentais, com a vantagem de não impor ao sistema um custo computacional muito alto.

O processo de montagem das caixas de simulação teve início com a definição do número de moléculas de PGA que fariam a composição do sistema. A escolha do número de moléculas deve levar em conta o tamanho e a forma da caixa resultante, já que a molécula de PGA se encontra na forma estendida, o que pode resultar em caixas de formato retangular, o que não é desejável.

Com o intuito de manter as caixas de simulação o mais próximo possível da forma cúbica, optou-se por organizar as moléculas de PGA compondo “linhas e colunas” em matrizes de 3 dimensões conforme o número de moléculas a agrupar.

O preenchimento da caixa com moléculas de água também foi pensado de forma a tentar reduzir o tempo necessário para a estabilização do sistema, evitando situações iniciais que favoreçam aglomeração das moléculas de PGA. O processo de colocação dessas moléculas visa criar uma camada de solvatação uniforme ao redor das moléculas de PGA, evitando o contato direto das mesmas na conformação inicial. Logicamente que essa camada de solvatação depende da quantidade de água presente no sistema, o que acima de determinada concentração de PGA é difícil de obter. Foi utilizada uma caixa com 1.000 moléculas de água para avaliar o processo de solvatação do dendrímero PGA. Como estudo inicial foi colocado somente uma molécula de PGA na caixa de água.

Na simulação da dinâmica molecular para avaliar a solvatação da moléculas, foi utilizado o algoritmo steepest implementado no programa GROMACS. Esse algoritmo define um vetor r como um vetor para todas as $3N$ coordenadas e utiliza um valor inicial h_0 para o deslocamento máximo permitido para os átomos (por exemplo $h_0 = 0.01\text{nm}$).

Em todas as simulações os sistemas tiveram temperatura e pressão controladas por meio de acoplamento a banhos térmicos e pressostatos, utilizando os algoritmos Berendsen implementados no GROMACS. A dinâmica molecular foi realizada para as estruturas de PGL de gerações 1, 2 e 3 nas temperaturas de 298, 310 e 315 K apenas para as estruturas de cadeia linear, já que para as estruturas ramificadas de PGA acabou não sendo feita a dinâmica molecular devido a problemas técnicos como dificuldade em rodar o programa com estruturas maiores e também ao tempo de cálculo que é bem superior ao tempo de cálculo das estruturas lineares.

Não foi possível simular a solvatação do HLP nem dos PGLs de gerações 1, 2 e 3 de estruturas ramificadas, por problemas com o programa Mktop que gera os arquivos de topologia.top. Para o PGA ramificado de geração 4, o qual foi utilizado para a incorporação do fármaco haloperidol ao dendrímero não foi obtida uma estrutura simétrica para se fazer os cálculos. Isso levaria bem mais tempo na otimização da geometria da estrutura no programa Hyperchem devido ao tamanho desse dendrímero. O PGA_{g4} também não caberia na caixa de água do GROMACS, com 1000 moléculas apenas.

O passo de integração utilizado foi de 2 fs e o tempo real simulado foi de 5ns na maioria dos casos, com exceção no caso das simulações onde se utilizou temperatura variável, onde os tempos necessários para que o sistema se adapte às variações de temperatura são consideravelmente maiores.

O campo de força escolhido foi o ffgmx, que é derivado do GROMOS-87. Foram utilizadas condições periódicas de contorno na forma padrão do GROMACS (xyz) de forma a evitar a ocorrência de efeitos de borda. Nesse procedimento são geradas réplicas da caixa de simulação, essas réplicas são conectadas à volta da caixa simulada, nos três eixos, em uma estrutura de 3 x 3 x 3 perfazendo um total de 26 cópias na primeira camada, com a caixa principal ao centro. Esse procedimento de replicação se estende até onde for necessário e permite que o sistema se comporte como se tivesse tamanho infinito.

O tratamento eletrostático foi feito com raio de corte (Cut-off) tanto para as interações de Coulomb quanto para as de Van der Waals, com valor para estes raios de corte de 0,9 nm, o que é sempre menos que a metade do comprimento do menor lado da caixa de simulação. Esse cuidado com o valor do raio de corte garante que nenhum átomo ou molécula presente na caixa de simulação seja considerado mais de uma vez nos cálculos das interações eletrostáticas.

Para complementar as análises realizadas neste trabalho foi utilizado o Programa MarvinSketch, desenvolvido pela ChemAxon, um editor molecular avançado disponível para todas as plataformas computacionais, o único requisito obrigatório é a de que o computador tenha o programa Java instalado. O MarvinSketch possui diversas ferramentas como desenho da estrutura em 2D e 3D, cálculo do Pka, Log P, Log D, polarizabilidade, refatividade, área da superfície molecular, aceitadores e doadores de hidrogênio, etc. O programa MarvinSketch foi instalado usando o shell script que está disponível para download no site da ChemAxon [58].

No programa MarvinSketch foi calculado o Log de P das estruturas HLP, PGA e PGA-HLP, de menor energia obtidas através da otimização de geometria no programa Hyperchem.

Capítulo 3

Técnicas experimentais de caracterização e simulação *in-silico*

A relação entre a Química e a propriedade dos biomateriais é direta e inequívoca. A integração entre a perspectiva macroscópica que caracteriza os biomateriais com o enfoque atômico/molecular característico da Química é imprescindível para o conhecimento e controle das conexões existentes entre estrutura, propriedades e funções dos biomateriais. O controle do processo de síntese do dendrímero PGA_{g4} utilizando-se as técnicas físicas e químicas de análise permite sua obtenção com diferentes graus de pureza, cristalinidades, tamanhos de partículas e reatividades superficiais adequadas para sua conjugação e utilização como sistema transportador do HLP. Este capítulo lança mão das técnicas químicas e físicas de análise para compreensão dos diferentes aspectos relacionados à composição e estrutura do PGA_{g4} e seu conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$. Embora o desenvolvimento de novos materiais esteja ainda fortemente associado à tradicional e necessária componente experimental, é introduzido as ferramentas da química quântica computacional na modelagem molecular propondo o estudo da relação quantitativa entre a estrutura e propriedade do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$.

3

RMN

FTIR

UV-VIS

MEV

TGA

Raios-X

Eletrofição

Aplicações da modelagem molecular

3. Técnicas experimentais de caracterização e simulação *in-sílico*

3.1. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é um método espectroscópico com base nas propriedades magnéticas dos núcleos atômicos. É um fenômeno físico que foi inicialmente descrito por Isidor Rabi e lhe valeu o Prêmio Nobel de Física em 1944 [59].

A técnica de RMN pode ser utilizada somente para se estudar núcleos atômicos com um número ímpar de prótons ou nêutrons (ou ambos). Nesse caso, essa situação se dá para os átomos de ^1H , ^{13}C , ^{19}F e ^{31}P . Estes núcleos são magneticamente ativos, ou seja, possuem spin assim como os elétrons, uma vez que os núcleos possuem carga positiva e um movimento de rotação sobre um eixo que faz com que se comportem como pequenos ímãs [60].

O spin é um momento angular, ou seja, o núcleo, que tem carga elétrica, comporta-se como um pequeno loop de corrente, e assim gera um campo magnético. Na ausência de campo magnético, os spins nucleares se orientam ao acaso. Por outro lado, quando uma amostra é colocada na presença de um campo magnético, os núcleos com spin positivo se orientam na mesma direção do campo em um estado de mínima energia, denominado de estado de spin α . Por outro lado, os núcleos com spin negativo se orientam na direção oposta ao do campo magnético em um estado de maior energia, denominado de spin β , **Figura 19**.

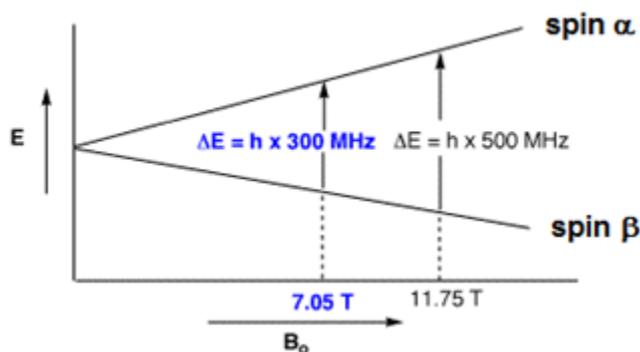


Figura 19 – Ilustração dos estados de energia de spin em função do campo magnético externo B_0 .

A diferença de energia entre os estados de spin depende da força do campo magnético aplicado B_0 . Quanto maior o campo magnético, maior a diferença de energia entre os estados de spin e é dada por:

$$\Delta E = h\nu = h(B_0 - B_c) \cdot \gamma \quad (5)$$

sendo ΔE a diferença de energia entre os estados de spin, h a constante de Planck, B_0 é o campo magnético externo, B_c o campo magnético gerado pelos elétrons da molécula e γ é o raio giromagnético, uma constante que é propriedade de um núcleo em particular.

O alinhamento dos spins dos núcleos pode ser perturbado por um pulso curto de ondas de rádio (RF) que serve para tirar os spins do núcleo de sua orientação paralela ao campo magnético e para fornecer a energia necessária para movimentos do tipo giroscópio dos spins dos núcleos, denominados de precessão [61]. Quando o pulso RF é removido, o núcleo tende a voltar para sua situação original e, assim fazendo, libera energia em forma de ondas de radiofrequência (**Figura 20 – B**).

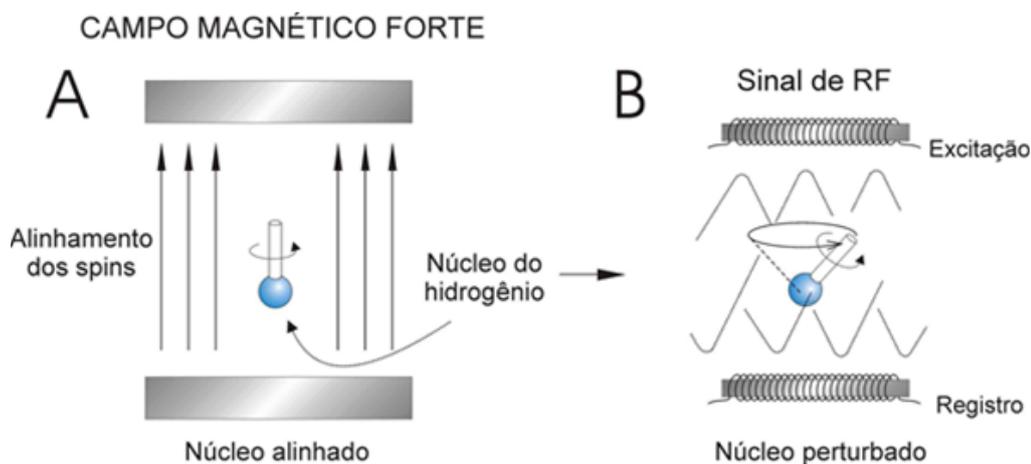


Figura 20 – Esquema da formação do sinal das ondas de rádio na obtenção das imagens por RMN [62].

Quando uma amostra que contém um composto orgânico é irradiada brevemente por um pulso intenso de radiação, dentro do intervalo da radiofrequência, os núcleos no estado de spin alfa são promovidos ao estado de spin beta. Quando os núcleos voltam ao seu estado inicial emitem sinais cuja frequência depende da diferença de energia (ΔE) entre os estados de spin alfa e beta. O espectrômetro de RMN detecta estes sinais e os registra como um gráfico da frequência vs intensidade, que é chamado de espectro de RMN [63]. Na realidade, os núcleos, tais como prótons ou carbonos que formam as moléculas orgânicas, não são isolados, são rodeados de elétrons que os protegem parcialmente do campo magnético externo ao qual estão sujeitos, por isso, é dito que o núcleo está protegido.

A frequência das ondas de rádio são distintas para diferentes espécies de átomos, assim como para um dado átomo em diferentes meios químicos ou físicos. Portanto, os núcleos ressonantes tornam-se transmissores de ondas de rádio com frequências características e revelam sua presença no tecido pelos seus sinais de RF. Núcleos diferentes absorvem energia de ondas de rádio de frequência diferente. A habilidade do núcleo atômico de absorver energia de ondas de rádio é denominada ressonância magnética nuclear.

Nos equipamentos modernos de RMN o campo magnético se mantém constante enquanto um pulso curto de RF excita todos os núcleos simultaneamente. Uma vez que o pulso curto de RF abrange um intervalo grande de frequências, os prótons absorvem individualmente a radiação de frequência necessária para entrar em ressonância (variar de estado de spin). À medida que os núcleos retornam a seus estados iniciais emitem uma radiação de frequência igual à diferença de energia entre os estados de spin. A intensidade dessa frequência diminui com o tempo. Um computador registra a intensidade do sinal em função do tempo e utilizando a técnica de transformada de Fourier (FT-RMN) converte os dados de intensidade do sinal em função da frequência. Nesse caso, a frequência (ν) de transição do spin nuclear é diretamente proporcional ao campo magnético e é dada por:

$$\nu = (B_0 - B_c) \cdot \gamma \quad (6)$$

Na prática é difícil se medir o campo magnético no qual um próton absorve com suficiente precisão para se distinguir prótons individuais uma vez que as absorções variam da ordem de milésimos. A medida é feita utilizando-se um composto de referência e se mede os deslocamentos químicos (δ), dado por:

$$\delta = \frac{\nu_{amostra} - \nu_{referencia}}{\nu_{referencia}} \cdot 10^6 \quad (7)$$

3.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), no inglês (HPLC), é uma técnica de separação que, em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos [64], [65]. As razões para este crescimento estão relacionadas à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade, a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis, com destaque para a indústria farmacêutica, bem como as suas aplicações em determinações ambientais e em muitos outros campos da ciência, como o da medicina. Estima-se que mais de 90% dos laboratórios de análise espalhados pelo mundo utilizam pelo menos um método que aplica a modalidade de CLAE em fase reversa (FR) [66].

Sistemas de CLAE-FR consistem de uma fase estacionária de menor polaridade e uma fase móvel de maior polaridade, enquanto a fase normal tem as polaridades invertidas. Estas fases apresentam várias vantagens, tais como: uso de fases móveis menos tóxicas e de menor custo, como metanol e água; fases estacionárias estáveis de muitos tipos diferentes; rápido equilíbrio da coluna após a mudança da fase móvel; facilidade de empregar eluição por gradiente; maior rapidez em análises e boa reprodutibilidade dos tempos de retenção [67]. A **Figura 21**, apresenta um esquema do equipamento HPLC.

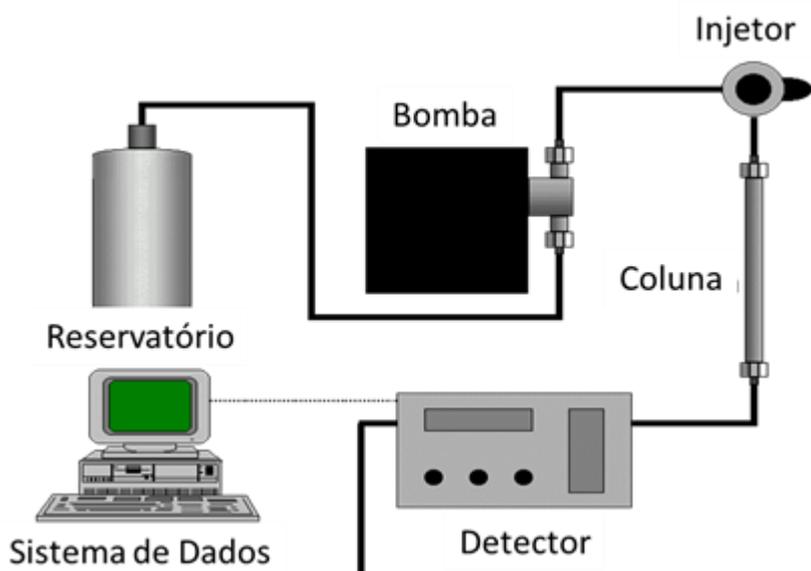


Figura 21 – Esquema de ilustração do equipamento de HPLC [68].

A técnica de CLAE é bastante aplicada à separação de solutos de diferentes polaridades, massas molares e funcionalidades químicas.

3.3. Espectroscopia no infravermelho por transformadas de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de absorção na região do infravermelho obtida por transformada de Fourier (FTIR) é uma poderosa ferramenta analítica utilizada para identificar um composto, e investigar a composição de uma amostra através da detecção de espectros vibracionais e rotacionais de macromoléculas orgânicas uma vez que as bandas do espectro FTIR correspondem às frequências de vibração específicas das ligações químicas das substâncias, cujas frequências correspondem a níveis de energia da molécula [69]. Tais frequências dependem da forma da superfície de energia potencial da molécula, da geometria molecular e das massas dos átomos [70]. Se as moléculas presentes na amostra interagirem com a radiação, esta radiação será absorvida. Para que uma vibração apareça no espectro FTIR, a molécula precisa sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração [71]. Essas vibrações moleculares são aproximadas pelo modelo do oscilador harmônico simples (OHS) e, a frequência fundamental da ligação é dada pela Lei de Hooke de acordo com a Equação (8):

$$v = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}} \quad (8)$$

sendo v a frequência de vibração fundamental, K a constante de força da ligação química e $\mu = (m_1 m_2) / (m_1 + m_2)$ a massa reduzida do sistema (m e são as massas dos átomos envolvidos na ligação química).

O sistema óptico, conhecido como espectrofotômetro FTIR, utilizado para quantificar os espectros vibracionais de uma molécula baseia-se no interferômetro de Michelson, conforme ilustrado na **Figura 22**.

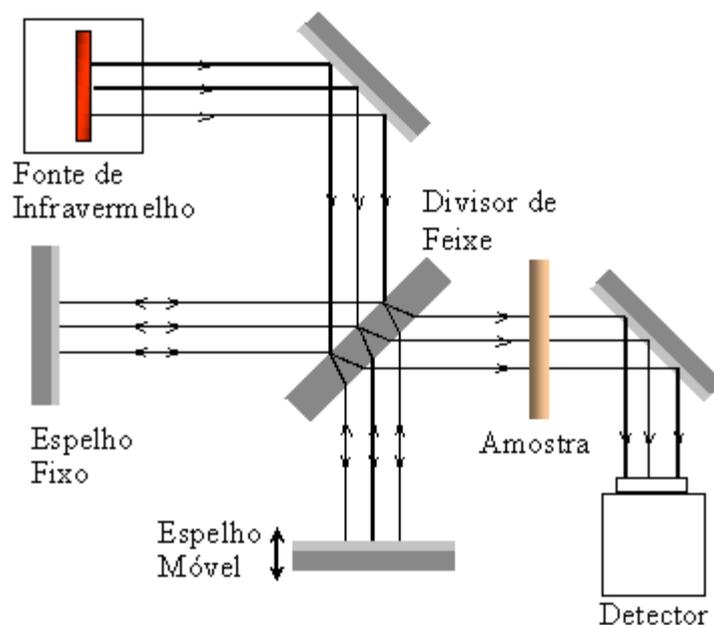


Figura 22 – Esquema representativo do espectrofotômetro FTIR [72].

O interferômetro consiste em uma fonte de radiação na região espectral do infravermelho, um divisor de feixes, de espelhos e de um fotodetector. A luz proveniente da fonte de radiação, depois de colimada por um espelho, incide no divisor de feixes e é separada em dois feixes, que são novamente refletidos, um deles pelo espelho fixo e o outro pelo espelho móvel, em direção ao divisor de feixes. Quando estas duas partes se recombinam, ocorre uma interferência. O resultado desta interferência dependerá da diferença entre os caminhos ópticos percorridos por cada feixe, que é determinada pela distância dos espelhos móvel e fixo ao divisor de feixes. À medida que o caminho óptico varia, devido ao movimento do espelho, a intensidade da interferência também varia. Após a radiação passar pelo sistema óptico, ela é direcionada para a amostra e a luz transmitida pelo material é focalizada sobre um detector, onde é convertida em um sinal analógico. Um diagrama da intensidade da radiação em função da diferença de caminho óptico entre os espelhos móvel e fixo, é chamado de interferograma. O espectro infravermelho é obtido a partir da transformada de Fourier do interferograma.

Neste trabalho foi utilizado o Espectrofotômetro FTIR, PerkinElmer Spectrum 100, (**Figura 23**) do Laboratório do Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologia da UNIFEI.

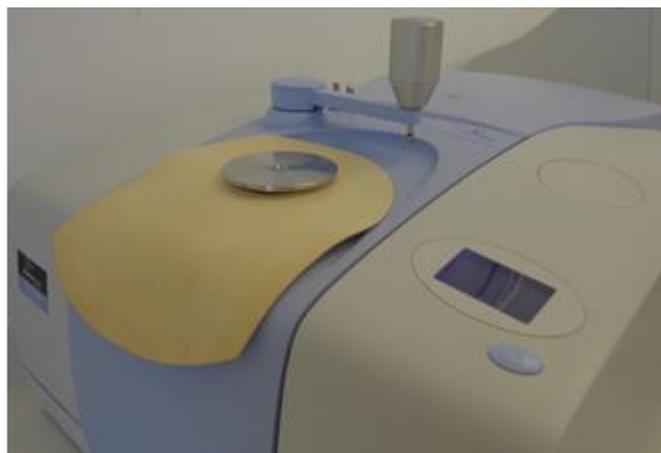


Figura 23 – Foto do espectrofotômetro FTIR PerkinElmer Spectrum 100.

O resultado das vibrações detectadas na espectroscopia é apresentado pelo espectrofotômetro na forma de um gráfico de transmitância versus o comprimento de onda, sendo a origem de cada pico devido à vibração específica de cada molécula. Um exemplo de espectro FTIR se encontra na **Figura 24** a seguir, a qual mostra os espectros vibracionais mais comuns [73].

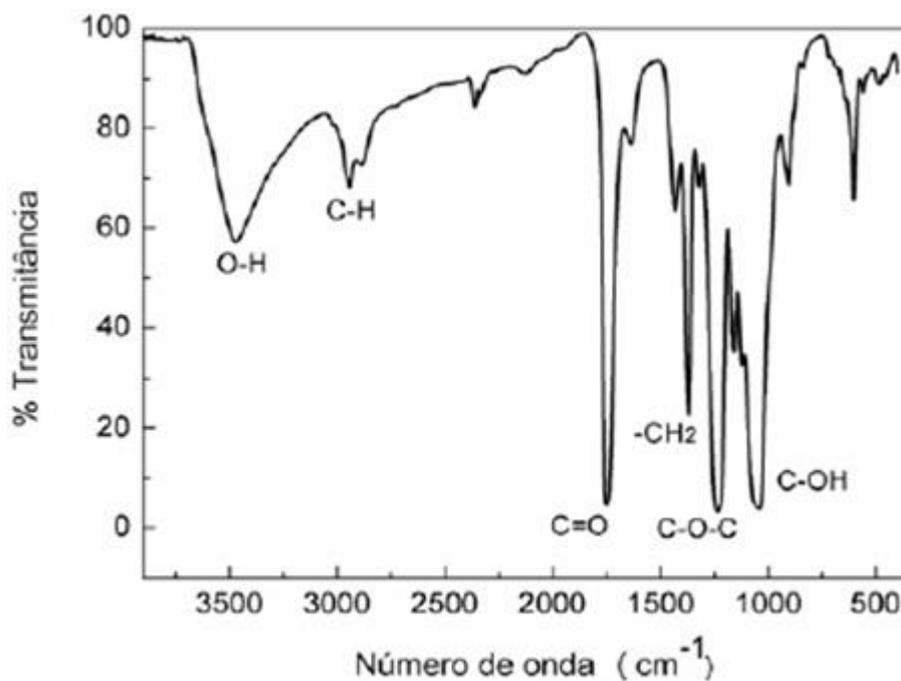


Figura 24 – Exemplo de um espectro FTIR com os modos vibracionais mais comuns da química orgânica.

Considerando o número de graus de liberdade, uma molécula diatômica possui 2 graus de liberdade rotacional (rotação em torno dos 2 eixos perpendiculares ao eixo da molécula); 2 graus de liberdade vibracional (1 associado à energia cinética de vibração, outro associado à energia potencial elástica). Devido a este grau de liberdade, o qual as ligações dos átomos nas moléculas podem vibrar, nomearam-se os tipos de vibrações de seis modos: estiramento simétrico, estiramento assimétrico, tesoura, rotação, “wag” e “twist” [70].

A faixa de 0,7 ou 0,75 μm até 2,5 ou 3 μm é chamada de infravermelho próximo (NIR – *Near Infrared*). A janela de 8 – 14 μm , também costuma ser designada por infravermelho termal, por compreender a região onde se encontra o pico de emissão de qualquer corpo na faixa de temperatura de -50°C à 50°C . É também comum na literatura a notação: SWIR – *Short Wavelength Infrared*, MWIR – *Middle Wavelength Infrared* e LWIR – *Long Wavelength Infrared* para as faixas acima [71].

Quando a molécula sofre uma pequena deformação, por qualquer destes modos, modo de extensão, que corresponde à variação da distância entre os átomos; modo de flexão, que corresponde à variação do ângulo formado por duas ligações sobre o mesmo átomo e modo de torção, que corresponde ao giro relativo de dois grupos de átomos sobre uma ligação; ocorre um desequilíbrio das forças eletrostáticas entre as cargas de elétrons e núcleos que a compõem. A força resultante tende a restabelecer a configuração de equilíbrio original sendo, portanto, uma força restauradora do tipo da Lei de Hooke, que é uma boa aproximação para o comportamento de todos os meios elásticos no limite de pequenas deformações, como no caso da vibração molecular. O completo entendimento da espectroscopia vibracional só é possível no contexto da mecânica quântica e a complexidade do problema de se estudar o espectro vibracional de moléculas poliatômicas pode ser bastante reduzida quando se explora as propriedades de simetria das moléculas, o que é feito com o auxílio da teoria matemática dos *grupos de simetria* [71].

Uma maneira de viabilizar a absorção das informações contidas nos gráficos de FTIR é usando a transformada de Fourier. É através da transformada de Fourier que o programa de FTIR do computador converte o resultado gráfico, informação que vem dada por intensidade *versus* tempo, obtido pelo equipamento de FTIR, para outro gráfico, intensidade *versus* frequência.

Com a transformação destes gráficos pode-se então atribuir aos resultados discussões acerca das informações obtidas. Esta transformação está ilustrada na **Figura 25** a seguir.



Figura 25 – Esquema da transposição gráfica obtida através da transformada de Fourier.

A Transformada de Fourier é uma técnica de muita importância para estudos de sistemas moleculares complexos. Empregando um interferômetro tipo Michelson como espectrômetro, as vantagens derivam tanto de uma abertura larga na entrada do sinal como da presença do espectro inteiro na saída **Figura 26**.

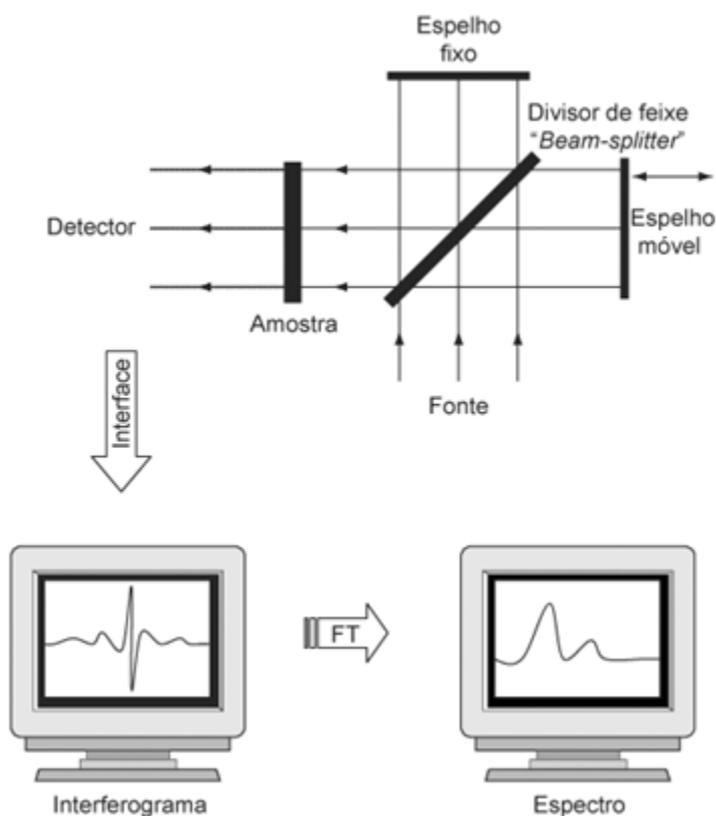


Figura 26 – Ilustração. Acima: interferômetro de Michelson e abaixo: espectro resultante da aplicação da transformada de Fourier [74].

Os espectrofotômetros FTIR são mais baratos do que os convencionais porque é mais simples construir um interferômetro do que um monocromador. Em adição, a medida de um único espectro é bem mais rápida nessa técnica porque as informações de todas as frequências são colhidas simultaneamente. Isso permite que se façam múltiplas leituras de uma mesma amostra e se tire a média delas, aumentando assim a sensibilidade da análise.

3.4. Espectroscopia eletrônica UV-VIS

A espectroscopia de UV-Visível baseia-se na absorção de energia, por átomos e moléculas, na região de comprimento de onda (λ) de 190 a 800 nm, gerando-se portanto, transições eletrônicas do estado fundamental a estados excitados. A absorção da radiação está diretamente ligada ao fato de as moléculas terem elétrons que pode ser promovidos a níveis de energia mais elevados por decorrência da absorção da radiação. Desta forma cada transição eletrônica que ocorre resultará em uma absorção específica e característica [75].

A aparição de uma banda no espectro de UV-Vis está diretamente vinculada à presença de um grupo cromóforo no composto em questão. Um grupo cromóforo, por tanto, é um grupo funcional que possui elétrons capazes de absorver energia UV-Vis e passar a um estado energético excitado. Quando da perda deste excedente de energia, os elétrons retornam ao seu estado fundamental, emitindo um fóton de luz equivalente a banda no respectivo espectro [76]. Devido à restrições envolvendo simetria, as quais controlam a intensidade das transições eletrônicas, somente quatro transições permitidas são observadas, sendo elas: elétrons não ligados para orbitais antiligantes de mesma simetria ($\sigma \rightarrow \sigma^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$) e de elétrons não ligados, ou seja, elétrons de orbitais atômicos, para orbitais moleculares antiligantes ($n \rightarrow \sigma^*$ e $n \rightarrow \pi^*$) [77].

Os espectros são obtidos por meio de um Espectrofotômetro UV-vis como o Varian Cary 50 UV-Vis do Laboratório do Centro de Estudos e Inovação em Materiais Biofuncionais e Biotecnologia da UNIFEI, apresentado na **Figura 27**.



Figura 27 – Foto do espectrofotômetro UV –Vis Varian, modelo Cary 50.

A espectroscopia na região do UV-Vis permite avaliar a concentração de um fármaco numa solução por meio de qualquer uma das bandas de absorção presentes no espectro, considerando que a concentração da espécie está diretamente relacionada com a absorvância através da lei de Lambert Beer [78]:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (9)$$

onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade do feixe incidente, I é a intensidade do feixe transmitido, c é a concentração da solução, l é o caminho óptico percorrido na cela e ε é o coeficiente de absorvância molar. O coeficiente de absorvância molar é definido como sendo a absorvância de uma solução 1 mol/dm³ em uma cela de 1 cm de caminho óptico.

3.5. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) [79] trouxe uma nova dimensão ao estudo da morfologia, por produzir imagens de alta resolução e dependendo da amostra pode-se conseguir uma ampliação de até 300.000X. Em geral se consegue um aumento com boa nitidez em torno de 50.000 a 100.000 X, acima disso exige um preparo mais minucioso da amostra e também depende da composição da mesma. Diferentemente das imagens geradas por microscopia óptica, aquelas formadas por MEV são de caráter virtual. As amostras não são vistas diretamente e suas imagens são formadas em um monitor através da codificação dos sinais gerados pela interação elétron-amostra [80]. Na **Figura 28**, é apresentado o MEV do Laboratório de Biomateriais.



Figura 28 – Foto do equipamento MEV Shimadzu modelo SS-550.

O princípio do funcionamento do MEV consiste na emissão de um feixe de elétrons gerado em filamento de tungstênio por efeito termo iônico. Os elétrons gerados sob alto vácuo são acelerados por uma diferença de potencial que varia entre 0,3 keV a 30 keV. Os elétrons têm seu percurso e diâmetro corrigido por um conjunto de lentes eletromagnéticas que agem como condensadoras. Estas lentes alinham os feixes na direção da abertura da objetiva, que ajusta o foco do feixe antes deste atingir a amostra. Logo acima da objetiva, duas bobinas eletromagnéticas são as responsáveis pela varredura das amostras. Da colisão dos elétrons com a amostra, são gerados uma série de sinais diferentes que são captados por detectores específicos e transformados em sinais elétricos. Dos sinais gerados, os elétrons secundários e os retro espalhados são os utilizados para a formação das imagens [81].

Quando o feixe de elétrons incide sobre a amostra, um dos efeitos observados é a geração de raios X. Esses raios X são formados quando um elétron de uma camada energética mais interna do átomo é arrancado, gerando uma vacância. Esta vacância passa então a ser ocupada por um elétron de uma camada mais externa, que libera energia sob a forma de raios X. Um detector acoplado ao MEV [82], o EDS (Espectroscopia de Raios X por dispersão de Energia), mede o valor dessa energia, que é característica para cada elemento. Desta forma, esta técnica permite a identificação dos elementos químicos constituintes da amostra [83].

Um efeito indesejado da interação dos elétrons com a amostra é chamado de carregamento. Este efeito ocorre em amostras não condutoras, onde os elétrons se acumulam na superfície da amostra prejudicando a formação da imagem [84]. Para evitar esse efeito, as amostras não metálicas são recobertas com uma fina camada de um material condutor permitindo o fluxo dos elétrons.

3.6. Análise térmica

A análise térmica [85] foi definida por Mackenzie em 1979, após vários estudos realizados por um grupo de trabalho nomeado em 1965 pela Confederação Internacional de Análise Térmica e Calorimetria, (ICTAC), como: “Grupo de técnicas nas quais se acompanham as variações em uma propriedade física de uma amostra e/ou de seus produtos de reação, enquanto a mesma é submetida a uma programação de temperatura [86]. Análise termogravimétrica, calorimetria exploratório diferencial e análise termomecânica são exemplos de técnicas de análise térmica [87].

3.6.1. Análise termogravimétrica (ATG)

A análise termogravimétrica (TGA) é uma técnica termoanalítica que acompanha a variação da massa da amostra, em função da programação de temperatura [88]. Por meio desta técnica se acompanha a perda ou ganho de massa da amostra em função do tempo ou temperatura [89]. Já a derivada da curva termogravimétrica (DTG) é um arranjo matemático, no qual a derivada da variação de massa em relação ao tempo (dm/dt) é registrada em função da temperatura ou tempo [90]. Assim a DTG é a derivada primeira da TGA. A **Figura 29** mostra o equipamento de análise térmica do laboratório de biomateriais.

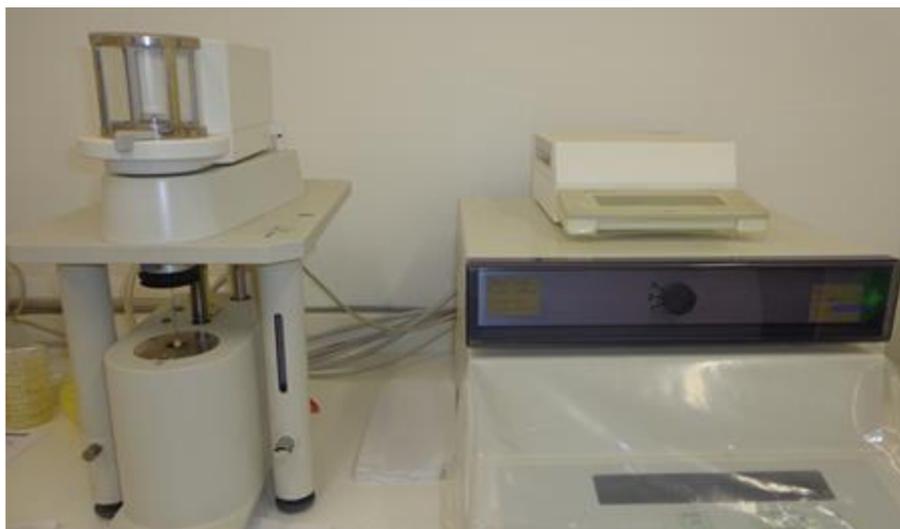


Figura 29 – Foto do equipamento de análise termogravimétrica Metler modelo TC11.

Pode-se dizer que o equipamento de análise termogravimétrica é composto basicamente pela termobalança. O equipamento pode mudar de configuração de um fabricante para outro, mas os fundamentos de todos eles são os mesmos. A termobalança é um instrumento que permite a pesagem contínua de uma amostra em função da temperatura, ou seja, a medida que ela é aquecida ou resfriada. Os principais componentes de uma termobalança são: balança registradora, forno, suporte de amostra e sensor de temperatura, programador de temperatura do forno, sistema registrador e controle da atmosfera do forno. As taxas de aquecimento mais utilizadas são 5, 10, 15 e 20 °C/min. Nos fornos mais comuns a temperatura atinge até 1000 °C. A sensibilidade é da ordem de 0,1 µg, geralmente com capacidade de até 1 g. Em geral coloca-se no cadinho uma massa de cerca 2 mg a 5 mg, dependendo do tipo de amostra, conforme mostra a literatura [91].

3.6.2. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) [92] é definida como uma técnica termoanalítica na qual as variações de entalpia da amostra são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte enquanto ambas são submetidas a uma programação controlada de temperatura. Trata-se de um método calorimétrico no qual são medidas diferenças de energia [93].

Assim como na TGA a velocidade de aquecimento mais utilizada na DSC [94] é de 10 °C/min, e no cadinho a massa utilizada é de cerca de 2 mg a 5 mg **Figura 30**.



Figura 30 – Foto do equipamento de DSC Shimadzu modelo DSC 60.

Duas modalidades são empregadas para se obter os dados de calorimetria exploratória diferencial: calorimetria exploratória diferencial por compensação de potência e calorimetria exploratória diferencial por fluxo de calor [95]. A primeira é um arranjo no qual a referência e a amostra são mantidas na mesma temperatura, através de aquecedores elétricos individuais. A potência dissipada pelos aquecedores é relacionada com a energia envolvida no processo endotérmico ou exotérmico. Já na DSC por fluxo de calor, o arranjo mais simples é aquele no qual a amostra e a referência, contidas em seus respectivos suportes de amostra, são colocados sobre um disco de metal. A troca de calor entre o forno e a amostra ocorre preferencialmente pelo disco. Embora os dois sistemas forneçam informações diferentes, por meio de calibrações adequadas realizadas, ambos fornecem resultados semelhantes [96].

3.7. Difratometria de raios-X

A difratometria de raios X [97] corresponde a uma das principais técnicas de caracterização microestrutural de materiais cristalinos, encontrando aplicações em diversos campos do conhecimento, mais particularmente na engenharia e ciências de materiais, engenharias metalúrgica, química e de minas, além de geociências, dentre outros. A principal aplicação da difração de raios X refere-se à identificação de compostos cristalinos, sejam eles inorgânicos ou orgânicos.

Os raios X ao atingirem um material podem ser espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente). O fóton de raios X após a colisão com o elétron muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida; cada elétron atua, portanto, como centro de emissão de raios X [98].

Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arranjados de maneira sistemática, como em uma estrutura cristalina do NaCl, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeito os de difração dos raios X podem ser observados em vários ângulos [99].

Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios X (**Figura 31**) (interferência construtiva ou numa mesma fase) vão depender da diferença de caminho percorrida pelos raios X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg, ou seja [97]:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \text{sen}\theta \quad (10)$$

onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, “n” a um número inteiro (ordem de difração), “d” à distância interplanar para o conjunto de planos hkl (índice de Miller) da estrutura cristalina e θ ao ângulo de incidência dos raios X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos) [99].

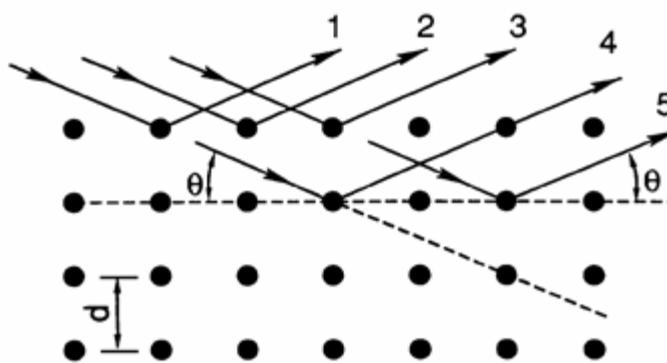


Figura 31 – Esquema da difração de Raios X.

A intensidade difratada, dentre outros fatores, é dependente do número de elétrons no átomo; adicionalmente, os átomos são distribuídos no espaço, de tal forma que os vários planos de uma estrutura cristalina possuem diferentes densidades de átomos ou elétrons, fazendo com que as intensidades difratadas sejam, por consequência, distintas para os diversos planos cristalinos [100].

3.8. Eletrofiação

A técnica de eletrofiação é um processo atualmente muito utilizado para a produção de fibras com diâmetro manométrico ao forçar um polímero viscoso sob a ação de um campo elétrico através do orifício metálico como a ponta de uma agulha. O campo elétrico transforma a gotícula pendente na agulha da seringa submetida à um campo elétrico em uma estrutura denominada cone de Taylor [101]. A estabilidade do cone de Taylor e consequentemente a formação do jato da solução polimérica é mantida pela viscosidade da solução. Se a viscosidade da solução for apropriada, a quebra do cone de Taylor é evitada e um jato estável da solução é formado. À medida que o jato continua a alongar-se, a sua área superficial aumenta e por esse motivo, a perda de solvente também aumenta. A um dado momento todo o solvente é perdido e o jato deixa de ser um fluido e transforma-se em um material com módulo de elasticidade o que leva à uma alteração no seu modo de elasticidade aproximando-se de um modo elástico o que reduz a velocidade de alongamento do jato [101].

3.9. Aplicação da modelagem molecular

A modelagem molecular possui diversas aplicações. A seguir são apresentadas algumas dessas aplicações, as quais ajudam a entender e a complementar alguns dos resultados experimentais.

3.9.1. Métodos *ab initio*

Entre os vários métodos computacionais que simulam ou modelam materiais, destacam-se aqueles que não utilizam nenhuma informação empírica, isto é, aquele que vem das medidas experimentais, sobre o sistema estudado: a partir das posições dos átomos e interações entre eles, esses métodos são capazes de resolver o problema quântico de átomos interagentes e providenciar a descrição do sistema eletrônico e nuclear do material. Por causa disso, eles são chamados métodos de primeiros princípios, ou métodos *ab-initio* [102]. O primeiro método deste tipo era o método de Hartree-Fock (HF), ainda usados hoje em dia para simulação de moléculas, clusters de átomos e outros sistemas quânticos de menor porte [103]. Nos anos 70 do século passado foram criados os métodos baseados na Teoria de Funcional da Densidade (DFT), com objetivo de calcular as propriedades microscópicas dos sólidos: LAPW (Linearized Augmented Plane Wave), LMTO (Linear Muffin Tin Orbital), métodos baseados nos pseudopotenciais. Utilizados praticamente através dos códigos de computadores, suas aplicações foram limitadas, no início, para o estudo dos sistemas simplificados e idealizados. Devido ao rápido desenvolvimento dos computadores nas últimas décadas, esses métodos atingiram tal ponto de eficiência de poder ser utilizados para simular sistemas reais, encontrados na natureza ou produzidos nos laboratórios. Hoje, eles são capazes de tratar cristais com defeitos, superfícies, interfaces, moléculas biológicas, e investigar fenômenos como semicondutividade, magnetismo, supercondutividade, interações hiperfinas, transições ópticas e correlações eletrônicas.

3.9.2. Métodos semi-empíricos

Devido às dificuldades encontradas no uso de métodos *ab-initio* para o tratamento de sistemas moleculares contendo uma grande quantidade de átomos, ou ainda em calcular propriedades que demandam grande esforço computacional, foram desenvolvidos em paralelo com o formalismo da mecânica quântica, os métodos que introduziam os parâmetros empíricos, os chamados métodos semi-empíricos.

O principal objetivo destes métodos é desenvolver um tratamento quantitativo de propriedades moleculares com boa exatidão, confiabilidade e baixo custo computacional. A grande maioria dos métodos semi-empíricos é baseada nas equações do método de Hartree-Fock-Roothaan, sendo que algumas partes das suas equações são: completamente omitidas, aproximadas e ainda substituídas por parâmetros derivados do experimento ou ajustados segundo técnicas de otimização de funções [50].

Usualmente, os elétrons mais internos não são incluídos nas equações desses métodos e somente um conjunto de base mínima é utilizado. Além disso, todas as integrais de dois-elétrons de três e quatro centros e algumas de dois centros são omitidas. Assim, para corrigir os erros introduzidos por omissão de partes do cálculo, o método é parametrizado.

Os parâmetros são obtidos por ajuste de resultados de dados experimentais ou cálculos *ab-initio* ou ainda retirados diretamente de dados experimentais. Muitas vezes, esses parâmetros substituem algumas das integrais não calculadas explicitamente.

Os métodos semi-empíricos são parametrizados para reproduzir diversas propriedades moleculares. Geralmente, geometria, energia e calor de formação. Muitos pesquisadores estendem isto colocando também momento dipolar, calor de reação e potencial de ionização no conjunto da parametrização.

Muitos métodos semi-empíricos calculam a energia como calor de formação. Não se devem adicionar correções de ponto-zero a estas energias porque as correções termodinâmicas estão implícitas na parametrização (pelo fato de se utilizar no conjunto de parametrização dados tomados a 25 °C e 1 bar) [50].

Os métodos semi-empíricos são usados essencialmente para o cálculo de um número muito grande de moléculas pequenas, como por exemplo, no projeto de fármacos ou para o projeto de moléculas para diversas outras finalidades. Também são usados para inúmeros e repetitivos cálculos de um mesmo tipo de sistema (Dinâmica Molecular ou Monte Carlo) e para

o cálculo de uma molécula gigante. Estas situações tornam-se praticamente impossíveis de serem tratadas por métodos *ab-initio* [103]. Cálculos semi-empíricos têm sido muito bem sucedidos no estudo de compostos orgânicos, onde as moléculas são de tamanho moderado. Alguns métodos semi-empíricos foram elaborados especificamente para a descrição da química inorgânica também.

A vantagem dos cálculos semi-empíricos é que eles são muito mais rápidos do que os cálculos *ab-initio*. A desvantagem é que os resultados podem não ser tão exatos e um menor número de propriedades pode ser preditas com confiabilidade. Outra desvantagem é que o procedimento de parametrização é difícil e por isso a grande maioria dos métodos não possui parâmetros para todos os átomos da tabela periódica.

Os métodos semi-empíricos mais comumente utilizados são: MNDO (*Modified Neglect of Diatomic Overlap*), AM1 (*Austin Model 1*), PM3 (*Parametric Method 3*), Método RM1 e Modelo Sparkle [104]. Neste Relatório serão descritos somente o método PM3 e o modelo Sparkle que foram utilizados neste trabalho.

3.9.2.1. PM3 (Parametric Method 3)

Este método utiliza as mesmas equações que o AM1, sendo que a diferença está no conjunto de parametrização. Neste método todos os parâmetros foram ajustados de forma a reproduzir dados experimentais, enquanto no AM1 alguns parâmetros são derivados diretamente de dados experimentais e outros foram baseados apenas na intuição química [50].

Este método também é extremamente popular para sistemas orgânicos. É mais exato que o AM1 para ângulos de ligações de hidrogênio, porém menos exato do que o AM1 para energias de ligação de hidrogênio. Os métodos PM3 e AM1 são mais populares que outros métodos semi-empíricos devido à disponibilidade de algoritmos para inclusão de efeitos de solvatação nestes cálculos e também à sua inclusão em diversos programas de cálculos de química computacional. Moléculas hipervalentes são também preditas mais exatamente, pois os seus dados experimentais foram incluídos no conjunto de parametrização. Em média, o PM3 prediz energias e comprimentos de ligação mais exatos que AM1 ou MNDO. Podemos destacar algumas limitações como: tendência a predizer estados eletrônicos incorretos para compostos de germânio; alguns mínimos espúrios são preditos; alguns anéis policíclicos não são planos [50].

3.9.3. Os métodos da dinâmica molecular (Gromacs)

Métodos computacionais para a solução de muitos problemas qualitativos e quantitativos estão sendo empregados no campo da química desde a década de 70, os quais tem tomado grande impulso com o surgimento dos campos de força mecânico moleculares. Estes representam uma interface entre os conhecimentos científicos desenvolvidos pela matemática, física e química, constituindo uma nova área de investigação da ciência moderna. O estudo dos sistemas Moleculares, em termos de interações atomísticas, tem por objetivo a previsão e descrição da estrutura e estabilidade dos sistemas em referência, seus diferentes estados energéticos e seus processos reativos internos. O primeiro ponto envolve a previsão do estado do sistema em seu nível de mais baixa energia; o segundo, a previsão da energia livre relativa de diferentes estados e o terceiro, a previsão do processo dinâmico de diferentes estados [105].

A simulação através da dinâmica molecular consiste em uma técnica para calcular as propriedades físico-químicas de um sistema clássico de muitos corpos. O fundamento para a simulação de dinâmica molecular é o conhecimento da equação do movimento para o sistema considerado. O algoritmo de um programa de dinâmica molecular consiste da solução numérica destas equações de movimento fornecendo uma trajetória (coordenadas e momentos conjugados em função do tempo) do sistema em estudo. Escolhendo-se o passo de integração, a resolução temporal e a extensão da trajetória podem ser adaptadas aos eixos de relaxação temporal para os processos dinâmicos. A partir da trajetória, propriedades de equilíbrio e grandezas dinâmicas podem ser calculadas em um código para dinâmica molecular. Um programa muito eficiente nos cálculos de dinâmica molecular é o software Gromacs [106] e com a vantagem deste ser gratuito e também por ser utilizado por vários grupos de pesquisa.

A simulação de um sistema molecular emprega um conjunto de funções empíricas, que constituem um campo de forças, e contém parâmetros ajustáveis que são otimizados para se obter a melhor concordância possível com dados obtidos por técnicas experimentais. Entretanto, do ponto de vista estritamente teórico, pode-se dizer que o conjunto de funções interativas a que se refere na construção de um campo de forças é derivado para reproduzir a superfície de potencial de um sistema molecular particular [107].

Capítulo 4

Resultados Experimentais e Discussão

Neste capítulo serão apresentados e discutidos os resultados obtidos. Primeiramente fez-se necessário apresentar o processo de síntese e caracterização físico-química do conjugado PGA_{g4} -HLP. Em seguida são apresentados os resultados obtidos quanto ao processo de eletrofiação para a obtenção das nanofibras de PGA_{g4} -c-HLP e o estudo de suas propriedades biológicas. Por fim, são apresentados os resultados quanto ao processo de liberação do HLP das membranas obtidas.

4

Síntese e caracterização do PGA_{g4} e seu conjugado PGA_{g4} -c-HLP

Eletrofiação do conjugado PGA_{g4} -c-HLP

Caracterização Biológica

Perfil de Liberação do HLP em meio enzimático

4. Resultados Experimentais e Discussão

4.1. Síntese e caracterização do núcleo oligomérico PGL₁₀

Neste trabalho, inicialmente foi sintetizado um núcleo oligomérico de decaglicerol (PGL₁₀) hidrofóbico a partir da eterificação do glicerol com a finalidade específica de se obter um dendrímero de poliglicerol (PGA_{g4}) com propriedades anfifílicas, núcleo hidrofóbico e superfície hidrofílica. Ao mesmo tempo, o núcleo hidrofóbico fornece a viscosidade necessária para o processo de eletrofição.

A eterificação catalítica direta do glicerol pode ser promovida tanto por ácidos como por bases [108]. Neste caso, a eterificação envolve a desidratação do glicerol com a formação de uma ligação éter e água.

No processo catalítico envolvendo catalisadores ácidos, as hidroxilas do glicerol atuam como aceptores de prótons havendo a eliminação de uma molécula de água. O carbocátion ataca o grupo hidroxila de outra molécula de glicerol, que atua como nucleófilo, resultando na formação da ligação éter (**Figura 32**). A reação pode seguir, portanto, um mecanismo do tipo SN1 (via um carbocátion) ou SN2 (ataque nucleofílico) [109]. O grande inconveniente dessa rota de síntese está na formação de grande quantidade de acroleína, subproduto de elevada toxicidade e de difícil remoção do produto principal.

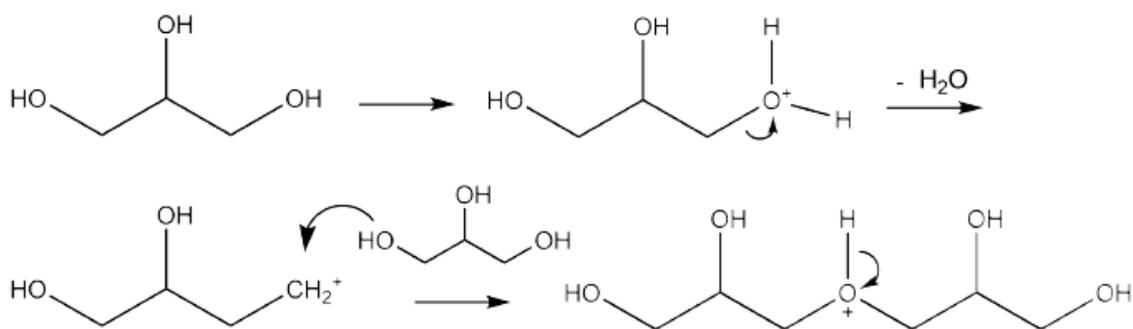


Figura 32 – Mecanismo da eterificação do glicerol catalisado por ácido. Adaptado [109].

O grande problema dessas reações é a formação de subprodutos indesejáveis a exemplo de digliceróis ramificados, digliceróis cíclicos e acroleína (**Figura 33**). Entretanto, o mecanismo exato da reação de oligomerização do glicerol catalisada por bases ainda não é conhecido, supondo-se apenas que a reação é favorecida pelas elevadas temperaturas reacionais [110].

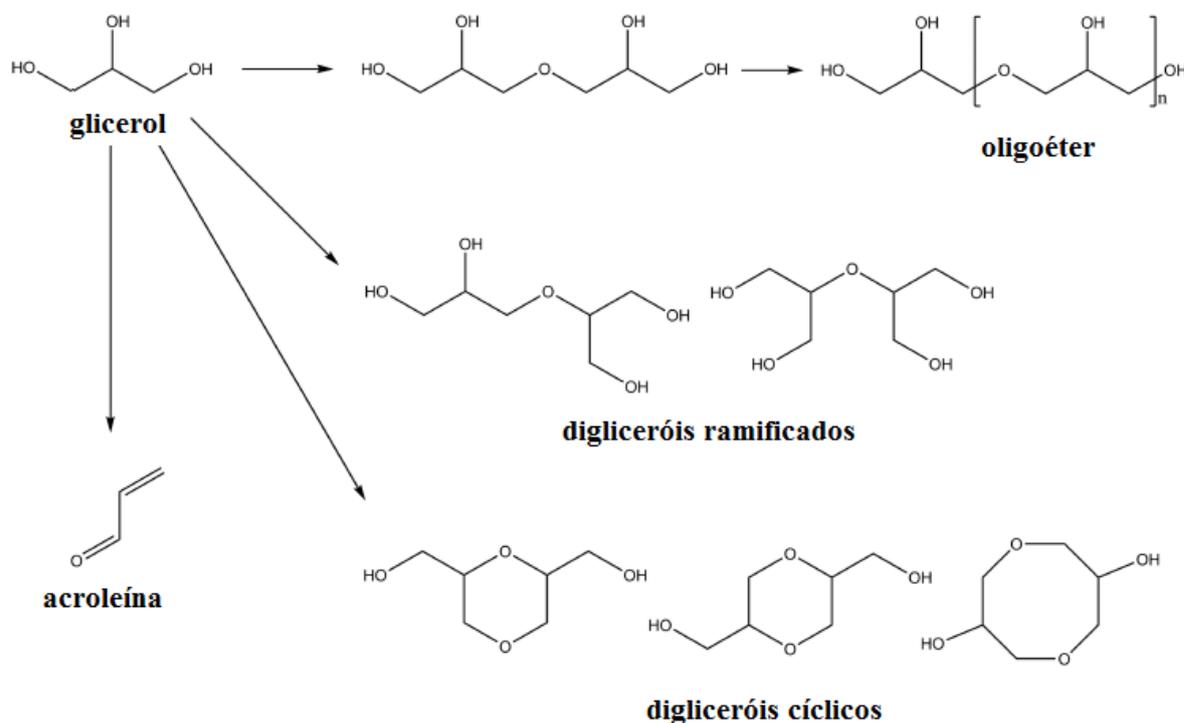


Figura 33 – Ilustração do processo de formação do oligoéter e dos produtos indesejáveis durante a reação de esterificação direta do glicerol.

Por outro lado, na catálise básica, o processo de formação de oligoéteres a partir do glicerol parece envolver a desprotonação de um grupo hidroxila seguido do ataque do ânion alcoxi formando outra molécula de glicerol (**Figura 34**).

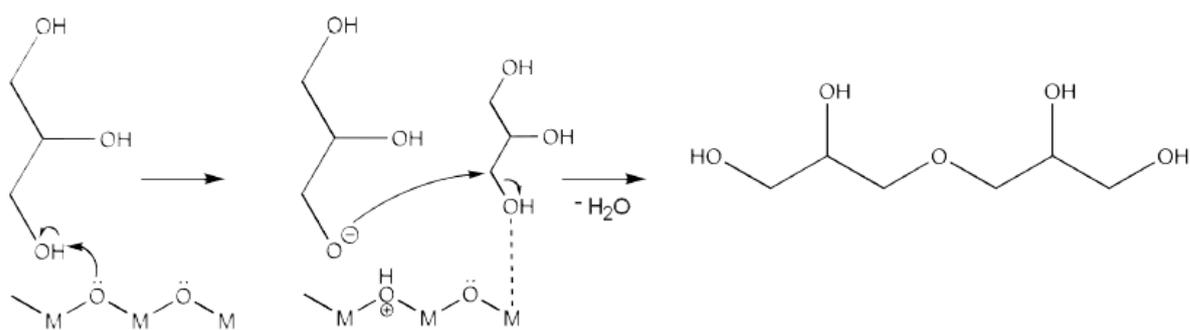


Figura 34 – Ilustração do possível mecanismo de oligomerização do glicerol catalisado por base. Adaptado [109].

Neste trabalho optou-se por utilizar a oligomerização do glicerol utilizando-se a catálise heterogênea utilizando-se uma mistura de K_2CO_3 e $LiOH$ suportado em óxido de alumínio. Na incorporação de $LiOH$ na proporção de 0,5% a 2,0% (m/m) no K_2CO_3 , a mistura apresenta elevada atividade catalítica na oligoeterificação do glicerol, atividade essa ainda não relatada pela literatura.

A opção em se utilizar a catálise heterogênea se baseia no fato de que o processo industrial de produção de oligoéteres é significativamente simplificado uma vez que se elimina a água de lavagem e conseqüentemente a água residual, visto que não há a necessidade da neutralização do ácido ou base utilizada. Por outro lado, uma desvantagem da utilização do sistema catalítico desenvolvido nesse trabalho seria os tempos reacionais mais longos dada a baixa solubilidade do $K_2CO_3/LiOH$ no sistema reacional. Entretanto, considerando a crise hídrica pela qual passa o mundo de forma generalizada, a desvantagem apontada converte-se em vantagem. A **Figura 35** mostra a microestrutura do catalisador $K_2CO_3:LiOH$ empregado na oligomerização do glicerol para a produção do decaglicerol (PGL_{10}), núcleo oligomérico do PGA.

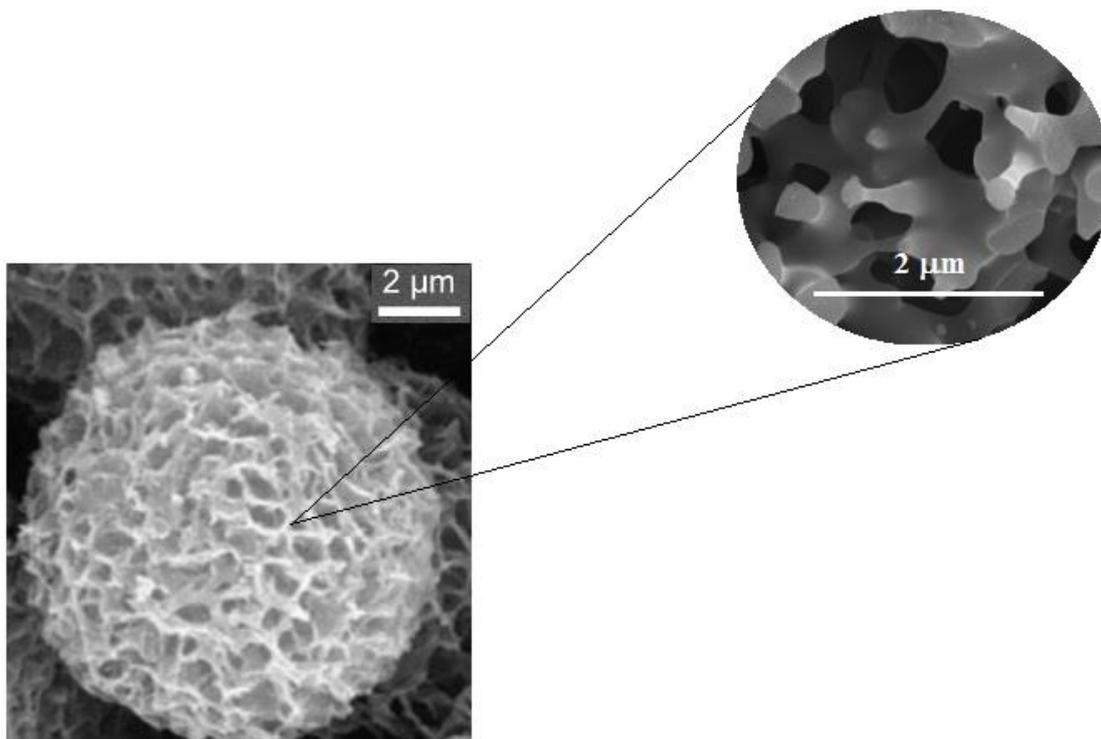


Figura 35 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV) da microestrutura do catalisador $K_2CO_3:LiOH$ utilizado nesse trabalho para a reação de oligomerização do glicerol.

A **Figura 36** ilustra a influência da temperatura e do tempo na conversão de glicerol em decaglicerol. A reação de oligomerização foi monitorada com base na medição da massa de água reacional removida no Dean-Stark. Conforme pode ser observado (**Figura 36**), para temperaturas inferiores a $200\text{ }^\circ\text{C}$, são atingidas baixas conversões de glicerol a PGL_{10} , aproximadamente 10% e 15%, respectivamente. Este comportamento também foi observado quando o tempo reacional foi inferior ou superior a 12 horas ou seja, o rendimento ótimo de conversão parece obedecer ao intervalo temporal $4h \leq 12h \leq 20h$. Desta maneira, as condições reacionais ótimas para que seja atingida uma conversão em torno de 80% parece se situar no intervalo (fechado) ótimo de temperatura e tempo de reação igual a $200\text{ }^\circ\text{C}$ e 12h. O decréscimo no rendimento reacional na obtenção do PGL_{10} a temperaturas superiores a $200\text{ }^\circ\text{C}$ parece estar associado à redução da seletividade do catalisador com o aumento da temperatura. Esse resultado parece ser consistente com o mecanismo reacional proposto pela literatura para os catalisadores básicos empregados na oligomerização do glicerol.

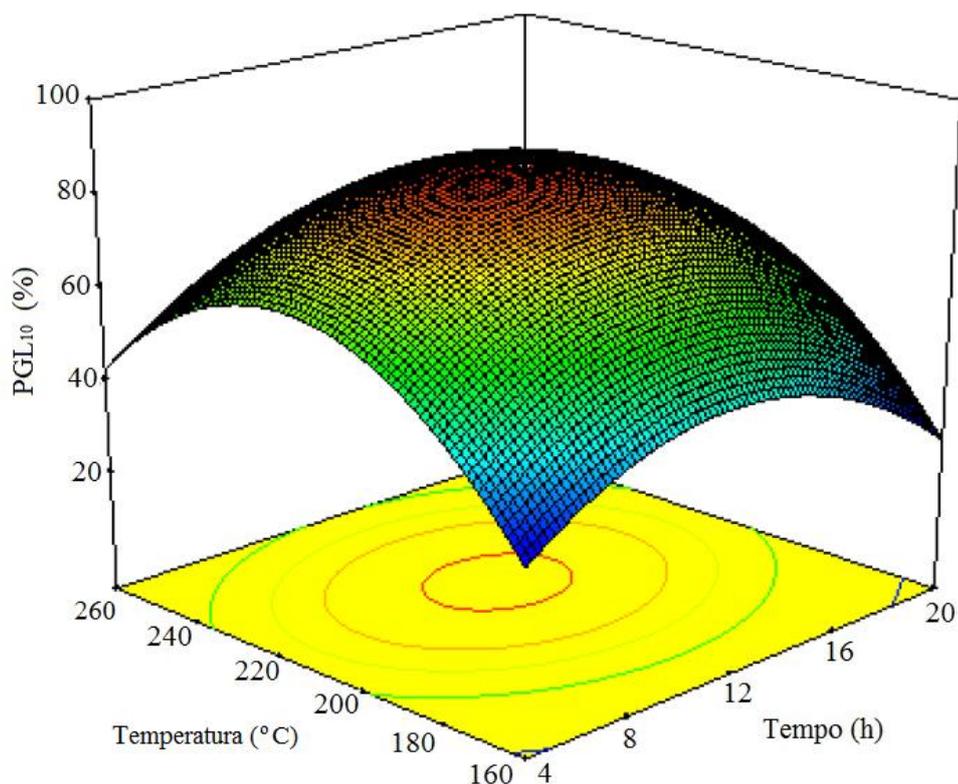


Figura 36 – Superfície 3-D sobre o efeito das variáveis temperatura e tempo no rendimento de formação do PGL₁₀. O catalisador utilizado foi K₂CO₃:LiOH.

4.2. Síntese e caracterização físico-química do PGA_{g4} e seu conjugado PGA_{g4}-c-HLP

O PGA_{g4} foi sintetizado pelo método divergente seguindo-se uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação a partir do núcleo de PGL₁₀, seguindo a metodologia adaptada da literatura [111], [112], [113].

A estrutura de um dendrímero pode ser caracterizada pelo número de gerações (g), a funcionalidade do núcleo (f_c) e dos grupos terminais e o número de meros (N_α). O crescimento da macromolécula dendrítica obedece à uma lei exponencial Equação (11) [112]:

$$N_{\alpha} = \frac{f_c(f - 1)^{g+1}}{f - 2} + 1 \quad (11)$$

Nesse caso, um dendrímero de geração 0 representa um caso limite de uma estrutura molecular do tipo estrelada. O número de grupos terminais na periferia do dendrímero (N_{end}) é dada por [112]:

$$N_{end} = f_c(f - 1)^g \quad (12)$$

Nota-se, na equação anterior, que a velocidade de crescimento do dendrímero PGA_{g4} é muito mais rápido que o volume hidrodinâmico da macromolécula PGA_{g3} ; nos quais a ramificação cresce a partir do núcleo de PGL_{10} para a periferia, conforme ilustrado na **Figura 37**. Conforme pode ser observado, o número de reações por molécula cresce exponencialmente o que dificulta a obtenção de macromoléculas exatamente monodispersas sem a presença de defeitos estatísticos, ou seja, a obtenção de um dendrímero. Por isso a estrutura do poliéter obtido nesse trabalho foi denominada de poliglicerol arborescente, PGA, admitindo assim a existência de defeitos estatísticos na estrutura macromolecular do dendrímero.

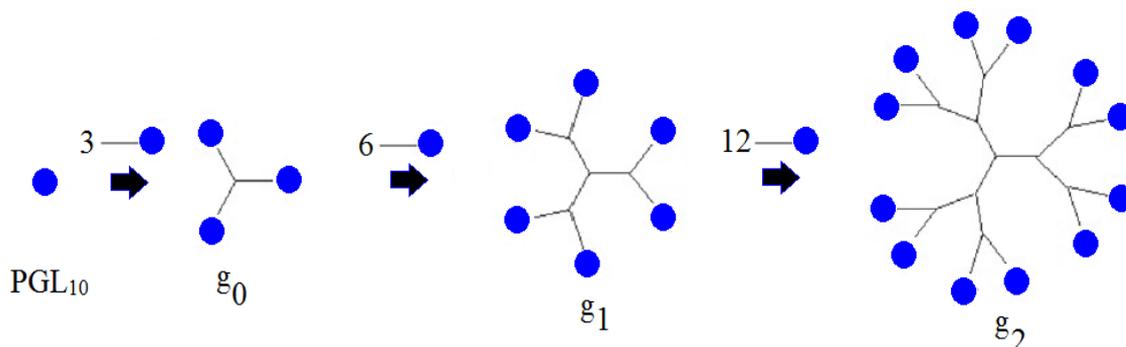


Figura 37 – Ilustração do processo de síntese divergente do PGA_{g4} . Os círculos azuis representam os grupos protetores que devem ser removidos antes da próxima etapa de síntese.

O PGA_{g4} foi sintetizado pelo método divergente seguindo-se uma sequência catalítica repetitiva de alilação e di-hidroxilação a partir do núcleo oligomérico de PGL_{10} , conforme apontado no capítulo referente às atividades experimentais. O rendimento do processo de síntese foi em média de 75%. A massa molar do PGA_{g4} foi avaliada utilizando-se a cromatografia de permeação em gel (GPC) (**Figura 38**). A massa molar obtida foi de 3.458 Da em concordância com o valor calculado (3.637 Da). O índice de polidispersão próximo de 1 indica a formação da estrutura arborescente.

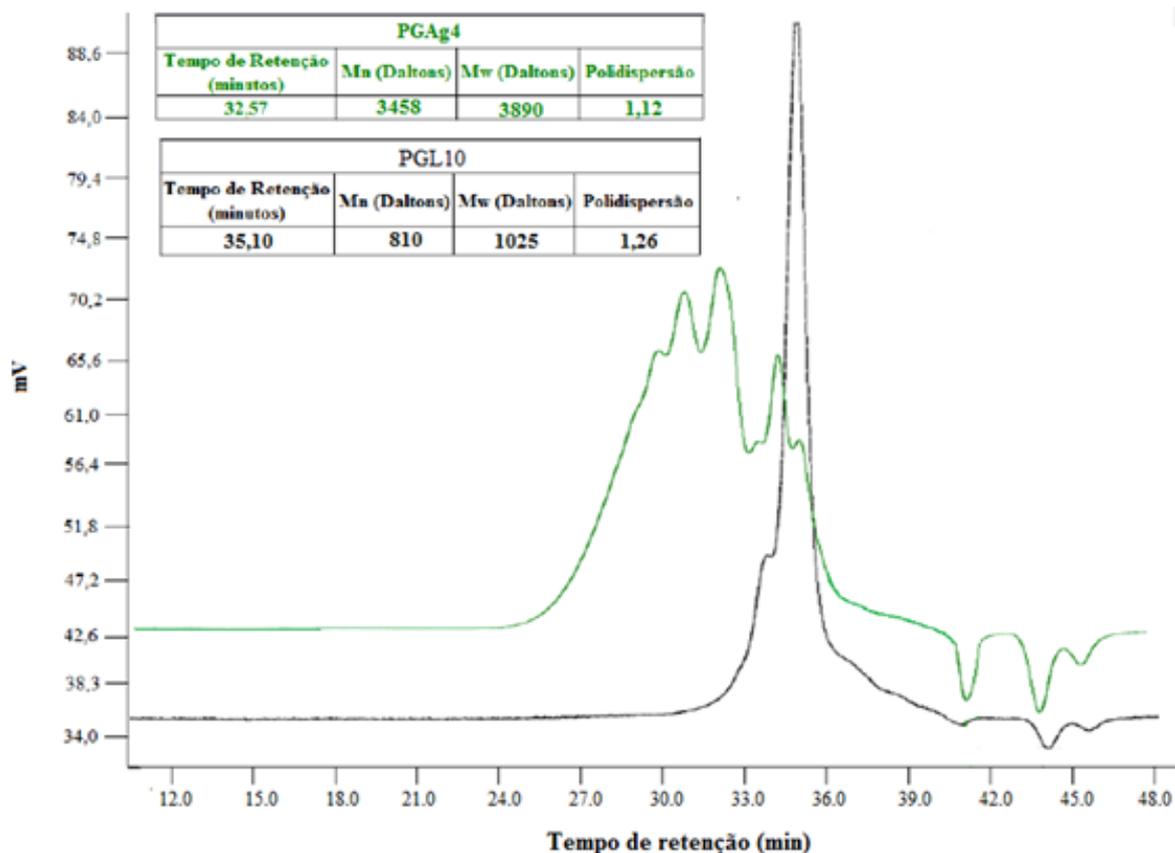


Figura 38 – Cromatografia de permeação em gel (GPC) do PGA_{g4} e do núcleo de PGL_{10} , utilizando-se como padrões poli(etilenoglicol) (PEG). O solvente utilizado foi dimetilformamida (DMF).

O espectro ^{13}C -RMN (**Figura 39**) apresentou os deslocamentos (δppm) em 80.3 ($(\text{CH}_2)_2\text{-CH}_2\text{C}(\text{H})\text{OR}$), 74.5 ($(\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), 73.4 ($\text{C}-(\text{CH}_2)_3$), 72.9 ($\text{ROCH}_2\text{C}(\text{H})(\text{OR})\text{CH}_2\text{OR}$), 72.6 ($(\text{CHOCH}_2\text{-CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$), 71.7 ($(\text{CHOCH}_2\text{CH}(\text{OR})\text{CH}_2\text{OR}$), 64.9 (CH_2OH).

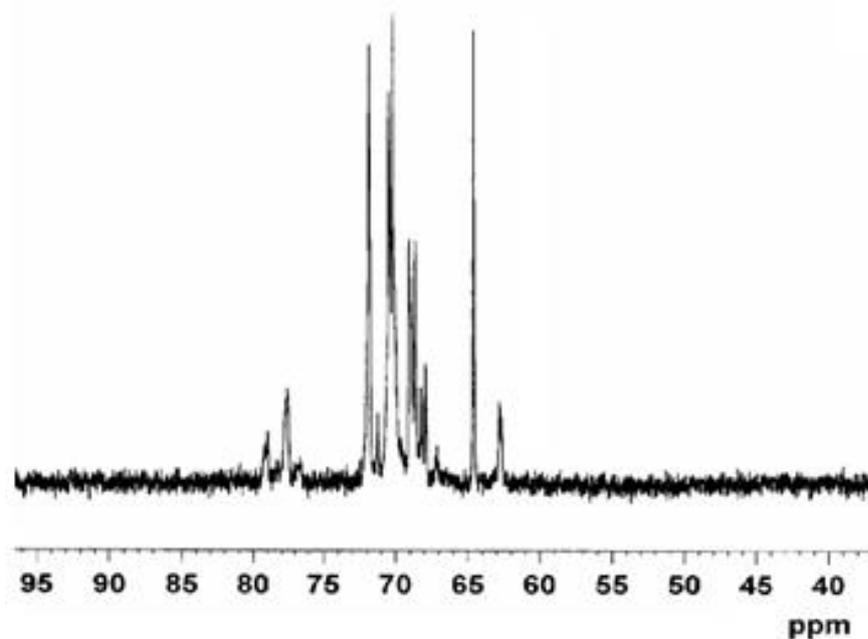


Figura 39 - Espectro ^{13}C -RMN do PGA_{g4} (Bruker ARX 300, 75 MHz, D_2O , 25 °C).

O percentual de ramificação pode ser calculado a partir da integração dos sinais de ^{13}C -RMN conforme a Equação (13) [113]:

$$DB \% = \frac{2D}{2D + (L_{1,2} + L_{1,3})} \times 100 \quad (13)$$

sendo DB% o grau de ramificação; D, o sinal referente às unidades dendríticas e L, o sinal referente às unidades lineares.

Considerando os sinais integrados, o DB calculado para o PGA_{g4} é igual a 0,87, característico da estrutura altamente ramificada de um dendrímero. Entretanto, um dendrímero ideal deveria possuir um DB igual a 1,0 o que indica que a estrutura do PGA_{g4} obtido nesse trabalho possui alguns defeitos característicos do processo de síntese utilizado [111].

A **Figura 40** mostra a influência da massa molar do dendrímero nas variáveis viscosidade intrínseca $[\eta]$ e temperatura de transição vítrea (T_g), experimentalmente mensuráveis. A viscosidade do PGA_{g4} foi medida em água a 25°C utilizando um viscosímetro capilar de Cannon-Manning (50 C286). A viscosidade específica foi calculada através da Equação (14):

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (14)$$

sendo η_{sp} a viscosidade da solução, η_0 a viscosidade da água, η_{rel} a viscosidade relativa, t a medida do tempo de escoamento da solução e t_0 a medida do tempo de escoamento da água.

A partir das medidas de η_{sp} , a viscosidade intrínseca $[\eta]$ pode ser calculada a partir de:

$$[\eta] = \left. \frac{\eta_{sp}}{c} \right|_{c \rightarrow 0} = \left. \frac{\ln(\eta_{rel})}{c} \right|_{c \rightarrow 0} \quad (15)$$

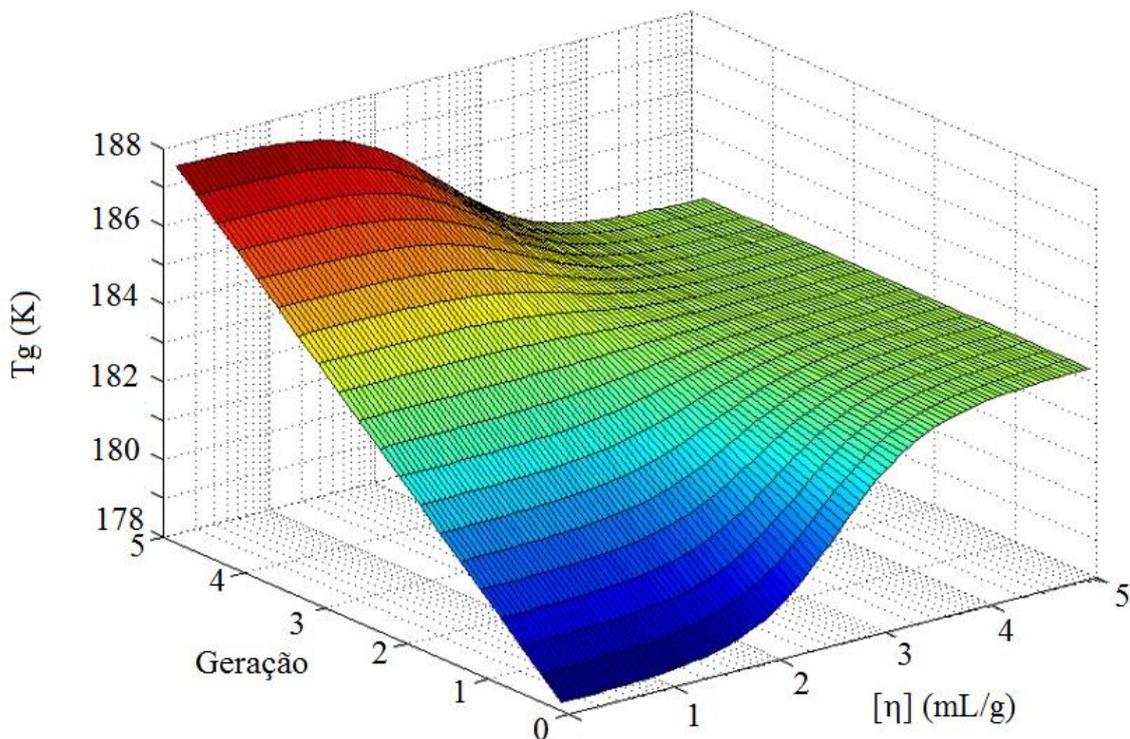


Figura 40 – Superfície 3-D sobre a influência da massa molar nas variáveis Tg, e $[\eta]$ do PGA.

Observa-se, na **Figura 40**, que a viscosidade intrínseca do PGA_{g4} não aumenta proporcional à massa molar do dendrímero (ou número de geração-G). De acordo com a equação de Mark-Houwink-Sakurada ($[\eta] = K.M^a$), a massa molecular do PGA_{g4} deveria aumentar proporcional ao número de gerações. Entretanto, a **Figura 40** mostra que a massa molar do dendrímero (ou seu equivalente, o número de geração) aumenta proporcionalmente até aproximadamente a terceira geração, mantendo-se constante a partir da terceira geração do PGA. É fato bem conhecido que $[\eta]$ é diretamente proporcional ao volume hidrodinâmico da molécula (V_H) e inversamente proporcional à massa molar viscosimétrica média, ou seja;

$$[\eta] \propto \frac{V_H}{M_V} \quad (16)$$

Para o poli(etilenoglicol) de massa molar 400 g/mol (PEG-400) a $[\eta]$ medida foi igual a 4,36 mL/g. Verifica-se que o PGA_{g4} parece se comportar como uma molécula de baixa massa molar em meio aquoso, um efeito anômalo dos dendrímeros, bem conhecido na literatura científica [114].

A **Tabela 1** ilustra, de forma comparativa, algumas propriedades características dos polímeros lineares, dendrímeros e polímeros hiper ramificados (PHR). A diferença entre esses materiais se origina na estrutura molecular, distribuição de sua massa molar e grau de ramificação de suas cadeias poliméricas. Observa-se (**Tabela 1**) que os dendrímeros possuem características semelhantes aos PHR's. Entretanto, os dendrímeros possuem viscosidade intrínseca significativamente mais baixa que os PHR's.

Tabela 1 – Algumas propriedades básicas de polímeros lineares, polímeros ramificados e dendrímeros. Adaptado de [111].

Propriedades	Polímeros lineares	Polímeros hiperamificados	Dendrímeros
Forma	Espiral aleatória	Globular	Esférica
Viscosidade Intrínseca	Alta	Moderada/Alta	Baixa
Cristalinidade	Variável	Amorfos	Amorfos
Grau de ramificação	0	0,4-0,6	1,0

A influência do número de gerações (G) do dendrímero PGA na temperatura de transição vítrea também está ilustrado na **Figura 40**. A T_g representa a temperatura na qual ocorre uma pseudotransição termodinâmica nos materiais vítreos e corresponde ao valor médio da faixa de temperatura que, durante o aquecimento de um polímero permite que as cadeias moleculares da fase amorfa adquiram mobilidade (conformação). Assim, abaixo da T_g o polímero não tem energia interna suficiente para permitir o deslocamento de uma cadeia com relação à outra (estado vítreo).

Verifica-se que a T_g dos dendrímeros é menor que a de seus polímeros lineares equivalentes e que existe uma relação complexa entre a natureza dos grupos terminais e o grau de ramificação como uma consequência de possíveis interações entre os grupos terminais e as variações no volume livre do dendrímero [115]. A **Figura 40** ilustra que o aumento do número de gerações eleva consideravelmente a T_g do PGA parecendo haver uma relação linear entre essas variáveis.

4.3. Síntese e caracterização do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$

A **Figura 41** ilustra o rendimento do processo de incorporação do HLP na estrutura dendrítica do PGA. Comparando as variáveis, percebe-se que o aumento do número de gerações do PGA favorece os rendimentos elevados no processo de conjugação do HLP com o dendrímero, provavelmente devido ao aumento do número de hidroxilas primárias mais reativas na periferia da macromolécula arborescente. O efeito do tempo utilizado no processo de conjugação do HLP ao dendrímero indica que o melhor rendimento de conjugação do HLP com o PGA ocorre no intervalo de tempo de 8 a 10 hs de reação.

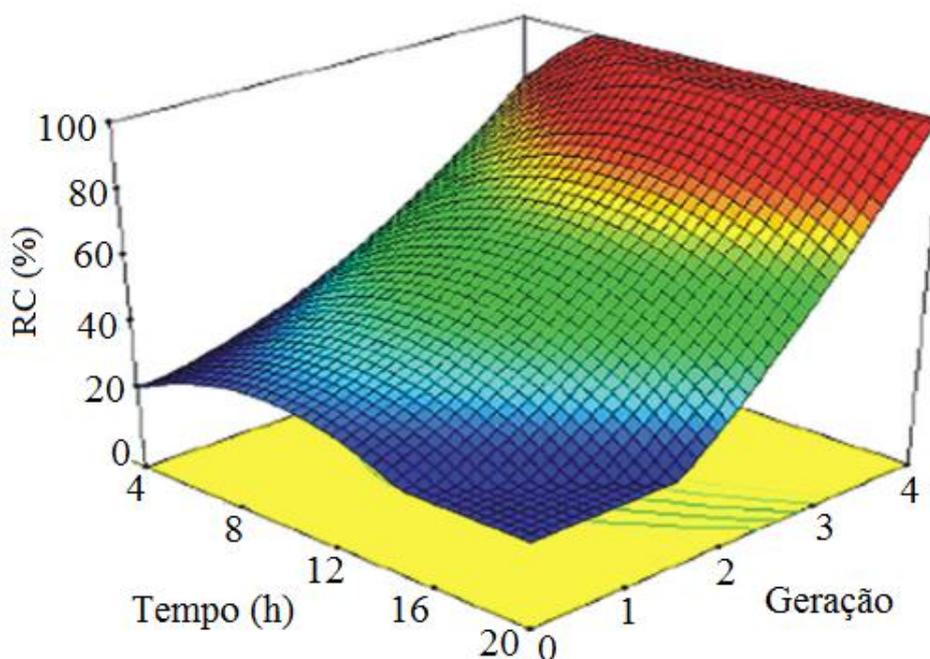


Figura 41 – Ilustração do rendimento da conjugação (RC) do HLP com PGA em função das variáveis tempo e número de geração do dendrímero.

O espectro FTIR do PGA_{g4} após reação com anidrido succínico é mostrado na **Figura 42**. As bandas de absorção correspondentes à incorporação do anidrido succínico na estrutura dendrítica aparece a 1741 cm^{-1} , característica do grupo carboxílico terminal do ácido succínico. Esta banda de absorção não aparece no FTIR do PGA_{g4} .

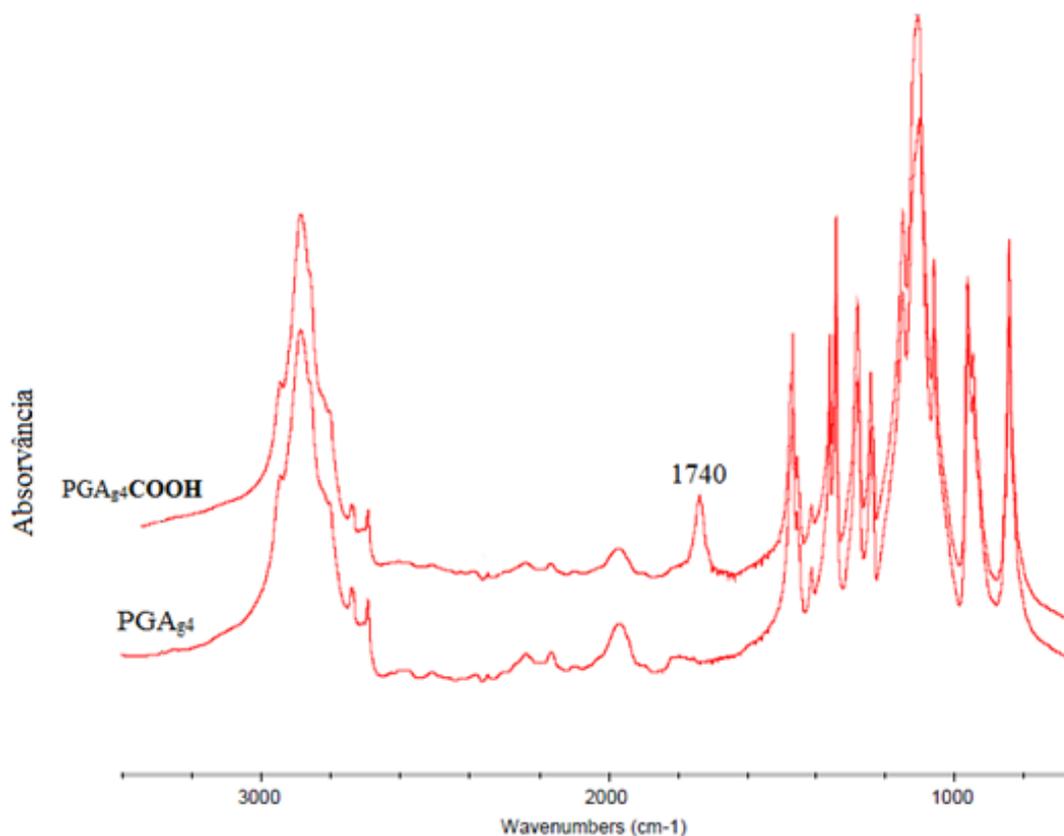


Figura 42 – Espectro FTIR-ATR do PGA_{g4} e do $\text{PGA}_{g4}\text{COOH}$.

Na **Figura 43** são apresentados os espectros FTIR para o HLP, PGA_{g4} e do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ e na Tabela 2 são apresentadas as respectivas atribuições das bandas de absorção observadas.

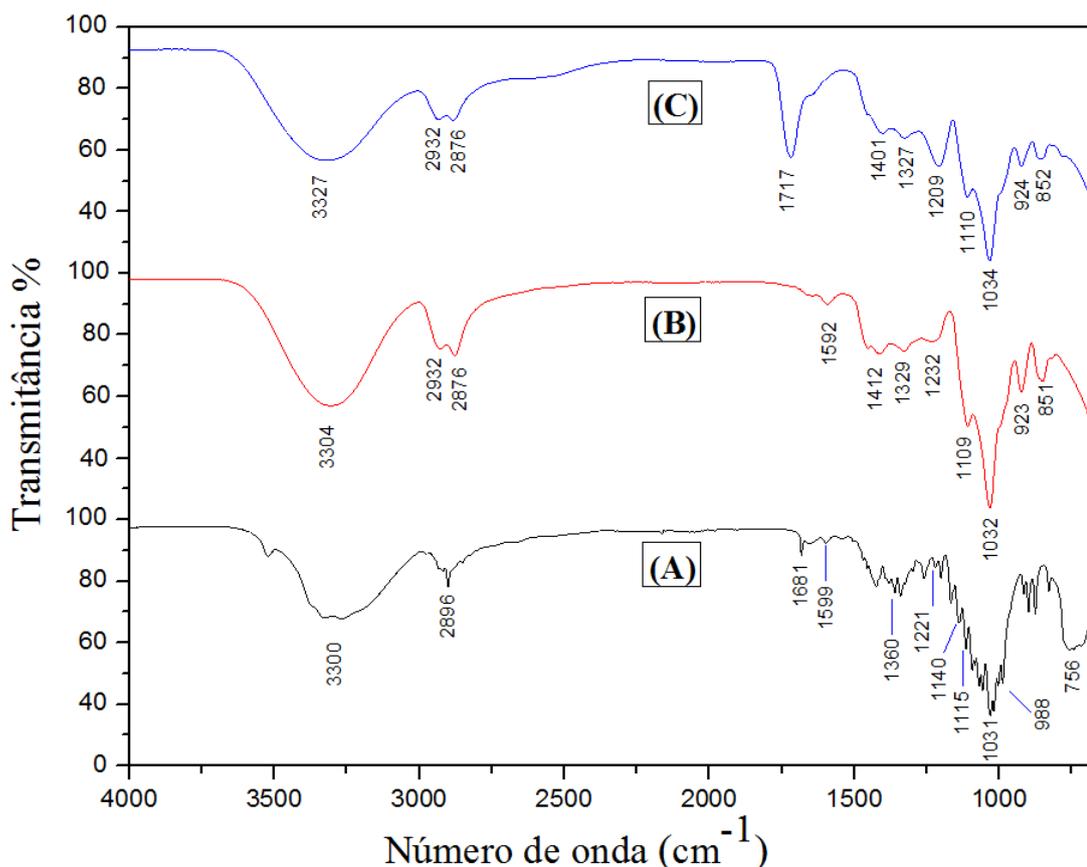


Figura 43 – Espectro FTIR do HLP (A) do PGA_{g4} (B) e do $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C).

As atribuições das bandas referentes ao HLP, PGA_{g4} e seu conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ foram feitas seguindo os estudos da literatura [116]. A banda de absorção do HLP aparece em 1681 referente ao estiramento $\nu(\text{C}=\text{O})$ da carbonila. Em 1140 cm^{-1} aparece a vibração do CH do anel aromático substituído de flúor, F e em 988 cm^{-1} a vibração do CH do anel aromático substituído de Cloro, Cl [117]. O espectro do FTIR puro, como já citado anteriormente está disponível no site [118], e também no trabalho do Rahman e col. [116] e Yazir e col. [117]. As bandas que aparecem em 1221 e 1031 cm^{-1} correspondem às vibrações $\nu(\text{C-F})$ e $\nu(\text{C-Cl})$, respectivamente.

Abeer e col. fizeram um estudo ainda mais detalhado do espectro FTIR do HLP [119]. Os autores identificaram para o HLP, as bandas que equivalem àquelas da **Figura 43**. As bandas de absorção no IR são: carbonila $\nu(\text{C}=\text{O})$ em 1681 e $\nu(\text{C}=\text{C})$ 1599 cm^{-1} , $\delta(\text{CH})$ em 1502 cm^{-1} , $\nu(\text{C-C})$ em 1378 cm^{-1} , $\nu(\text{C-N})$ em 1358 cm^{-1} , $\nu(\text{C-O})$ em 1322 cm^{-1} , $\omega(\text{C-H})$ em 1257 e 1140 cm^{-1} , e em especial na banda em 1113 cm^{-1} pode se observar os modos vibracionais de $\nu(\text{C-F})$ e $\nu(\text{C-Cl})$ combinados.

Tabela 2 – Dados do espectro FTIR do HLP, PGA_{g4} e do conjugado PGA_{g4}-c-HLP.

HLP cm ⁻¹	PGA _{g4} cm ⁻¹	PGA _{g4} -c-HLP cm ⁻¹	Atribuição
3300	3304	3327	ν (OH), ν (=CH)
2896	2932 / 2876	2932 / 2876	ν (CH ₂ alifático), ν _{as} (CH ₂) e ν (CH)
--	--	1717	Grupo carboxílico, ν (-C=O) estiramento
1681		--	ν (C=O) carbonila
1599	1592	--	ν (C=O da carbonila), Dubleto ν _{as} (NH, C=O), ν(C=C)
1400	1412	1401	ω =C-H, δ (COH), ω (=C-OH) Grupo carboxílico
1378	--	--	ω C-H(CH ₃), ν (C-C)
1358	1329	1327	ω (O-H), ν (C-N), ν(C-O), ω(CH ₂)
1221	1232	1209	ω C-H(CH ₂), ν(C-F), ω(CH ₂)
1140	--	--	α, δ, ρ, γ (CH do anel aromático substituído de - F)
1115	1109	1110	ν (CO, CC, COH), ν(C-O), ν(C-F), ν(C-Cl), ν(C-O-C)
1031	1032	1034	ν (C-O, C-C, C-O-C), ν (C-O)
988	--	--	α, δ, ρ, γ (CH do anel aromático substituído de - Cl)
	923	924	ν(C-OH)
	851	852	ω =CH ₂
756	--	--	ν(C-Cl)

As bandas de absorção no IR identificadas para o PGA_{g4} envolvem a banda em 3304 cm⁻¹ corresponde a vibração de ν (OH), os picos em 2932 e 2876 cm⁻¹ correspondem a ν (CH), em 1646 e 1592 cm⁻¹, em 1454 cm⁻¹ a ω(CH₂), em 1406 cm⁻¹ a flexão do plano ω(C-OH), em 1322 e 1219 cm⁻¹ ω(CH₂), em 1108 a ν(C-O-C e C-O), em 1032 a ν(C-O), e em 921 a ν(C-OH). Estas bandas encontradas estão em concordância com os trabalhos de Boudou [120] e de Salehpour [121].

No espectro do conjugado de PGA_{g4}-c-HLP as bandas em 1717 cm⁻¹ e 1209 cm⁻¹ ficaram evidenciadas e comprovam a incorporação do HLP à estrutura dendrítica. A banda em 1717 cm⁻¹ só aparece no PGA_{g4}-c-HLP e, embora com significativo deslocamento está muito próxima da banda de absorção a 1681 cm⁻¹ referente a vibração ν(C=O) presente no espectro

FTIR do HLP, sendo uma característica fundamental do mesmo [119]. A presença desta banda em 1717 cm^{-1} indica que houve uma forte interação dos grupos terminais das hidroxilas do PGA_{g4} com o fármaco HLP. O mesmo comportamento é observado na banda de absorção a 1221 cm^{-1} correspondente a vibração $\nu(\text{C-F})$ do HLP que foi deslocada para 1209 cm^{-1} . Os deslocamentos das bandas de absorção podem estar associadas a ligações de hidrogênio intramoleculares estabelecidas entre a estrutura macromolecular do PGA_{g4} e do HLP incorporado na estrutura dendrítica.

O espectro ^{13}C -RMN para o PGA_{g4} , $\text{PGA}_{g4}\text{-OCOCH}_2\text{CH}_3\text{COOH}$ e $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ é mostrado na **Figura 44**. O carbono hidroxílico característico aparece com sinal de deslocamento a 57 ppm. Após a esterificação do HLP com PGL_{g4} observa-se o deslocamento do carbono hidroxílico do HLP para 57 ppm.

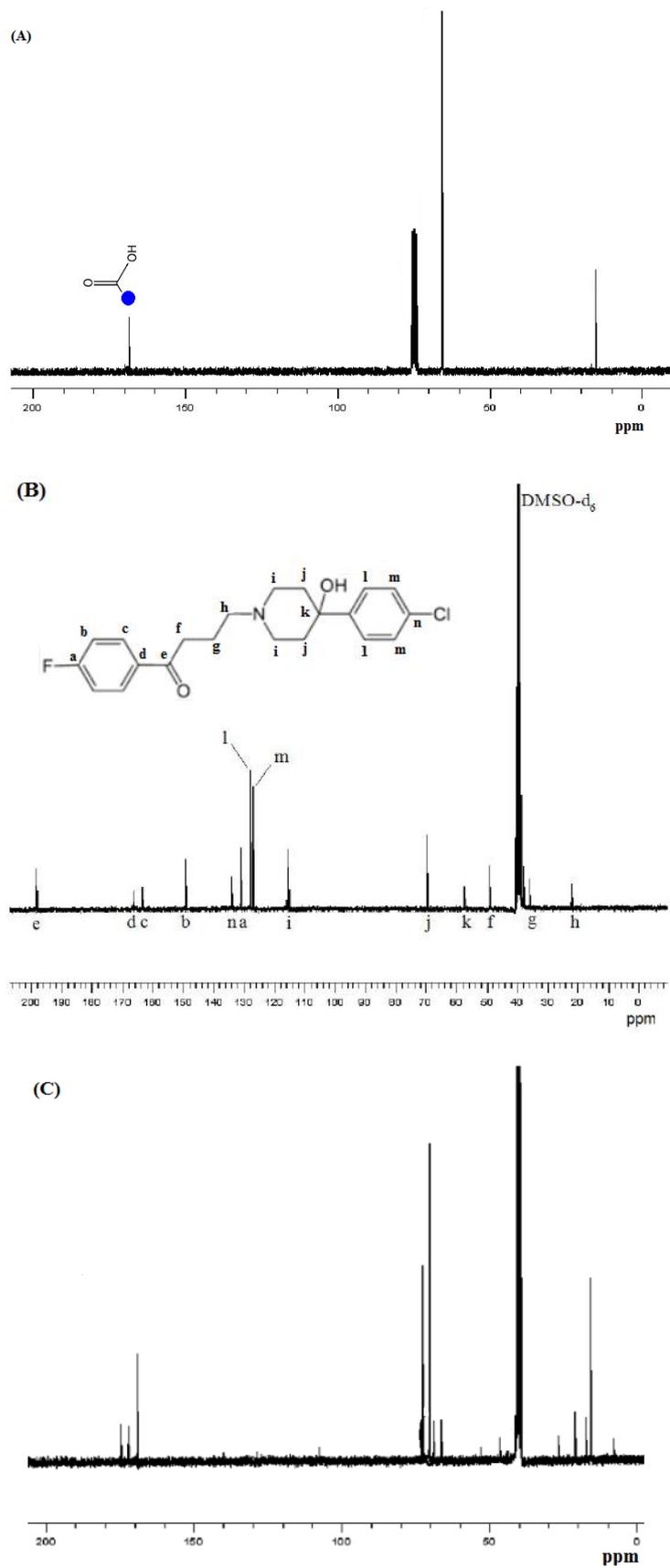


Figura 44 – Espectro ^{13}C -RMN à temperatura ambiente (25 °C) do PGA_{g4} (A), HLP (B) e $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ (C). Solvente: DMSO-d_6 .

A imobilização do HLP no PGA_{g4} , bem como a presença de fases cristalinas ou amorfas presente no material desempenha uma função importante no processo de liberação controlada do fármaco [122]. Dessa maneira, fármacos cristalinos a exemplo do HLP possuem baixa solubilidade no meio aquoso em comparação com sua fase amorfa e, por conseguinte baixa biodisponibilidade em meio fisiológico [123]

A difração de Raios-X (DRX) é uma técnica apropriada para o estudo da cristalinidade do conjugado PGA_{g4} -c-HLP uma vez que o padrão difratométrico de um composto cristalino constitui sua impressão digital. A **Figura 45** mostra o espectro DRX do HLP e do PGA_{g4} . No caso do HLP, **Figura 45(A)**, são observados picos de alta intensidade nos ângulos de difração em 2θ : 6° , 15° , 20° , 25° , 30° , $32,5^\circ$, $37,5^\circ$, 40° e 45° , característicos dos planos cristalinos do fármaco HLP [124].

A **Figura 45(B)** mostra o DRX do PGA_{g4} . Observa-se um padrão de difração essencialmente amorfo, característico dos dendrímeros. A ausência de picos de alta intensidade no intervalo no DRX do PGA_{g4} -c-HLP, **Figura 45(C)** caracteriza o conjugado como amorfo sugerindo que o fármaco está molecularmente disperso na arquitetura molecular do dendrímero, assim estrutura cristalina do HLP incorporado no PGA_{g4} deixa de ser evidenciada no DRX.

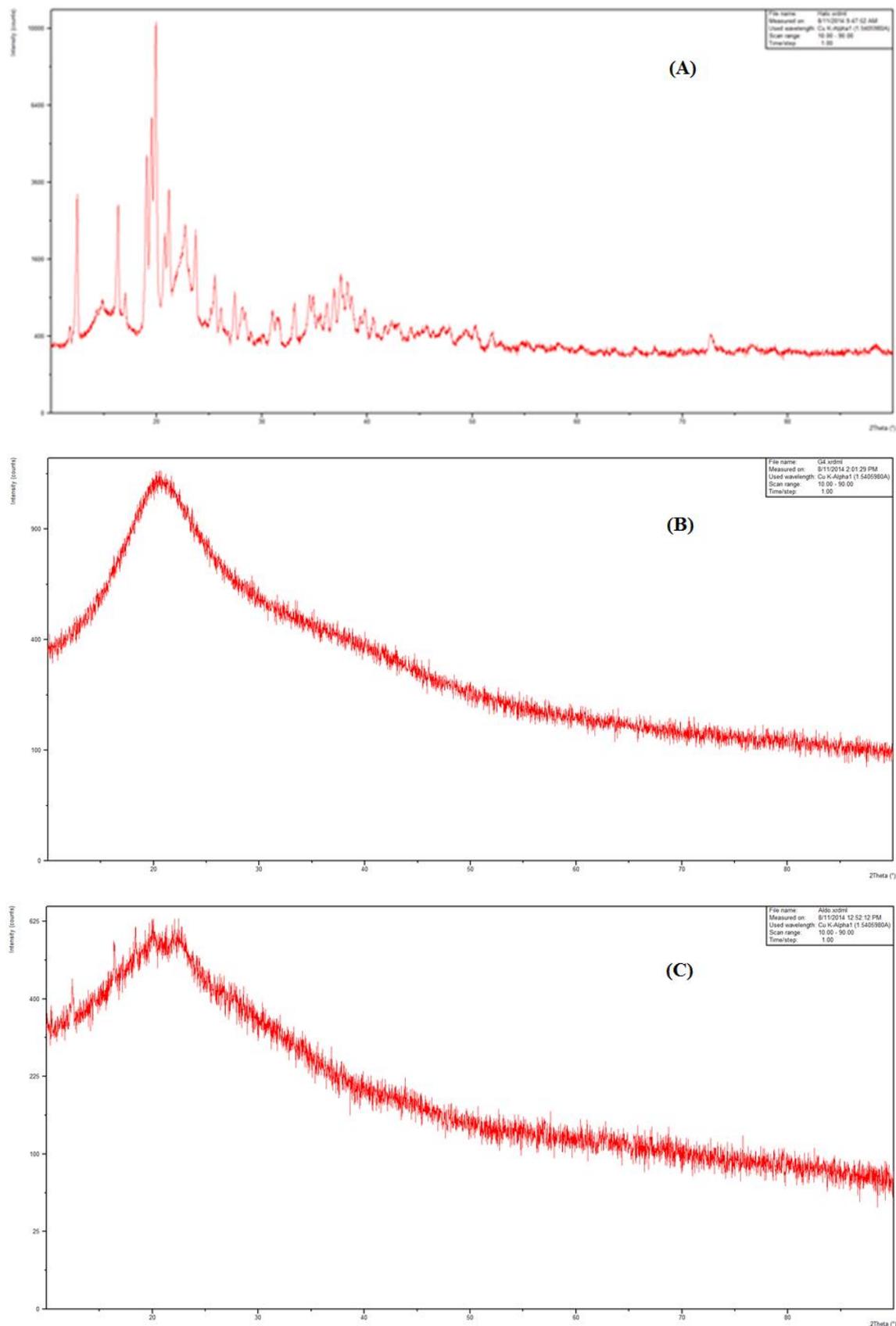


Figura 45 – Difractometria de Raios-X de: HLP(A), PGA_{g4} (B) e PGA_{g4}-c-HLP (C).

As curvas termogravimétricas (TGA) para o HLP, PGA_{g4} e o conjugado PGA_{g4}-c-HLP são mostradas na **Figura 46**. Também são apresentadas as derivadas das curvas obtidas para um estudo comparativo complementar em termos de número de etapas de perdas de massa em atmosfera inerte N₂.

O HLP (**Figura 46 (A)**) revela três eventos pronunciados de perda mássica. O primeiro evento ocorre no intervalo de 100 °C -192 °C indicando a perda de moléculas de água e início da decomposição térmica do fármaco. A segunda etapa de degradação do HLP ocorre no intervalo de temperatura de 192 °C - 230 °C com perda de massa de aproximadamente 24,0 % e temperatura de pico de 212 °C (DTG). O terceiro evento da degradação térmica do HLP ocorre no intervalo de temperaturas de 230 °C-370 °C havendo uma massa residual de aproximadamente 20%, provavelmente associado a material carbonoso de elevada estabilidade térmica.

O PGA_{g4} apresenta três etapas de degradação térmica (**Figura 46(B)**). O primeiro evento ocorre no intervalo de temperaturas de 100 °C a 215 °C com perda de massa de aproximadamente 46%. Esta etapa de degradação parece estar associada principalmente à perda de água estrutural processo que continua no segundo estágio, com perda de massa de 24% atribuídos à condensação das hidroxilas primárias do dendrímero. O terceiro estágio de decomposição térmica no intervalo de temperatura de 270°C a 345 °C com perda de massa de aproximadamente 24% parece estar associado à pirólise do dendrímero com formação de moléculas de baixa massa molecular a exemplo de CH₃CHO, HCOOCH₃ e HCOOC₂H₅ [125]. Finalmente, observa-se uma massa residual de cerca de 6%, provavelmente resultante da condensação intramolecular de grupos OH secundários durante o aquecimento e formação de composto mais estável termicamente, algum possível resíduo das ligações da cadeia central do PGA_{g4} que podem aparecer durante a termodecomposição.

A análise TGA do conjugado PGA_{g4}-c-HLP revela um comportamento térmico intermediário entre o PGA_{g4} e o HLP, **Figura 46 (C)**. Nesse caso, observam-se basicamente duas etapas de perda mássica, mostrando-se resistente à degradação térmica. No intervalo de 100°C – 150 °C ocorre uma perda de massa de cerca de 10% associada à eliminação de moléculas de água, visto que o dendrímero apresenta higroscopicidade devido à alta densidade de hidroxilas em sua estrutura. No intervalo de temperatura de 200°C-400°C o conjugado perde aproximadamente 70% de sua massa em um processo de pirólise suave e contínuo, sendo reforçada a ideia de que o HLP está ligado ao PGA_{g4}, o que confere ao conjugado maior resistência térmica.

A **Tabela 3**, apresenta os dados obtidos a partir das curvas termogravimétricas. Nela estão os valores das faixas de temperatura em que ocorrem as etapas de decomposição para cada evento e a temperatura máxima de pico na curva DTG para cada composto, na taxa de aquecimento ϕ de 10°C/min.

Tabela 3 – Dados das curvas TGA do HLP, PGA_{g4} e do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$, na velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

Etapas	Composto	Intervalo de temperatura (°C)	Temperatura do pico-DTG (°C)	Perda de Massa (%)
I	HLP	100 – 192	126	9
II		192 – 230	212	24
III		230 – 370	350	40
Resíduo		Acima de 370		27
I	PGA_{g4}	100 – 215	188	46
II		215 – 270	261	24
III		270 – 345	328	24
Resíduo		Acima de 345		6
I	$\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$	100 – 221	210	44
II		221 – 248	241	3
III		248 – 380	317	37
Sobra		Acima de 380		16

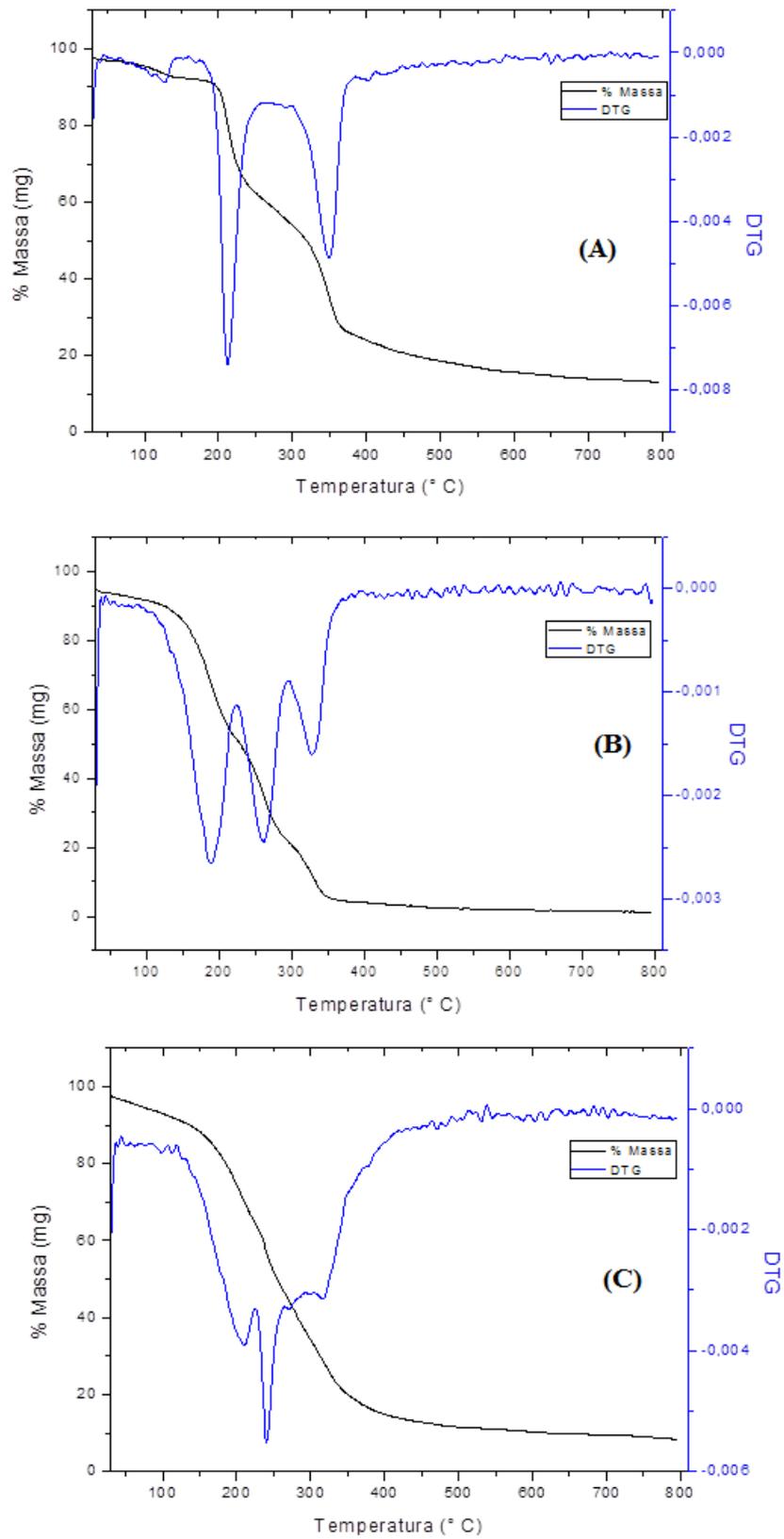


Figura 46 – Curva Termogravimétrica e DTG para o HLP (A), PGA_{g4} (B) e PGA_{g4-c} -HLP (C) na velocidade de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e atmosfera inerte de N_2 .

O estudo da cinética de degradação térmica do conjugado PGA_{g4}-c-HLP permitirá a proposição de modelos cinéticos que melhor descrevam a reação de degradação gerando variáveis físico-químicas que poderão auxiliar no estabelecimento do tempo de vida do composto bioativo.

A degradação do PGA_{g4}-c-HLP decorre de reações químicas ou físicas sofridas pelo material e que podem ser relacionadas ao tipo de aplicação ou processamento a que será submetido. Nesse trabalho, o conjugado PGA_{g4} foi submetido ao processo de eletrofiação. Portanto, esse processo pode afetar a estrutura do conjugado PGA_{g4}-c-HLP, resultando na alteração de suas propriedades físico-químicas. Logo, o conhecimento do estudo cinético a partir da degradação térmica do conjugado PGA_{g4}-c-HLP também consiste em um importante parâmetro a ser determinado de forma a garantir a estabilidade do composto durante seu processamento [126].

A análise TGA dinâmica permite a determinação da cinética de decomposição do conjugado PGA_{g4}-c-HLP a partir do tratamento dos dados obtidos a partir de 5 a 10 curvas isotérmicas. Nesse caso, o estudo cinético pode ser descrito pela equação básica que relaciona a taxa de reação da/dt , também chamada de taxa de conversão, em função da concentração de um dos reagentes $g(\alpha)$ por meio da constante de velocidade k , à temperatura constante como descrito pela Equação (17) e [127].

$$\frac{da}{dt} = k \cdot g(\alpha) \quad (17)$$

O grau de conversão (α) (também chamado de fator de conversão) do processo de decomposição ao longo do tempo é dado pela expressão:

$$\alpha = \frac{m_i - m}{m_i - m_f} \quad (18)$$

onde m_i e m_f representam a massa inicial e final da amostra, e m corresponde a massa em função do tempo.

A temperatura é a “força motriz” da reação de decomposição do composto e seu efeito é introduzido por meio da equação de Arrhenius na determinação da constante de velocidade de perda de massa, k , Equação (19)

$$k = A \cdot e^{\left(\frac{-Ea}{RT}\right)} \quad (19)$$

sendo A é o fator pré-exponencial de Arrhenius (também chamado de fator de frequência por representar a frequência de colisões inter-atômicas durante a reação de decomposição da

amostra; E_a é a energia de ativação em J, R a constante dos gases ($8,3145 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$), e T a temperatura absoluta em K.

Substituindo k na Equação (19), de acordo com a equação de Arrhenius obtém-se a Equação (20):

$$k = A \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \cdot g(\alpha) \quad (20)$$

A taxa de conversão é função do consumo do reagente, decomposição do composto, para sistemas termorrígidos, não fusíveis, que obedecem à cinética de reação de cura de ordem n, assumindo-se que $g(\alpha) = (1-\alpha)^n$, onde o grau de conversão α é a concentração fracionária dos reagentes consumidos no tempo t, tem-se []:

$$\frac{d\alpha}{dt} = A \cdot e^{\left(\frac{-E_a}{RT}\right)} \cdot (1 - \alpha)^n \quad (21)$$

Considerando-se o grau de conversão α , proporcional ao calor envolvido, e assumindo a dependência da temperatura com a equação de Arrhenius, a Equação (20) torna-se a base para os métodos cinéticos dinâmicos que utilizam múltiplas varreduras como o método de Kissinger [79] e Osawa [81], os quais relacionam a temperatura máxima do pico da reação de decomposição do composto, T_{\max} com a velocidade de aquecimento.

O método de Kissinger [127] é um método isoconversional diferencial, que utiliza dados termodinâmicos obtidos da análise termogravimétrica em diferentes taxas de aquecimento ($5 \text{ }^\circ\text{C}$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$, $15 \text{ }^\circ\text{C}$ e $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$), na determinação dos parâmetros cinéticos de Arrhenius: fator pré-exponencial “A” (frequência de colisões) e energia de ativação E_a . O método de Kissinger é um dos mais populares dos métodos de cálculo dos parâmetros cinéticos de reações de decomposição térmica, o qual na sua forma mais simples está representado pela Equação (22):

$$\ln \frac{\phi}{T_p^2} = \ln \frac{A \cdot R}{T} - \frac{E_a}{RT_p} \quad (22)$$

A associação da equação de Kissinger [127] com a equação da reta: $y = bx + a$ permite obter os valores de $\ln(\phi/T_p^2)$ e, representá-los em função de $(1/T_p \times 10^3)$, onde T_p é a temperatura absoluta de pico da curva DTG e ϕ é a taxa de aquecimento da amostra. A temperatura de pico, T_p , de cada etapa de decomposição, representa o ponto onde a velocidade da reação de decomposição é máxima. Para cada etapa de decomposição um gráfico foi traçado a partir das quatro taxas de aquecimento: $5 \text{ }^\circ\text{C}$, $10 \text{ }^\circ\text{C}$, $15 \text{ }^\circ\text{C}$ e $20 \text{ }^\circ\text{C}$; de forma a se aplicar o método de Kissinger para o cálculo de E_a .

A **Figura 47** exibe as curvas TGA e suas derivadas de primeira ordem para as amostras do HLP, PGA_{g4} e PGA_{g4-c} -HLP em algumas velocidades de aquecimento. Observa-se, a partir do platô de temperatura inicial, que o HLP, PGA_{g4} e o conjugado PGA_{g4-c} -HLP começam a se decompor por volta de $200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $5\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ **Figura 47**. As temperaturas encontradas tendem a se deslocar para a direita com maiores taxas de aquecimento, conforme apresentado na **Figura 47**. Isto ocorre porque o material precisa absorver energia antes da decomposição e se a velocidade de aquecimento é mais elevada, atinge uma maior temperatura para sua decomposição.

O gráfico de Kissinger para a decomposição térmica do HLP, PGA_{g4} e PGA_{g4-c} -HLP, obtidos a partir dos dados da **Figura 47** são apresentados na **Figura 48**. Os quatro pontos das retas são as taxas de aquecimento (ϕ) de cada amostra nas temperaturas de $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $10\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $20\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivamente. Foi utilizado o método dos quadrados mínimos, aplicando-se uma regressão linear a fim de se obter os coeficientes referentes à inclinação das mesmas, os quais permitem calcular a energia de ativação E_a e o fator de frequência A , respectivamente. A conversão é utilizada de forma independente e não se torna necessário conhecer a ordem n de reação para a obtenção da energia de ativação, conforme mostra a Equação (22). Uma vez que a ordem de reação é conhecida, pode-se utilizar a Equação (21) para estimar a energia de ativação para o processo degradativo das amostras.

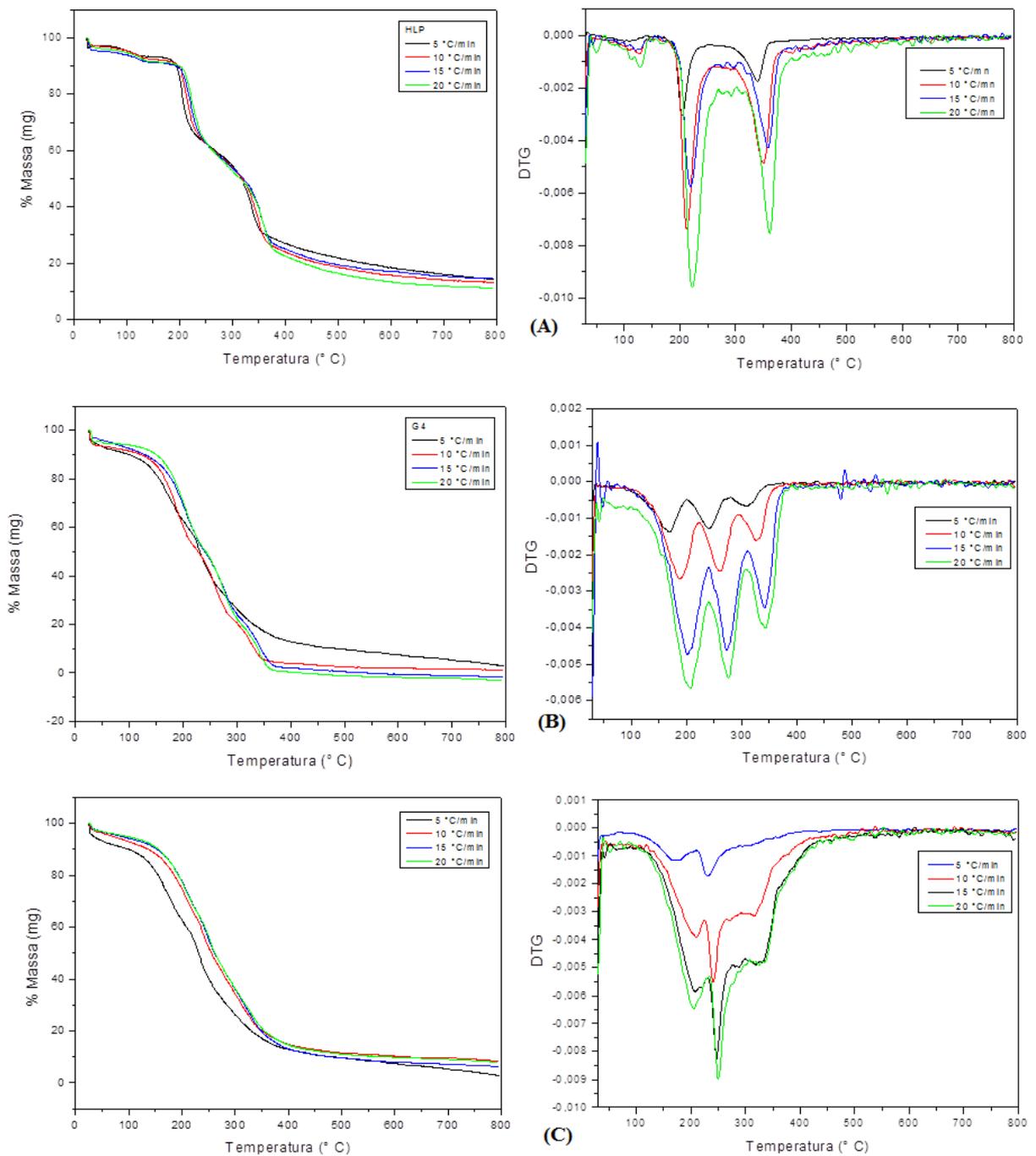


Figura 47 – Curvas termogravimétricas (TGA) e suas respectivas derivadas (DTG) obtidas em atmosfera de N₂ nas velocidades de aquecimento de 5 °C/min, 10 °C/min, 15 °C/min e 20 °C/min para: HLP (A), PGA_{g4} (B) e o conjugado PGA_{g4}-c-HLP. As análises foram efetuadas da temperatura ambiente (25 °C) a até 800 °C.

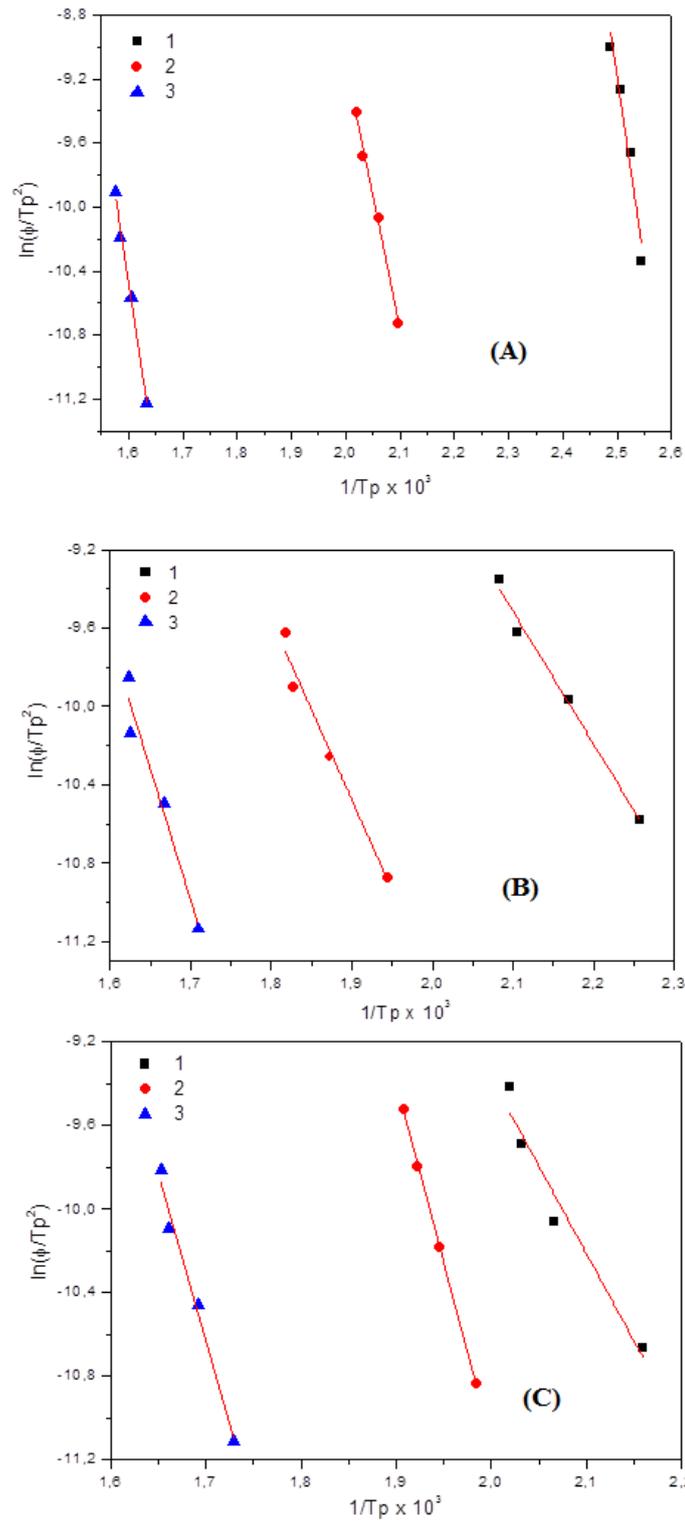


Figura 48 – Gráfico de Kissinger para a decomposição térmica do HLP (A), PGA₄ (B) e PGA₄-c-HLP (C). T é a temperatura absoluta e ϕ são as taxas de aquecimento a 5 °C, 10 °C, 15 °C e 20 °C/min, e ■ = Pico 1, ● = Pico 2 e ▲ = Pico 3.

Tabela 4 – Valores determinados pelo método de Kissinger para o fator pré-exponencial aparente, $\ln A_{app}$ e energia de ativação, E_a , para o HLP, PGA_{g4} e $PGA_{g4-c-HLP}$.

Picos DTG	Composto	Coefficiente de Correlação Linear R	Fator de Frequência A (s^{-1})	Energia de Ativação E_a (kJ/mol)
I	HLP	0,9412	$6,7 \times 10^{22}$	193,4
II		0,98886	$1,2 \times 10^{12}$	138,5
III		0,99019	$3,1 \times 10^{11}$	186,1
I	PGA_{g4}	0,9866	$3,8 \times 10^3$	56,1
II		0,96789	$4,1 \times 10^4$	76,6
III		0,94397	$4,7 \times 10^6$	111,3
I	$PGA_{g4-c-HLP}$	0,80769	$5,0 \times 10^4$	69,7
II		0,99961	$3,9 \times 10^{10}$	142,9
III		0,98008	$3,9 \times 10^7$	132,0

Os parâmetros de Arrhenius foram obtidos a partir dos coeficientes das retas resultantes da regressão linear dos pontos das etapas de decomposição para as quatro taxas de aquecimento. A energia de ativação foi calculada a partir da relação: $(-E_a/R) =$ coeficiente angular b e, o fator de frequência A foi determinado pela igualdade: $\ln(AR/T) =$ coeficiente linear a .

Os valores encontrados pelo método de Kissinger para a energia de ativação “ E_a ” e para o fator pré-exponencial “ A ” para os compostos HLP, PGA_{g4} e $PGA_{g4-c-HLP}$ são apresentados na **Figura 49**. O ajuste matemático dos pontos as equações de retas indicou que o método de Kissinger se ajusta adequadamente ao estudo da cinética de degradação dos compostos HLP, PGA_{g4} e $PGA_{g4-c-HLP}$ em atmosfera de nitrogênio.

Assim, os valores da energia de ativação obtidos para as diferentes taxas de conversão são apresentados na **Figura 49**, a qual mostra o comportamento das energias de ativação referentes às etapas de decomposição das amostras de HLP, PGA_{g4} e $PGA_{g4-c-HLP}$. Em geral o HLP apresentou maior energia de ativação para as três etapas, e seu conjugado $PGA_{g4-c-HLP}$ apresentou energia de ativação intermediária, o que corrobora a ligação covalente do fármaco (HLP) ao dendrímero (PGA_{g4}) **Tabela 4**.

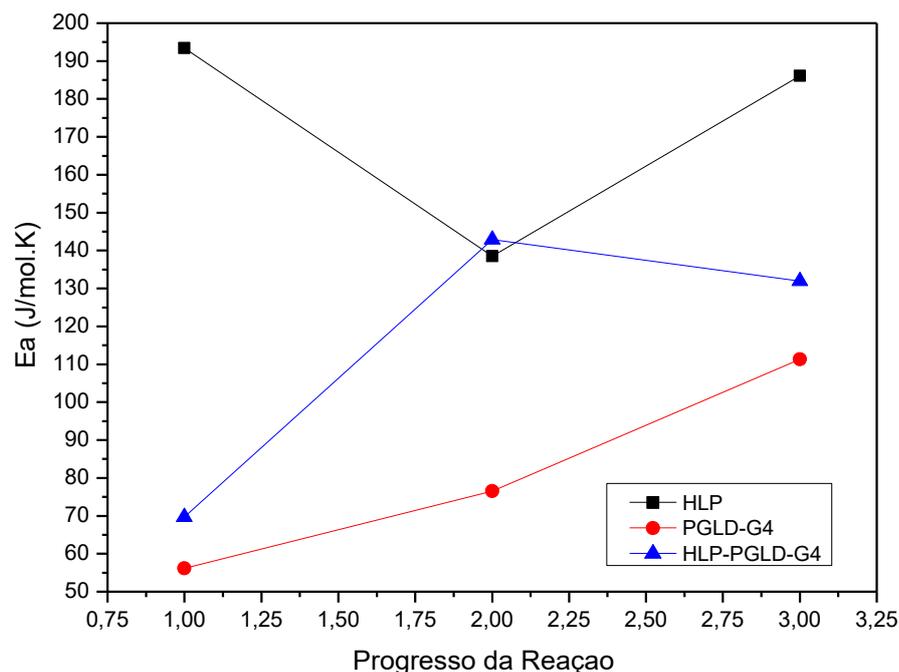


Figura 49 – Gráfico de Kissinger para a decomposição.

A cinética de estado sólido desenvolveu-se a partir da cinética de reações em sistemas homogêneos (ex. gases e líquidos). A relação entre a constante de velocidade de uma reação de única etapa com a temperatura é feita por meio da equação de Arrhenius através da “Ea” e do fator pré-exponencial “A”. Assume-se que a energia de ativação e o fator pré-exponencial permaneçam constantes, todavia, na cinética de reações de estado sólido, observa-se que estes parâmetros variam com o progresso da reação. Os métodos isoconversionais, tais como Friedman [83], Flynn-Wall-Ozawa [84, 85], Malek [86], Kissinger [79], entre outros, são capazes de detectar esta variação. Este comportamento parece mostrar que a cinética do estado sólido ao ser comparado com reações em fase homogênea, é muito mais complexa, dividindo-se em várias etapas.

Segundo Lesnikovich e Vyazovkin [87], a variação de Ea serve para identificar a complexidade dos processos, e o seu esquema cinético. Uma reação elementar (que acontece em uma só etapa) pode mostrar variação Ea durante seu progresso devido à natureza heterogênea da amostra sólida, a qual pode causar uma mudança sistemática na cinética da reação devido à formação de produtos, formação de defeitos na rede cristalina, tensão intracristalina ou outros efeitos semelhantes. A reatividade também pode ser afetada por variáveis experimentais que podem mudar a cinética da reação afetando o calor ou a transferência de massa na interface da reação [82].

Quando duas ou mais etapas elementares, cada uma tendo um único valor de E_a , controlam a velocidade de formação dos produtos, a reação é chamada de reação complexa [82]. Em tais reações, pode se observar uma mudança na E_a com o progresso da reação. Esta mudança depende da contribuição de cada etapa elementar. A complexidade cinética não está limitada às múltiplas etapas das reações químicas, podendo incluir os processos físicos (ex. sublimação, fusão localizada, adsorção-desorção, difusão de produtos gasosos, efeitos de tamanho de partículas e de morfologia) que apresentam diferentes valores de E_a durante o curso da reação.

4.4. Eletrofiação do conjugado PGA_{g4} -c-HLP e caracterização físico-química

Neste trabalho, a fim de se obter soluções poliméricas com elevada viscosidades, efetuou-se a síntese do PGA_{g4} a partir do PGA_{10} , um núcleo oligomérico de decaglicerol. A massa molecular do núcleo oligomérico PGA_{10} favorece o processo de eletrofiação uma vez que pequenas concentrações do PGA_{g4} proporciona a obtenção de soluções de elevada viscosidade. Soluções com viscosidades mais elevadas significam maior interação entre as moléculas de solvente e, assim, quando a solução polimérica for aplicada sob a influência das cargas originadas pela ação do campo elétrico, as moléculas do solvente tendem a se espalhar sobre as moléculas do polímero o que permite a estabilização do cone de Taylor e do jato polimérico, respectivamente.

A **Figura 50** ilustra o procedimento para a obtenção de uma membrana eletrofiada do conjugado PGA_{g4} -c-HLP, o aspecto físico da membrana obtida e sua microestrutura observada no microscópio eletrônico de varredura (MEV). As condições operacionais do processo de eletrofiação favoráveis para a formação de fibras foram efetuadas utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura (MEV) como técnica analítica de controle de processo. Foram efetuadas observações quanto à tensão aplicada, distância agulha-coletor e o fluxo da solução. As condições aperfeiçoadas para a obtenção de membranas estáveis mecanicamente e com estrutura fibrosa com o mínimo de defeitos são apresentadas na **Figura 51**.

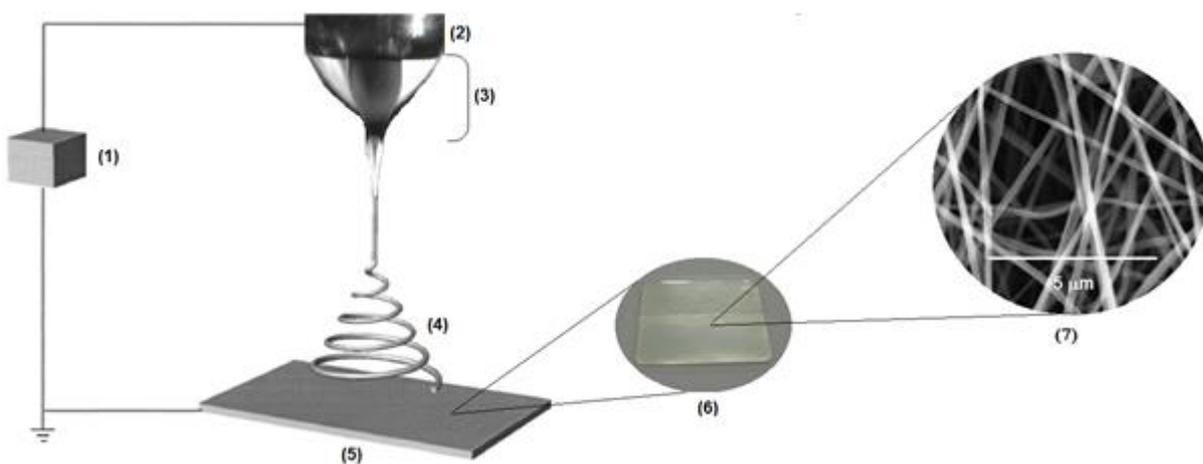


Figura 50 – Foto do processo de eletrofição do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$: Fonte de alta tensão (20 kV), agulha metálica da seringa (2), região de formação do cone de Taylor (3), jato polimérico alongado e estabilizado pela evaporação do solvente (4), placa coletora das nanofibras formadas (5), aspecto físico macroscópico da membrana de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ obtida (6) e micrografia do microscópio eletrônico de varredura (MEV) da membrana obtida (7).

Observa-se na **Figura 51** que as condições ótimas para a formação de microfibras estáveis na placa coletora foram: distância de 15 cm, fluxo de 0,5 mL/h e tensão aplicada de 20 kV. Distâncias inferiores a 15 cm levaram à perda da solução polimérica por deposição fora do coletor. O fluxo da solução durante o processo de eletrofição foi de 0,5 mL/h uma vez que fluxos inferiores levam à formação de defeitos como estrutura de gotas devido à desestabilização do cone de Taylor. Aplicou-se valores de tensão de 20 kV para a formação de membranas eletrofiadas estáveis. Valores inferiores a 20 kV não contribuíram para a formação de membranas estáveis.

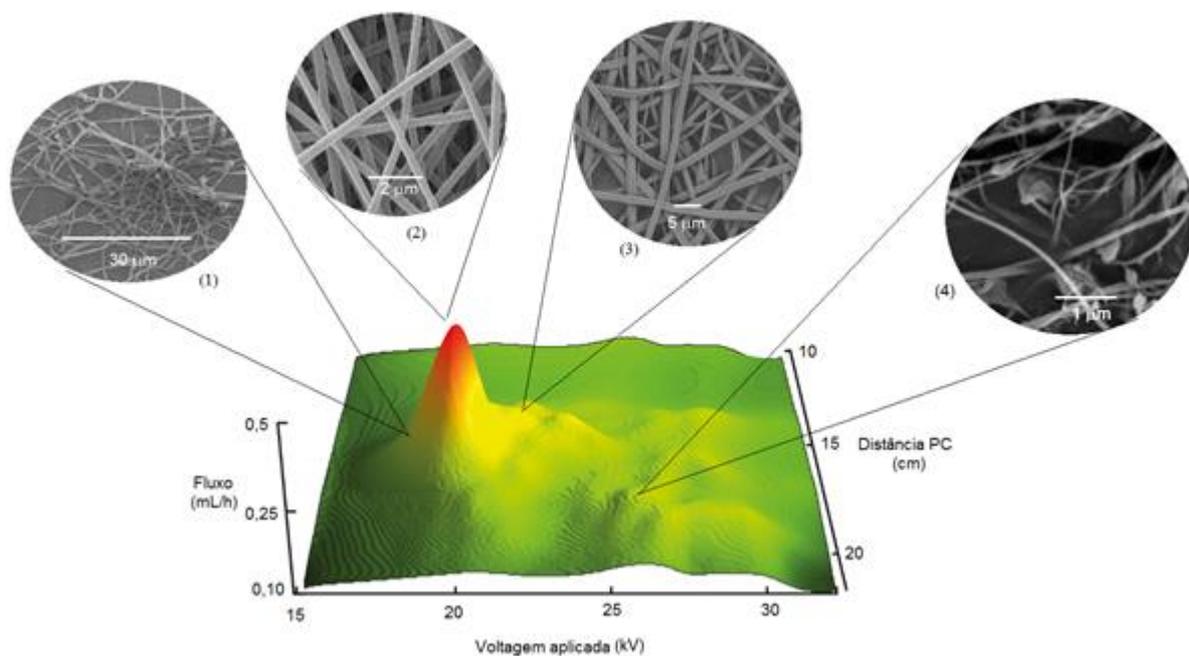


Figura 51 – Condições para a formação de fibras do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ na placa coletora. PC: placa coletora. As micrografias MEV indicam a morfologia da microestrutura da membrana em cada ponto da superfície 3-D: região onde se inicia a formação das microfibras (1), região de boa formação de microfibras (2), região de formação de fitas (3) e região de má formação de fibras (4).

Considerando as condições experimentais utilizadas no processo de eletrofiação, o diâmetro médio das fibras de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ obtidas através da técnica de eletrofiação utilizando uma tensão de 20 kV foi de $290 \text{ nm} \pm 58 \text{ nm}$ (**Figura 52**).

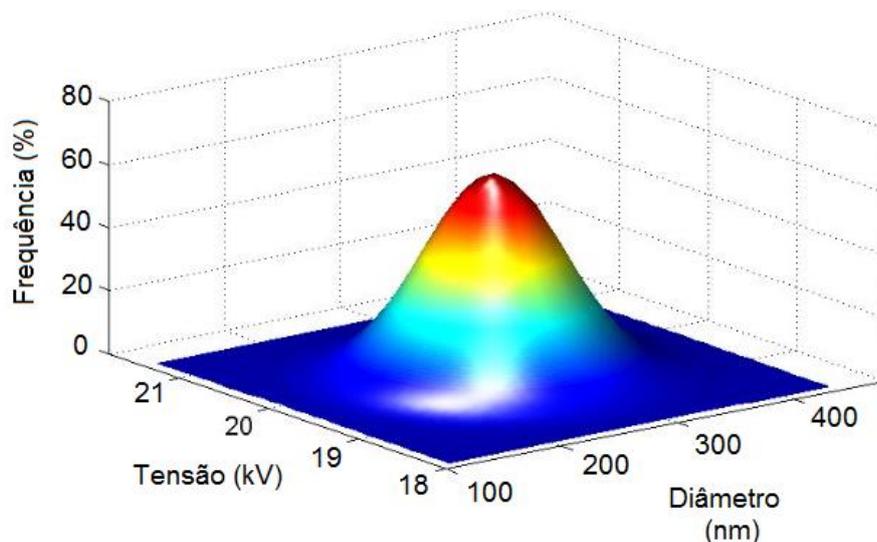


Figura 52 – Gráfico da distribuição do diâmetro das fibras eletrofiadas de PGA_{g4}-c-HLP em função da tensão aplicada.

4.5. Caracterização Biológica

4.5.1. Citotoxicidade

Pelo fato de ter sido utilizado o OsO₄ na síntese do PGA_{g4} e outros catalisadores no processo de síntese do PGA_{g4}-c-HLP, o conjugado pode exibir alguma toxicidade contra as células de mamíferos, mesmo após o exaustivo processo de purificação. Nesse sentido a avaliação da toxicidade do composto contra as células de mamíferos é de grande importância para assegurar a qualidade do material quando aplicado na medicina.

O teste de citotoxicidade *in vitro* é classificado pela ISO 10993-5 como o primeiro ensaio a ser utilizado para avaliar a biocompatibilidade de um material candidato a uso na biomedicina. Esse ensaio fornece resultados relacionado à interação entre o material e o tecido biológico de forma rápida e eficiente, minimizando o uso de animais em experimentação [128].

O ensaio de citotoxicidade consistiu em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais. O composto, para ser viável no ensaio de citotoxicidade *in vitro*, não deve ocasionar a morte das células, nem afetar suas funções biológicas. As alterações nas funções biológicas ou mesmo a morte celular podem ser verificadas por meio de processos de coloração, que são aplicados à cultura celular após sua exposição ao composto a ser testado.

O método colorimétrico utilizado nesse trabalho foi o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), um sal solúvel de tetrazólio metabolizado por células vivas, produzindo um produto colorido solúvel. Nesse caso, o sal é reduzido pelas células vivas, produzindo um produto colorido insolúvel, o azul de formazan a partir das enzimas mitocondriais presentes somente nas células metabolicamente ativas. A quantificação da inibição enzimática pode ser realizada espectrofotometricamente, obtendo-se assim os valores de IC₅₀ ou seja; a concentração do composto que inibe 50% da atividade enzimática [129].

A **Figura 53** mostra o ensaio de citotoxicidade das membranas de PGA_{g4}-c-HLP eletrofiadas contra as células CHO. De acordo com os dados obtidos neste ensaio, a membrana eletrofiada de PGA_{g4}-c-HLP não apresentou citotoxicidade, pois a viabilidade celular manteve-se acima de 50% para todas as concentrações do extrato, tendo-se o PEAD como controle negativo e o fenol a 0,3% como controle positivo (**Figura 53**). O resultado de citotoxicidade obtido parece favorecer a utilização das membranas eletrofiadas de PGA_{g4}-c-HLP como sistemas para a liberação controlada de HLP. A **Figura 54** mostra o ensaio de citotoxicidade em gráfico 3-D considerando-se a viabilidade celular acima do intervalo de 50%.

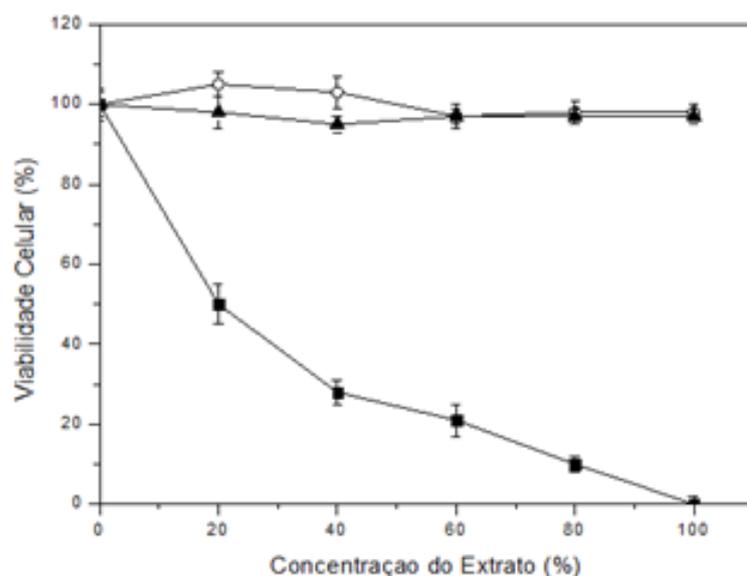


Figura 53 – Ensaio de viabilidade celular para as membranas eletrofiadas de PGA_{g4}-c-HLP (○). Os controles positivo e negativo são o fenol a 0,3% (□) e o polietileno de alta densidade (▲), respectivamente.

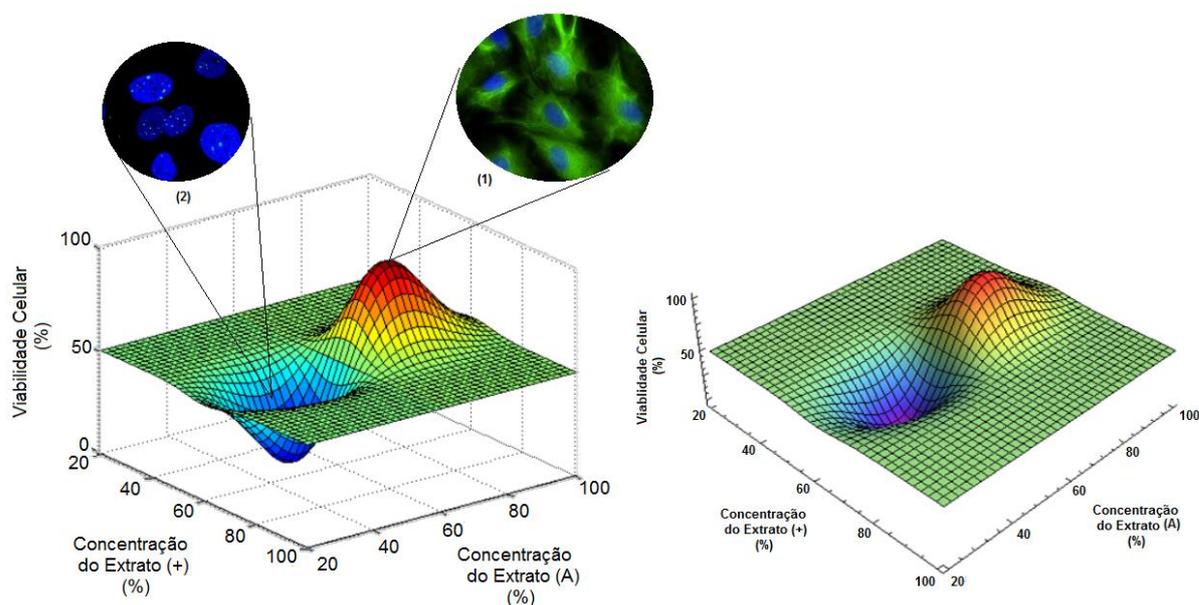


Figura 54 – Gráfico 3-D dos ensaios de viabilidade celular para as membranas eletrofiadas de PGA_{g4}-c-HLP, Extrato (A). O controle negativo é fenol a 0,3% (m/m). Em (1) são mostradas a micrografia da microscopia de fluorescência de células CHO vivas e mortas (2). As células foram coradas com DAPI (4'6'-diamidino-2-fenilindol).

4.5.2. Hemocompatibilidade

O ensaio de hemólise é importante para a análise das interações entre o sangue e o PGA_{g4}-c-HLP uma vez que um elevado nível de hemoglobina plasmática indica hemólise e indica a fragilidade da membrana dos eritrócitos em contato com o composto sintético [130], [131].

Os eritrócitos, hemácias ou glóbulos vermelhos são células únicas que executam funções importantes no organismo humano. A função primária desta célula é o transporte de hemoglobina (Hb), visto que esta proteína está associada a outras funções como o transporte de oxigênio (O₂) e transporte de dióxido de carbono (CO₂) [132]. Para realizar suas funções, um eritrócito tem de manter a flexibilidade da membrana, um processo que requer energia sob a forma de ATP (adenina trifosfato). Os eritrócitos com baixa concentração de ATP perdem sua forma discoide e tornam-se equinócitos, perdendo cátions e acumulando cálcio e posteriormente são destruídos na microcirculação. Por outro lado, se os eritrócitos possuem ATP, a perda de deformabilidade é reversível desde que o acúmulo de cálcio seja mínimo. Nesse caso, a deformabilidade torna-se irreversível quando a concentração de cálcio atinge 1 mM [133]. A hemólise compreende, portanto; vários processos que resultam na destruição dos eritrócitos e liberação de hemoglobina no sangue circulante (hemólise intravascular) ou num tecido (hemólise extravascular), sendo um forte indicativo da viabilidade da utilização de um material sintético na medicina.

A **Figura 55** reporta os resultados obtidos pelo ensaio de hemólise para o composto PGA_{g4}-c-HLP. Uma vez que os resultados de hemólise mostraram-se inferior a 2%, conclui-se que o conjugado eletrofiado apresenta boas características de hemocompatibilidade para aplicações biomédicas [134], [135]. Embora o índice hemolítico seja uma escala arbitrária e não validada pela literatura, sua utilização é importante uma vez que é um número relativo à diferença entre a média do índice hemolítico do controle negativo e o índice hemolítico das amostras. Nesse caso, o índice hemolítico das amostras foi classificado como não hemolítico e o conjugado PGA_{g4}-c-HLP revela um ótimo potencial para aplicação na medicina invasiva.

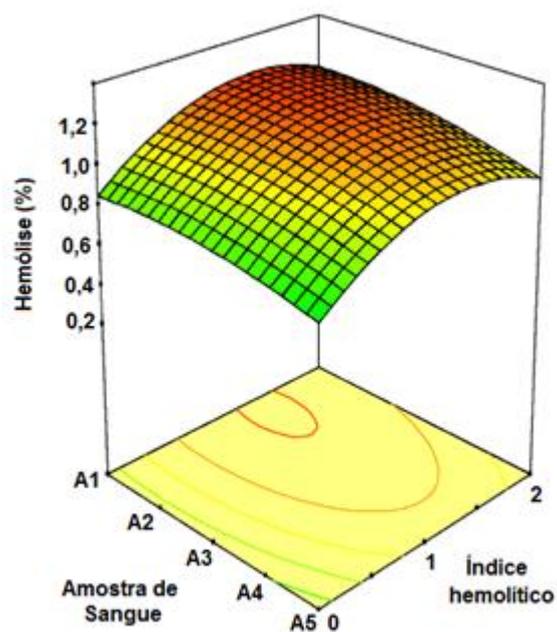


Figura 55 – Resultados obtidos para o ensaio de hemólise do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$.

4.6. Perfil de Liberação do HLP em meio enzimático

A terapia convencional com HLP envolve a administração de doses periódicas do medicamento de forma a se manter a concentração do princípio ativo em um nível plasmático clinicamente desejado. Nesse caso, a concentração do fármaco deve oscilar ao redor de um nível de concentração estacionário que oscila entre a concentração efetiva e a concentração terapêutica mínima na “janela” terapêutica ideal (**Figura 56**).

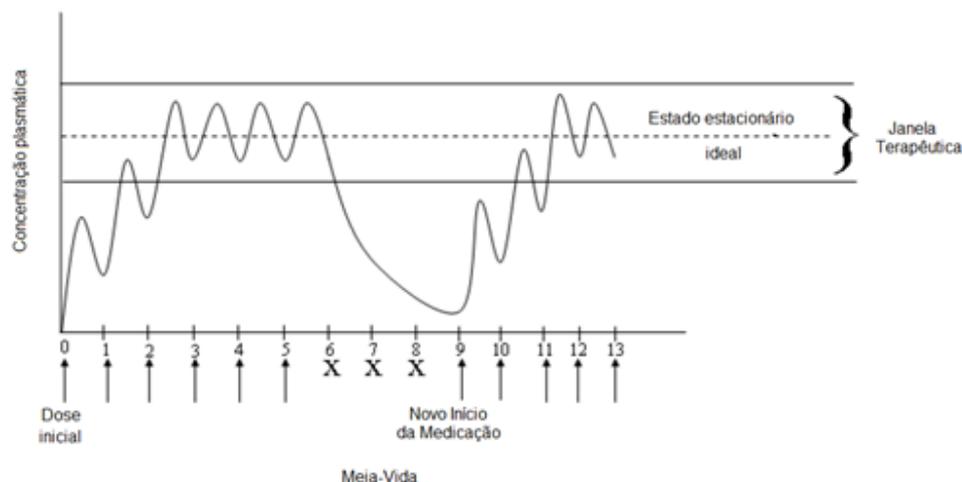


Figura 56 – Exemplo de um sistema de entrega de fármaco convencional onde são observadas as oscilações até se atingir a janela terapêutica e o efeito do descumprimento no intervalo entre 6 e 8 (XXX) da medicação.

O haloperidol é um antipsicótico classicamente utilizado para tratar a esquizofrenia. O fármaco é administrado em doses de 1 a 2 mg de 3 a 4 vezes por dia [136]. Um sistema de entrega do fármaco a longo prazo, que permitisse manter um nível estável no plasma, elimina a possibilidade de esquecimento da ingestão, e, portanto, flutuações severas fora da janela terapêutica (**Figura 56**). A meia-vida de um fármaco representa o tempo no qual metade do fármaco é eliminada do corpo. Observa-se na **Figura 56** que, após três doses a concentração do fármaco oscila em torno do estado estacionário. Quando o paciente se esquece de ingerir o medicamento o nível plasmático do fármaco cai abruptamente. Além disso, a amplitude das oscilações é dependente da frequência da dosagem, de tal modo que uma administração mais frequente de doses menores vai resultar em menores oscilações de concentração do fármaco em torno da média.

Um dos objetivos do sistema de liberação controlada de fármacos é a melhor aproximação possível da janela terapêutica eliminando as desvantagens como efeitos secundários adversos tais como flutuações na concentração plasmática, baixa biodisponibilidade, manutenção da dose terapêutica de forma a se eliminar os efeitos colaterais do fármaco e aumentar a adesão do paciente pelo tratamento.

Uma vez que o objetivo do sistema PGA_{g4} -c-HLP é sua utilização como sistema de liberação controlada implantável sob a pele, efetuou-se o estudo da hidrólise do HLP da matriz eletrofiada utilizando-se a catálise enzimática. Nesse caso, como o HLP incorporado na cadeia

do dendrímero arborescente, ou ligado à cadeia do dendrímero através de uma ligação éster, considerou-se o mecanismo da reação hidrolítica do grupamento éster catalisado por uma enzima proteolítica, a tripsina.

Deve ser enfatizado que a hidrólise de ésteres é muito importante no processo de liberação prolongada de macromoléculas dado seu mimetismo de processos biológicos importantes a exemplo da hidrólise de ésteres no meio biológico catalisado por enzimas como a quimiotripsina, a tripsina e várias enzimas relacionadas ao processo de coagulação sanguínea.

A tripsina é uma enzima particularmente atraente para esse estudo uma vez que segue o mecanismo das serinas-proteases similarmente ao que acontece no organismo humano. Sabe-se que o grupo ativo da tripsina é uma hidroxila da serina responsável pelo ataque ao grupo éster [137], [138].

Inicialmente foi obtido o coeficiente de extinção molar do HLP a fim de se preparar uma curva de calibração no intervalo de concentrações compreendidas entre 1,0 μM e 100 μM no intervalo de temperatura de 21 °C, 35 °C e 40 °C. Uma vez medidas as absorvâncias correspondentes, obteve-se a curva de calibração para a análise do processo de liberação do HLP da matriz eletrofiada. As curvas de calibração são apresentadas na **Figura 57**. Observa-se boas correlações entre a absorvância e a concentração das soluções de HLP indicando a validade da lei de Lambert-Beer no intervalo de concentrações e temperaturas estudadas.

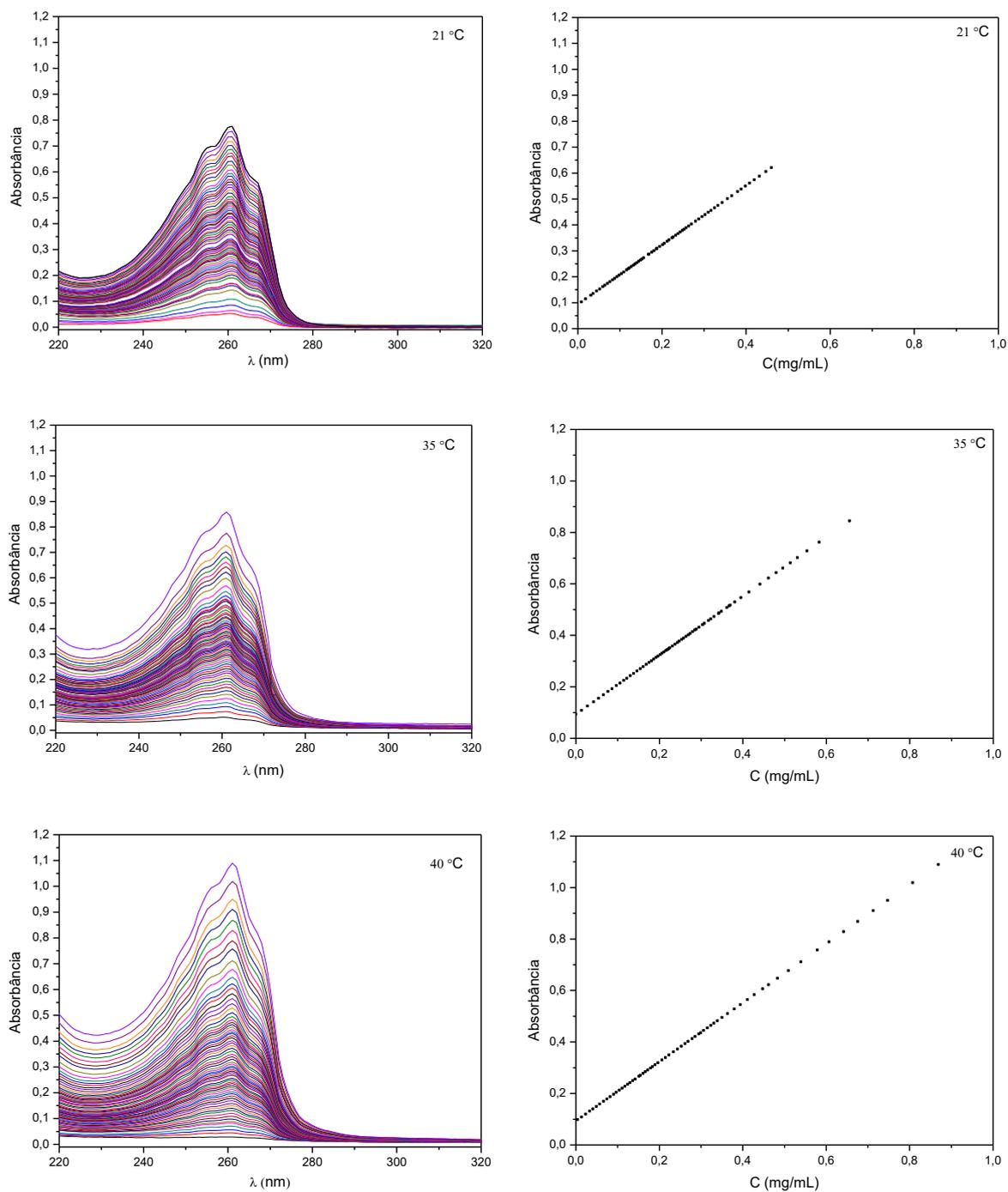


Figura 57 – Curvas de calibração preparadas para o estudo da liberação do HPL das matrizes eletrofiadas de PGA_{g4} -c-HPL nas temperaturas de 21 °C, 35 °C e 40 °C. HPL foi dissolvido em tampão PBS ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) pH 7,4 contendo tripsina a 0,25 % (v/v).

O estudo da liberação de HLP do PGA_{g4-c}-HLP foi efetuado nas temperaturas de 21 °C, 35 °C e 40 °C, respectivamente (**Figura 57**) com o objetivo específico de se determinar o tipo de transporte (n), o coeficiente de difusão (D) e a energia de ativação relacionada ao processo.

O estudo do transporte de HLP durante o processo de hidrólise pode ser tratado quantitativamente utilizando-se a 2ª lei de Fick, uma equação diferencial parcial de ordem 2, representada na Equação (23).

$$\frac{\partial C(x, t)}{\partial t} = D \cdot \frac{\partial^2 C(x, t)}{\partial x^2} \quad (23)$$

A difusão é um processo de transporte no qual uma força motriz originada pelo gradiente de concentração produz o transporte do HLP da membrana eletrofiada, uma região de alta concentração para uma região de baixa concentração, o fluido biológico. Nesse caso, o mecanismo de transporte de HLP das membranas eletrofiadas pode ser descrito pela Equação (24).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (24)$$

sendo n o tipo de transporte na membrana, M_t e M_∞ representam as massas de HLP liberadas no tempo t e no equilíbrio, respectivamente.

A linearização da (24) extraindo seu logaritmo, permite o cálculo de “n”, ou seja; o tipo de transporte de HLP através da membrana eletrofiada. Para o caso I (transporte fickiano), $n = 0,5$ com velocidade de difusão muito menor que a relaxação; no caso de transporte II, $n = 1,0$. Neste caso, a velocidade de difusão do HLP é muito maior comparativamente ao processo de relaxação do sistema polimérico. Para sistemas não-fickianos o valor de n está compreendido entre 0,5 e 1,0. Quando a concentração inicial do agente permeante (HLP) é constante na superfície e atinge valores máximos, no equilíbrio de intumescimento (M_∞) a solução para a Equação (24) assume a forma da Equação (25):

$$\frac{M_t}{M_\infty} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{[-D(2n+1)^2 \frac{\pi^2}{2h^2} t]} \quad (25)$$

sendo h a espessura inicial da membrana.

Integrando a Equação (25) obtém-se o coeficiente de difusão de HLP através da matriz eletrofiada em função do tempo expressa na Equação (26) [139]:

$$\ln \left[1 - \frac{M_t}{M_\infty} \right] = \ln \left(\frac{8}{\pi^2} \right) - \frac{D\pi^2 t}{2h^2} \quad (26)$$

sendo D o coeficiente de difusão do HLP da membrana eletrofiada, h sua espessura e t o tempo.

De acordo com a Equação (26), o gráfico de $\ln[1-M_t/M_\infty]$ *versus* t pode ser obtido aplicando-se o método dos quadrados mínimos, sendo sua inclinação proporcional ao coeficiente de difusão ($\alpha = D\pi^2/2h^2$).

Na **Figura 58** está apresentado o perfil de liberação do HLP da membrana eletrofiada nas temperaturas de 21, 35 e 40 °C, em miligrama e em percentual.

A **Figura 58** também mostra o gráfico de $\log(M_t/M_\infty)$ em função de $\log(t)$. A **Tabela 5** mostra os valores obtidos para os coeficientes de Fick, “n”, “D” e os coeficientes de correlação das retas. Observa-se (**Figura 58, Tabela 5**) que o tipo de transporte “n” do HLP através da membrana eletrofiada tende a ser não-Fickiano, e parece estar associado à uma combinação de dois processos aparentemente independentes. Um dos processos é devido ao transporte do fármaco que obedece às leis de Fick ou transporte Fickiano através da membrana eletrofiada. O outro processo parece ser consequência dos fenômenos de inchamento/relaxamento da membrana eletrofiada envolvendo uma transição de um estado semirrígido a outro mais flexível, chamado transporte Caso-II.

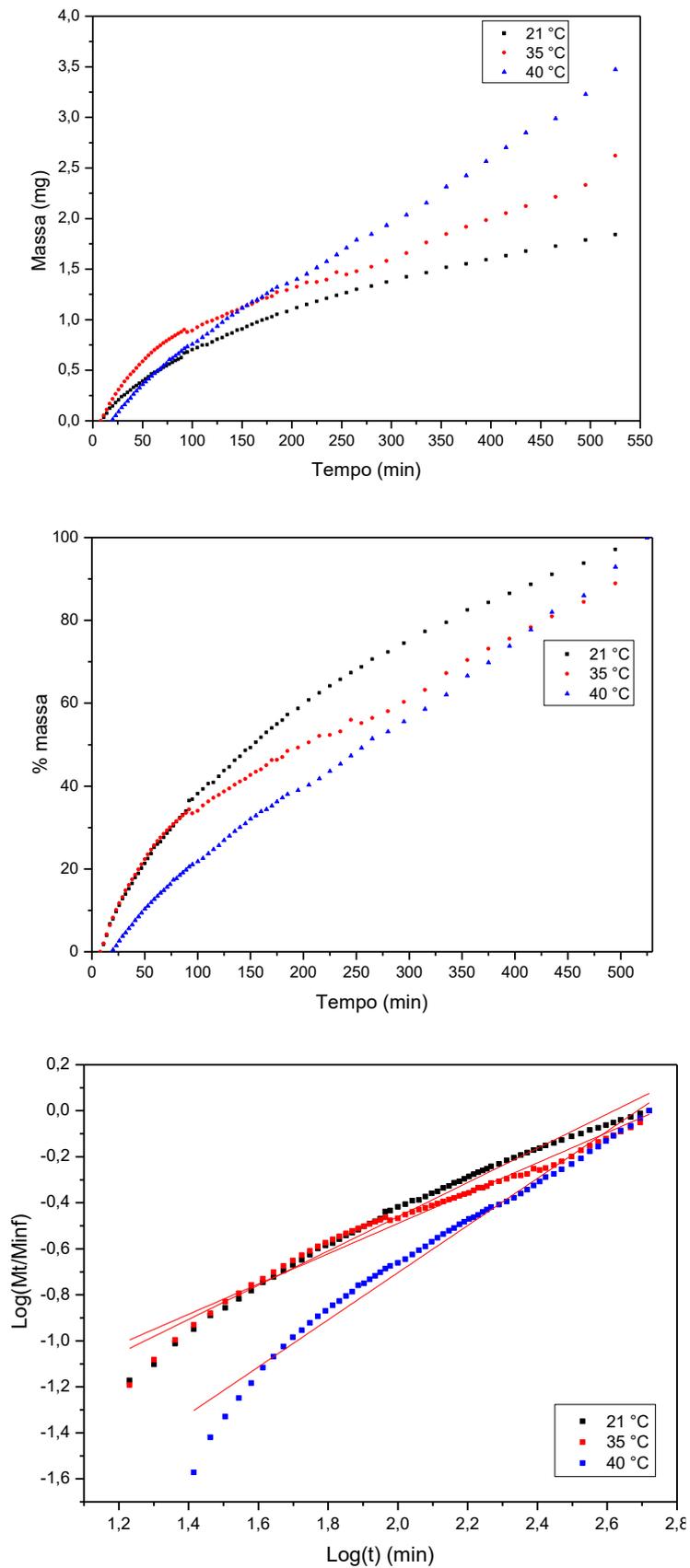


Figura 58 – Determinação da massa de HLP liberada e avaliação do tipo de transporte “n” do HLP através da membrana eletrofiada.

Figura 59 (A-C) ilustra o cálculo do coeficiente de difusão (D) a partir da Equação (26) e da energia de ativação **Figura 59(D)** para o processo. A **Figura 60**, ilustra, no gráfico 3-D, a relação entre “ D ”, “ n ” e a temperatura. Observa-se que enquanto “ n ” aumenta com a temperatura, aproximando-se do transporte não-Fickiano (Caso II), o coeficiente “ D ” diminui.

As medidas realizadas indicam que os coeficientes de difusão (D) seguem uma representação linear de Arrhenius. Entretanto, a dependência exata de “ D ” com a temperatura é de difícil solução, pois se dá através da frequência de colisões moleculares sendo necessário para sua solução conhecimentos fundamentais sobre as forças intramoleculares entre o HLP e a arquitetura arborescente. Ao mesmo tempo, são necessários conhecimentos das forças intrmoleculares entre a enzima e o conjugado e as reações cinéticas envolvidas. Esse não é o tema desse trabalho, mas há a necessidade de que um planejamento experimental seja efetuado para a análise dessa temática em perspectivas futuras.

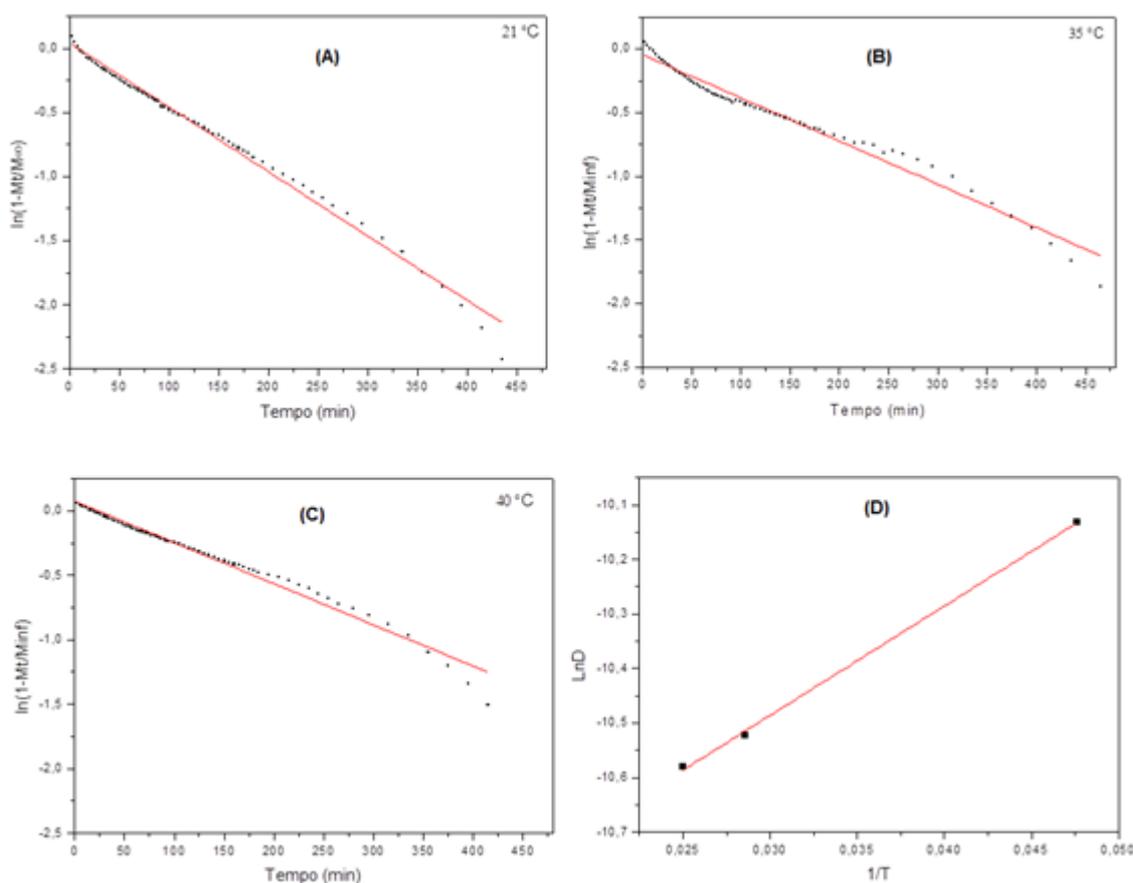


Figura 59 – Ilustração do cálculo do coeficiente de difusão (A-C) de Fick e da energia de ativação (D) para o processo de liberação do HLP da matriz eletrofiada.

Na **Figura 60** está apresentado o perfil de liberação do HLP em meio enzimático (Tripsina), onde mostra a relação entre o coeficiente de Fick (n), a temperatura e o coeficiente de difusão D.

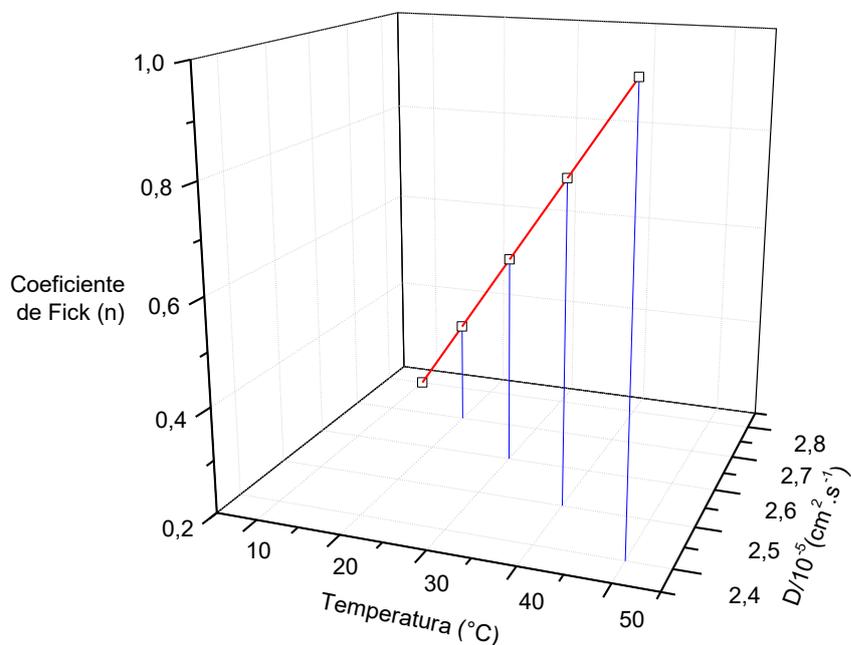


Figura 60 – Gráfico 3-D ilustração da relação entre “n”, “D” e a temperatura.

Na **Tabela 5**, estão os dados principais a partir dos quais pôde ser determinada a energia de ativação no processo de difusão do HLP da membrana eletrofiada com o conjugado PGA_{g4}-c-HLP.

Tabela 5 – Dados obtidos a partir do estudo do processo de liberação do HLP nas temperaturas de 21 °C, 35 °C e 40 °C.

Temperatura de Liberação (°C)	Ordem n da reação	Coeficiente de Difusão D (cm ² .s ⁻¹)	Constante cinética (k _c)	Ea (kcal.mol ⁻¹)
21	0,7	2,8 x 10 ⁻⁵	0,0050	-166,68
35	0,6	2,7 x 10 ⁻⁵	0,0033	
40	1,0	2,5 x 10 ⁻⁵	0,0032	

Capítulo 5

Resultados e Discussão da Modelagem

In Silico

Neste capítulo é aplicado métodos computacionais no estudo e no planejamento de arcabouços moleculares baseados no poliglicerol arborescente que utilizam a rota de síntese a partir do glicerol.

5

Propriedades eletrônicas

Dinâmica molecular do PGL

Estudo da interação entre o HLP e PGA

5. Resultados e Discussão da Modelagem *In Silico*:

5.1. Propriedades eletrônicas determinadas por métodos semi-empíricos

Apesar dos registros sobre a preparação de dendrímeros como transportadores de drogas não existe nenhum estudo sobre $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ em seus resultados teóricos e de segurança biológica para uso como sistemas de distribuição de drogas. Entretanto, nenhum dos PGL-HLPs preparados podem circular por um longo período de tempo no sangue. Para esta finalidade, no presente trabalho, além do estudo experimental de preparo e avaliação do $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ quanto à sua segurança biológica foi feito também um estudo de modelagem *In Silico* do PGL-HLP [140].

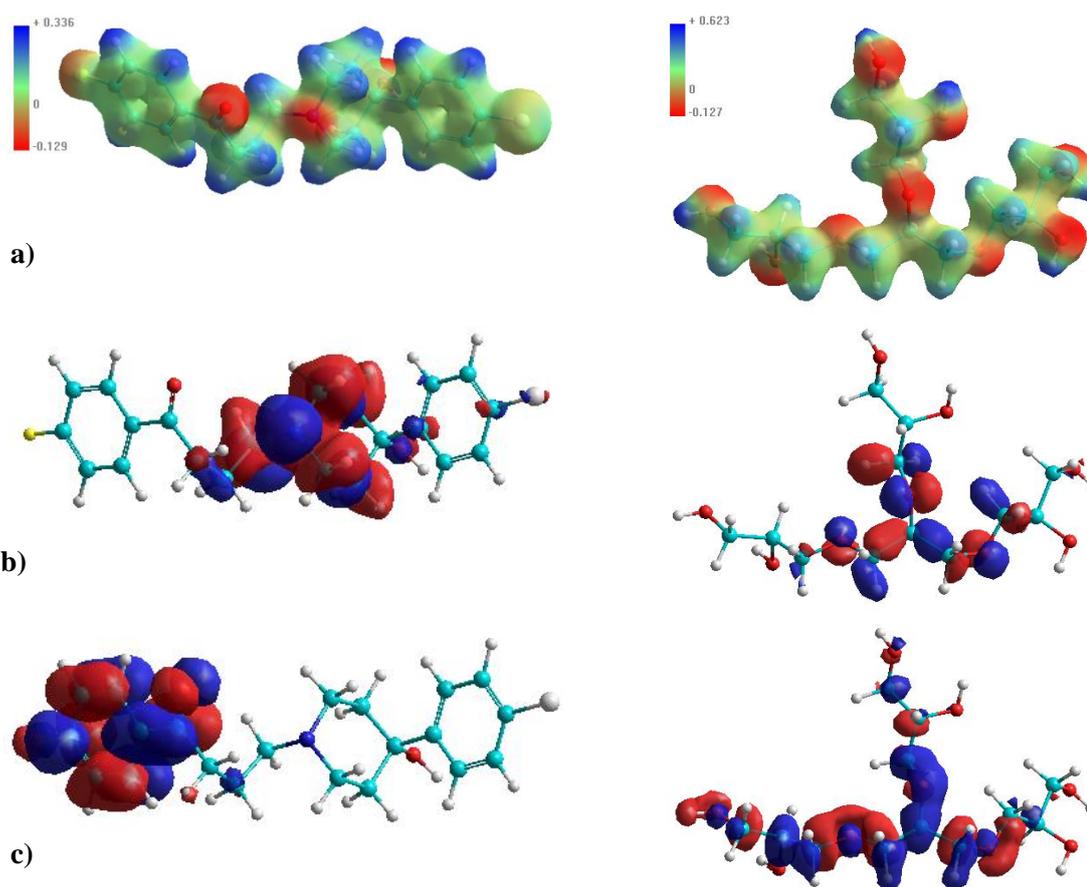


Figura 61 – O orbital HOMO a partir da porção do grupamento terminal hidroxila (a direita) para o dendrímero PGLD e o orbital LUMO da moléculas de Haloperidol (a esquerda), **a)** Mapa de potencial eletrostático, **b)** HOMO, **c)** LUMO.

A Teoria do Orbital Molecular de Fronteira (*FMOT*) postula que a interação entre o HOMO e LUMO de moléculas submetidas a uma reação pode fornecer uma boa aproximação da reatividade [140]. A reação irá ocorrer com o aumento da frequência máxima e sobreposição dos orbitais HOMO e LUMO. Estas propriedades eletrônicas foram calculadas usando o método PM3 implementado em Hyperchem. Para este estudo, o LUMO da molécula haloperidol e o HOMO do dendrímero foi determinada. A diferença de energia entre o dendrímero HOMO e LUMO haloperidol também foi determinada e analisada como se pode ver na **Tabela 6**.

O HOMO do PGL foi localizado num dos grupos de hidroxila terminais. Isto iria permitir a uma interação com o LUMO no HLP, o que verificou-se estar localizado no grupo Fluor (**Figura 61**).

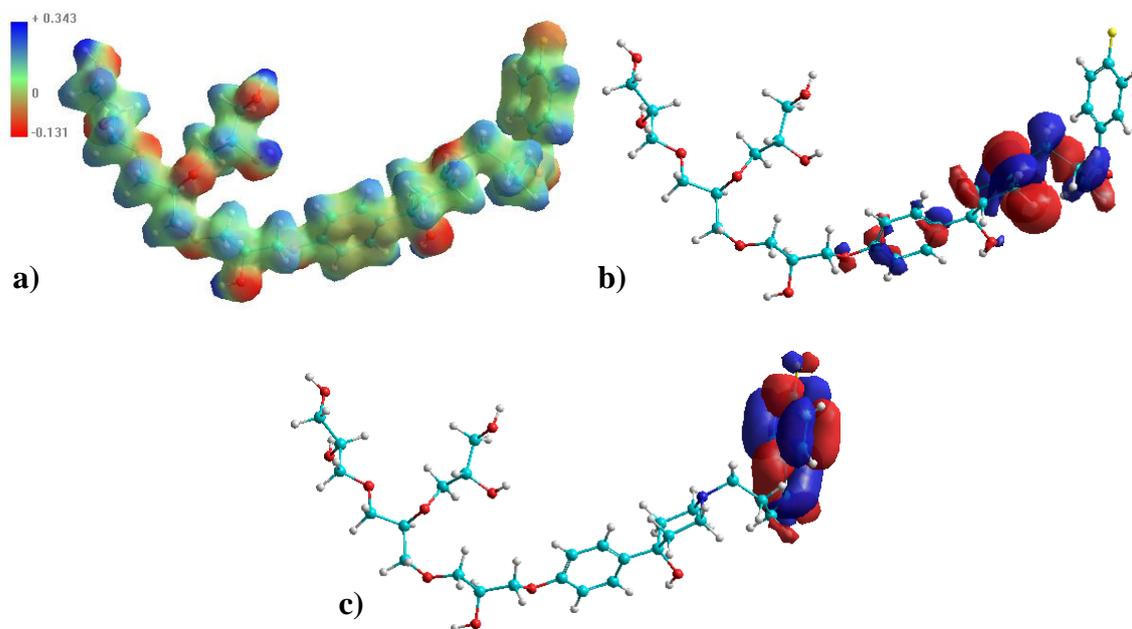


Figura 62 – No topo, aumento das ramificações do dendrímer PGLD, modificado com um Haloperidol, submetido ao cálculo no programa Hyperchem através do método semi-empírico PM3, para determinara o valor da energia do HOMO e sua localização. O gap HOMO-LUMO foi determinado tal como o valor da energia do HOMO foi determinada para cada estrutura do dendrímero, e o LUMO de uma molécula de HLP (-4,61 eV); a) Mapa de potencial eletrostático, b) HOMO, c) LUMO.

Estes cálculos das propriedades eletrônicas foram aplicados para verificar o aumento de tamanho das gerações de PGL com e sem HLP (**Figura 62**). Esta abordagem permitiu fazer a

ilustração da localização do HOMO nos grupos de hidroxilas terminais, onde a interação com o LUMO de HLP é esperada para acontecer. Uma nova observação importante foi a de que o HOMO do fármaco permaneceu na mesma região após sua ligação como o PGL. Assim pode-se inferir que a interação entre o fármaco e o PGL não interferiu nas propriedades químicas do fármaco.

A diferença entre o HOMO do PGL e o LUMO do haloperidol diminuiu à medida que o tamanho da molécula de dendrímero aumentada (**Figura 62 e Tabela 6**). De acordo com o FMOT, o menor gap entre o HOMO e LUMO aumenta a probabilidade da reação acontecer. Por analogia, era esperado que esta diferença seria ainda menor se todo o PGL fosse considerada.

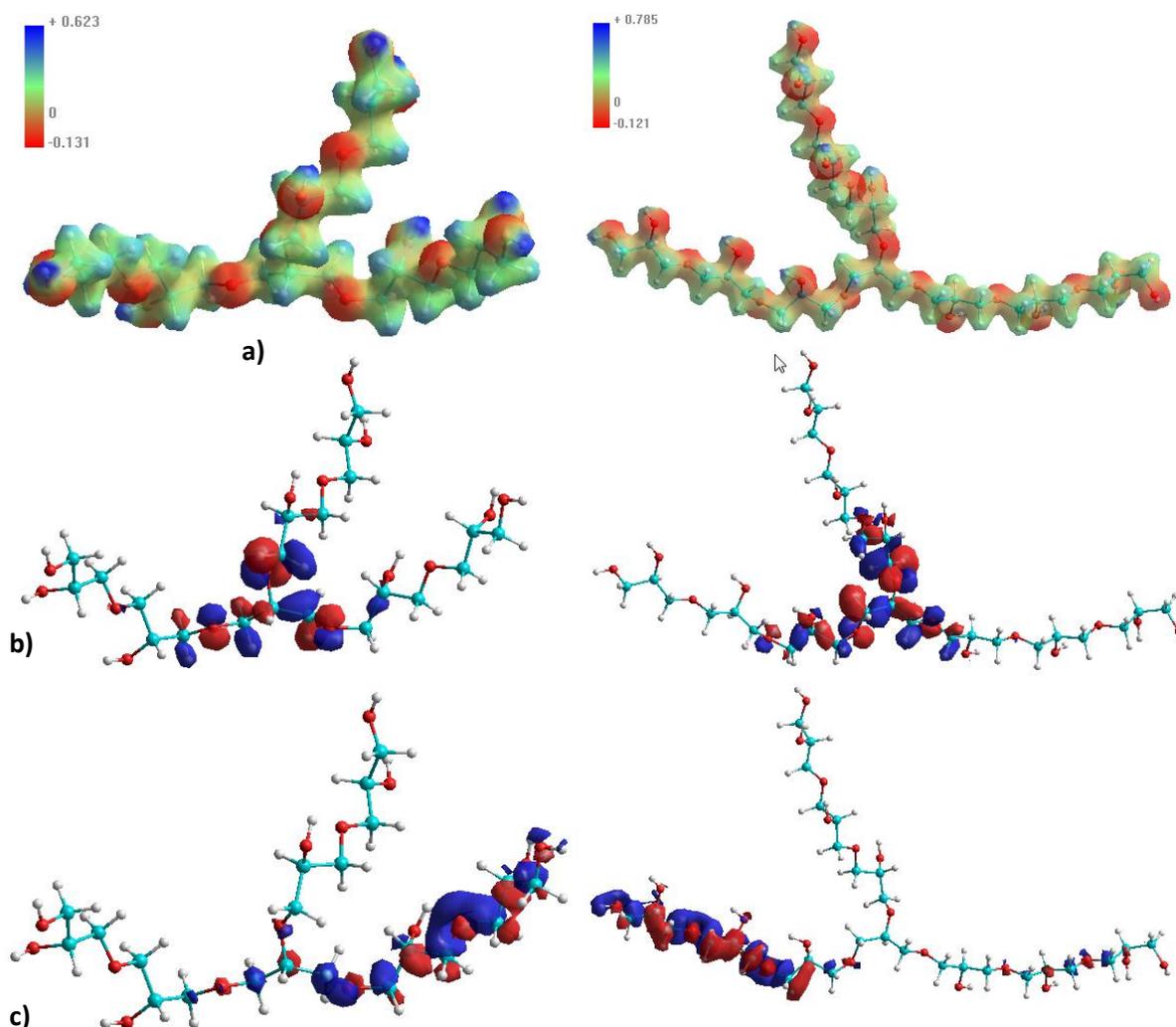


Figura 63 – Dependência do HOMO-LUMO com o número de gerações do PGL. PGL_{g2} (a direita) e PGL_{g3} (a esquerda); a) Mapa de potencial eletrostático, b) HOMO, c) LUMO.

Uma análise detalhada dos segmentos de dendríticos mostraram que as energias de ambos HOMO e LUMO, com três moléculas de haloperidol anexados foi quase o dobro do valor de energia LUMO da molécula haloperidol. Isto fez com que a adição de um quarto fármaco para a secção de dendrímero em estudo fosse muito improvável. Por conseguinte, a carga máxima teórica de um PGL geração 3 com haloperidol encontrado foi de 12. No entanto, os efeitos eletrônicos apenas por si mesmo, são insuficientes para compreender totalmente a carga e a distribuição das moléculas de haloperidol na superfície de PGL. A observação da posição do HOMO, e definição tanto da localização e da disponibilidade do grupo terminal, era necessário para compreender melhor as cargas e a distribuição das moléculas de haloperidol.

Tabela 6 – Valores médios da energia HOMO determinada para o PGL estudado, e diferenças entre o HOMO do dendrímero de geração 3 e o LUMO do HLP (-9,67 eV).

	Energia HOMO (eV)	Energia LUMO (eV)	HOMO-LUMO (GAP) (eV)
Poliglicerol g1	-10,45	2,16	-12,61
Poliglicerol g2	-10,42	2,10	-12,52
Poliglicerol g3	-10,33	2,05	-12,38
Haloperidol	-9,20	-0,67	-8,53
HLP_PGLg1	-9,03	-0,46	-8,56

A adição do primeiro haloperidol é favorável porque os HOMOs dos grupos hidroxila estão disponíveis. Depois que um haloperidol foi covalentemente ligado a um dos grupos terminais, o HOMO está novamente localizado em um grupo hidroxila periférico tornando a adição de uma segunda molécula de haloperidol favorável. Quando duas moléculas de fármaco estão ligados ao dendrímero, torna-se muito menos provável que a adição do terceiro haloperidol ocorra porque existe somente uma possibilidade de 50:50 que HOMO estará disponível para interação com um grupo terminal hidroxila.

A adição de uma quarta molécula haloperidol é muito pouco provável de ocorrer dentro de um mesmo PGL. Assim, a conjugação de moléculas de haloperidol adicionais requer a superação de barreiras de energia cada vez mais elevadas, com posições disponíveis para conjugação estando disponível para apenas metade do tempo. Reações de conjugação adicionais de haloperidol em todo o dendrímeros são muito improváveis porque o gap e as sobreposições de energia entre o LUMO de haloperidol e o HOMO do conjugado recém-formado são grandes, e o grupo terminal de ácido carboxílico não está disponível. Estas

observações baseadas em modelagem molecular são importantes para ajudar no entendimento dos dados experimentais. Em média de seis moléculas de haloperidol foram conjugadas com a superfície de um dendrímero PGA geração 3,0. Como a estrutura do PGA possui maior número de hidroxilas disponíveis para a conjugação, é possível conjugar mais moléculas de HLP ao PGA do que no PGL.

5.2. Dinâmica Molecular do PGL

Um estudo inicial foi feito para avaliar a solvatação dos dendrímeros de gerações: 1, 2 e 3, mas de cadeia lateral. A ideia inicial era a de simular via modelagem por dinâmica molecular no Gromacs a solvatação em meio aquoso destes dendrímeros, do HLP e do HLP conjugado com os dendrímeros de gerações 1, 2 e 3 de cadeia lateral. Na sequência seria estudado a solvatação do HLP conjugado com os dendrímeros hiper ramificados de gerações: 1, 2, 3 e até mesmo 4 se o sistema computacional suportasse, uma vez que a estrutura do PGA_{g4} hiper ramificado é muito grande para uma simulação computacional, além de ser difícil de obter uma estrutura simétrica de mínima energia para grandes estruturas moleculares.

Portanto só foi possível fazer a solvatação para os dendrímeros de cadeia lateral. Não foi possível estudar a solvatação do HLP através do Gromacs, uma vez que o programa Mktop que gera o arquivo de topologia das estruturas criadas no Hyperchem e convertidas para o formato pdb, a partir do programa OpenBabel, para simulação no Gromacs, não conseguiu gerar tal arquivo de topologia devido a algum problema com o anel benzênico do HLP. Depois com a atualização automática da versão do Ubuntu, ou devido a outro problema desconhecido, o arquivo Mktop que roda junto com o Gromacs, forneceram incompatibilidade com o mesmo, não sendo mais possível fazer toda a simulação por dinâmica molecular como era esperado inicialmente. Assim foram realizados apenas cálculos de otimização de geometria no Hyperchem, e Log de P no MarvinSketch, para as demais estruturas.

Entretanto, a simulação por dinâmica molecular no Gromacs dos dendrímeros de poliglicerol de cadeia lateral, para as gerações 1, 2 e 3, forneceram alguns resultados interessantes como descritos a seguir.

Para melhor entendimento do comportamento dinâmico desses dendrímeros, simulações de dinâmica molecular foram realizadas para 4,8 ns. Propriedades moleculares incluindo o raio de giração e RMSD foram estimados e representados graficamente como uma função do tempo utilizando a ferramenta de análise de trajetória VegaZZ (**Figura 64**). As propriedades moleculares das gerações de dendrímeros PGLs g1, g2 e g3 seguindo uma trajetória de 4,8 nm foram determinados em água a temperaturas de 298, 310 e 315 K.

A simulação por dinâmica molecular forneceu: o gráfico da função de distribuição radial entre os oxigênios dos grupos hidroxila das moléculas de PGL e os oxigênios das moléculas de água; e mostrou a evolução dos valores da superfície acessível ao solvente (SAS) por molécula de PGL durante o processo de simulação, a fim de obter sistemas com valores de SAS praticamente estáveis com tempos de simulação próximos de 1000 ps, conforme apresentado na (**Figura 64**).

A análise RMSD, como uma medida da flexibilidade e dobradura do dendrímero [141] e [142], foi realizada para todas as estruturas PGL. Um platô foi observado após os primeiros 200 ps (**Figura 64**). Isto significa que a molécula explorou o espaço conformacional com diferenças semelhantes quando comparados com a estrutura inicial tomado como referência para os cálculos RMSD. No entanto, outras alterações no espaço conformacional explorado foram observados, como indicado pelo aumento dos valores RMSD no final da simulação. Apesar de que, o gráfico RMSD atingiu um patamar após 200 ps, valores RMSD de aproximadamente 13 Å indicaram uma estrutura flexível. Este patamar foi consistente com o perfil que foi obtido para o raio de giração, onde, apenas após cerca de 900 ps, flutuações limitadas ocorreram. Estas flutuações indicaram que a forma geral da estrutura não passou por grandes alterações durante o período de simulação.

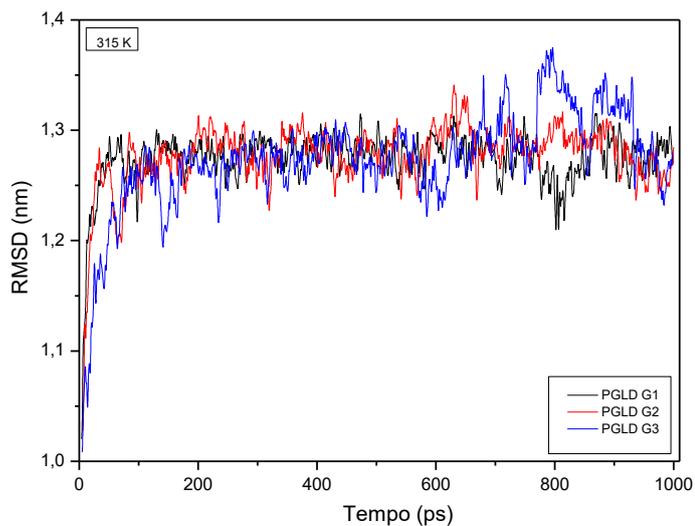
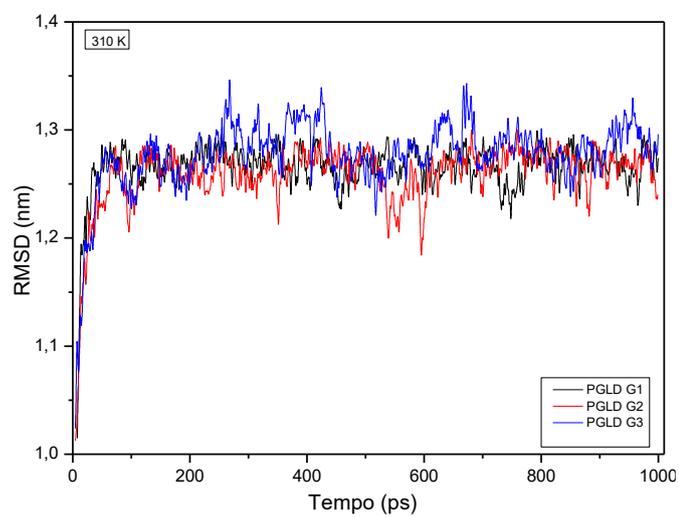
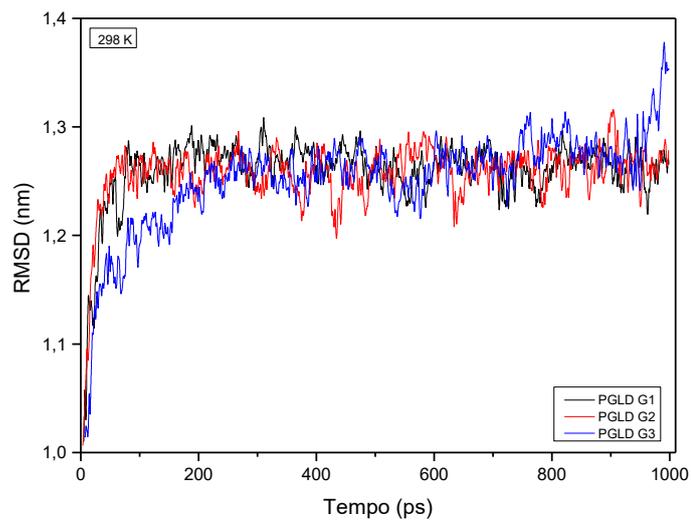
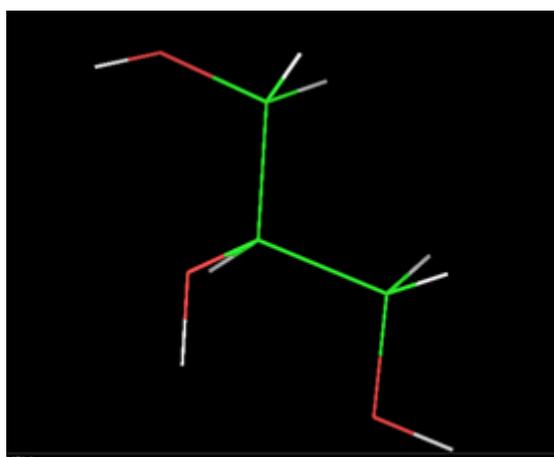
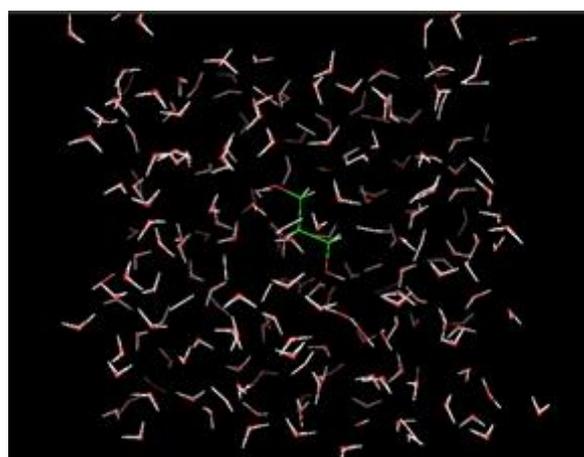


Figura 64 – Propriedades moleculares determinadas para as gerações de dendrímeros PGL, g1, g2 e g3 ao longo de uma trajetória de 4,8 ns. Raiz quadrada média (RMSD) em Angstroms.

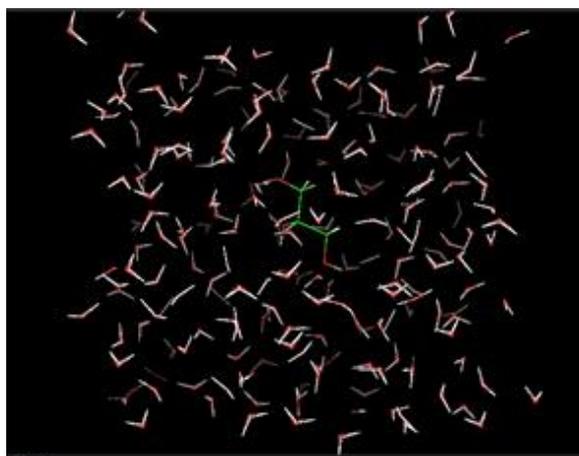
As figuras a seguir mostram a solvatação das moléculas de PGL até a estrutura de decaglicerol que foi o núcleo utilizado para a síntese do PGA. Como a cadeia do PGL_{g4} é grande não foi possível realizar a simulação para o PGL_{g4}, todavia espera-se resultados semelhantes aos dos PGLs do g2 e do g3.



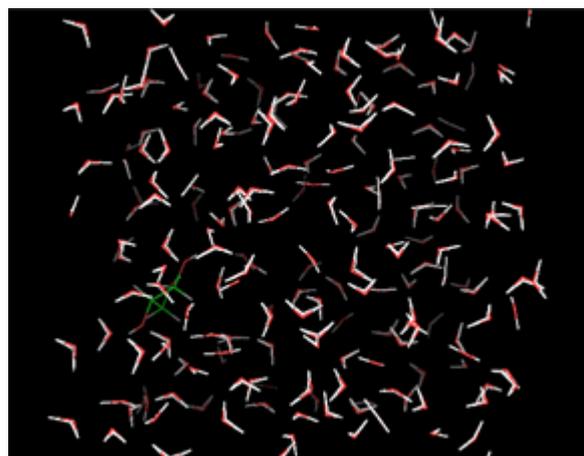
Glicerol



Glicerol inserido na caixa de água pelo Gromacs

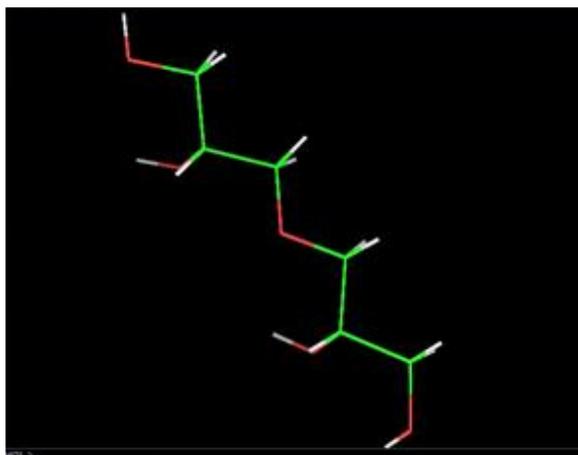


Glicerol após minimizar a energia no Gromacs

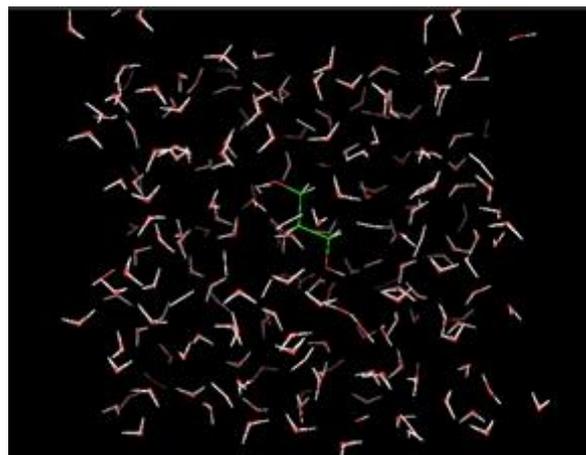


Glicerol após a dinâmica molecular do Gromacs

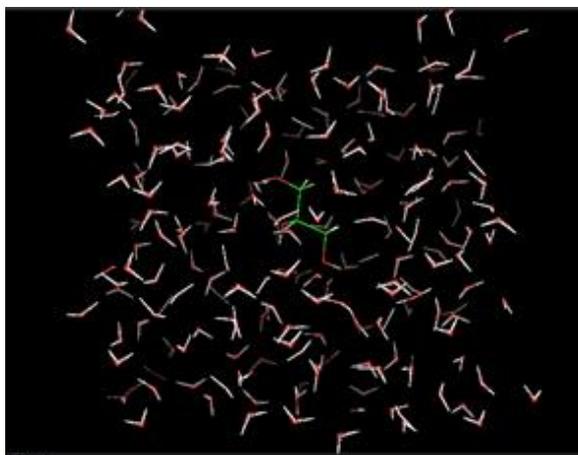
Figura 65 – Dinâmica molecular do glicerol



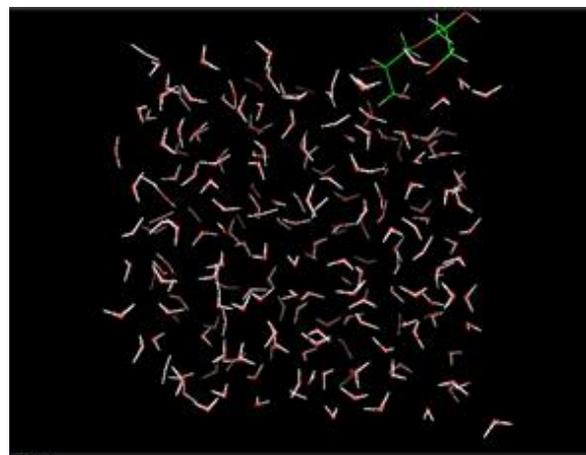
Diglicerol



Diglicerol inserido na caixa de agua pelo Gromacs

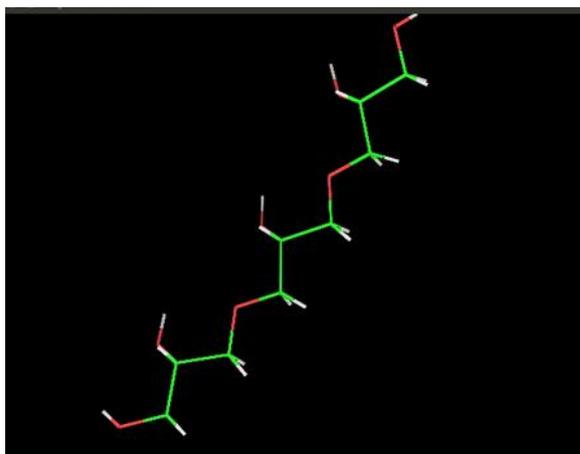


Diglicerol após minimizar a energia no Gromacs

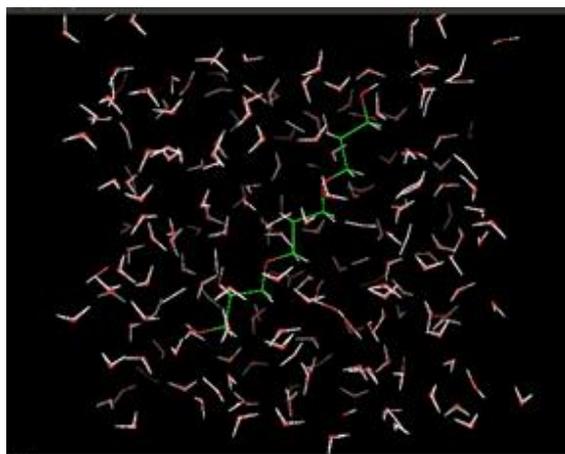


Diglicerol após a dinâmica molecular do Gromacs

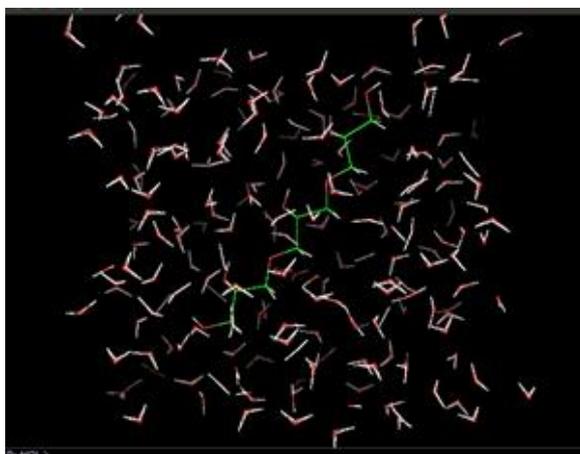
Figura 66 - Dinâmica molecular do diglicerol



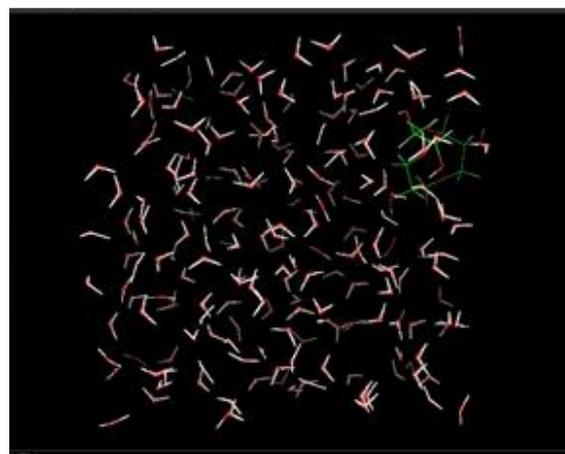
Triglicerol



Triglicerol inserido na caixa de agua pelo Gromacs

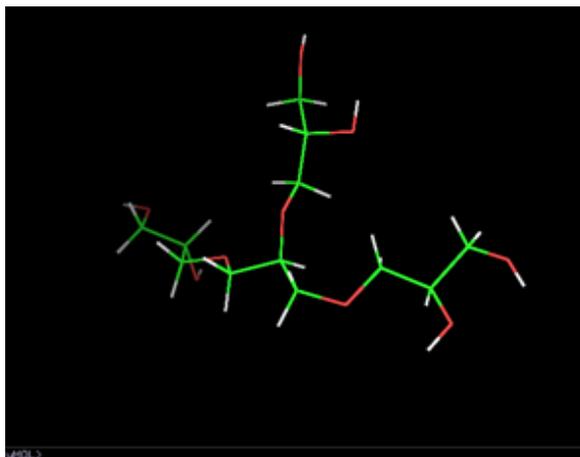


Triglicerol após minimizar a energia no Gromacs

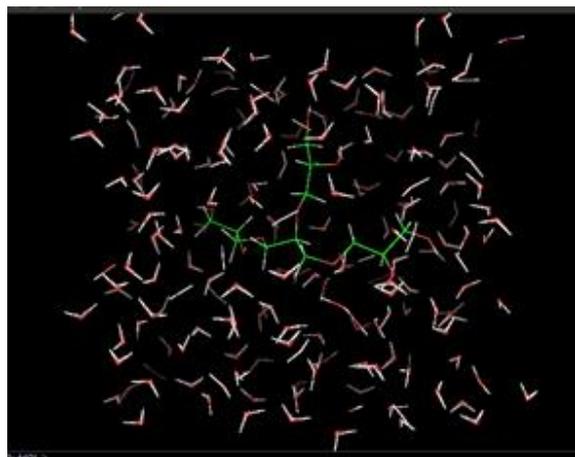


Triglicerol após a dinâmica molecular do Gromacs

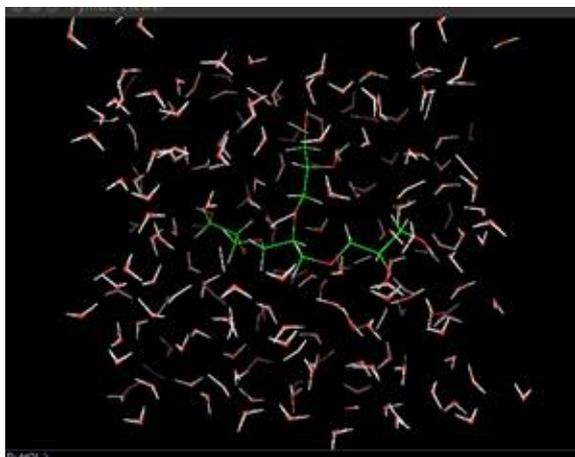
Figura 67 - Dinâmica molecular do triglicerol



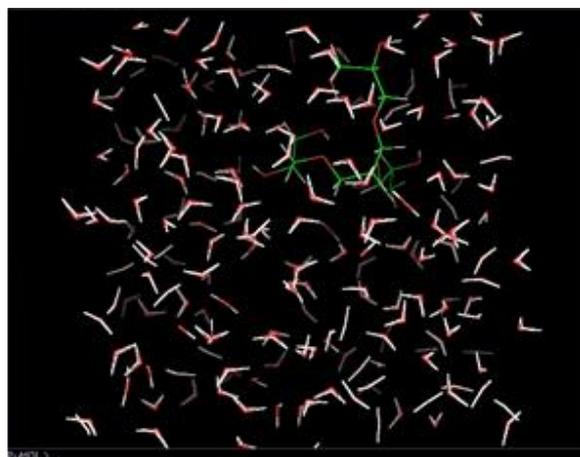
PGLg1 de Cadeia Lateral



PGLg1 inserido na caixa de agua pelo Gromacs

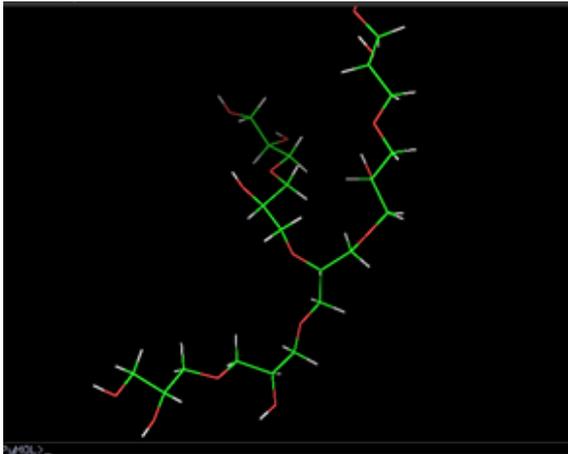


PGLg1 após minimizar a energia no Gromacs

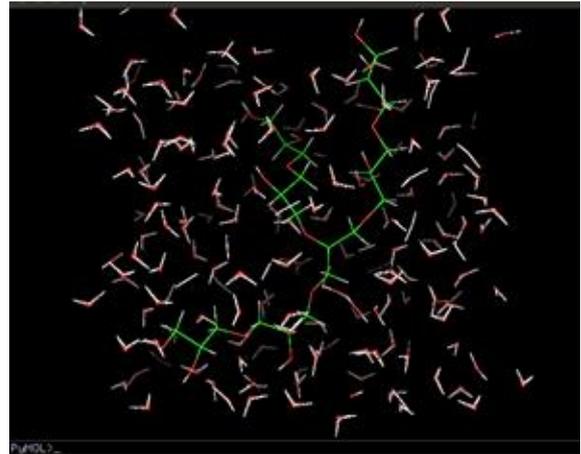


PGLg1 após a dinâmica molecular do Gromacs

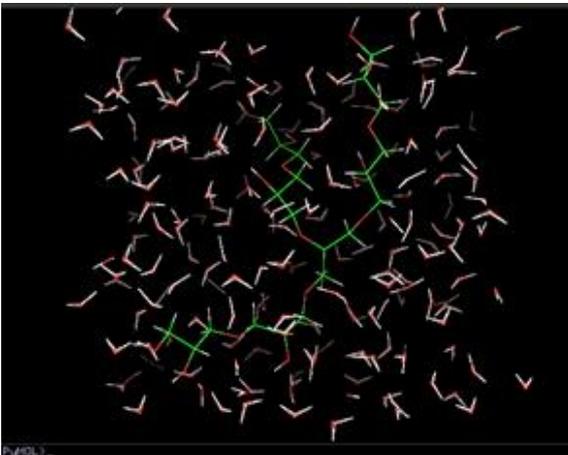
Figura 68 – Dinâmica molecular do PGL_{g1} de cadeia lateral.



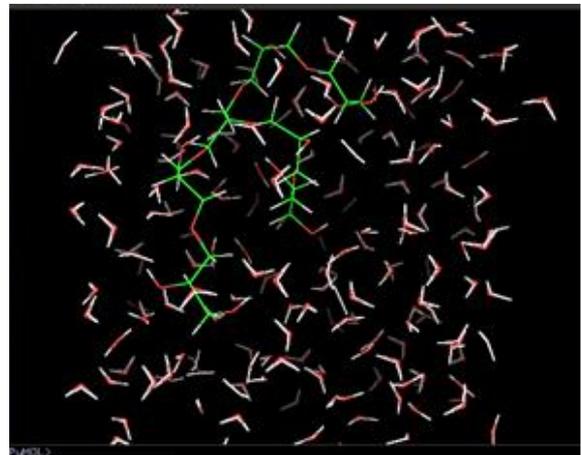
PGLg2 de Cadeia Lateral



PGLg2 inserido na caixa de agua pelo Gromacs

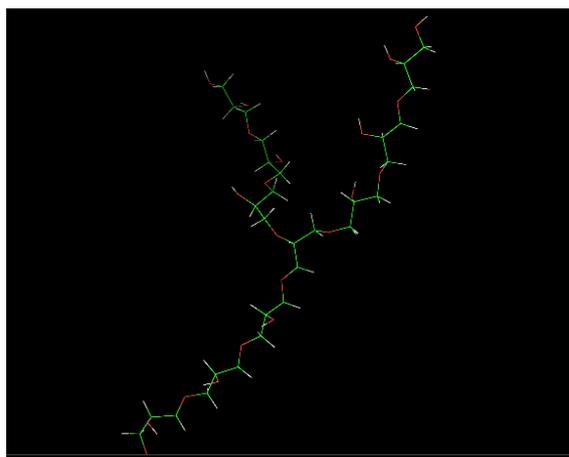


PGLg2 após minimizar a energia no Gromacs

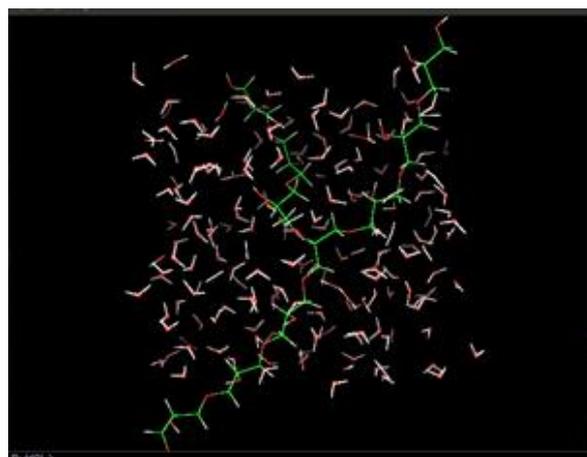


PGLg2 após a dinâmica molecular do Gromacs

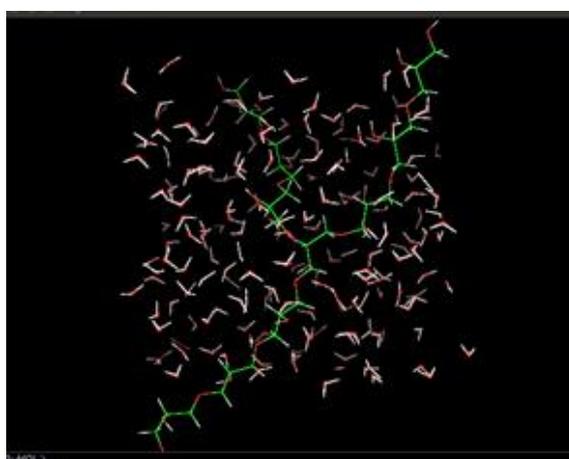
Figura 69 – Dinâmica molecular do PGLg₂ de cadeia lateral.



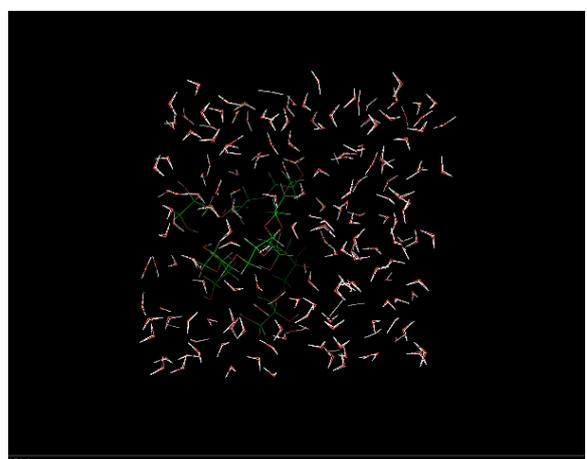
PGLg3 de Cadeia Lateral



PGLg3 inserido na caixa de agua pelo Gromacs



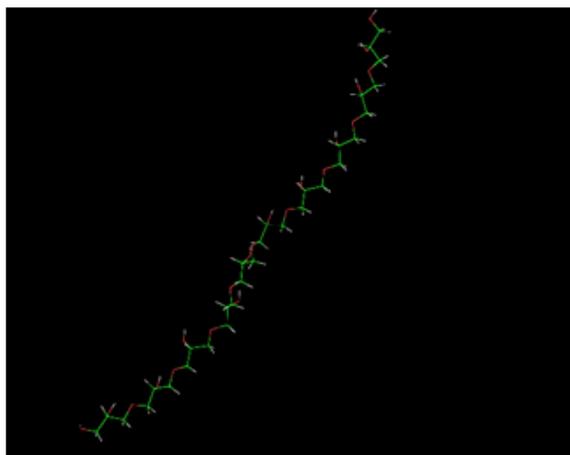
PGLg3 após minimizar a energia no Gromacs



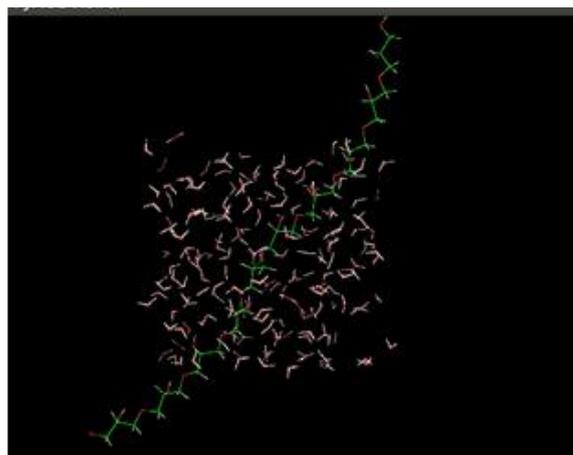
PGLg3 após a dinâmica molecular do Gromacs

Figura 70 – Dinâmica molecular do PGL_{g3} de cadeia lateral.

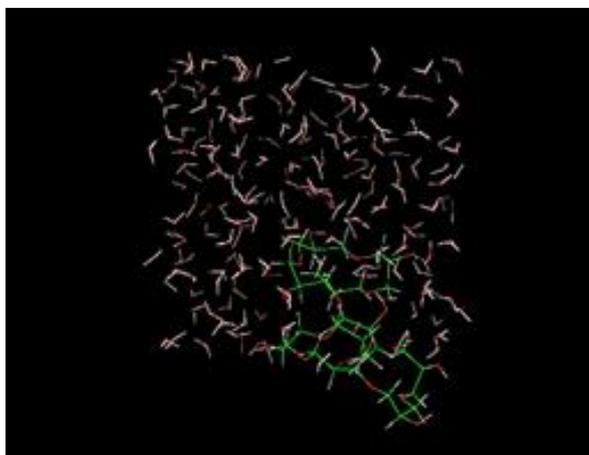
Como se pode observar nas figuras de solvatação das moléculas de PGL, apenas a estrutura do decaglicerol não teve uma boa solvatação em meio aquoso, como se pode observar na **Figura 71**, o decaglicerol acabou expulso da caixa de água. Isso pode ter ocorrido por dois fatores: (i) porque as moléculas de água não foram suficientes para a solvatação do decaglicerol ou (ii) porque como o decaglicerol possui menos hidroxilas disponíveis, sua solvatação é pouco provável de ocorrer.



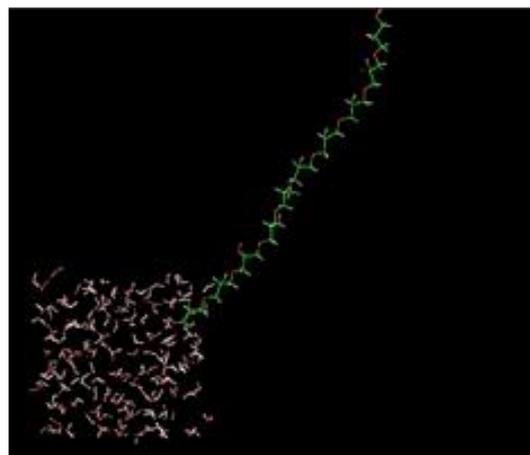
Decaglicerol



Decaglicerol inserido na caixa de água pelo Gromacs



Decaglicerol após minimizar a energia no Gromacs



Decaglicerol após a dinâmica molecular do Gromacs

Figura 71 – Dinâmica molecular do decaglicerol

5.3. Estudo da interação entre o HLP e o PGA

Após esta simulação computacional inicial, com o HLP e com o PGA de cadeia lateral, também foi feito um estudo com o HLP e o PGA de cadeia lateral de segunda geração, para verificar qual grupamento do HLP teria maior interação com o PGA, e avaliar qual relação desta interação com o grupo farmacofórico do medicamento HLP. O FTIR mostrou que há uma predominância da interação por ligação de hidrogênio, entre o HLP e o PGA. No entanto, uma ligação covalente entre PGA e o HLP, poderia mudar a dinâmica de liberação do fármaco, e isso ajudaria na regulação do processo de liberação do fármaco pelo PGA. Uma vez constatado este efeito, uma nova rota de incorporação do fármaco pelo PGA poderia ser elaborada.

Os resultados da simulação computacional estão apresentados na **Tabela 7**. O mapa de potencial eletrostático e os orbitais de fronteira foram determinados para as três estruturas em estudo como mostra a **Figura 72**. A localização dos orbitais Homo e Lumo para as moléculas de Haloperidol, não mudou nos três tipos de ligação que foram feitos.

Tabela 7 – Valores médios das energias HOMO e LUMO determinadas para o PGA, e GAP HOMO-LUMO determinadas para o Haloperidol, PGA_{g2}, e PGA_{g2}-Hal.

	Homo (eV)	Lumo (eV)	GAP Homo-Lumo	Energia Livre (kcal/mol)	Calor de Formação (kcal/mol)	Momento de Dipolo (Debyes)	Log de P	Área da Superfície de Van der Walls
Haloperidol	-9,06	-0,84	-8,22	-111075	-37,75	5,828	2,63	591,21
PGA-G2	-10,61	1,81	-12,42	-331586	-1212,67	9,216	-10,87	1588,43
PGA-G2-Hal-OH	-9,46	-0,91	-8,55	-424383	-1243,49	9,145	-6,04	2050,7
PGA-G2-Hal-F	-9,09	-0,42	-8,67	-421362	-1245,40	10,67	-6,99	2087,0
PGA-G2-Hal-Cl	-9,09	-0,42	-8,67	-424209	-1281,66	8,76	-7,45	2012,0

Os orbitais Homo e Lumo indicam as regiões onde as interações entre o fármaco e o dendrímero devem acontecer, bem como a região que será solvatada pelo fluido fisiológico para fazer a liberação do fármaco. Os orbitais Lumo mostram a região da molécula que é mais reativa. Os orbitais Homo e Lumo no ligante PGA_{g2}-Hal, ficaram localizados somente na região do fármaco. O grupo amina é o grupo farmacofórico de muitos fármacos, todavia nessa primeira análise, o anel benzênico que contém o fluor é a parte da molécula que é mais reativa, e provavelmente deve ser o grupo farmacofórico do haloperidol.

O ligante que teve menor gap de energia foi o PGA_{g2}-Hal-OH, e ao mesmo tempo o maior log P. Somente o Log de P do Haloperidol é positivo. O log de P parece indicar que é possível modelar o mecanismo de liberação do fármaco mudando o elemento do Haloperidol que será ligado ao PGA.

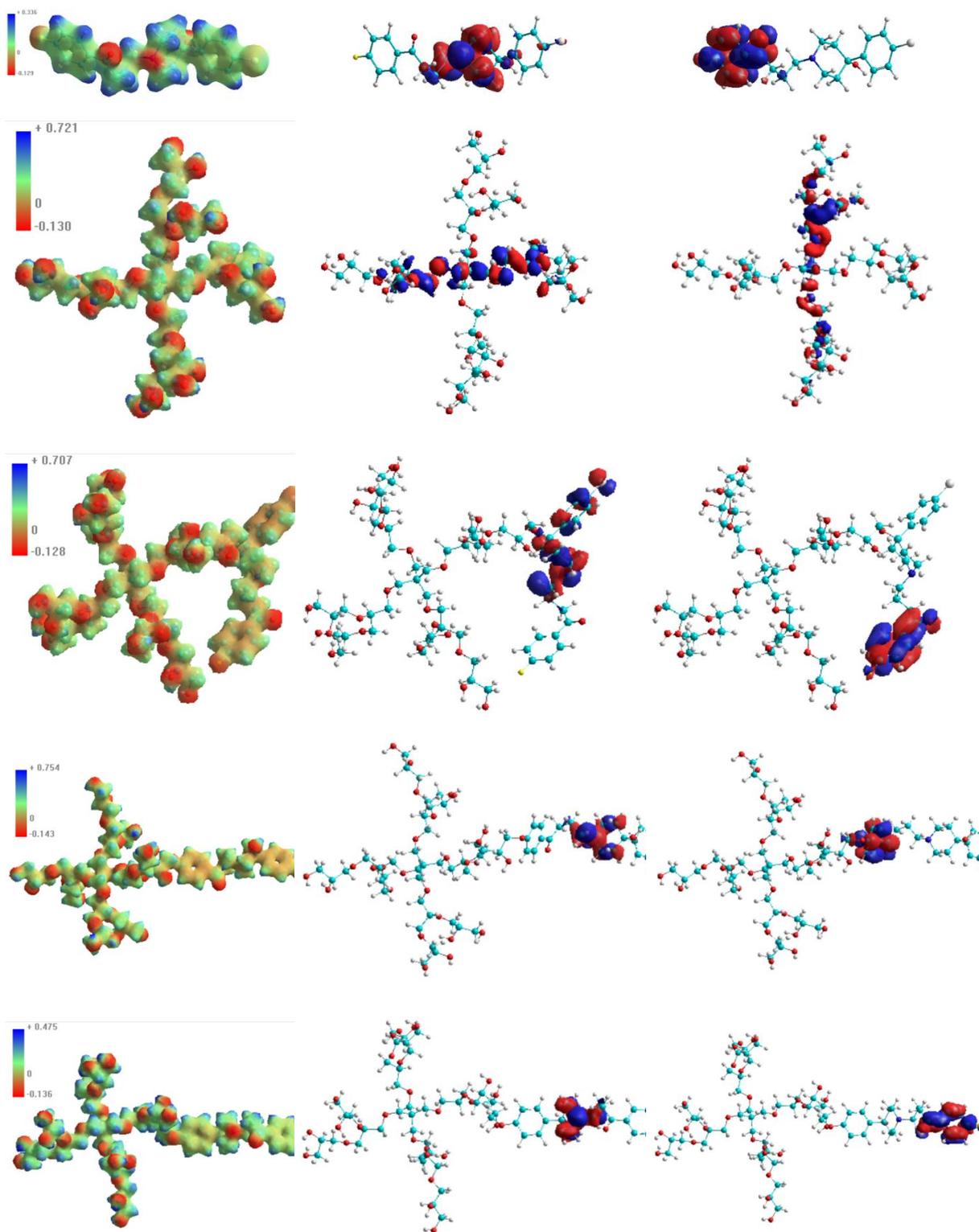


Figura 72 – Mapa de Potencial Eletrostático e localização dos orbitais Homo e Lumo para os diferentes tipos de ligação do $\text{PGA}_{g2}\text{-Hal}$ a) Haloperidol, b) PGA_{g2} , c) $\text{PGA}_{g2}\text{-Hal-OH}$, d) $\text{PGA}_{g2}\text{-Hal-F}$, e) $\text{PGA}_{g2}\text{-Hal-C}$.

A ideia inicial era seguir com estes cálculos no Gromacs para ver na simulação por dinâmica molecular como seria o processo de liberação do fármaco pelo PGA_{g2} . Todavia devido a problemas técnicos com o Gromacs optou-se por deixar esta parte da simulação para um trabalho futuro. Não fosse tais problemas técnicos o estudo teria prosseguido com o PGA_{g3} de terceira geração.

Capítulo 6

Conclusões e Perspectivas Futuras

Este capítulo apresenta os resultados promissores para se implantar o sistema de liberação controlada no tratamento de transtornos psiquiátricos com base conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ e aponta o direcionamento para realização de trabalhos futuros.

6

Conclusões

Perspectivas futuras

6. Conclusões e Perspectivas Futuras

O conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ apresentou resultados promissores, que, embora necessitem de aperfeiçoamento como uma posterior validação *in vivo*, se apresentam como uma alternativa viável como sistema de liberação controlada implantável para o tratamento de transtornos psiquiátricos.

Em relação ao conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$, primeiramente, o objetivo da conjugação do fármaco HLP ao dendrímero através da reação de esterificação foi corroborado pela análise físico-química realizada no produto obtido (FTIR, ^1H -RMN, ^{13}C -RMN e análise térmica (TGA)).

A difração de Raios-X evidenciou um padrão de difração para o $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ essencialmente amorfo, característico dos dendrímeros. A ausência de picos do HLP caracteriza o conjugado como amorfo sugerindo que o fármaco está molecularmente disperso na arquitetura molecular do dendrímero indicando ao mesmo tempo em que o PGA_{g4} mudou a estrutura do HLP para sua forma amorfa.

A análise térmica (TGA/DTG) indicou que o conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ possui estabilidade térmica adequada para o processo da eletrofição. O estudo cinético da degradação térmica indicou que a degradação térmica do conjugado segue bem o modelo de Kissinger, com energia de ativação (E_a) entre 70 kJ/mol e 140 kJ/mol. De modo geral o conjugado, $\text{PGA}_{g4}\text{-HLP}$ apresentou E_a de valor intermediário entre o HLP e o PGA_{g4} , sendo obedecida a relação: $\text{HLP} > \text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP} > \text{PGA}_{g4}$, o que corrobora a ligação covalente do fármaco (HLP) ao dendrímero (PGA_{g4}).

Os parâmetros ajustados para a obtenção das nanofibras eletrofiadas de $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ com diâmetro médio de 290 nm \pm 58 nm foram: distância de 15 cm da placa coletora, fluxo de 0,5 mL/h e tensão aplicada de 20 kV.

Quanto à biocompatibilidade, pode ser inferido a partir dos ensaios de hemocompatibilidade e citotoxicidade que o conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ possui as propriedades de biocompatibilidade adequadas para sua aplicação como sistema de liberação prolongada implantável uma vez que não ativa a hemólise nem possui propriedades citotóxicas.

O estudo da difusão do fármaco hidrolisado do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ eletrofiado revelou que o transporte do HLP próximo da temperatura fisiológica (35 °C) é do tipo não-Fickiano ($n=0,7$) com coeficiente de difusão (D) igual a $2,8 \cdot 10^{-5}$ cm²/s e E_a de 166,7 kJ/mol. Os parâmetros n e D apresentaram dependência da temperatura. Observou-se que enquanto “ n ”

aumenta com a temperatura, aproximando-se do transporte não-Fickiano (Caso II), o coeficiente “D” diminui. As medidas realizadas indicam que os coeficientes de difusão (D) seguem uma representação linear de Arrhenius. Entretanto, a dependência exata de “D” com a temperatura é de difícil solução, pois se dá através da frequência de colisões moleculares sendo necessário para sua solução conhecimentos fundamentais sobre as forças intramoleculares entre o HLP e a arquitetura arborescente.

Com base nos resultados obtidos pode ser afirmado que as membranas eletrofiadas do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ são potenciais candidatas ao desenvolvimento de sistemas implantáveis para a liberação de antipsicóticos para períodos longos de tratamento.

Apesar dos resultados dessa Tese demonstrarem a viabilidade do desenvolvimento de membranas eletrofiadas do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$ para a liberação de psicoterápicos, o seu emprego requer investigações mais aprofundadas. Por exemplo, no estudo da difusão do HLP do conjugado $\text{PGA}_{g4}\text{-c-HLP}$, se observou que a difusão parece ser significativamente afetada pelo aumento da temperatura. Em particular, para um aumento de cerca de 20 °C na temperatura a difusão do HLP hidrolisado da matriz eletrofiada diminuiu quase duas ordens de grandeza (aproximadamente 1,6 vezes). Essa observação parece contrariar a lei de Van ’t Hoff.

Talvez a discrepância observada possa ser atribuída à estrutura micrométrica da membrana eletrofiada. Entretanto, a dependência exata de “D” do HLP com a temperatura é de difícil solução, pois se dá através da frequência de colisões moleculares sendo necessário para sua solução, de conhecimentos fundamentais sobre as forças intramoleculares entre o HLP e a arquitetura arborescente. Ao mesmo tempo, são necessários conhecimentos das forças intermoleculares entre a enzima e o conjugado e as reações cinéticas envolvidas. Ao mesmo tempo, é necessário também se conhecer a influência da arquitetura do conjugado na bioatividade das enzimas existentes no fluído biológico, a exemplo da tripsina. Nesse caso, há a necessidade de que um planejamento experimental seja efetuado para a análise dessa temática em perspectivas futuras.

Referências Bibliográficas

A seguir estão as referências deste Trabalho de Tese.

Referências

Referências Bibliográficas

- [1] FOUDA, M. M. G.; EL-AASSAR, M. R. e AL-DEYAB, S. S. Antimicrobial activity of carboxymethyl chitosan/polyethylene oxide nanofibers embedded silver nanoparticles. *Carbohydrate polymers*, v. 92, n. 2, p. 1012–7, doi:10.1016/j.carbpol.2012.10.047, 2013.
- [2] YUKSELOGLU, S. M.; SOKMEN, N. e CANOGLU, S. Biomaterial applications of silk fibroin electrospun nanofibres. *Microelectronic Engineering*, v. 146, p. 43–47, doi:10.1016/j.mee.2015.04.008, 2015.
- [3] BALDWIN, S. P. e SALTZMAN, W. M. Materials for protein delivery in tissue engineering. v. 33, p. 71–86, 1998.
- [4] BARI, H. A PROLONGED RELEASE PARENTERAL DRUG DELIVERY SYSTEM – AN OVERVIEW. v. 3, n. 1, 2010.
- [5] PELESHANKO, S. e TSUKRUK, V. V. The architectures and surface behavior of highly branched molecules. *Progress in Polymer Science*, v. 33, n. 5, p. 523–580, doi:10.1016/j.progpolymsci.2008.01.003, 2008.
- [6] ZHOU, J. e RITTER, H. Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems. *Polymer Chemistry*, v. 1, n. 10, p. 1552, doi:10.1039/c0py00219d, 2010.
- [7] TOMALIA, D. a. Birth of a new macromolecular architecture: dendrimers as quantized building blocks for nanoscale synthetic polymer chemistry. *Progress in Polymer Science*, v. 30, n. 3-4, p. 294–324, doi:10.1016/j.progpolymsci.2005.01.007, 2005.
- [8] TOMALIA, D. A.; NAYLOR, A. M. e GODDARD, W. A. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 29, n. 2, p. 138–175, doi:10.1002/anie.199001381, 1990.
- [9] FISCHER, M. e VÖGTLE, F. Dendrimers: From Design to Application—A Progress Report. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 38, n. 7, p. 884–905, doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19990401)38:7<884::AID-ANIE884>3.0.CO;2-K, 1999.
- [10] VÖGTLE, F.; RICHARDT, G. e WERNER, N. Front Matter. *Dendrimer Chemistry*. [S.l.]: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. p. i–xi.
- [11] FRÉCHET, J. M. Functional polymers and dendrimers: reactivity, molecular architecture, and interfacial energy. *Science (New York, N.Y.)*, v. 263, n. 5154, p. 1710–5, 1994.
- [12] MALIK, N. et al. Dendrimers: relationship between structure and biocompatibility in vitro, and preliminary studies on the biodistribution of 125I-labelled polyamidoamine dendrimers in vivo. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 65, n. 1-2, p. 133–48, 2000.

- [13] JANSEN, J. F.; BRABANDER-VAN DEN BERG, E. M. DE e MEIJER, E. W. Encapsulation of guest molecules into a dendritic box. *Science (New York, N.Y.)*, v. 266, n. 5188, p. 1226–9, doi:10.1126/science.266.5188.1226, 1994.
- [14] JANSEN, JOHAN F G A AND MAIJER*, E. W. The Dendritic Box: Shape-Selective Liberation of Encapsulated Guests. *J. Am. Chem. Soc.*, v. 117, p. 4417–4418, 1995.
- [15] LIU, M.; KONO, K. e FRÉCHET, J. M. Water-soluble dendritic unimolecular micelles: their potential as drug delivery agents. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 65, n. 1-2, p. 121–31, 2000.
- [16] LANCE J. TWYMAN, ANTHONY E. BEEZER, et Al. The Synthesis of Water Soluble Dendrimers, and their Application as Possible Drug Delivery Systems. *Tetrahedron Letters*, v. 40, p. 1743–1746, 1999.
- [17] BAHADIR, E. B. e SEZGINTÜRK, M. K. Poly(amidoamine) (PAMAM): An emerging material for electrochemical bio(sensing) applications. *Talanta*, v. 148, p. 427–438, doi:10.1016/j.talanta.2015.11.022, 2016.
- [18] QIU, L. Y. e BAE, Y. H. Polymer architecture and drug delivery. *Pharmaceutical research*, v. 23, n. 1, p. 1–30, doi:10.1007/s11095-005-9046-2, 2006.
- [19] HEATH, F.; HARIA, P. e ALEXANDER, C. Varying Polymer Architecture to Deliver Drugs. v. 9, n. 2, p. 235–240, 2007.
- [20] CEVHER, E.; SEZER, A. D. e ÇAĞLAR, E. Ş. Gene Delivery Systems : Recent Progress in Viral and Non-Viral Therapy. 2012.
- [21] Membrana Celular <http://educacao.globo.com/biologia/assunto/fisiologia-celular/membrana-plasmatica.html>. [S.d.].
- [22] KRUEGER, K. P.; BERGER, B. A. e FELKEY, B. Medication Adherence and Persistence : A Comprehensive Review. v. 22, n. 4, p. 313–356, 2005.
- [23] LAM, P. L. e GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, v. 178, p. 25–45, doi:10.1016/j.jconrel.2013.12.028, 2014.
- [24] *R_drug_delivery_thermosensitive.pdf*. . [S.l: s.n.], [S.d.].
- [25] YU, D. X. et al. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem cell reports*, v. 2, n. 3, p. 295–310, doi:10.1016/j.stemcr.2014.01.009, 2014.
- [26] CHUNG, J. H. et al. Whole-Genome Sequencing and Integrative Genomic Analysis Approach on Two 22q11.2 Deletion Syndrome Family Trios for Genotype to Phenotype Correlations. *Human mutation*, v. 36, n. 8, p. 797–807, doi:10.1002/humu.22814, 2015.
- [27] BRENNAND, K. J. et al. Modelling schizophrenia using human induced pluripotent stem cells. *Nature*, v. 473, n. 7346, p. 221–225, doi:10.1038/nature09915, 2011.

- [28] CORBERA, S. et al. Physiological evidence of a deficit to enhance the empathic response in schizophrenia. *European psychiatry: the journal of the Association of European Psychiatrists*, v. 29, n. 8, p. 463–72, doi:10.1016/j.eurpsy.2014.01.005, 2014.
- [29] BASU, A. Cost-effectiveness analysis of pharmacological treatments in schizophrenia: critical review of results and methodological issues. *Schizophrenia research*, v. 71, n. 2-3, p. 445–62, doi:10.1016/j.schres.2004.02.012, 2004.
- [30] SCHMITT, A. et al. Schizophrenia as a disorder of disconnectivity. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience*, v. 261 Suppl , p. S150–4, doi:10.1007/s00406-011-0242-2, 2011.
- [31] TANDON, R.; NASRALLAH, H. a e KESHAVAN, M. S. Schizophrenia, “just the facts” 4. Clinical features and conceptualization. *Schizophrenia research*, v. 110, n. 1-3, p. 1–23, doi:10.1016/j.schres.2009.03.005, 2009.
- [32] MAATZ, A.; HOFF, P. e ANGST, J. Clinical research. p. 43–49, 2015.
- [33] BRADFORD, a. The dopamine and glutamate theories of schizophrenia: A short review. *Current Anaesthesia & Critical Care*, v. 20, n. 5-6, p. 240–241, doi:10.1016/j.cacc.2009.07.008, 2009.
- [34] FREEDMAN, R. review article. 2003.
- [35] PALMER, B. W.; DAWES, S. E. e HEATON, R. K. What do we know about neuropsychological aspects of schizophrenia? *Neuropsychology review*, v. 19, n. 3, p. 365–84, doi:10.1007/s11065-009-9109-y, 2009.
- [36] COSTAFREDA, S. G. et al. Pattern of neural responses to verbal fluency shows diagnostic specificity for schizophrenia and bipolar disorder. *BMC psychiatry*, v. 11, p. 18, doi:10.1186/1471-244X-11-18, 2011.
- [37] Organização Mundial de Saúde (OMS). *Http://www.who.int/mental_health/suicide-prevention/en/ http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx*, n. Acesso 22/10/2015, [S.d.].
- [38] OMS <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. [S.d.].
- [39] SALIZE, H. J. et al. Cost of treatment of schizophrenia in six European countries. *Schizophrenia research*, v. 111, n. 1-3, p. 70–7, doi:10.1016/j.schres.2009.03.027, 2009.
- [40] The United States Pharmacopeia. *Rockville USP Convention*, v. NF XXI edi, n. (USA), p. 1200–01, 1985.
- [41] HAAG, R. e SUNDER, A. An Approach to Glycerol Dendrimers and Pseudo-Dendritic Polyglycerols. p. 2954–2955, 2000.
- [42] SUNDER, A. et al. Controlled Synthesis of Hyperbranched Polyglycerols by Ring-Opening Multibranching Polymerization. p. 4240–4246, 1999.

- [43] KOSKI, a.; YIM, K. e SHIVKUMAR, S. Effect of molecular weight on fibrous PVA produced by electrospinning. *Materials Letters*, v. 58, n. 3-4, p. 493–497, doi:10.1016/S0167-577X(03)00532-9, 2004.
- [44] ZHAO, Y. Y; YANG, Q. B; LU, X. F; WANG, C; WEI, Y. Study on correlation of morphology of electrospun products of polyacrylamide with ultrahigh molecular weight. *J PolymSci, Part B: PolymPhys.*, v. V.43, n. n.16, p. 2190–2195, 2005.
- [45] ZUO, X. et al. Effects of thermal-oxidative aging on the flammability and thermal-oxidative degradation kinetics of tris (tribromophenyl) cyanurate flame retardant PA6 / LGF composites. *Polymer Degradation and Stability*, v. 98, n. 12, p. 2774–2783, doi:10.1016/j.polyimdeggradstab.2013.10.014, 2013.
- [46] JAIN, A. a.; MEHRA, A. e RANADE, V. V. Processing of TGA data: Analysis of isoconversional and model fitting methods. *Fuel*, v. 165, p. 490–498, doi:10.1016/j.fuel.2015.10.042, 2015.
- [47] HENKELMAN, S. et al. Standardization of incubation conditions for hemolysis testing of biomaterials. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, n. 5, p. 1650–1654, doi:10.1016/j.msec.2009.01.002, 2009.
- [48] BRAUNE, S. et al. Are there sufficient standards for the in vitro hemocompatibility testing of biomaterials ? p. 1–9, 2013.
- [49] Biological evaluation of medical devices . Tests for in vitro cytotoxicity, Suíça. *Internantional Organization for Standardization.*, v. Suíça, p. Part 5, 2009.
- [50] THIEL, W. Semiempirical Methods. 2000.
- [51] ALMEIDA, W. B. Métodos Semi-empíricos e Mecânica Molecular. *Química Quântica - Escola de Química Teórica, Dept. de Química – ICEX – Universidade Federal de Minas Gerais*, p. 18–19, 1993.
- [52] JOSHI, B. B. et al. In silico analysis of functional nsSNPs in human TRPC6 gene associated with steroid resistant nephrotic syndrome. *Gene*, v. 572, n. 1, p. 8–16, doi:10.1016/j.gene.2015.06.069, 2015.
- [53] HUMPHREY, W.; DALKE, a e SCHULTEN, K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of molecular graphics*, v. 14, n. 1, p. 33–8, 27–8, 1996.
- [54] *www.shrodinger.com.* . [S.l: s.n.], [S.d.].
- [55] LEVY, R. M. e GALLICCHIO, E. Computer simulations with explicit solvent: recent progress in the thermodynamic decomposition of free energies and in modeling electrostatic effects. *Annual review of physical chemistry*, v. 49, p. 531–67, doi:10.1146/annurev.physchem.49.1.531, 1998.
- [56] ABRAHAM, M. J. et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, v. 2, p. 19–25, doi:10.1016/j.softx.2015.06.001, 2015.

- [57] VEGA, C. et al. Radial distribution functions and densities for the SPC/E, TIP4P and TIP5P models for liquid water and ices I. p. 1450–1456, 2005.
- [58] [HTTPS://WWW.CHEMAXON.COM/](https://www.chemaxon.com/). *Marvin - ChemAxon*. . [S.l: s.n.], [S.d.].
- [59] RABI, I. I. Stories from the early days of quantum mechanics. n. August, 2006.
- [60] SIMPSON, A. J.; SIMPSON, M. J. e SOONG, R. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy and Its Key Role in Environmental Research. 2012.
- [61] ZHAO, J. et al. Neutron intensity modulation and time-focusing with integrated Larmor and resonant frequency techniques. *Applied Physics Letters*, v. 107, n. 11, p. 113508, doi:10.1063/1.4931384, 2015.
- [62] <http://www.cerebromente.org.br/n13/tecnologia/ressonancia.htm>. p. 13, [S.d.].
- [63] MITCHELL, J. e FORDHAM, E. J. Contributed review: nuclear magnetic resonance core analysis at 0.3 T. *The Review of scientific instruments*, v. 85, n. 11, p. 111502, doi:10.1063/1.4902093, 2014.
- [64] GARCÍA-ALVAREZ-COQUE, M. C. et al. On the use of ionic liquids as mobile phase additives in high-performance liquid chromatography. A review. *Analytica chimica acta*, v. 883, p. 1–21, doi:10.1016/j.aca.2015.03.042, 2015.
- [65] FR, C. et al. Revisão. v. 25, n. 4, p. 616–623, 2002.
- [66] CARR, P. W.;; STOLL, D. R. e WANG, X. Liquid Chromatography. p. 1890–1900, 2011.
- [67] ZACS, D. e BARTKEVICS, V. Analytical capabilities of high performance liquid chromatography - Atmospheric pressure photoionization - Orbitrap mass spectrometry (HPLC-APPI-Orbitrap-MS) for the trace determination of novel and emerging flame retardants in fish. *Analytica chimica acta*, v. 898, p. 60–72, doi:10.1016/j.aca.2015.10.008, 2015.
- [68] <http://pfarma.com.br/farmaceutico-industrial/130-cromatografia-liquida-de-alta-eficiencia.html>. p. 130, [S.d.].
- [69] ATAKA, K. e HEBERLE, J. Biochemical applications of surface-enhanced infrared absorption spectroscopy. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 388, n. 1, p. 47–54, doi:10.1007/s00216-006-1071-4, 2007.
- [70] COATES, J. e ED, R. A. M. Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach Interpretation of Infrared Spectra , A Practical Approach. p. 10815–10837, 2000.
- [71] LEVIN, I. W. e BHARGAVA, R. Fourier transform infrared vibrational spectroscopic imaging: integrating microscopy and molecular recognition. *Annual review of physical chemistry*, v. 56, n. 1, p. 429–74, doi:10.1146/annurev.physchem.56.092503.141205, 2005.
- [72] <http://www2.sorocaba.unesp.br/gpm/ftir.htm>. p. 2, [S.d.].

- [73] BAPTISTA, A. C.; BORGES, J. P. e FERREIRA, I. OBTIDAS PELA TÉCNICA DE ELECTROFIAÇÃO. v. 22, p. 2–13, 2010.
- [74] HELFER, G. A. et al. Aplicação de métodos de análise multivariada no controle qualitativo de essências alimentícias empregando espectroscopia no infravermelho médio 1. v. 26, n. 4, p. 779–786, 2006.
- [75] SILVERSTEIN, ROBERT M.; WEBSTER, FRANCIS X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. *Saraiva*, v. Sétima Edi, n. LTC, 2006.
- [76] WIEGAND, J. R.; MATHEWS, L. D. e SMITH, D. A UV – Vis Photoacoustic Spectrophotometer. 2014.
- [77] FARIAS, R. F. De. Química de Coordenação - Fundamentos e Atualidades -. *Editora Átomo*, v. 2ª ed, 2009.
- [78] SKOOG, DOUGLA A., HOLLER, F. JAMES, NIEMAN, T. A. A. Princípios de Análise Instrumental. *Thomson*, v. 5ª Edição., p. São Paulo – SP, 2008.
- [79] DANILATOS, G.; KOLLIA, M. e DRACOPOULOS, V. Transmission environmental scanning electron microscope with scintillation gaseous detection device. *Ultramicroscopy*, v. 150, p. 44–53, doi:10.1016/j.ultramic.2014.11.010, 2015.
- [80] Electron backscatter Kikuchi diffraction in the scanning electron microscope. v. 7, p. 1715–1746, 2002.
- [81] Review : transmission scanning electron microscopy. v. 8, p. 279–285, 1973.
- [82] TORRES, E. a e RAMÍREZ, a J. In situ scanning electron microscopy. *Science and Technology of Welding and Joining*, v. 16, n. 1, p. 68–78, doi:10.1179/136217110X12785889550028, 2011.
- [83] LIANG, Z. et al. Nanoscale surface analysis that combines scanning probe microscopy and mass spectrometry: A critical review. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 75, p. 24–34, doi:10.1016/j.trac.2015.07.009, 2016.
- [84] RUSSIN, W. Scanning Electron Microscopy for the Life Sciences. Heide Schatten (Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2013, 261 pages. ISBN: 978-0-521-19599-7 (Hardcover). *Microscopy and Microanalysis*, v. 20, n. 01, p. 313, doi:10.1017/S1431927613014062, 2014.
- [85] CHENG, S. Z. D. et al. Thermal analysis : the next two decades. v. 355, p. 59–68, 2000.
- [86] SHAZLY, J.; WAHSH, S. e YASSIN, a. Thermal modeling of an AFPMSM: A review. *Journal of Electrical Systems and Information Technology*, v. 2, n. 1, p. 18–26, doi:10.1016/j.jesit.2015.03.003, 2015.
- [87] WENDHAUSEN, P. A. P. A n á l i s e s T é r m i c a s. [S.d.].
- [88] OZAWA, T. Thermal analysis Ð review and prospect. v. 355, n. July 1999, p. 35–42, 2000.

- [89] ERICKSON, B. E. *The Many Faces of Thermal Analysis*. 1999.
- [90] REDFERN, J. P. *Thermogravimetric Analysis*. v. 1, n. 906, [S.d.].
- [91] OZAWA, T. Kinetic analysis by repeated temperature scanning . Part 1 . Theory and methods. v. 356, p. 173–180, 2000.
- [92] SUNDARAMURTHI, P. e SURYANARAYANAN, R. Calorimetry and complementary techniques to characterize frozen and freeze-dried systems. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, n. 5, p. 384–95, doi:10.1016/j.addr.2011.12.004, 2012.
- [93] ARTICLES, R.; DOOREN, A. A. Van e MILLER, B. W. Purity determinations scanning calorimetry of drugs with differential critical review. v. 20, p. 217–233, 1984.
- [94] SCHAWWE, J. E. K. *acta A comparison of different evaluation methods in modulated temperature DSC*. v. 260, p. 1–16, 1995.
- [95] SIMON, S. L. Temperature-modulated differential scanning calorimetry: theory and application. v. 374, p. 55–71, 2001.
- [96] CENLER, T. R. *thermochimica acta Linearity and non-linearity A critique on modulated in DSC : DSC **. v. 253, n. 94, 1995.
- [97] SHARMA, P. e NANDI, T. X-ray spectroscopy: An experimental technique to measure charge state distribution during ion–solid interaction. *Physics Letters A*, v. 380, n. 1-2, p. 182–187, doi:10.1016/j.physleta.2015.09.031, 2016.
- [98] PFENNIG, D. W. et al. Simultaneous Femtosecond X-ray. n. April, p. 491–496, 2013.
- [99] SEVEN, S. e ERDOĞAN, H. Energy dependence of photon-induced $K\alpha$ and $K\beta$ x-ray production cross-sections for some elements with $42 \leq Z \leq 68$ in the energy range 38–80keV. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 117, p. 1–6, doi:10.1016/j.radphyschem.2015.07.005, 2015.
- [100] PALMER, B. A. et al. X-ray birefringence imaging. [S.d.].
- [101] ANGAMMANA, C. J. e JAYARAM, S. H. A Theoretical Understanding of the Physical Mechanisms of Electrospinning. p. 1–9, 2011.
- [102] THIEL, W. Nobel 2013. *Nature*, p. 2–3, 2013.
- [103] BOOK MODELAGEM LEACH, A. R. Molecular modelling PRINCIPLES AND APPLICATIONS. *Pearson Education, New York.*, p. 2001, 2001.
- [104] HURT, R. e ISLAND, R. Book Re V iews. v. 123, n. 41, p. 10141–10146, 2001.
- [105] CICHERO, E. et al. Homology modeling, docking studies and molecular dynamic simulations using graphical processing unit architecture to probe the type-11 phosphodiesterase catalytic site: a computational approach for the rational design of selective inhibitors. *Chemical biology & drug design*, v. 82, n. 6, p. 718–31, doi:10.1111/cbdd.12193, 2013.

[106] LUNDBORG, M. e LINDAHL, E. Automatic GROMACS Topology Generation and Comparisons of Force Fields for Solvation Free Energy Calculations. 2015.

[107] MAGARKAR, A. *Molecular Dynamics Simulations of Drug Delivery Liposomes and Their Interactions With Bloodstream Elements* Aniket Magarkar *Molecular) dynamics) simulations) of) drug) delivery) liposomes) and) their) interactions) with) bloodstream) elements)*. [S.l: s.n.], [S.d.].

[108] SIVAIHAH, M. V. et al. Recent developments in acid and base-catalyzed etherification of glycerol to polyglycerols. *Catalysis Today*, v. 198, n. 1, p. 305–313, doi:10.1016/j.cattod.2012.04.073, 2012.

[109] RUPPERT, A. M. et al. Glycerol etherification over highly active CaO-based materials: new mechanistic aspects and related colloidal particle formation. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, v. 14, n. 7, p. 2016–24, doi:10.1002/chem.200701757, 2008.

[110] NIMLOS, M. R. et al. Mechanisms of Glycerol Dehydration. p. 6145–6156, 2006.

[111] HIGASHIHARA, T. et al. Synthesis of hyperbranched polymers with controlled degree of branching. *Polymer Journal*, v. 44, n. 1, p. 14–29, doi:10.1038/pj.2011.99, 2011.

[112] TOMALIA, D. a.; NAYLOR, A. M. e GODDARD, W. a. Starburst Dendrimers: Molecular-Level Control of Size, Shape, Surface Chemistry, Topology, and Flexibility from Atoms to Macroscopic Matter. *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 29, n. 2, p. 138–175, doi:10.1002/anie.199001381, 1990.

[113] WYATT, V. T. e STRAHAN, G. D. Degree of Branching in Hyperbranched Poly(glycerol-co-diacid)s Synthesized in Toluene. *Polymers*, v. 4, n. 4, p. 396–407, doi:10.3390/polym4010396, 2012.

[114] LU, Y. et al. A simple model for the anomalous intrinsic viscosity of dendrimers. *Soft Matter*, v. 6, n. 12, p. 2619, doi:10.1039/c0sm00061b, 2010.

[115] VOIT, B. Hyperbranched polymers—All problems solved after 15 years of research? *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 43, n. 13, p. 2679–2699, doi:10.1002/pola.20821, 2005.

[116] RAHMAN, N. R. A. K. and H. STUDIES ON THE DEVELOPMENT OF SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF. v. 35, n. 2, p. 392–397, 2012.

[117] YASIR, M. e SARA, U. V. S. Solid lipid nanoparticles for nose to brain delivery of haloperidol: In vitro drug release and pharmacokinetics evaluation. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, p. 1–10, doi:10.1016/j.apsb.2014.10.005, 2014.

[118] Site <http://apps.who.int/phint/en/p/docf/>. [S.d.].

[119] EL-HABEEB, A. a.; AL-SAIF, F. a. e REFAT, M. S. Charge transfer complex of some nervous and brain drugs – Part 1: Synthesis, spectroscopic, analytical and biological studies on

the reaction between haloperidol antipsychotic drugs with π -acceptors. *Journal of Molecular Structure*, v. 1034, p. 1–18, doi:10.1016/j.molstruc.2012.08.045, 2013.

[120] BOUDOU, J.-P. et al. Hyperbranched polyglycerol modified fluorescent nanodiamond for biomedical research. *Diamond and Related Materials*, v. 38, p. 131–138, doi:10.1016/j.diamond.2013.06.019, 2013.

[121] SALEHPOUR, S. e DUBÉ, M. a. Reaction Monitoring of Glycerol Step-Growth Polymerization Using ATR-FTIR Spectroscopy. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 6, n. 2-3, p. 85–92, doi:10.1002/mren.201100071, 2012.

[122] JEONG, J.-C.; LEE, J. e CHO, K. Effects of crystalline microstructure on drug release behavior of poly(ϵ -caprolactone) microspheres. *Journal of Controlled Release*, v. 92, n. 3, p. 249–258, doi:10.1016/S0168-3659(03)00367-5, 2003.

[123] MURDANDE, S. B. et al. Aqueous solubility of crystalline and amorphous drugs: Challenges in measurement. *Pharmaceutical development and technology*, v. 16, n. 3, p. 187–200, doi:10.3109/10837451003774377, 2011.

[124] LI DESTRI, G. et al. How molecular interactions affect crystal morphology: the case of haloperidol. *Journal of pharmaceutical sciences*, v. 100, n. 11, p. 4896–906, doi:10.1002/jps.22654, 2011.

[125] HEATLEY, F. A ^{13}C NMR Study of the Products and Mechanism of the Thermal Oxidative Degradation of Poly (ethylene oxide). p. 2273–2280, doi:10.1002/macp.v203, 2002.

[126] SHAMSIPUR, M. et al. Thermal stability and decomposition kinetic studies of acyclovir and zidovudine drug compounds. *AAPS PharmSciTech*, v. 14, n. 1, p. 287–93, doi:10.1208/s12249-012-9916-y, 2013.

[127] SOC, J. C. et al. Reaction Kinetics. *Analytical Chemistry*, v. 29, n. 1956, p. 1702, 1957.

[128] GUIDANCE, D. *Use of International Standard ISO - 1 10993, "Biological Evaluation of 2 Medical Devices Part 1: Evaluation 3 and Testing*. [S.l: s.n.], 2013.

[129] SEIDL, K. e ZINKERNAGEL, A. S. The MTT assay is a rapid and reliable quantitative method to assess *Staphylococcus aureus* induced endothelial cell damage. *Journal of microbiological methods*, v. 92, n. 3, p. 307–9, doi:10.1016/j.mimet.2012.12.018, 2013.

[130] Norma NP EN ISO 10993-4: 2002 – “Avaliação Biológica dos Dispositivos Médicos, Parte 4: Selecção de testes para interacções com o sangue.” p. 10993, 2002.

[131] *Norma ASTM F 756 - Assessment of Hemolytic Properties of Materials*. . [S.l: s.n.], [S.d.].

[132] OLIVEIRA, S. DE e SALDANHA, C. An overview about erythrocyte membrane. *Clinical hemorheology and microcirculation*, v. 44, n. 1, p. 63–74, doi:10.3233/CH-2010-1253, 2010.

[133] ANDERSON, D. R.; DAVIS, J. L. e CARRAWAY, K. L. Calcium-promoted Membrane Changes of the Human. v. 252, n. 19, 1977.

[134] Norma ASTM F 756- 00; "Assessment of Hemolytic Properties of Materials" , American Society of Testing and Materials, "Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials,."p. 756, [S.d.].

[135] *ASTM 756.pdf*. . [S.l: s.n.], [S.d.].

[136] HUDSON, C. J.; SEEMAN, P. e SEEMAN, M. V. Parkinson's disease: low-dose haloperidol increases dopamine receptor sensitivity and clinical response. *Parkinson's disease*, v. 2014, p. 684973, doi:10.1155/2014/684973, 2014.

[137] CERA, E. DI. Serine proteases. *IUBMB life*, v. 61, n. 5, p. 510–5, doi:10.1002/iub.186, 2009.

[138] TRYPSIN, O. F. et al. The Mechanism of the Specificity of Trypsin Catalysis. v. 239, n. 5, p. 1388–1395, 1964.

[139] ABRAHAM, G. A. e QUEIROZ, A. A. A. De. Immobilization of a nonsteroidal antiinflammatory drug onto commercial segmented polyurethane surface to improve haemocompatibility properties. v. 23, p. 1625–1638, 2002.

[140] REACTIOI, C. MO : E Role of Frontier Orbitals In. v. 218, n. 4574, p. 747–754, 1982.

[141] N. MAIOROV, and F. M. C. V. Significance of Root-Mean-Square Deviatio in Comparing Three-dimensional Structures of Globular Proteins. *J. Mol. Bio*, v. 235, p. 625–634, 1994.

[142] PAZUKI, G. R.;; TAGHIKHANI, V. e VOSSOUGH, M. Contribution Model. p. 4109–4118, 2009.