

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

LAYDE TEIXEIRA DE CARVALHO

Modificação química de pululana e seu uso na produção de partículas para
sistemas de liberação controlada de Indometacina

Lorena
2019

LAYDE TEIXEIRA DE CARVALHO

Modificação química de pululana e seu uso na produção de partículas para sistemas de liberação controlada de Indometacina

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-graduação em Engenharia Química na área de Desenvolvimento de Produtos e Processos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Simone de Fátima Medeiros Sampaio

Versão Corrigida

Lorena
2019

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

Ficha catalográfica elaborada pelo
Sistema Automatizado da Escola de
Engenharia de Lorena, com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho, Layde Teixeira de
Modificação química de pululana e seu uso na
produção de partículas para sistemas de liberação
controlada de Indometacina / Layde Teixeira de
Carvalho; orientadora Simone de Fátima Medeiros
Sampaio - Versão Corrigida. - Lorena, 2019.
99 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2019

1. Pululana. 2. Poli(?-caprolactona). 3. Poli(3
hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato). 4. Cuaac. 5.
Partículas. I. Título. II. Sampaio, Simone de Fátima
Medeiros, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado força para enfrentar e superar os desafios encontrados ao longo do Mestrado.

Aos meus pais, Yara e José Antônio, meus irmãos, Livia e Caio e meus cunhados, Erick e Mariane, que me proporcionaram suporte, apoio, e palavras de ânimo e incentivo para que não me abatesse perante as dificuldades encontradas.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório que fiz durante o Mestrado, Rodolfo, Gizelda, Maria Luiza, Ana Júlia, Isabella, Ludmila, Gabriel, Alessandro, Thiago, Guilherme, Pedro e Adriano, por compartilhar comigo as tarefas do dia-a-dia, me proporcionando momentos de alegria e me incentivando com palavras de esperança e coragem.

Aos meus amigos, Caio, Michele e Matheus que mesmo não estando comigo no laboratório, me ouviram, me incentivaram, acreditaram em mim e estiveram presentes sempre que puderam ao longo de todo o Mestrado.

Ao Prof. Dr. Richard Landers, à Profa. Dra. Jayne Carlos Barbosa, ao Prof. Dr. Fábio Florenzano e ao Dr. Marcelo Alves Ferreiras, aos alunos do laboratório de Plasma da Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (FEG/UNESP), pela disponibilidade, paciência e boa vontade na realização das análises, que tanto me foram úteis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de demanda social, cujo auxílio foi indispensável para a elaboração deste trabalho.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Simone de Fátima Medeiros Sampaio cujo auxílio durante todo meu Mestrado foi de extrema importância para a concretização desse trabalho, me sugerindo novas ideias e ao mesmo tempo permitindo que eu tivesse autonomia para buscar novos caminhos.

A todos aqueles que estiveram de certa forma, envolvidos ajudando, motivando e acreditando neste trabalho.

“Comecei a entender que a caneta e as palavras podem ser muito mais poderosas do que metralhadoras, tanques ou helicópteros. Estávamos aprendendo a lutar. E a perceber como somos poderosos quando nos manifestamos”. Malala Yousafzai (2013).

RESUMO

CARVALHO, L. T. **Modificação química de pululana e seu uso na produção de partículas para sistemas de liberação controlada de Indometacina.** 2019. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Sistemas carreadores de princípios ativos visam modificar as propriedades físico-químicas limitantes dos fármacos, melhorando, desta forma, a sua farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição nos tecidos) e reduzindo os seus efeitos toxicológicos (toxicidade local e sistêmica). A modificação da permeabilidade e solubilidade de um princípio ativo é um fator crucial para melhorar sua administração e aumentar sua biodisponibilidade. Nesse contexto, o principal objetivo deste trabalho consiste no preparo de partículas a partir de copolímeros anfifílicos enxertados, biocompatíveis e biodegradáveis, para favorecer a administração e prolongar a liberação de princípios ativos. Os copolímeros anfifílicos foram obtidos a partir da modificação química da pululana (Pull) com poli(ϵ -caprolactona) (PCL), ou poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) (PHBHV), via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre alcino e azida ou *CuAAC*. Primeiramente, as hidroxilas da pululana foram parcialmente modificadas com brometo de 2-bromopropanoíla. Em seguida, os átomos de bromo foram substituídos por grupos azida, através da reação com azida de sódio. Em paralelo, a PCL e o PHBHV foram funcionalizados com grupos alcino. Através da reação de cicloadição 1,3-dipolar, a PCL, ou o PHBHV, foram, então, enxertados nas cadeias de pululana. Os polímeros foram caracterizados pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN ^1H), Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS) e Difractometria de Raios-X (DRX), entre outras, as quais confirmaram a modificação química prevista em cada etapa. A concentração de agregação crítica (CAC) foi avaliada através da análise de fluorescência, obtendo-se um valor igual a $6,6 \cdot 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$. Finalmente, a pululana-*graft*-poli(ϵ -caprolactona) (Pull-*g*-PCL) foi utilizada para o preparo de partículas poliméricas biodegradáveis, e encapsulação de indometacina, através do método de diálise. As partículas foram avaliadas em termos de diâmetro médio (DP), polidispersidade e morfologia, através das técnicas de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM). Foram obtidas partículas com DP de 220,0 e 273,7 nm, com e sem indometacina, respectivamente. A eficiência de encapsulação da indometacina foi de 35,5 %. A cinética de liberação da indometacina foi avaliada *in vitro* a 37 °C e em pH 7,4, apresentando um perfil de liberação descrito pelo modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, com expoente de liberação *n* igual a 0,8, o que indica uma difusão anômala, ou seja, um mecanismo de difusão não-Fickiano. Quando comparados os valores de constante cinética de dissolução da indometacina livre observa-se a eficiência do copolímero anfifílico no controle da liberação *in vitro* do fármaco. As partículas preparadas apresentaram potencial para aplicação em sistemas de liberação controlada de princípios ativos hidrofóbicos.

Palavras-chave: Pululana. Poli(ϵ -caprolactona). Poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*). *CuAAC*. Partículas. Indometacina.

ABSTRACT

CARVALHO, L. T. **Chemical modification of pullulan and its application on the particles preparation for controlled release systems of Indomethacin.** 2019. 99 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena.

The novel active principle delivery systems aim to modify the limiting physicochemical properties of the drugs, thus improving their pharmacodynamics (enhanced therapeutic effect), pharmacokinetics (controlled absorption and distribution in tissues) and reducing their toxicological effects (local and systemic toxicity). The modification of the permeability and solubility of an active principle is a crucial factor to improve its administration and increase its bioavailability. In this context, the main objective of this work is to prepare particles from grafted, biocompatible and biodegradable amphiphilic copolymers to facilitate administration and to prolong the release of active principles. The amphiphilic copolymers were obtained from the chemical modification of pullulan with poly(ϵ -caprolactone) (PCL), or poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBHV), via the 1,3-dipolar cycloaddition reaction between alkyne and azide or CuAAC. Firstly, the pullulan hydroxyls were partially modified with 2-bromopropanoate bromide. Then the bromine atoms were replaced by azide groups, by reaction with sodium azide. Meanwhile, PCL and PHBHV were functionalized with alkyne groups. Then PCL, or PHBHV, was grafted onto the pullulan chains through CuAAC reaction. The polymer was characterized by Proton Nuclear Magnetic Resonance (^1H NMR), Fourier-Transform Infrared (FTIR), Differential Scanning Calorimetry (DSC), X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and X-Ray Diffraction (XRD), among others, which confirmed the chemical modification expected in each step. The critical aggregation concentration (CAC) was evaluated by fluorescence analysis, resulting in a critical concentration of $6.6 \cdot 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$. Finally, pullulan-graft-poly(ϵ -caprolactone) (Pull-g-PCL) was used for the preparation of biodegradable polymeric particles, and encapsulation of indomethacin, through the dialysis method. The particles were evaluated in terms of mean diameter (DP), polydispersity and morphology, using Dynamic Light Scattering (DLS) and Transmission Electron Microscopy (TEM) techniques. Particles were obtained with DP of 220.0 and 273.7 nm, with and without indomethacin, respectively. Indomethacin encapsulation efficiency was 35.5%. Indomethacin release kinetics were evaluated in vitro at 37°C and pH 7.4, resulting in a profile release described by the Korsmeyer-Peppas equation, with a release exponent n of 0.8, which indicates an anomalous diffusion, or non-Fickian mechanism. When comparing the constant values of the free indomethacin dissolution kinetic, the efficiency of the amphiphilic copolymer in drug release control was observed. The prepared particles presented potential for application in controlled release systems of hydrophobic active.

Keywords: Pullulan. Poly(ϵ -caprolactone). Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). CuAAC. Particles. Indomethacin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Comparação entre os níveis de concentração atingidos através de diferentes dosagens de fármaco: (a) dose oral, (b) overdose oral, (c) intravenosa, (d) liberação controlada ideal.	21
Figura 3.1 Estrutura química da pululana.	26
Figura 3.2 Estrutura química do poli(3-hidroxitbutirato-co-3-hidroxitvalerato) (PHBHV).	28
Figura 3.3 Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona) (PCL).	30
Figura 3.4 Mecanismo proposto para síntese regioseletiva de 1,2,3-triazóis 1,4-substituídos catalisada por Cu (I).	34
Figura 4.1 Fluxograma das etapas da metodologia realizadas.	40
Figura 4.2 Polimerização por abertura de anel da ϵ -CL em tolueno iniciada por álcool propargílico.	41
Figura 4.3 Reação de redução de massa molar do PHBHV via transesterificação com álcool propargílico catalisada pelo dibutil-dilaurato de estanho.	42
Figura 4.4 Esquema de reação de funcionalização da pululana com BPB.	43
Figura 4.5 Esquema da reação de substituição dos grupos bromo da pululana por grupos azida.	44
Figura 4.6 Representação da reação de enxertia da PCL nas cadeias de pululana, via CuAAC.	45
Figura 4.7 Representação da reação de enxertia da PHBHV nas cadeias de pululana, via CuAAC.	46
Figura 5.1 Espectros de FTIR do (a) álcool propargílico, (b) ϵ -CL e do (c) produto de reação de polimerização por ROP da ϵ -CL com álcool propargílico.	55
Figura 5.2 Espectro de RMN ^1H do álcool propargílico (a), da ϵ -CL (b) e da PCL-alcino(c).	56
Figura 5.3 Espectros de FTIR do (a) álcool propargílico, (b) PHBHV de partida e (c) do PHBHV-alcino.	59
Figura 5.4 Espectros de RMN ^1H do álcool propargílico (a), do PHBHV de partida (b) e do produto de reação de transesterificação do PHBHV com álcool propargílico (c).	60
Figura 5.5 Espectros de FTIR da (a) pululana de partida, (b) da pululana funcionalizada com BPB e (c) da pululana funcionalizada com azida.	62
Figura 5.6 Espectros de RMN ^1H da pululana de partida (a), da pululana funcionalizada com BPB (b) e da (c) pululana funcionalizada com grupos azida.	64

Figura 5.7 Diagrama de XPS da pululana não modificada (a), da pululana funcionalizada com BPB (b) e da pululana funcionalizada com grupos azida (c).	66
Figura 5.8 Termograma de DSC da pululana não modificada (a), da pululana funcionalizada com BPB (b) e da pululana funcionalizada com grupos azida (c).	67
Figura 5.9 Espectros de FTIR da PCL-alcino (a), da PullN ₃ (b) e da Pull-g-PCL (c).	69
Figura 5.10 Espectros de RMN ¹ H da PCL-alcino (a), da PullN ₃ (b) e da Pull-g-PCL (c).	70
Figura 5.11 Diagrama de XPS da PullN ₃ (a) e da Pull-g-PCL (b).	71
Figura 5.12 Termograma de DSC da (a) PCL-alcino e (b) da Pull-g-PCL .	72
Figura 5.13 Curvas termogravimétricas da (a) PullN ₃ , (b) PCL-alcino, (c) Pull-g-PCL, com as respectivas derivadas, bem como a (d) correlação entre as curvas termogravimétricas dos reagentes e produto da CuAAC.	74
Figura 5.14 Difratoograma de DRX da PullN ₃ (a) da PCL-alcino (b) e da Pull-g-PCL (c).	75
Figura 5.15 Determinação da concentração crítica de agregação, através da comparação da intensidade da razão I ₃₃₇ /I ₃₃₃ do espectro de excitação do pireno vs. log c de diversas concentrações de partículas Pull-g-PCL em água. Concentração do Pireno = 6.0×10 ⁻⁷ M.	76
Figura 5.16 Espectros de FTIR da PullN ₃ (a) do PHBHV-alcino (b) e da Pull-g-PHBHV (c).	77
Figura 5.17 Termograma de DSC da PullN ₃ (a), da PHBHV-alcino (b) e da Pull-g-PHBHV (c).	78
Figura 5.18 Curvas termogravimétricas da (a) PullN ₃ , (b) PHBHV-alcino, (c) Pull-g-PHBHV, com as respectivas derivadas, bem como a (d) correlação entre as curvas termogravimétricas dos reagentes e produto da CuAAC.	80
Figura 5.19 Difratoograma de DRX da PullN ₃ (a) do PHBHV-alcino (b) e da Pull-g-PHBHV (c).	81
Figura 5.20 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das formulações (a) F2, (b) F3, (c) F7 e (d) F10.	83
Figura 5.21 Curva de liberação de indometacina em função do tempo, realizada em solução tampão PBS, pH 7,4 a 37,0 °C.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Formulações utilizadas no preparo de partículas a partir do copolímero Pull-g-PCL via nanoprecipitação por diálise.....	48
Tabela 4.2 Modelo cinético dependente aplicado para analisar os dados de liberação do fármaco.....	54
Tabela 5.1 Massa molar e dispersidade (\bar{M}_w) da PCL-alcino, obtida via ROP, utilizando o álcool propargílico como iniciador.....	57
Tabela 5.2 Massa molar e dispersidade (\bar{M}_w) do PHBHV e PHBHV-alcino.	61
Tabela 5.3 Diâmetro de partículas (DP) e polidispersidade, obtidos para as partículas preparadas, variando-se o tipo de solvente, a quantidade de polímero e de fármaco.	82
Tabela 5.4 Eficiência de encapsulação da indometacina em partículas de Pull-g-PCL a partir da precipitação por diálise.	84
Tabela 5.5 Resultados do ajuste de curvas e análise cinética de dados de dissolução da indometacina pura e da liberação de indometacina a partir das partículas de Pull-g-PCL, usando o modelo Korsmeyer-Peppas e Eficiência de Dissolução (DE), obtida a partir da análise independente.	86

LISTA DE ABREVIações

- AIC - critério de informação de Akaike
- ASGPR - asialoglicoproteína
- CAC - concentração de agregação crítica
- CDCl_3 - clorofórmio deuterado
- CuAAC - *copper(I)-catalyzed azide-Alkyne cycloaddition*
- \mathfrak{D} - dispersidade
- D_2O – água deuterada
- Da – Daltons
- Dextran-*g*-PHBHV – copolímero de dextrana-*graft*-poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*)
- DLS - espalhamento Dinâmico de Luz
- DMSO-d_6 - dimetilsulfóxido deuterado
- DP - diâmetro de partícula
- DRX - difratometria de Raio-X
- DS – grau de substituição
- DSC - calorimetria diferencial de varredura
- FDA - *food and drug administration*
- HB – 3- hidroxi-*butirato*
- HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência
- HV - 3-hidroxi-*valerato*
- K – coeficiente de dissolução, constante cinética
- M_n - massa molar numérica média
- M_w - massa molar ponderal média
- n - expoente de liberação
- NPs - nanopartículas
- PCL - poli(ϵ -caprolactona)
- PCL-alcino - poli(ϵ -caprolactona) funcionalizada com alcino
- PCL-*g*-CNC - poli(ϵ -caprolactona) enxertada em nanocristais de celulose
- PGA - poli(ácido glicólico)
- PHAs - poli(hidroxi-*alcanoatos*)
- PHB - poli-3-hidroxi-*butirato*

PHBHV - poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

PHBHV-alcino - poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) funcionalizado com alcino.

PLA - poli(ácido láctico)

PMDTA - N,N,N',N'',N'''-pentametildietilentríamina

Pull - pululana

PullBr – pululana funcionalizada com bromo

Pull-*g*-PCL - pululana-*graft*-poli(ϵ -caprolactona)

Pull-*g*-PHBHV - pululana-*graft*-poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato)

PullN₃ - pululana funcionalizada com grupos azida

PVDF – poli(fluoreto de vinilideno)

R² – coeficiente de correlação

RI - Índice de refração

RMSE - raiz do erro médio quadrático

TEM - Microscopia Eletrônica de Transmissão

T_g – Temperatura de transição vítrea

T_m – Temperatura de fusão cristalina

T_c – Temperatura de cristalização

TGA - análises termogravimétricas

THF - Tetrahidrofurano

XPS - Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X

ϵ -CL - ϵ -caprolactona

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo geral	23
2.2	Objetivos específicos	23
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis	24
3.1.1	<i>Polímeros naturais</i>	24
3.1.1.1	<i>Pululana</i>	24
3.1.1.2	<i>Poli(hidroxialcanoatos)</i>	27
3.1.2	<i>Polímeros sintéticos</i>	29
3.1.2.1	<i>Poli(ϵ-caprolactona) (PCL)</i>	30
3.2	Modificação química de polímeros	31
3.2.1	<i>Reações de cicloadição 1,3-dipolar entre alcinos e azidas (CuAAC)</i>	32
3.3	<i>Partículas biodegradáveis para aplicações in vivo</i>	35
3.3.1	<i>Nanoprecipitação por diálise</i>	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	Materiais	38
4.2	Métodos	39
4.2.1	<i>Obtenção da poli(ϵ-caprolactona) com grupo terminal alcino (PCL-alcino)</i> 40	
4.2.2	<i>Obtenção do poli(3- hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) com grupo terminal Alcino (PHBHV-alcino)</i>	41
4.2.3	<i>Funcionalização da pululana com brometo de 2-bromopropionila (BPB)</i>	42
4.2.4	<i>Obtenção da pululana funcionalizada com grupos azida</i>	43
4.2.5	<i>Síntese de copolímero enxertado Pull-g-PCL via CuAAC</i>	44
4.2.6	<i>Síntese do copolímero enxertado Pull-g-PHBHV via CuAAC</i>	46
4.2.7	<i>Preparo de partículas a partir dos copolímeros enxertados Pull-g-PCL e encapsulação de indometacina</i>	47
4.2.7.1	<i>Eficiência de encapsulação</i>	48
4.3	Caracterizações	49

4.3.1	<i>Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)</i>	49
4.3.2	<i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)</i>	50
4.3.3	<i>Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)</i>	50
4.3.4	<i>Calorimetria diferencial de varredura (DSC)</i>	50
4.3.6	<i>Difratometria de Raios-X (DRX)</i>	51
4.3.7	<i>Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS)</i>	51
4.3.8	<i>Concentração Crítica de Agregação.</i>	52
4.3.9	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i>	52
4.3.10	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)</i>	52
4.4	Ensaio de liberação <i>in vitro</i> da indometacina	53
5	RESULTADOS	55
5.1	Obtenção da poli(ε-caprolactona) com grupo terminal alcino, PCL-alcino. 55	
5.2	Obtenção do poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi-valerato</i>) com grupo terminal alcino, PHBHV-alcino.	58
5.3	Modificação química da pululana com brometo de 2-bromopropionila (BPB) seguida pela modificação com azida.	62
5.4	Síntese da pululana- <i>g</i> -poli(ε-caprolactona) Pull- <i>g</i> -PCL via <i>CuAAC</i>	68
5.5	Síntese da pululana- <i>g</i> -poli(3-hidroxi- <i>butirato-co-3-hidroxi-valerato</i>) Pull- <i>g</i> -PHBHV via <i>CuAAC</i>	76
5.6	Obtenção de partículas a partir do copolímero Pull- <i>g</i> -PCL	81
5.7	Encapsulação e estudo da cinética de liberação <i>in vitro</i> da indometacina a partir das partículas de Pull- <i>g</i> -PCL	83
6	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	90

1 INTRODUÇÃO

Os biopolímeros naturais ou polissacarídeos obtidos por processos fermentativos destacam-se pela sua capacidade de formar soluções viscosas e géis em meio aquoso (LI et al., 2014). Esses materiais podem encontrar aplicação nos mais variados setores industriais, dependendo das suas características reológicas. Além disso, apresentam outras propriedades fundamentais, determinadas por sua composição química, tipo de ligações moleculares, grupamentos e graus de substituição e massa molar média e sua distribuição. Possuem excelentes propriedades físico-químicas e fisiológicas, desta forma são considerados materiais desejados para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de ativo modelo. (LI et al., 2014; SONI et al., 2018). Além dos polissacarídeos produzidos por via microbiana, destacam-se aqueles de origem vegetal (amido, celulose) e de algas marinhas (carragenanas, agar-agar), devido ao menor custo. A pululana é um dos importantes biopolímeros de origem microbiana, produzidos a partir do fungo *Aureobasidium pullulans*. Trata-se de um polissacarídeo hidrofílico, não tóxico, e não mutagênico, cuja presença de grupos hidroxila facilmente modificáveis possibilita uma variabilidade estrutural do material (SHEN; LI; YANG, 2014). Possui diversas aplicações nas indústrias alimentícias, química e farmacêutica. Devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade, diversos estudos relatam a utilização da pululana como transportadores de princípios ativos. No entanto, apenas com este polissacarídeo não é possível obter sistemas eficazes de transporte de ativos, para isso é necessário a hidrofobização do material para sua posterior aplicação em sistemas carreadores de ativos (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). A pululana por si só não apresenta as propriedades requeridas para o preparo das partículas com estrutura do tipo *core-shell*. Porém, o seu uso pode ser muito vantajoso para a enxertia de macromoléculas hidrofóbicas e, conseqüente obtenção de copolímeros com comportamento anfifílico (EFENTAKIS; POLITIS, 2006). Estudos relatam que copolímeros anfifílicos, obtidos a partir das cadeias de pululana são capazes de formar partículas auto agregáveis do tipo *core-shell*, ou seja núcleo-casca, quando em soluções aquosas, dando origem a sistemas capazes de promover o transporte e a liberação controlada de princípios ativos. (ZHANG et al., 2009; SHEN; LI; YANG, 2014; JEONG et al., 2006).

Dentre diversas aplicações dos sistemas de liberação controlada de ativos, destaca-se a liberação controlada de fármacos, cujo objetivo visa alterar a farmacocinética dos ativos modelados, de modo a manter as concentrações de efeito terapêutico em locais específicos do corpo, reduzindo desta maneira os efeitos colaterais do produto (BALMAYOR; AZEVEDO; REIS, 2011). A indometacina é um anti-inflamatório não esteróide, de baixo peso molecular e de natureza moderadamente hidrofóbica, comumente utilizada no tratamento de artrite reumatoide, dor aguda no ombro e artrite gotosa. A administração oral da indometacina resulta em efeitos colaterais gastrointestinais (MISHRA et al., 2013). Desta forma, visando à redução dos efeitos indesejáveis do fármaco ao trato gastrointestinal, a liberação controlada do medicamento melhora sua farmacodinâmica, reduzindo o desconforto causado pelo fármaco no organismo do paciente.

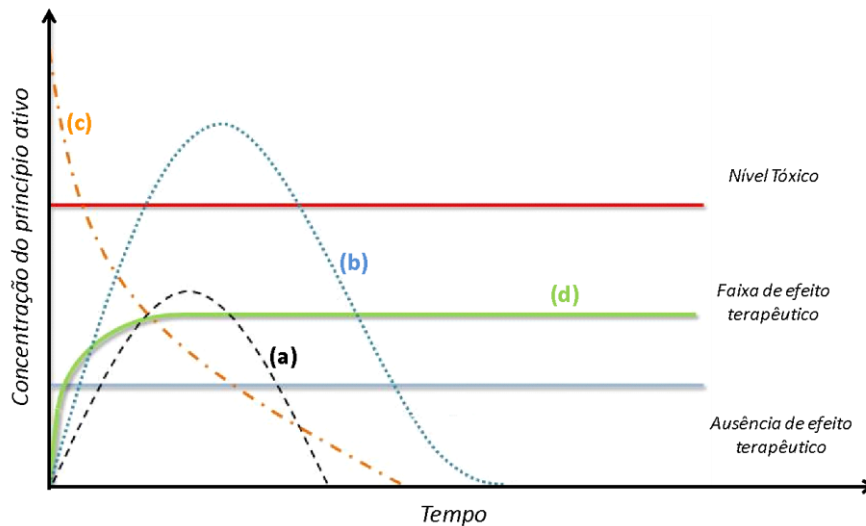
Um perfil farmacocinético de um princípio ativo é dado pela sua concentração no sangue, ou nos tecidos, em função do tempo e engloba os processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação (TOZER; ROWLAND, 2009). O processo de absorção consiste na passagem do fármaco desde o local onde ele é depositado até atingir a circulação sanguínea. Quando administrado por via intravenosa, não existe absorção, visto que o fármaco é introduzido diretamente na corrente sanguínea (TOZER; ROWLAND, 2009). De uma forma geral, a administração convencional requer dosagens periódicas, uma vez que o fármaco, após absorção, circula por todo corpo e sua concentração atinge altos níveis. O declínio da concentração ocorre devido à excreção e/ou conversão metabólica do princípio ativo pelo organismo (OLIVEIRA, 2013).

Para a administração convencional altas doses são necessárias para adquirir um efeito prolongado do ativo. Assume-se, então, que a concentração do princípio ativo no organismo pode atingir três níveis principais: (1) o nível sub terapêutico, no qual sua concentração é inferior à necessária, (2) o nível terapêutico, em que o fármaco possui a função terapêutica requerida e, finalmente, (3) o nível tóxico, isto é, a concentração do fármaco é excessiva, podendo levar à ocorrência de diversos efeitos indesejáveis (DUMITRIU, S.; DUMITRIU, M., 1993).

Visando manter a concentração terapêutica do ativo por um período prolongado, a liberação controlada pode ser realizada de três formas principais: retardando a dissolução do fármaco, inibindo sua difusão através da matriz ou

controlando o fluxo da solução que o contém (KUMAR et al., 2007). A Figura 1.1 apresenta uma comparação entre um perfil farmacocinético geral, obtido a partir de uma administração convencional e a partir de um sistema de liberação controlada.

Figura 1.1 Comparação entre os níveis de concentração atingidos através de diferentes dosagens de fármaco: (a) dose oral, (b) overdose oral, (c) intravenosa, (d) liberação controlada ideal.



Fonte: adaptado de Medeiros et al. (2011).

Dentre algumas terapias comuns, em que a administração convencional de fármacos pode não ser totalmente efetiva, pode-se citar a administração de insulina para pacientes com diabetes, o uso de anticoncepcionais, a reposição hormonal, etc. (KOST; LANGER, 2012). Por outro lado, nas terapias mais complexas, como, por exemplo, na terapia de câncer, o desenvolvimento de sistemas carreadores, capazes de transportar e liberar princípios ativos de uma forma controlada e direcionada representa importante avanço (RAPOPORT, 2007). O direcionamento e o controle da liberação do agente ativo podem ser feitos nas células doentes, mediante o uso de carreadores poliméricos, frequentemente classificados como: (1) sistemas reservatórios (lipossomas, micro e nanocápsulas, fibras ocas, etc.), capazes de aprisionar o agente ativo no interior de uma barreira de difusão inerte, ou (2) sistemas matriciais (micro e nanoesferas poliméricas, por exemplo) cujo fármaco é disperso em uma matriz polimérica, formando um sólido monolítico homogêneo (FIGUEIREDO; DIAS; ARRUDA, 2008). Do ponto de vista da liberação do fármaco no organismo, os carreadores podem ser categorizados em quatro

sistemas: (1) controlados por difusão (dispositivos monolíticos), (2) ativados por solvente (inchaço ou compactação), (3) quimicamente controlados (biodegradáveis) e (4) controlados pela variação de um dos parâmetros do meio externo, como, por exemplo, pH ou temperatura, etc. (LIECHTY et al., 2010).

Esse trabalho de pesquisa visa, portanto, explorar sistemas que possam ser utilizados para aplicações biomédicas, sistêmica e tópica, respectivamente. Espera-se, com a execução deste projeto, o desenvolvimento de materiais capazes de aumentar a biodisponibilidade e modificar a farmacocinética de medicamentos hidrofóbicos, como da indometacina por exemplo, reduzindo seus efeitos colaterais e promovendo a liberação tópica e sistêmica do ativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consiste na síntese de copolímeros anfifílicos, pululana-*g*-poli(ϵ -caprolactona) e pululana-*g*-poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*), para posterior uso no preparo de partículas biodegradáveis e biocompatíveis, e avaliação de sua eficiência na encapsulação e modificação da cinética de liberação de um princípio ativo modelo.

2.2 Objetivos específicos

- Funcionalização da pululana com grupos azida, através de reações de esterificação seguida por substituição nucleofílica;
- Obtenção dos polímeros poli(ϵ -caprolactona) e poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*) funcionalizados com grupos alcino, a partir das reações de abertura de anel da ϵ -caprolactona e da transesterificação do poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*), respectivamente;
- Síntese dos copolímeros anfifílicos, pululana-*g*-poli(ϵ -caprolactona) e pululana-*g*-poli(3-hidroxi-*butirato-co*-3-hidroxi-*valerato*), via reação 1,3 dipolar entre alcinos e azidas, catalisada por cobre(I);
- Preparo de partículas constituídas de pululana-*g*-poli(ϵ -caprolactona) via nanoprecipitação por diálise, e encapsulação da indometacina;
- Avaliação da cinética de liberação *in vitro* da indometacina a partir das partículas de pululana-*g*-poli(ϵ -caprolactona), em condições que simulam as características fisiológicas sanguíneas, ou seja, pH 7.4 e temperatura de 37 °C.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros biodegradáveis e biocompatíveis

A biodegradabilidade e a biocompatibilidade de polímeros são propriedades com crescente procura para as áreas biomédicas, como, por exemplo, na liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos, implantes, biosensores (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011; ZHANG; YANG, 2013). O progressivo interesse nos polímeros biocompatíveis se deve a capacidade de tolerância do material pelo corpo, sem que ocorra a interferência na função normal do organismo (MEDEIROS et al., 2011). Já a biodegradabilidade dos polímeros refere-se ao potencial de degradação do material in vivo, enzimática ou não enzimaticamente, que resulta em subprodutos inofensivos (PRAJAPATI et al., 2019). Quando aplicados ao corpo, os polímeros biodegradáveis possuem capacidade de degradação, absorção e eliminação, sem deixar resíduos remanescentes no organismo após sua utilização (ZHANG; YANG, 2013). Desta forma, os polímeros biocompatíveis e/ou biodegradáveis possuem sua origem diversificada, podendo esta ser natural ou sintética (PRAJAPATI et al., 2019).

3.1.1 *Polímeros naturais*

Polímeros naturais são polímeros produzidos a partir de sistemas biológicos, como por exemplo, microrganismos, plantas, animais (CHANDRA, 1998). Dentre alguns biopolímeros naturais, pode-se citar os polissacarídeos e os poli(hidroxialcanoatos). Suas propriedades únicas, diferentes funcionalidades e abundância, tem atraído grande interesse para aplicações em diferentes áreas da ciência de materiais (MENG et al., 2019).

3.1.1.1 *Pululana*

Polissacarídeos são polímeros formados monossacarídeos unidos por ligações glicosídicas. Dentre suas principais características destacam-se sua biodegradabilidade, processabilidade, bioreatividade, biocompatibilidade, baixa toxicidade, as quais tornam um biomaterial promissor para aplicações biomédicas

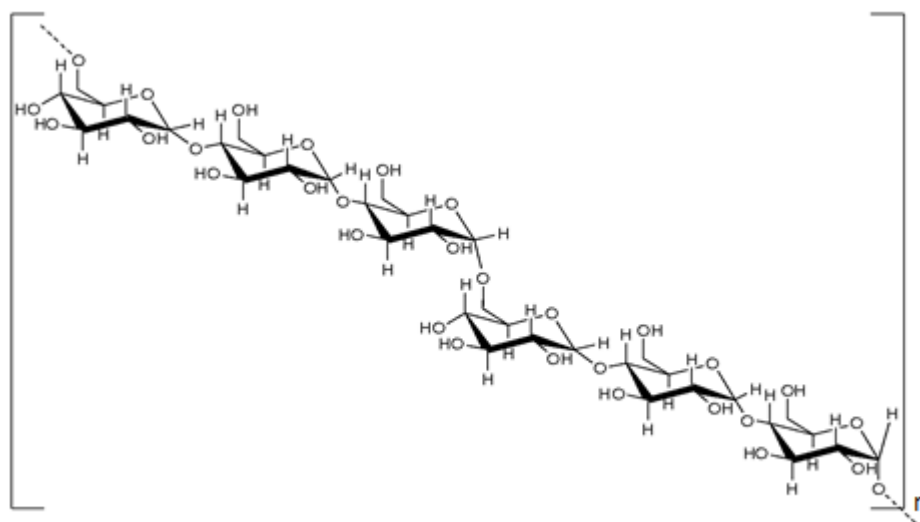
e alimentícias (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011; SUN et al., 2018). Devido à sua abundância natural, polissacarídeos e seus derivados, estão sendo avaliados para diferentes aplicações, tais como em sistemas de encapsulação e liberação controlada de fármacos e outros princípios ativos, adjuvantes de vacinas, expansores plasmáticos, etc. (ZHANG et al., 2009; SUN et al., 2018; KULICKE; HEINZE, 2006).

Os principais polissacarídeos de interesse são celulose e amido, porém outros polissacarídeos têm sido estudados, como carboidratos mais complexos produzidos por bactérias e fungos, sendo estes a goma xantana, pululana e o ácido hialurônico (CHANDRA, 1998). Sua estrutura química com grande quantidade de hidroxilas viáveis para de substituição química auxilia na obtenção de maior diversidade e a complexidade da estrutura molecular do polímero, resultando em uma variedade de aplicações (OLIVEIRA, 2013).

A pululana é um polissacarídeo produzido a partir do fungo *Aureobasidium pullulans*, que foi identificada por Bauer (1938). Porém, anos seguintes, foi isolada por Bernier (1958), dando início à sua caracterização (SINGH; KAUR; KENNEDY, 2015). Trata-se de um biopolímero composto por unidades de maltotriose, isto é, três unidades de glicose ligadas entre si por ligações glicosídicas α -(1→4), e interconectadas via ligações α -(1→6), conforme ilustrado na Figura 3.1 (HILARES et al., 2017; PEREIRA, 2013). A pululana é um polímero hidrofílico, biodegradável, atóxico, neutro, inodoro e insípido (SINGH; KAUR; KENNEDY, 2015). Possui capacidade de degradação no corpo humano sem provocar reações imunológicas resultando na busca por novas aplicações biomédicas para esse polissacarídeo, como, por exemplo, em engenharia de tecidos, em sistemas de liberação controlada de fármacos, etc. (PEREIRA, 2013; HASUDA et al., 2005). Porém, este polissacarídeo não possui facilidade de autoagregação em solução aquosa devido à sua alta solubilidade em água. Desta forma, para a aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos, faz-se necessário a sua modificação química, promovendo a hidrofobização do material. Quando hidrofobizada, a pululana torna-se auto agregável, sendo capaz de formar partículas estáveis, com núcleo hidrofóbico, quando em meio aquoso (ZHANG et al., 2009). Dentre as demais propriedades da pululana, sua especificidade de absorção pelo fígado através do receptor de asialoglicoproteína (ASGPR) presente neste órgão, resulta no crescente interesse em seu uso para aplicações direcionadas ao tratamento de

doenças hepáticas. Seus filmes poliméricos apresentam excelentes propriedades físico-químicas e mecânicas (SINGH; SAINI; KENNEDY, 2008). Outra importante característica da pululana é sua aprovação pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uma grande variedade de aplicações nas indústrias cosmética e alimentícia (USFDA, 2018).

Figura 3.1 Estrutura química da pululana.



Fonte: Adaptado de Singh; Kaur; Kennedy (2015).

Constantin et al. (2017) utilizaram o copolímero hidrofílico e termossensível, constituído de pululana enxertada com macrocadeias de poli(*N*-isopropilacrilamida), resultando em pululana-*g*-poli(*N*-isopropilacrilamida) (PUL-*g*-PNIPAAm), para a encapsulação de indometacina, utilizando a técnica de encapsulação por diálise seguida por nanoprecipitação à temperatura ambiente. O diâmetro médio das partículas e polidispersidade variaram de acordo com a concentração do polímero em solução. A encapsulação da indometacina teve eficiência acima de 80% quando utilizada proporção mássica de Indometacina/polímero de 1/1 e concentração polimérica acima de 10 g.L⁻¹. Ganeshkumar et al. (2016), prepararam nanopartículas constituídas de pululana acetilada carregadas com curcumina, com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas da curcumina, e garantir sua ação em doenças do fígado. Após a avaliação do diâmetro e da morfologia das partículas, bem como da cinética de liberação *in vitro* do fármaco, os autores observaram o tamanho médio de partículas

de $123,4 \pm 2$ nm com eficiência de encapsulação de $85,87 \pm 1,09\%$. Desta forma, foi caracterizada a eficiência e estabilidade do fármaco em pululana acetilada, podendo esse material ser futuramente aplicado como agente de proteção hepático contra danos no fígado (GANESHKUMAR et al., 2016).

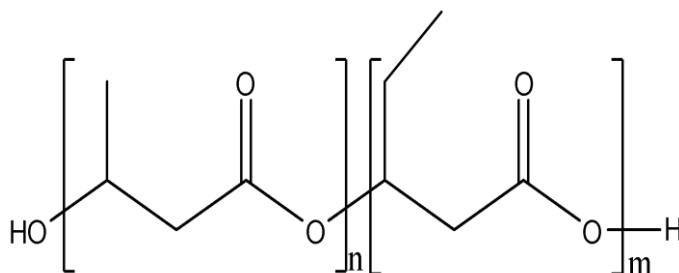
3.1.1.2 Poli(hidroxicanoatos)

Poli(hidroxicanoatos) (PHAs) são poliésteres naturais de ácidos hidroxialcanóicos, isotáticos e semicristalinos, com massa molar elevada, produzidos a partir de uma grande variedade de microrganismos, como reserva de carbono e fonte de energia intracelular (GRACIDA et al., 2004). Dentre suas inúmeras propriedades, suas principais vantagens são: biocompatibilidade e biodegradabilidade (CHANDRA, 1998)

O início do processo de desenvolvimento tecnológico e científico dos PHAs se deu com a observação de materiais solúveis em clorofórmio, acumulados em bactérias *Azotobacter chroococcum*, na forma de inclusões lipídicas (STAPP, 1924; SUDESH; ABE; DOI, 2000). Porém, a composição química dessas inclusões foi determinada por Lemoigne (1926) e identificada como poli-3-hidroxi-*butirato* (PHB), anos mais tarde. No ano de 1974, Wallen e Rohwedder (1974) identificaram outras unidades de hidroxicanoatos, sendo uma das unidades o 3-hidroxi-*valerato* (HV), caracterizando em seguida o copolímero poli(3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato**) (PHBHV) (MONTORO et al., 2011).

Através do uso da bactéria *Ralstonia eutropha*, poliésteres são produzidos em escala industrial contendo unidades de hidroxi-*butirato* (3-HB) e de hidroxi-*valerato* (3-HV), resultando no copolímero poli(3-hidroxi-*butirato-co-3-hidroxi-*valerato**) (PHBHV) (GRACIDA et al., 2004; LIU et al., 2016). A estrutura deste copolímero está representada na Figura 3.2.

Figura 3.2 Estrutura química do poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBHV).



Fonte: Adaptado de Montoro et al. (2011).

As propriedades do PHB, como elevado índice de cristalinidade e instabilidade térmica próxima ao ponto de fusão (175 - 180 °C) (ABDELWAHAB et al., 2012), influenciam nos mecanismos de degradação do material, resultando na diminuição do seu potencial para algumas aplicações na área biomédica. No entanto, a copolimerização do 3-HB com o 3-HV é uma das estratégias promissoras para modificação das propriedades térmicas e mecânicas, contribuindo para o controle da velocidade de degradação, bem como da massa molar média (MONTORO et al., 2011). Copolímeros poli(3-hidroxi butirato-co-3-hidroxi valerato) (PHBHV) possuem menor cristalinidade, maior maleabilidade e, conseqüentemente, maior velocidade de degradação, embora suas propriedades intrínsecas de hidrofobicidade possam, ainda, restringir algumas aplicações *in vivo* (POUTON; AKHTAR, 1996; NAGUIB et al., 2011).

Vardhan et al. (2017) descreveram o uso de PHBHV como forma de administração de fármacos hidrofóbicos para liberação controlada de Docetaxel, medicamento utilizado para tratamento de câncer, encapsulado através da técnica de emulsão e evaporação de solvente. Foram analisados parâmetros como tamanho e morfologia das partículas, eficiência de encapsulação e velocidade de liberação do fármaco, dentre outros. Os resultados obtidos foram satisfatórios, mantendo a eficácia da ação do medicamento nas células cancerígenas através do tempo de circulação do fármaco no organismo durante o tratamento do câncer de mama (VARDHAN et al., 2017). Já Lemechko et al. (2012) sintetizaram copolímeros de dextrana-*g*-PHBHV via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre alcinos e azidas, também conhecido como *CuAAC*. Os resultados obtidos foram satisfatórios,

confirmando a síntese do copolímero anfifílico. Além disso, as partículas formadas a partir do copolímero apresentaram diâmetro médio entre 160 e 335 nm, sem a necessidade do uso de surfatantes para manter a sua estabilidade (LEMECHKO et al., 2012).

3.1.2 *Polímeros sintéticos*

Polímeros sintéticos são materiais quimicamente sintetizados que podem apresentar características biodegradáveis e biocompatíveis (BALAJI et al., 2018). Os polímeros sintéticos biodegradáveis possuem cadeias principais hidrolisáveis, suscetíveis à biodegradação por hidrólise ou, também, cadeias compatíveis com sítios ativos enzimáticos, propensas à degradação por catálise enzimática (CHANDRA, 1998). Portanto, poliésteres como poli(ácido láctico) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ϵ -caprolactona) (PCL), possuem cadeias hidrolisáveis e flexíveis, sendo considerados polímeros biodegradáveis (OKAMOTO; JHON, 2013).

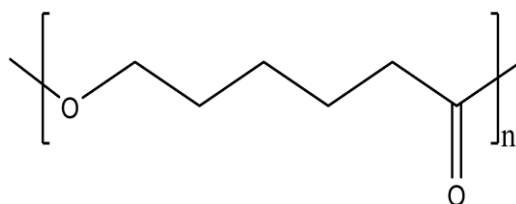
Na década de 1960, pesquisas em polímeros sintéticos biodegradáveis proporcionaram novas aplicações biomédicas para biopolímeros produzidos a partir de ácido glicólico e ácido láctico, os quais foram utilizados para suturas biodegradáveis (MIDDLETON; TIPTON, 1998). Outros polímeros sintéticos também foram implementados para utilização em dispositivos médicos, como os homopolímeros e copolímeros à base de poli(ϵ -caprolactona) e poli(carbonato de trimetileno) (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011).

Biopolímeros sintéticos biocompatíveis e/ou biodegradáveis apresentam vantagens em relação aos naturais, tais como uniformidade na produção de lotes, matérias primas com maior rastreabilidade e maior confiança, evitando futuras preocupações com imunogenicidade (MIDDLETON; TIPTON, 1998). Dentre suas principais aplicações estão suturas, sistemas de administração de fármacos e dispositivos de fixação ortopédicos. Para este grupo de polímeros, os poliésteres tem atraído grande interesse devido à sua facilidade de degradação por hidrólise de ésteres (GUNATILLAKE; ADHIKARI, 2003; OKAMOTO; JHON, 2013).

3.1.2.1 Poli(ϵ -caprolactona) (PCL)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL) é um poliéster linear semicristalino obtido, geralmente, via polimerização por abertura de anel (ROP). Sua estrutura química encontra-se apresentada na Figura 3.3 (YU; KANG; YOUK, 2012). Devido à biodegradabilidade e biocompatibilidade da PCL e seus copolímeros, crescente interesse vem sendo observado para a sua aplicação na área médica e farmacêutica, como em suturas biodegradáveis, sistemas de fixação ortopédicos, pele artificial, suportes de engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de princípios ativos (WU et al., 2014). Em comparação a outros poliésteres alifáticos biodegradáveis, a PCL apresenta algumas vantagens, incluindo ampla permeabilidade a moléculas pequenas, cinética de erosão lenta e miscibilidade com vários polímeros, além de sua compatibilidade com uma ampla gama de fármacos, que contribui para uma distribuição uniforme do medicamento na matriz da formulação (WU et al., 2013; DASH; KONKIMALLA, 2012). No entanto, a cristalinidade relativamente elevada e a alta hidrofobicidade da PCL limitam sua aplicação em sistemas de liberação de princípios ativos devido à sua baixa taxa de degradação *in vivo*. Porém, através de misturas de polímeros (blendas) e obtenção de copolímeros com blocos à base de PCL, tais desvantagens podem ser reduzidas (GLAIED; DELAITE; RIESS, 2012).

Figura 3.3 Estrutura química da poli(ϵ -caprolactona) (PCL).



Fonte: Adaptado de Yu; Kang; Youk, (2012).

Rosado, Silva e Reis (2013) utilizaram PCL para a nanoencapsulação de hidrocortisona, utilizando a técnica de deslocamento do solvente para a formação de partículas, para controlar a liberação do fármaco no organismo e reduzir seus efeitos colaterais. Os autores avaliaram o tamanho e morfologia das partículas, a eficiência de encapsulação e a cinética de liberação do fármaco, dentre outros parâmetros. Os resultados, em geral, foram satisfatórios, evidenciando a

viabilidade da PCL como agente de encapsulação e liberação controlada de hidrocortisona para aplicações na superfície da pele. Já Bellani et al. (2016) utilizaram nanocompósitos de PCL e PCL enxertada em nanocristais de celulose (PCL-g-CNC). A enxertia foi confirmada através da espectrometria de infravermelho (FTIR) e de análises termogravimétricas (TGA). Através das análises térmicas, mecânicas e microscópicas, os nanocompósitos de PCL-g-CNC incorporados à matriz PCL foram caracterizados, e os resultados apresentaram grande potencial para o seu uso como materiais biomédicos (BELLANI et al., 2016).

3.2 Modificação química de polímeros

Pesquisas na área de polímeros biodegradáveis vêm demonstrando a importância da combinação de diferentes biopolímeros, visando à obtenção de novos materiais com propriedades específicas, de difícil obtenção em um homopolímero (ULERY; NAIR; LAURENCIN, 2011). As modificações químicas de polímeros vêm sendo comumente empregadas para combinar diferentes propriedades em um único material (SPATAREANUA et al., 2014). Através da modificação química de polímeros, importantes propriedades específicas, como solubilidade, biodegradabilidade, estabilidade térmica e comportamento mecânico, podem ser ajustadas (CONSTANTIN et al., 2011).

Atualmente, técnicas de modificação química são importantes mecanismos para a adaptação das estruturas e propriedades de polissacarídeos. Através da modificação química homogênea ou de superfície dos polissacarídeos, diferentes grupos funcionais podem ser obtidos, como também diferentes derivados capazes de formar hidrogéis e micelas (MENG; EDGAR, 2016). As modificações frequentemente aplicadas aos polissacarídeos são a esterificação, eterificação, oxidação, reações de deslocamento nucleofílico e reações de enxertia (WANG et al., 2015; HEZARKHANI; YILMAZ, 2019). A modificação química trata-se, portanto, de um mecanismo de alterações na estrutura e na configuração de propriedades dos materiais, cuja variabilidade ocorre de acordo com exigências de aplicações específicas (MOCANU et al., 1999).

A modificação de grupos hidroxila por grupos carboxílicos na cadeia principal da pululana, por exemplo, é capaz de promover uma interação mais efetiva com medicamentos que possuem grupos catiônicos, devido ao caráter aniônico dos

grupos carboxílicos (TEZUKA, 1997). A presença de grupos amino na pululana, por sua vez, favorece a interação com medicamentos aniônicos (WANG et al., 2015).

A combinação de diferentes polímeros, conservando-se suas propriedades individuais na mistura final, é uma estratégia de baixo custo e vantajosa para obtenção de novos materiais estruturais (BAJPAI et al., 2008).

3.2.1 Reações de cicloadição 1,3-dipolar entre alcinos e azidas (CuAAC)

Em 2001, Sharpless introduziu o conceito de *click chemistry* para descrever reações termodinamicamente favoráveis, capazes de acoplar duas moléculas de forma muito simples, rápida e com altos rendimentos (KOLB; FINN; SHARPLESS, 2001; MAJUMDER, 2015). Para qualificar uma reação como *click*, esta deve possuir alto rendimento, gerar subprodutos inofensivos e de fácil remoção e ser estereoespecífica (MENG; EDGAR, 2016).

Dentre as reações compreendidas nesse tipo de mecanismo, um dos exemplos comumente referenciado é a cicloadição 1,3-dipolar entre um alcino e uma azida, catalisada por espécies de cobre (Cu(I)), ou reação de Huisgen, com a formação regioespecífica de 1,2,3-triazóis-1,4-dissubstituídos. Este tipo de reação é comumente conhecida como reação CuAAC (*Copper(I)-catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition*) (SINGH; CHOWDHURY; KOLEY, 2016). A reação tradicional de “cicloadição de Huisgen” promove a formação de uma mistura de regioisômeros triazólicos 1,4 e 1,5-dissubstituídos como produto de síntese quando alcinos assimétricos estão envolvidos. A reação apresenta baixo rendimento, e são necessárias altas temperaturas e longos tempos reacionais (GIL; ARÉVALO; LÓPEZ, 2007). No entanto, estudos realizados em 2002 pelo grupo de pesquisa de Meldal et al. (2008) (TORNØE; CHRISTENSEN; MELDAL, 2002; HE et al., 2016) e de Kolb, Finn e Sharpless (2001) (ROSTOVTSSEV et al., 2002; HE et al., 2016), mostraram que a utilização de catalisadores de sais de Cu(I) acelera consideravelmente a velocidade da reação. Este tipo de mecanismo constitui uma das reações “*click*” mais aplicadas para polissacarídeos (MENG; EDGAR, 2016).

Para a reação CuAAC, as espécies de Cu(I) podem ser introduzidas no meio reacional através de complexos pré-formados, ou podem ser geradas no meio reacional (*in situ*) por intermédio das seguintes formas (FREITAS et al., 2011; SINGH; CHOWDHURY; KOLEY, 2016).

(I) Um composto de Cu em estado de oxidação +2 (tal como CuSO_4), juntamente com um agente redutor (por exemplo, ascorbato de sódio), reduzirá o Cu de seu estado de oxidação +2 para +1. A presença do agente redutor compensa pequenas quantidades de oxigênio que possam ter sido introduzidas no sistema reacional, não comprometendo o rendimento da reação, pois o oxigênio oxida o Cu(I) a Cu(II);

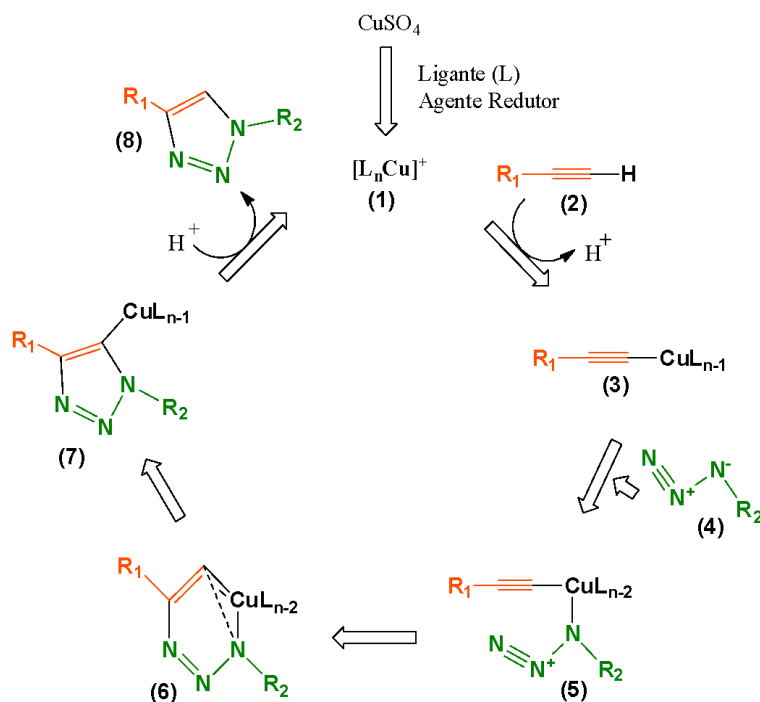
(II) Utilização de cobre metálico (fio, limalha, pó ou aglomerado) na presença ou ausência de sulfato de cobre que, após redução, leva à formação da espécie reativa Cu(I);

(III) Halogenetos de cobre (iodeto, brometo, cloreto ou acetato) também podem ser utilizados neste tipo de reação. No entanto, a reação com sais de Cu(I) demanda o uso de uma base nitrogenada ou de aquecimento para promover a formação inicial do acetileto de cobre, pois, apesar destes sais de cobre serem solúveis nos solventes empregados, eles se encontram geralmente na forma de aglomerados estáveis. Outra desvantagem do uso de sais de Cu(I) é sua instabilidade termodinâmica, podendo ser oxidado para Cu(II) e/ou sofrer desproporcionamento para cobre metálico e Cu(II) no decorrer da reação. Desta forma, este procedimento requer atmosfera inerte e condições anidras.

O mecanismo de reação de CuAAC, com as espécies de Cu(I) geradas *in situ*, a partir de um sal de Cu(II) encontra-se representado, de modo simplificado, na Figura 3.4 (HIMO et al., 2004; FREITAS et al., 2011). A primeira etapa do mecanismo consiste em uma adição oxidativa do alcino (2) ao complexo catalítico (1) (cobre (I) e moléculas do solvente) levando à formação do acetileto do metal (3). Essa complexação leva à redução do pK_a do hidrogênio do alcino, permitindo a desprotonação na presença de uma base ou em meio aquoso, facilitando assim a formação do acetileto de cobre. Este se complexa também ao nitrogênio nucleofílico da azida (nitrogênio ligado ao carbono) (4), gerando o complexo azida-acetileto (5). Essa estrutura favorece um ataque do carbono do tipo β -vinilidênico do acetileto de Cu(I) ao nitrogênio eletrofílico terminal da azida orgânica com a formação da primeira ligação C-N e a obtenção do metalociclo instável (anel incomum de seis membros) (6). Em seguida, ocorre a contração desse intermediário por meio de uma associação transanular dos elétrons do nitrogênio vizinho ao metal com o orbital antiligante do carbono também ligado a um átomo

de cobre, fornecendo a triazola de cobre (7). Por fim, a formação do triazol (8) se faz pela protonação da triazola de cobre por uma base protonada ou pelo próprio solvente.

Figura 3.4 Mecanismo proposto para síntese regioseletiva de 1,2,3-triazóis 1,4-substituídos catalisada por Cu (I).



Fonte: adaptado de HIMO et al. (2004).

Os solventes mais comumente utilizados em nas reações 1,3-dipolar são apolares, embora solventes polares tais como água, THF, DMSO, acetonitrila também possam ser empregados. Misturas de solventes também são muito utilizadas. Apesar dessa versatilidade, a escolha do tipo de solvente a ser utilizado deve ser feita com base na fonte de cobre empregada e nas propriedades dos demais reagentes utilizados nas sínteses (HEIN; LIU; WANG, 2008).

Quanto às bases utilizadas, comumente emprega-se a *N,N'*-diisopropiletilamina (DIPEA), trietilamina (TEA), carbonato de potássio (K_2CO_3), 2,6-lutidina e piridina (MELDAL et al., 2008).

A reação CuAAC tem atraído grande atenção na química de macromoléculas, com uso em sistemas específicos, tais como na funcionalização pós-polimerização, na síntese de novos polímeros e acoplamento de cadeias para a obtenção de copolímeros em blocos e enxertados (ACIK; SEY; TASDELEN, 2018). O uso das modificações químicas, dentre elas a *reação 1,3-dipolar*, vem

atraído atenção para a aplicação em polissacarídeos, visto que favorece a diversidade estrutural do biomaterial (LIEBERT; HANSCH; HEINZE, 2006).

3.3 *Partículas biodegradáveis para aplicações in vivo*

Mais de 40% dos princípios ativos farmacêuticos (*APIs* em inglês) em estudo e desenvolvimento são pouco solúveis em água, o que limita sua formulação, aplicação clínica e possibilidade de comercialização, visto sua baixa velocidade de dissolução e biodisponibilidade (VO; PARK; LEE, 2013). Nas últimas três décadas, os avanços no uso de partículas para encapsulação de princípios ativos são responsáveis pela maior biodisponibilidade oral de fármacos pouco solúveis em água (TIWARI et al., 2012).

Quando corretamente projetadas, nanopartículas (NPs) auxiliam na biodisponibilidade de fármacos pouco solúveis em água, no prolongamento da meia-vida dos princípios ativos *in vivo*, na cinética e na especificidade de liberação do medicamento (YANG et al., 2017). A mistura molecular entre fármaco e polímero pode favorecer a obtenção da forma amorfa do fármaco, o que ocasiona uma redução no tamanho das partículas e elevação da área superficial (BIKIARIS, 2011). Micelas poliméricas obtidas a partir de copolímeros anfifílicos são consideradas dispositivos promissores para a liberação de fármacos, devido à sua capacidade de formar estruturas do tipo núcleo-casca (*core-shell*). Polissacarídeos, proteínas, polipeptídeos, são frequentemente usados para o preparo das micelas devido à sua boa biocompatibilidade e biodegradabilidade (LI et al., 2017)

Com a complexidade dos sistemas *in vivo*, torna-se indispensável à compreensão das propriedades físico-químicas das nanopartículas, e sua interação *in vivo* (SHEN; LI; YANG, 2014). Desta forma, é de grande interesse a obtenção de dispersões em nível molecular, com interações intermoleculares favoráveis entre o fármaco e a matriz polimérica, proporcionando respostas favoráveis ao corpo, com a diminuição da toxicidade do medicamento (VO; PARK; LEE, 2013). Esses sistemas oferecem inúmeras vantagens e têm o potencial de melhorar a eficácia dos medicamentos, bem como a praticidade e aceitação em relação ao paciente (KUMAR et al., 2007). Alguns dos benefícios incluem menores riscos de superdose e menor probabilidade de irritações locais. Isto porque, como a dosagem total do fármaco pode ser reduzida em 50-80%, a dosagem no sítio alvo é aumentada e a

absorção sistêmica é diminuída (SHEN et al., 2010). Essa tecnologia também pode fornecer barreiras entre os materiais bioativos sensíveis e o meio ambiente, permitindo a diferenciação entre gostos e aromas, assim como o mascaramento de gostos ou cheiros desagradáveis, além da melhora da estabilidade dos produtos finais ou durante o processamento (NEDOVICA et al., 2011).

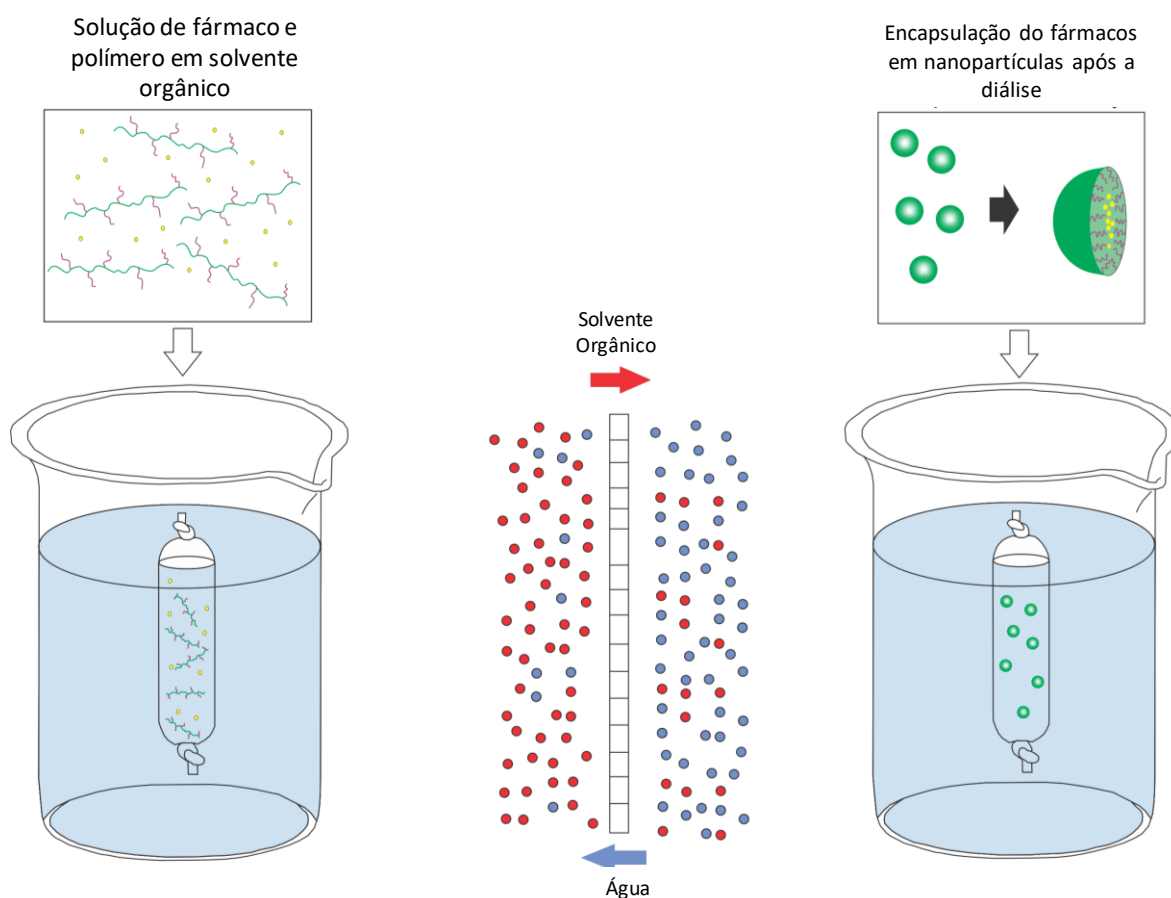
Para a obtenção partículas constituídas de polímero-fármaco ou mistura de polímeros-fármacos, algumas técnicas são propostas; dentre elas a emulsão-evaporação do solvente e a secagem por atomização (“*spray-drying*”), a nanoprecipitação, e a nanoprecipitação por diálise.

3.3.1 *Nanoprecipitação por diálise*

Nos últimos anos, a nanoprecipitação tem sido frequentemente utilizada para a obtenção de nanopartículas poliméricas para aplicação em liberação controlada de fármacos (ZHANG; CHUNG; PRIESTLEY, 2012). A diálise trata-se de uma técnica alternativa para a nanoprecipitação, sendo este um método simples e eficaz utilizado para o preparo de nanopartículas (FESSI et al., 1989; HORNIN et al., 2009; ZHANG; CHUNG; PRIESTLEY, 2012). O método de diálise é frequentemente usado na formação de micelas e partículas quando um copolímero não é facilmente solúvel em água, sendo necessária sua solubilização prévia em solventes orgânicos como a dimetilformamida, por exemplo. A mistura de solvente de copolímero é agitada e dialisada em água deionizada. Durante o processo de diálise, a formação de micelas é induzida com a difusão da água para o interior da micela, e o solvente orgânico é, conseqüentemente, removido (ALLEN; MAYSINGER; EISENBERG, 1999). Nesse método, polímeros são dissolvidos em solventes orgânicos e adicionados em membranas de diálise com corte de peso molecular apropriado, variando de 3,5 a 15 kg/mol. Em seguida, a membrana é submersa em uma solução não solvente (em geral, água destilada e/ou deionizada), sob agitação constante, iniciando a diálise. Conforme o não solvente migra para dentro da membrana, o solvente é deslocado promovendo a progressiva agregação do polímero pela perda de solubilidade, resultando na formação de suspensões homogêneas de nanopartículas, conforme apresentado na Figura 3.5 (RAO; GECKELER, 2011). Depois de decorrido um tempo, que pode variar entre

12 a 96 h, a membrana é retirada da solução e o processo de diálise é finalizado (RAO; GECKELER, 2011; HORNIG et al., 2009). Dentre os parâmetros que influenciam no método da diálise estão: (1) tipo de solvente e não solvente, (2) solubilidade e concentração do polímero, entre outros. Tais parâmetros podem interferir tanto no tamanho de diâmetro médio das partículas quanto na polidispersidade (ZHANG; CHUNG; PRIESTLEY, 2012).

Figura 3.5 Representação esquemática da encapsulação de ativos através da nanoprecipitação por diálise.



Fonte: autoria própria.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

O monômero ϵ -caprolactona, (ϵ -CL, 97%, Sigma-Aldrich) foi purificado por destilação a vácuo. O poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBHV, 8,6% HV, Lote 110, gentilmente cedido pela PHB Industrial S/A) com massa molar numérica média (M_n) de 159.710 Da e dispersidade (\mathcal{D}) igual a 1,49, foi utilizado sem nenhuma etapa de purificação inicial. A pululana (Pull, grau farmacêutico, fornecida pela empresa Dinaco Especialidades Químicas) foi utilizada conforme recebida. Brometo de 2-bromopropionila (BPB, 97%, Sigma-Aldrich), trietilamina (TEA, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), azida de sódio (NaN_3 , 99%, Synth), 2-etil hexanoato

de estanho II ($(\text{Sn}(\text{Oct})_2$, 92,5-100%, Sigma-Aldrich), 1,3,5-trioxano ($\geq 99\%$, Sigma-Aldrich), dibutil-dilaurato de estanho (DBTB, 95%, Sigma-Aldrich), brometo de cobre (CuBr , 98%, Sigma-Aldrich), N,N,N',N'',N'''' -pentametildietilentríamina (PMDTA, 99%, Sigma-Aldrich), álcool propargílico (99%, Sigma-Aldrich), dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6 , 99,9%, Sigma-Aldrich), água deuterada (D_2O , 99,9%, Sigma-Aldrich) e clorofórmio deuterado (CDCl_3 , 99,8%, Sigma-Aldrich) foram utilizados como recebidos.

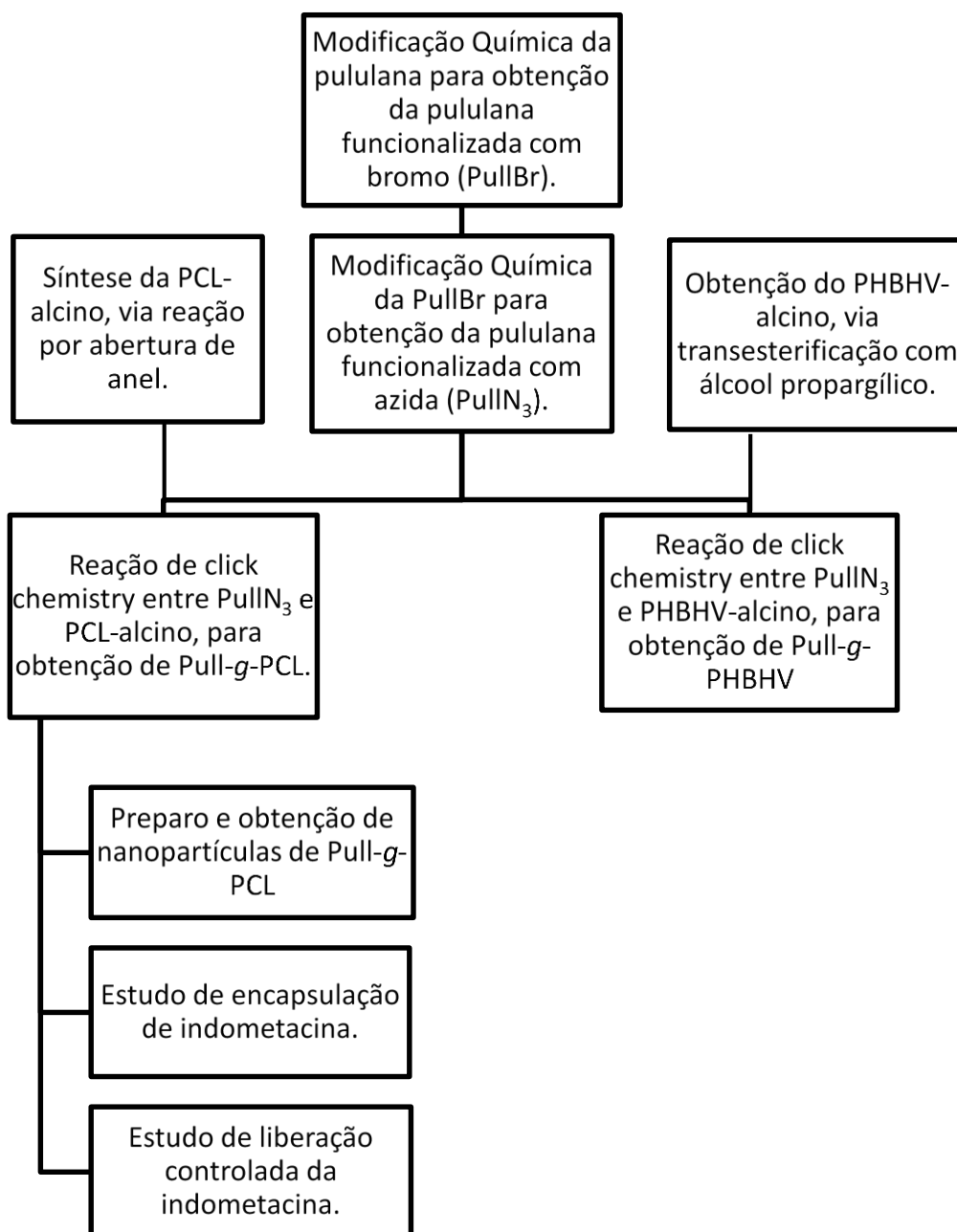
O solvente tetrahidrofurano (THF, P.A., Synth) foi destilado sob pressão atmosférica na presença de sódio metálico. O tolueno (P.A., Synth) foi destilado a pressão atmosférica na presença de hidreto de cálcio (CaH_2). A N,N -dimetilformamida (DMF, 99,8%, Synth) foi destilada sob pressão reduzida na presença de hidreto de cálcio (CaH_2). A água utilizada em todo o processo foi destilada e deionizada.

Os demais solventes utilizados nas etapas de purificação dos polímeros, álcool etílico (P.A., Synth), álcool metílico (P.A., Synth), éter etílico (P.A., Synth), dimetilsulfóxido (DMSO, P.A., Synth) foram usados sem purificação prévia.

4.2 Métodos

A Figura 4.1 apresenta o fluxograma que descreve, de maneira sucinta, as etapas realizadas para o desenvolvimento do trabalho.

Figura 4.1 Fluxograma das etapas da metodologia realizadas.



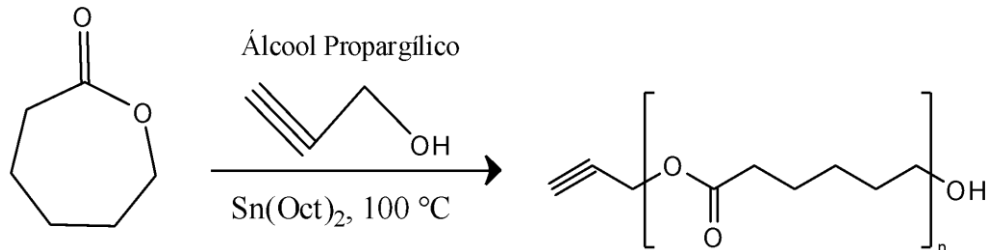
Fonte: Autoria própria.

4.2.1 Obtenção da poli(ϵ -caprolactona) com grupo terminal alcino (PCL-alcino)

A síntese da PCL-alcino foi realizada via polimerização por abertura de anel (ROP) da ϵ -CL iniciada pelo álcool propargílico, na presença do catalisador 2-etil hexanoato de estanho II ($\text{Sn}(\text{Oct})_2$), utilizando tolueno como solvente, conforme

esquema apresentado na Figura 4.2. A metodologia utilizada foi adaptada de Degirmenci, Besli e Genli (2014).

Figura 4.2 Polimerização por abertura de anel da ϵ -CL em tolueno iniciada por álcool propargílico.



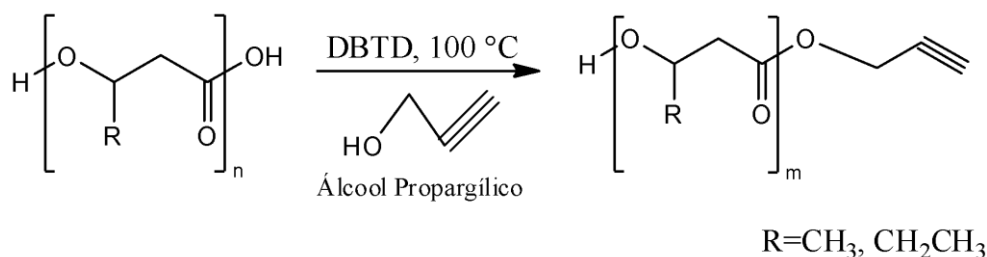
Fonte: Autoria própria.

Inicialmente, 20 g de ϵ -CL (0,175 mol) e 10 mL de tolueno foram adicionados em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL. Em seguida, duas soluções previamente preparadas contendo 0,30 g de álcool propargílico (5,0 mmol) e 0,35 g de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (0,86 mmol) em 5 mL de tolueno, respectivamente, foram adicionadas ao balão. A mistura reacional foi, então, colocada sob agitação magnética e fluxo de nitrogênio gasoso por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a deaeração, o sistema reacional foi imerso em banho de glicerina previamente aquecido a $100\text{ }^\circ\text{C}$ e mantido sob agitação e aquecimento por 8 horas. Após o término do tempo de reação, a PCL-alcino foi purificada por precipitação em éter dietílico gelado e seca em estufa sob vácuo a $30\text{ }^\circ\text{C}$, durante 24 horas. O procedimento de precipitação foi repetido três vezes para a remoção de resíduos da reação.

4.2.2 Obtenção do poli(3- hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) com grupo terminal Alcino (PHBHV-alcino)

Para a redução da massa molar do PHBHV e sua funcionalização com grupo alcino, utilizou-se a transesterificação com álcool propargílico, catalisada por dibutil-dilaurato de estanho, utilizando tolueno como solvente. A Figura 4.3 apresenta o esquema referente à reação de transesterificação do PHBHV.

Figura 4.3 Reação de redução de massa molar do PHBHV via transesterificação com álcool propargílico catalisada pelo dibutil-dilaurato de estanho.



Fonte: Autoria própria.

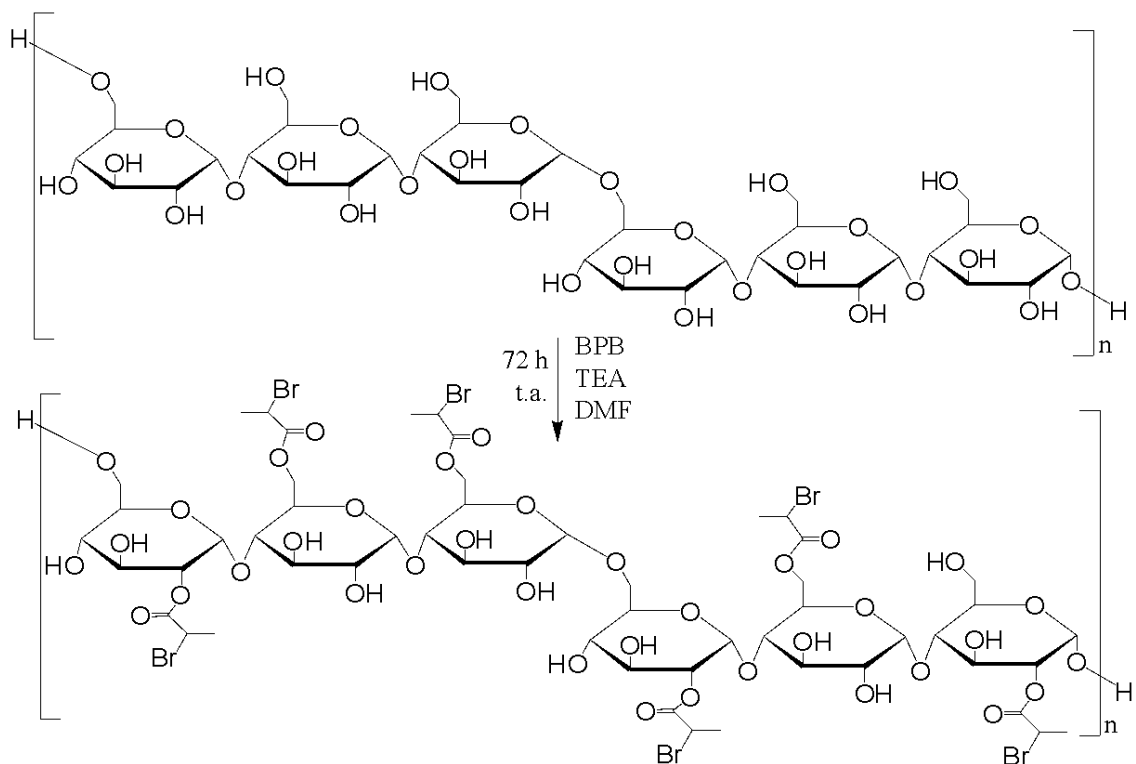
Inicialmente, 20 g de PHBHV (0,125 mmol) e 21,2 mL de álcool propargílico (0,367 mol) 270 mL de tolueno foram adicionados a um balão de fundo redondo com capacidade para 500 mL. A solução foi deaeração sob fluxo de nitrogênio por 30 min, seguido pelo aquecimento do sistema em banho de glicerina a 130 °C. Após completa solubilização, a temperatura do sistema foi reduzida para 110 °C e adicionou-se uma solução constituída de 1 g de dibutil-dilaurato de estanho (1,5 mmol) em 30 mL de tolueno, dando início à reação de transesterificação. Transcorridas 12 h de reação, o sistema reacional foi imerso em água gelada para interromper a reação. Em seguida o material foi precipitado em *n*-hexano gelado e mantido por 24 h em ambiente refrigerado. O precipitado foi recuperado através de filtração a vácuo e, posteriormente, seco em estufa a vácuo. Após secagem, o polímero foi solubilizado em clorofórmio, e precipitado novamente em *n*-hexano gelado, para remoção de impurezas, e foi mantido por 24 h em ambiente refrigerado. Em seguida, o material foi recuperado por filtração a vácuo e secagem em estufa a vácuo por 24 h. O procedimento de purificação foi realizado três vezes.

4.2.3 Funcionalização da pululana com brometo de 2-bromopropionila (BPB)

Para a funcionalização da pululana com BPB adicionou-se 1 g de pululana (6,18 mmols unidades de glicose) em 20 mL de DMF em balão de fundo redondo, com capacidade para 100 mL, mantendo-se sob agitação até a solubilização completa da pululana. Em seguida, uma solução constituída de 1,25 g de TEA (12,36 mmol) em 5 mL de DMF foi adicionada ao meio, deixando por 30 minutos

sob fluxo de nitrogênio e agitação. O sistema foi, então, submetido a banho de gelo e foram adicionados, gota a gota, 0,67 mg de BPB (3,09 mmol) em 5 mL de DMF. Após o término da adição, o sistema foi retirado do banho de gelo e do fluxo de nitrogênio e mantido por 72 h à temperatura ambiente. O esquema de reação encontra-se apresentado na Figura 4.4. O produto final foi purificado através da precipitação em mistura 1:5 de éter dietílico e álcool etílico, respectivamente. Na sequência o material final, PullBr, foi filtrado e seco a vácuo por 24 h.

Figura 4.4 Esquema de reação de funcionalização da pululana com BPB.



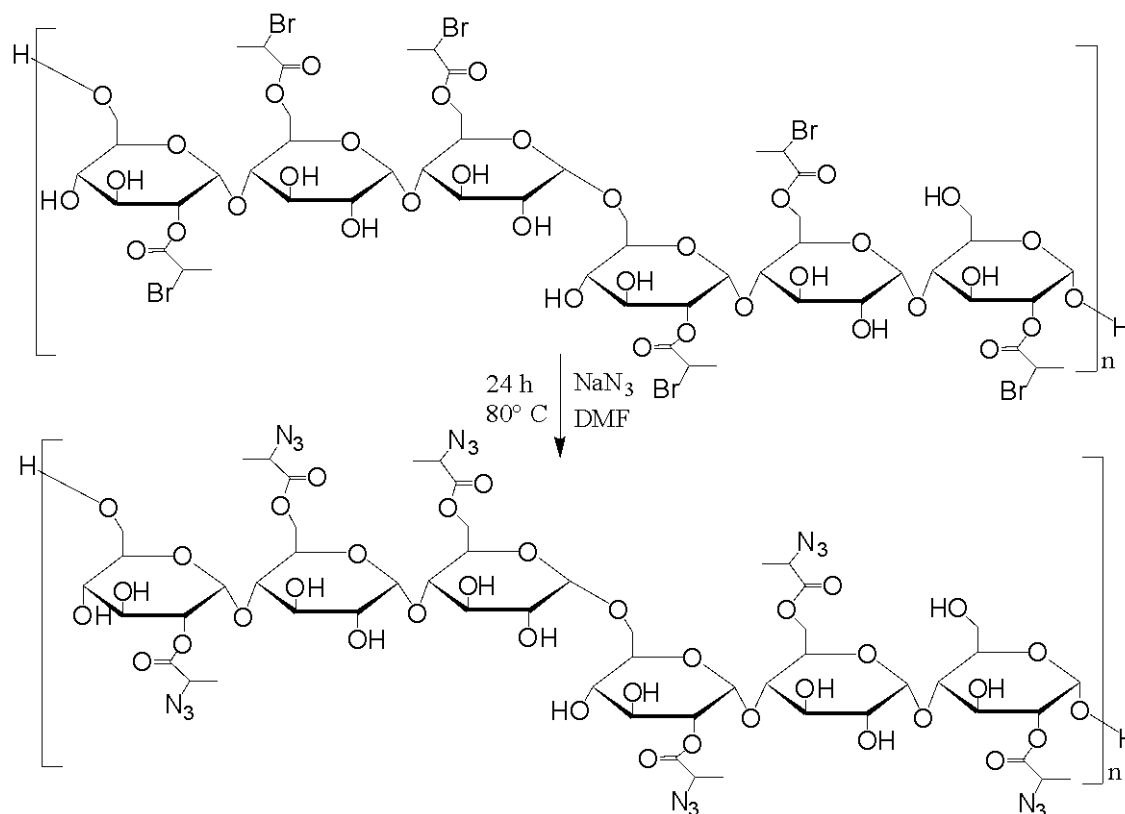
Fonte: Autoria própria.

4.2.4 Obtenção da pululana funcionalizada com grupos azida

Para a modificação química da pululana com grupos azida (Fig. 4.5) foram adicionados 1 g de PullBr (6,2 mmol de unidade de glicose, DS=0.08) em 20 mL de DMF em balão de fundo redondo, com capacidade para 100 mL, mantendo-se sob agitação até a solubilização completa da pululana. Em seguida, foi adicionado ao balão 0,16 g de NaN₃ (2,47 mmol), sob fluxo de nitrogênio por 30 minutos. Na

sequência, o fluxo de nitrogênio foi retirado e o sistema foi submerso em banho de glicerina previamente aquecido a 80 °C. Após 24 h, o produto final foi precipitado em mistura 1:5 de éter dietílico e metanol respectivamente. Finalmente, a PullN₃ foi filtrada e seca à vácuo por 24 h.

Figura 4.5 Esquema da reação de substituição dos grupos bromo da pululana por grupos azida.

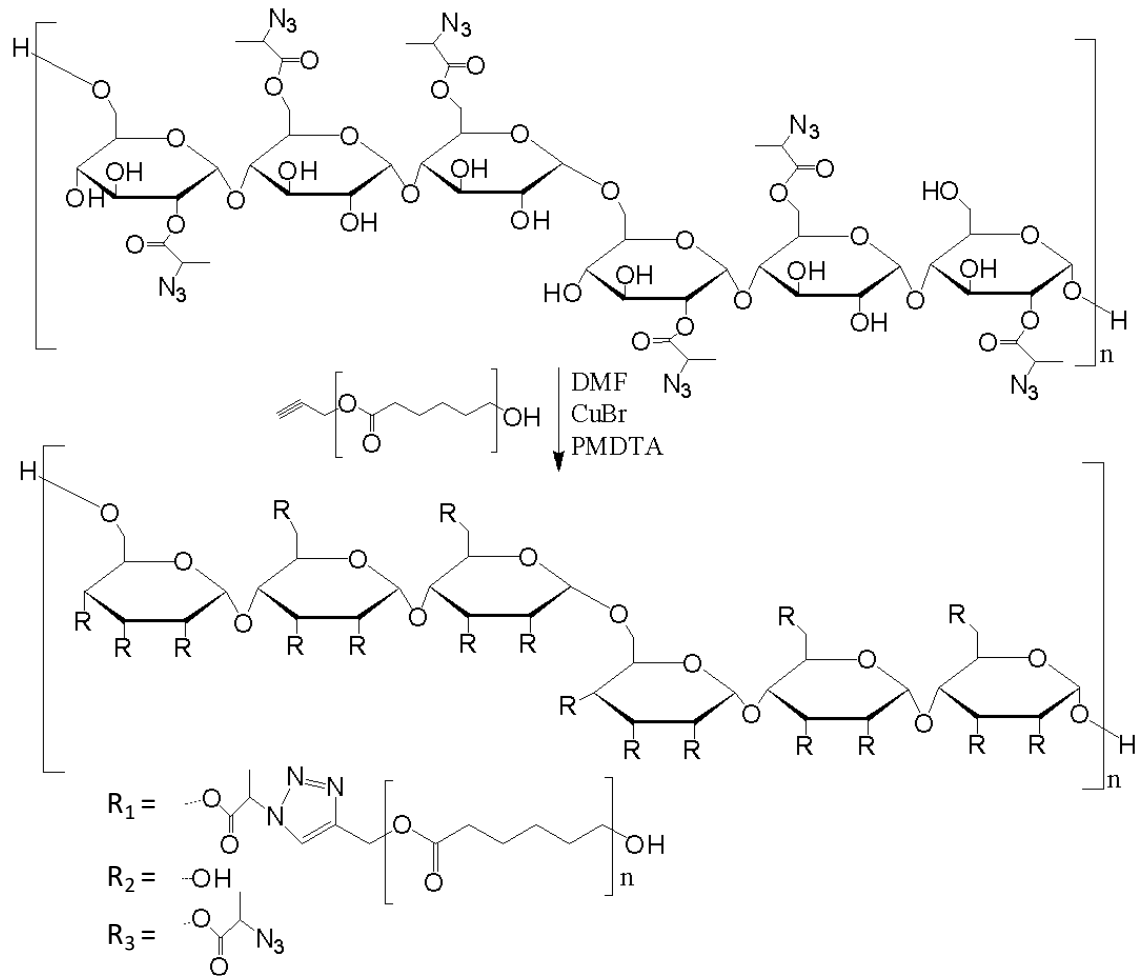


Fonte: Autoria própria.

4.2.5 Síntese de copolímero enxertado Pull-g-PCL via CuAAC

O acoplamento entre a PullN₃ e a PCL-alcino foi feito via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre alcino e azida, também conhecida como CuAAC. Para esta reação, é indispensável o uso de um catalisador Cu(I). Neste projeto, optou-se por utilizar o CuBr em presença da base PMDTA. A Figura 4.6 apresenta o esquema da reação de enxertia.

Figura 4.6 Representação da reação de enxertia da PCL nas cadeias de pululana, via CuAAC.



Fonte: Autoria própria.

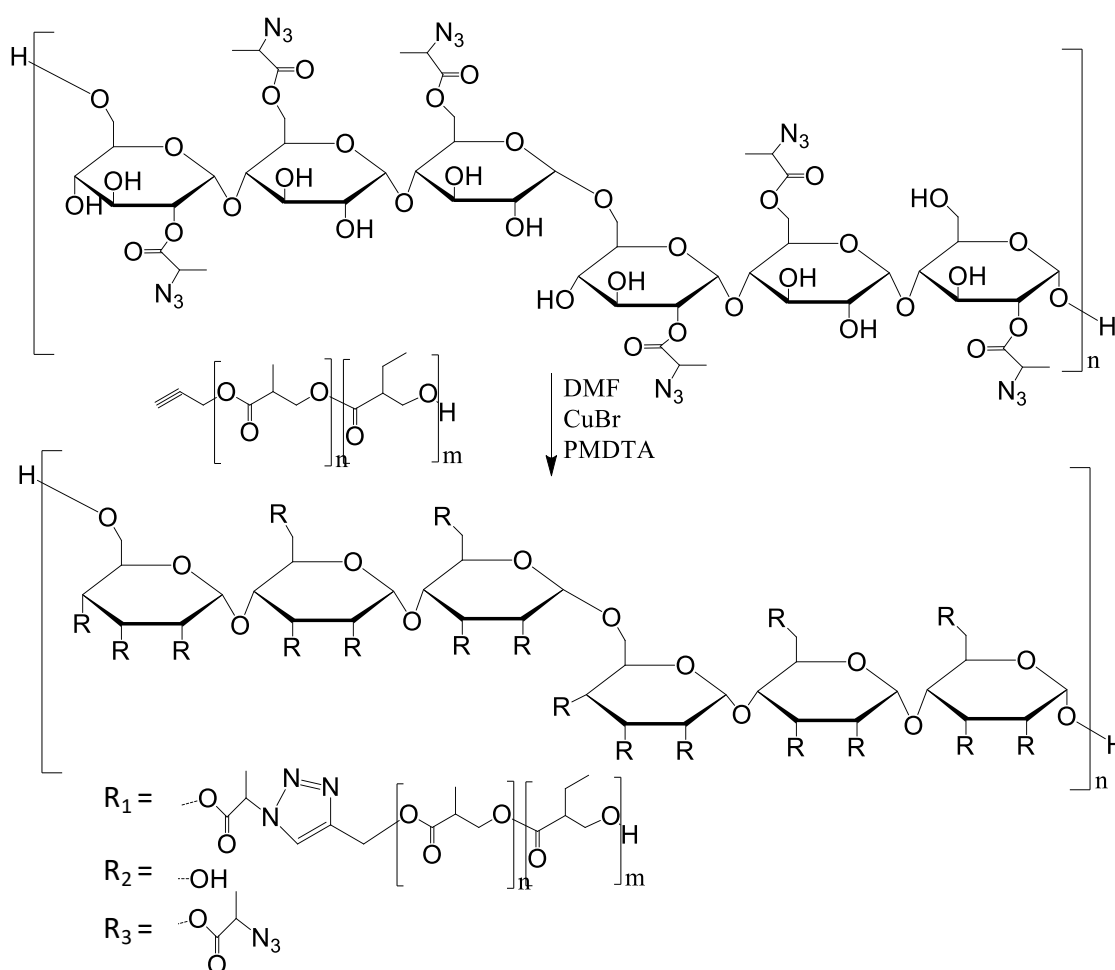
Para essa reação, primeiramente, adicionou-se 0,2522 g de PullN₃ (1,56 mmol de unidade de glicose, DS=0,08) em um balão de fundo redondo juntamente com 0,5006 g de PCL (0,116 mmol) e 5 mL de DMF. A solução foi submetida a forte agitação e fluxo de nitrogênio constante, para a homogeneização e completa remoção de oxigênio do meio reacional. Em paralelo, foram preparadas duas soluções, sendo elas 37,18 mg.mL⁻¹ de solução de CuBr e 44,92 mg.mL⁻¹ de solução de PMDTA ambas preparadas em DMF. As soluções foram deaeração e agitadas continuamente. Após o período de deaeração, 1 mL da solução de PMDTA (0,259 mmol) foi adicionado ao balão reacional, seguido pela adição de 1 mL da solução de CuBr (0,465 mmol). Desta forma, o fluxo de nitrogênio foi encerrado e o balão vedado e submerso em banho de glicerina a 60 °C. Após 120 horas, o produto final

de reação foi precipitado em mistura de éter e álcool etílico 1:5, respectivamente. O produto final, Pull-g-PCL foi filtrado e seco, sob vácuo, durante 24 h.

4.2.6 Síntese do copolímero enxertado Pull-g-PHBHV via CuAAC

O acoplamento entre a PullN₃ e a PHBHV-alcino foi feito via reação de cicloadição 1,3-dipolar entre alcino e azida, utilizando um catalisador de Cu(I), conforme esquema apresentado na Figura 4.7. A obtenção do copolímero foi realizada utilizando a mesma metodologia conforme aplicado para a síntese da Pull-g-PCL.

Figura 4.7 Representação da reação de enxertia da PHBHV nas cadeias de pululana, via CuAAC.



Fonte: Autoria própria.

Para essa reação, primeiramente, foi adicionado, em balão de fundo redondo, 0,0803 g de PullIN₃ (0,498 mmol de unidade de glicose, DS=0,08) juntamente com 0,1593 g de PHBV (0,039 mmol) e 8 mL de DMF. A solução foi submetida a forte agitação e fluxo de nitrogênio constante, para a homogeneização e completa remoção de oxigênio do meio reacional. Em paralelo, foram preparadas duas soluções, solução de CuBr 141,88 mg.mL⁻¹ e solução de PMDTA 171,4 mg.mL⁻¹ ambas com DMF como solvente. As soluções foram deaeração e agitadas continuamente. Após o período de deaeração, 2,5 mL da solução de PMDTA (2,4 mmol) foi adicionado ao balão reacional, seguido pela adição de 2,5 mL da solução de CuBr, (2,47 mmol) obtendo um volume total de 13 mL no meio reacional. Desta forma, o fluxo de nitrogênio foi encerrado e o balão vedado e submerso em banho de glicerina a 60 °C. Após 120 horas, o produto final de reação foi precipitado em mistura de éter e álcool etílico 1:5, respectivamente. O produto final, Pull-g-PHBV foi filtrado e seco, sob vácuo, durante 24 h.

4.2.7 Preparo de partículas a partir dos copolímeros enxertados Pull-g-PCL e encapsulação de indometacina

O copolímero Pull-g-PCL foi, então, utilizado para o preparo de partículas, contendo ou não indometacina, através do método de nanoprecipitação por diálise de acordo com a metodologia adaptada de Sui et al. (2008). Dez formulações diferentes foram preparadas, variando-se o tipo de solvente utilizado, *N,N*-dimetilformamida (DMF) ou dimetilsulfóxido (DSMO), a quantidade de polímero e quantidade de fármaco, de acordo com os dados listados na Tabela 4.1. Primeiramente, quantidade apropriada do copolímero foi dissolvida em 5 mL do solvente e, em seguida, a indometacina, quando cabível, foi adicionada ao sistema em diferentes proporções mássicas (0/7,5, 5/7,5, 10/10 e 5/10 mg de fármaco por mg de copolímero respectivamente). A solução foi agitada à temperatura ambiente, e transferida para uma membrana de diálise de massa molecular de corte de 12 kDa (Sigma-Aldrich). A amostra foi dialisada em 1 L de água deionizada por 72 h, realizando 3 trocas de água por dia. A suspensão de partículas foi liofilizada e, posteriormente, utilizada para a determinação da eficiência de encapsulação.

Tabela 4.1 Formulações utilizadas no preparo de partículas a partir do copolímero Pull-g-PCL via nanoprecipitação por diálise.

Formulação	Massa de polímero (mg)	Massa de fármaco (mg)	Solvente
F1	15	-	DMF
F2	7,5		DMF
F3	7,5	5	DMF
F4	7,5	10	DMF
F5	10	10	DMF
F6	10	5	DMF
F7	7,5		DMSO
F8	7,5	5	DMSO
F9	7,5	7,5	DMSO
F10	10	5	DMSO

Fonte: Autoria própria.

4.2.7.1 Eficiência de encapsulação

Para determinar a eficiência de encapsulação das partículas, primeiramente foi construída a curva de calibração do fármaco em DMF. Para isso, diferentes concentrações de indometacina (0,1 a 0,005 mg.mL⁻¹) foram solubilizadas em DMF e analisadas no equipamento de UV/Visível, Shimadzu UV-1800 (Laboratório de Polímeros, LOQ - EEL/USP), com o comprimento de onda de 319. Através da linearização dos resultados de absorvância obtidos, foi possível determinar a equação da reta para a concentração da indometacina.

Em seguida, uma amostra do nanoagregado foi solubilizada em 2 mL de DMF, e analisada no UV/VIS com o mesmo comprimento de onda. Através do valor de absorvância obtido foi determinada a concentração de indometacina presente nas partículas. Para o cálculo de eficiência de encapsulação, a concentração final de indometacina no copolímero foi correlacionada com a concentração adicionada antes do início da diálise, conforme apresentado na Equação 4.1 (CONSTANTIN et al., 2017).

$$EF (\%) = \frac{\text{razão mássica real } \left(\frac{\text{mg de indometacina}}{\text{mg de amostra analisada}} \right)}{\text{razão mássica teórica } \left(\frac{\text{mg de indometacina inicial}}{\text{mg de amostra inicial total}} \right)}, \quad (4.1)$$

4.3 Caracterizações

4.3.1 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massas molares médias numérica (M_n) e ponderal (M_w) e a dispersidade (\bar{M}_w/\bar{M}_n) dos polímeros foram determinadas pela técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC). Para as amostras de PCL-alcino, PHBHV de partida e PHBHV-alcino, utilizou-se um equipamento Waters, modelo Breeze locado no Departamento de Engenharia Química (LOQ-EEL-USP) com detector de índice de refração (RI) modelo 2414 e injetor automático, modelo Waters 717. A PCL-alcino foi caracterizada utilizando THF, com 0,3% v/v de trietilamina, como eluente, enquanto o PHBHV e o PHBHV-alcino foram caracterizados utilizando clorofórmio como eluente. Todas as amostras foram preparadas na concentração de 10 mg.mL⁻¹, filtradas em filtro de membrana de poli(difluoreto de vinilideno) (PVDF) modificada (0,45 µm) e, posteriormente, injetadas no equipamento. A vazão de solvente foi de 1 mL.min⁻¹, e a temperatura interna das colunas foi mantida a 30 °C. As curvas de calibração foram obtidas utilizando padrões de poliestireno monodisperso.

Para a amostra de pululana comercial não modificada, utilizou-se um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC) com injetor automático (Sil-20A) e detector de índice de refração Shimadzu, locado no Departamento de Engenharia de Materiais (LOM-EEL-USP). Duas colunas Phenomenex, PolySep – SEC GFC P5000 e P3000 (intervalo de separação 3-400 kDa, dimensões da coluna 300 x 7,8 mm) e uma pré coluna Phenomenex, PolySep – SEC GFC P (dimensão 35 x 7,8 mm) foram utilizadas para a separação. A pululana foi solubilizada em solução tampão fosfato (50 mmol.L⁻¹), em pH = 7, contendo 0,05 % (m/v) de azida sódica (fungistático) e 0,05 %m/v de nitrato de potássio, e filtrada em filtro de membrana de poli(difluoreto de vinilideno) PVDF modificada (0,45 µm). A solução tampão foi utilizada como fase móvel, com vazão fixa de 0,5 mL.min⁻¹, e volume de injeção de 15 µL de amostra diluída. As curvas de calibração foram obtidas utilizando padrões de polietilenoglicol.

4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A composição química dos polímeros foi avaliada via ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) em um espectrômetro Varian modelo Mercury 300 (LOQ-EEL-USP), operando com frequência de 300 MHz. A técnica de RMN ^1H também foi utilizada na análise da conversão dos monômeros ϵ -CL, bem como para o cálculo de grau de substituição da modificação química da pululana e na síntese de copolímeros enxertados. Para as caracterizações foram utilizadas 10 mg de amostra solubilizadas em 1 mL de solvente deuterado (DMSO- d_6 , CDCl_3 ou D_2O).

4.3.3 Espectrometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A composição química dos polímeros foi avaliada, qualitativamente, através da espectrometria de infravermelho (FTIR). Estas análises foram realizadas utilizando-se pastilhas de brometo de potássio (KBr), em um aparelho da marca Shimadzu, modelo IRPrestige-21 (LOM-EEL-USP). Para o preparo das pastilhas foi utilizada a proporção de 2 mg de amostra para 100 mg de KBr.

A análise de composição química do material também foi realizada através da técnica de FTIR com o modo de Reflexão Total Atenuada (ATR), utilizando o equipamento Perkin-Elmer Spectrum 100, do Laboratório de Plasma da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Guaratinguetá. Foi utilizado o cristal de diamante como elemento interno de reflexão, e resolução da análise de 4 cm^{-1} .

4.3.4 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foram realizadas no equipamento TA Instruments – Waters LLC, Modelo Q20 (LOQ-EEL-USP). As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio, com fluxo de $50\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, e uma taxa de $10^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Foram realizados dois aquecimentos na amostra, o primeiro feito para a remoção de históricos residuais, com faixa de temperatura entre -50 e 180°C e o segundo com faixa de temperatura entre -80 a 200°C , para

todas as amostras, incluindo pululana, pululana modificada, PCL-alcino e Pull-g-PCL.

4.3.5 Análise termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram realizadas no equipamento NETZSCH, modelo STA 449 F3 Júpiter, disponível no Departamento de Engenharia de Materiais (DEMAR/EEL). Para a realização da análise, foram pesadas as amostras entre 12 e 15 mg, e submetidas a aquecimento, variando a temperatura de 30 à 700 °C, com taxa de aquecimento de 10 °C/min, em atmosfera de nitrogênio.

4.3.6 Difratometria de Raios-X (DRX)

As análises de difração de raios-X da pululana, antes e após as reações de modificação, da PCL-alcino e da Pull-g-PCL foram realizadas utilizando o difratômetro PAN-analytical Empyrean ACMS 101 (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, United Kingdom) (LOM-EEL-USP). Foi utilizada fonte de cobre (Cu) com radiação de emissão $K\alpha$ ($\lambda=1,5418 \text{ \AA}$). As análises foram realizadas à temperatura ambiente, na faixa de varredura de 10 a 90°, com o incremento de 0.02°, contabilizando 50 segundos por incremento.

4.3.7 Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS)

As análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-x de pululana antes e após as reações de modificação, da PCL-alcino e da Pull-g-PCL foram realizadas com o analisador esférico VSW HA-100 e não monocromado com radiação $AlK\alpha$ ($h\nu=1486.6 \text{ eV}$). As análises foram realizadas no laboratório de Física de Superfícies (GFS), na Universidade de Campinas (UNICAMP). Os espectros de alta resolução foram medidos com energia constante de 44eV com pressão menor que 6×10^{-8} mbar. As amostras foram analisadas por meio de sua fixação em um porta amostras de aço inoxidável com fita condutora dupla face. O ajuste de curva foi realizado usando formas de linhas Gaussianas, e um fundo de Shirley foi subtraído dos dados.

4.3.8 Concentração Crítica de Agregação.

A concentração crítica de agregação (CAC) da Pull-*g*-PCL em água deionizada foi determinada pela técnica de espectroscopia de fluorescência, utilizando o fluorímetro VarianCary Eclipse (LOQ-EEL-USP). Pireno foi utilizado como sonda de acordo com a metodologia adaptada de Constantin et al. (2017). Primeiramente, uma solução de pireno foi preparada em acetona, e adicionada em balões volumétricos de 10 mL, mantendo a concentração constante em todos os balões de $6,0 \times 10^{-7}$ M. Em seguida, a acetona foi evaporada e soluções do copolímero anfifílico foram adicionadas aos balões em diferentes concentrações, variando-as de $2,5 \times 10^{-4}$ a $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. As soluções foram armazenadas à temperatura ambiente por 24 h, e as leituras foram realizadas no equipamento com comprimento de onda de emissão de 390 nm. A razão entre a intensidade de emissão do pico em 333 nm e a intensidade do pico em 337 nm (I333/I337) do pireno é de grande sensibilidade em relação à polaridade do microambiente, sendo esses picos utilizados para a determinação da concentração crítica de agregação.

4.3.9 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro médio (DP) e a polidispersidade das partículas baseadas em Pull-*g*-PCL, preparadas com diferentes concentrações de polímero, diferentes solventes e contendo ou não a indometacina, foi avaliado por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) no equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments) (LOQ-EEL-USP). As partículas em suspensão, obtidas através da nanoprecipitação por diálise em água deionizada, foram diretamente colocadas em cubeta de vidro e medidas em triplicatas no equipamento.

4.3.10 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)

Na caracterização das partículas à base de Pull-*g*-PCL, contendo ou não a indometacina, por TEM, utilizou-se um equipamento da marca Philips, modelo Tecnai 10, operado a 80kV, locado no Centro de Microscopia do Hospital das Clínicas (HC) da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo. Para estas análises, uma gota da suspensão de partículas foi depositada em grade de cobre revestida

com carbono, seca à temperatura ambiente durante 1 hora e, posteriormente, analisada.

4.4 Ensaios de liberação *in vitro* da indometacina

Os ensaios de liberação *in vitro* da indometacina foram realizados para a amostra de partículas sintetizadas a partir da formulação F1, de acordo com a Tabela 4.1, constituídas de Pull-*g*-PCL, a 37 °C, utilizando solução tampão fosfato pH 7,4. Para a obtenção da curva de porcentagem de liberação de indometacina em função do tempo, 7,5 mg de partículas, contendo o fármaco, secas foram pesadas e colocadas em membranas de diálise de 12 kDa de corte, com o auxílio de 5 mL da solução tampão pH 7,4, logo em seguida, a membrana foi mergulhada em 70 mL de solução pH 7,4, e mantida sob agitação constante por 24 horas. Para cada 1 mL de amostra realizou-se o perfil de dissolução do fármaco retirando-se as alíquotas nos tempos de 1, 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 360, 480, 600, 720 e 1440 minutos, e repondo-se o mesmo volume de meio a $37 \pm 0,5$ °C, conforme retirada das amostras. As alíquotas coletadas foram analisadas em UV/Visível Shimadzu UV-1800 (Laboratório de Polímeros, LOQ - EEL/USP), utilizando o comprimento de onda de 319.

4.5 Aplicação de modelo matemático para descrever o perfil de liberação *in vitro* da indometacina a partir das partículas de Pull-*g*-PCL

O perfil de liberação *in vitro* da indometacina foi analisado utilizando uma abordagem independente (Eficiência de Dissolução, *DE*) e dependente de um modelo matemático (ajuste da curva de liberação em função do tempo). O software KinetDS® foi usado para ajustar as curvas de liberação ao modelo matemático de Korsmeyer-Peppas (PEPPAS, 1965) (Equação 4.2, Tabela 4.2). A exatidão e a capacidade de predição do modelo matemático foram analisadas pelo cálculo do coeficiente de correlação (R^2), critério de informação de Akaike (*AIC*) e raiz do erro médio quadrático (*RMSE*), descrito na Tabela 2 (Equações 4.3 e 4.4). Os valores de *DE* também foram obtidos através do software KinetDS®, conforme Equação 4.5 (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 Modelo cinético dependente aplicado para analisar os dados de liberação do fármaco.

Abordagem	Método	Equação
Dependente de modelo	Korsmeyer-Peppas	$M_t = K * t^n$ (4.2)
	Melhor critério do modelo	$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (y_{i_{obs}} - y_{i_{pred}})^2}{n}}$ (4.3)
		$AIC = (2 * K) + n * [\ln(\sum_{i=1}^n (y_{i_{obs}} - y_{i_{pred}})^2)]$ (4.4)
Independente de modelo	Eficiência de dissolução (DE)	$DE = \left(\frac{\int_0^t Mtdt}{M_{t_{max}} * t} \right) * 100$ (4.5)

Mt é a quantidade de fármaco liberado no tempo time t;

K é a constante de liberação incorporando características estruturais e geométricas da formulação farmacêutica;

n é o expoente difusional indicando o mecanismo de liberação da droga;

Mt_{max} = quantidade máxima de droga liberada (=100%).

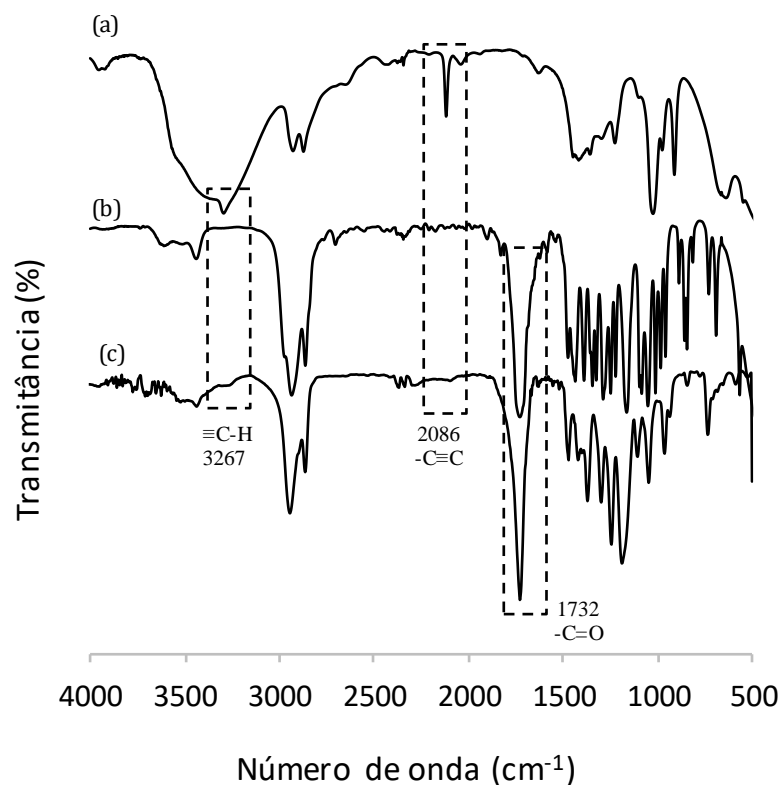
Fonte: Autoria própria.

5 RESULTADOS

5.1 Obtenção da poli(ϵ -caprolactona) com grupo terminal alcino, PCL-alcino.

A Figura 5.1 apresenta os espectros de FTIR do álcool propargílico, do monômero ϵ -CL e da PCL-alcino, após sua síntese via polimerização por abertura de anel. O espectro de RMN ^1H e a massa molar, bem como dispersidade (\mathcal{D}), da PCL-alcino são apresentados na Figura 5.2 e Tabela 5.1, respectivamente.

Figura 5.1 Espectros de FTIR do (a) álcool propargílico, (b) ϵ -CL e do (c) produto de reação de polimerização por ROP da ϵ -CL com álcool propargílico.

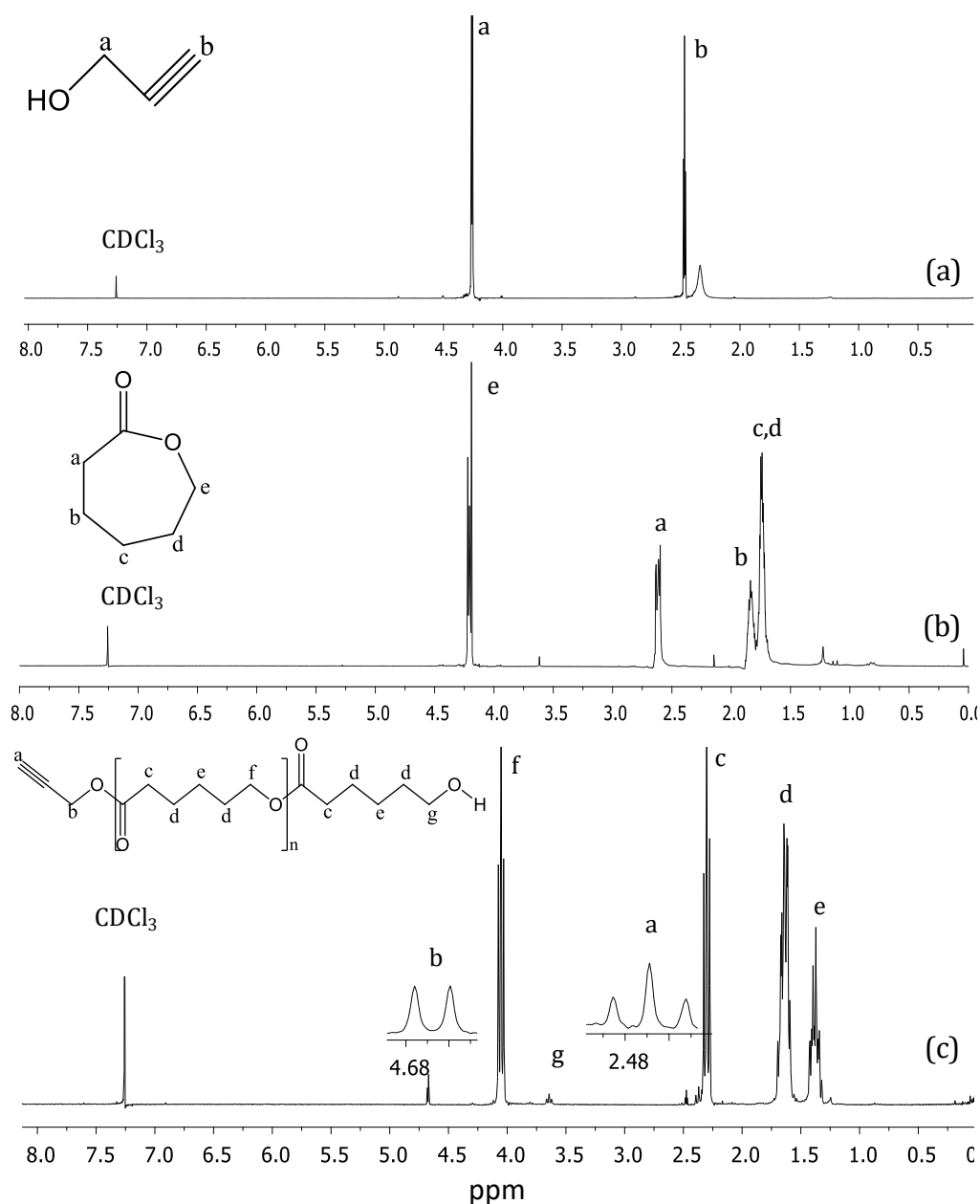


Fonte: Autoria própria.

Analisando o resultado de FTIR apresentado na Figura 5.1, observa-se a presença de deformação axial referente à carbonila em 1732 cm⁻¹, presente tanto na estrutura da ϵ -CL quanto na PCL-alcino. Já os picos referentes às ligações presentes na estrutura do alcino, H-C \equiv e -C \equiv C-, respectivamente 3267 e 2086 cm⁻¹.

¹ encontram-se presentes nos espectros do álcool propargílico e da PCL-alcino (Fig 5.1.a e Fig. 5.1.c), caracterizando sua funcionalização com o grupo alcino. Os picos apresentados em 2947 cm⁻¹ e 2866 cm⁻¹ são característicos da deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-H, presentes tanto antes quanto após a abertura de anel. Nota-se também, a vibração assimétrica acoplada de CC(=O)-O em 1188 cm⁻¹, caracterizando desta forma, a estrutura química da PCL-alcino.

Figura 5.2 Espectro de RMN ¹H do álcool propargílico (a), da ε-CL (b) e da PCL-alcino(c).



Fonte: Autoria própria.

Através do espectro de RMN ^1H da PCL-alcino, apresentado na Figura 5.2.c, observa-se a presença de picos de hidrogênio da PCL em δ (ppm) = 2,30 (2H, $-\text{OC}(=\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_2$, representado por “c”), 1,64 e 1,37 (referentes a cadeia alifática, representados respectivamente por “d” e “e”), 4,05 (2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OC}(=\text{O})-$, representado por “f”) e 3,64 (2 H, $-\text{CH}_2\text{OH}$, representado por “g”). Além disso, os picos provenientes do álcool propargílico apresentados na Figura 5.2.a foram detectados em 2,47 (1H, $\underline{\text{C}}\text{H}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-$, “a”) e 4,25 (2H, $\text{CH}\equiv\text{C}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-$, “b”), valores estes que diferem do álcool propargílico de partida, devido ao seu acoplamento às cadeias de PCL. Desta forma, evidencia-se, então, a funcionalização da PCL com grupo alcino terminal, conforme proposto.

Tabela 5.1 Massa molar e dispersidade (\mathcal{D}) da PCL-alcino, obtida via ROP, utilizando o álcool propargílico como iniciador.

Amostra	X(%) ^a	$M_n(\text{Da})^b$	$M_n(\text{Da})^c$	$M_n(\text{Da})^a$	\mathcal{D}^b
PCL-alcino	99,67	6438	3798,8	4319,6	1,45

Determinado por ^a RMN ^1H , ^b GPC, ^c M_n teórica Fonte: Autoria própria.

Os valores de massa molar da poli(ϵ -caprolactona), apresentados na Tabela 5.1, foram determinados via GPC, teoricamente e via RMN ^1H , obtendo respectivamente os valores de 6438 Da, 3798,8 Da e 4319,6 Da. Os valores elevados de massa molar confirmam a polimerização da ϵ -caprolactona com grupos propargílicos, obtendo-se cadeias poliméricas homogêneas com valor de dispersidade 1,45 (via GPC). Para determinar a massa molar via RMN ^1H , atribuiu-se o valor de um ao sinal em 4,68 ppm (Figura 5.2.c) correspondente ressonância do grupo propargil. Em seguida, os sinais em 4,05 ppm e 3,64 ppm (Figura 5.2.c), correspondentes às ressonâncias de grupos característicos da ϵ -caprolactona, foram integrados, obtendo-se os valores de 36,32 e 1,08, respectivamente. A soma dos valores de integração resultou em um grau de polimerização de 37,40, o qual multiplicado pelo peso molecular da ϵ -caprolactona e somado ao peso molecular da unidade de propargil, presente na extremidade da cadeia polimérica, resultou na determinação da massa molar da PCL via RMN ^1H . Para a determinação da massa molar teórica utilizou-se a equação 5.1, a qual correlaciona as proporções molares entre o monômero ϵ -caprolactona e o álcool propargílico utilizado como o agente

de transferência de cadeia, na reação de polimerização por abertura de anel. Esta proporção molar foi multiplicada pelo rendimento da reação e em seguida multiplicada pela massa molar do monômero, somando, por fim, a massa molar do álcool presente na extremidade da cadeia.

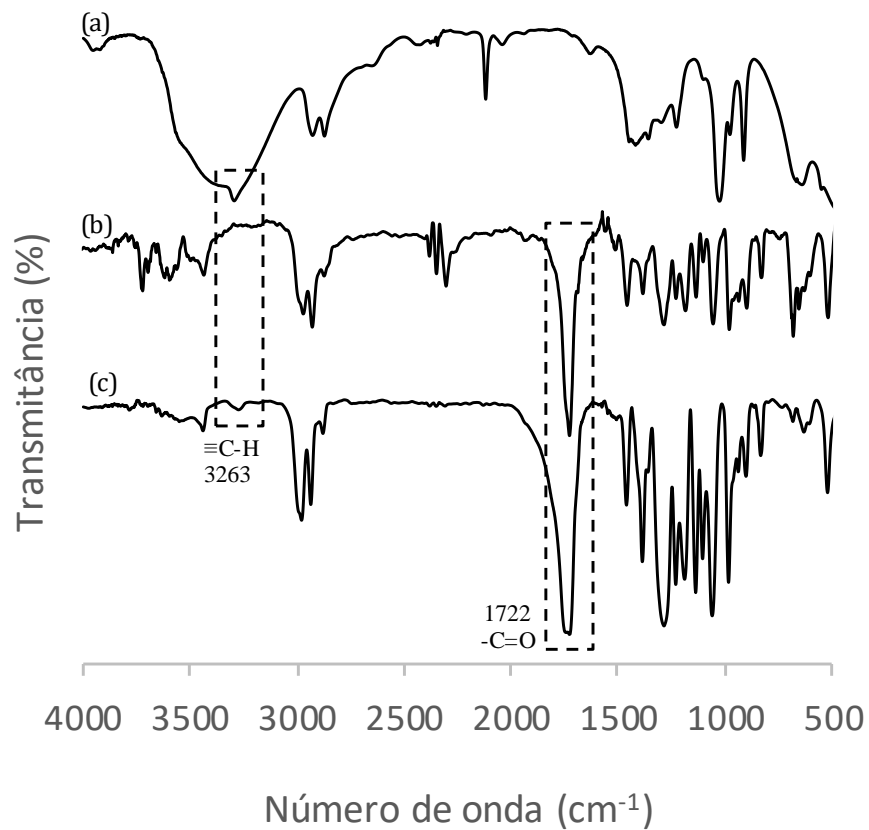
$$Mn_{teórica} = \left(\frac{[\varepsilon-CL]}{[álcool]} \cdot X_{\varepsilon-CL} \right) \cdot Mn_{\varepsilon-CL} + Mn_{álcool \text{ propargílico}}, \quad (5.1)$$

Comparando os valores obtidos pelas diferentes técnicas, observa-se certa discrepância dentre eles. Este fato pode ser justificado devido à calibração das análises de GPC ser realizada utilizando padrão de poliestireno, cuja volume hidrodinâmico se diferencia da espécie molecular utilizada como amostra, a PCL-alcino.

5.2 Obtenção do poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato) com grupo terminal alcino, PHBHV-alcino.

A Figura 5.3 apresenta os espectros de FTIR do álcool propargílico, do PHBHV de partida e funcionalizado com grupo alcino (PHBHV-alcino). O espectro de RMN 1H do PHBHV-alcino e as massas molares e dispersidades (\mathcal{D}) do PHBHV de partida e do PHBHV-alcino, são apresentados na Figura 5.4 e na Tabela 5.2, respectivamente.

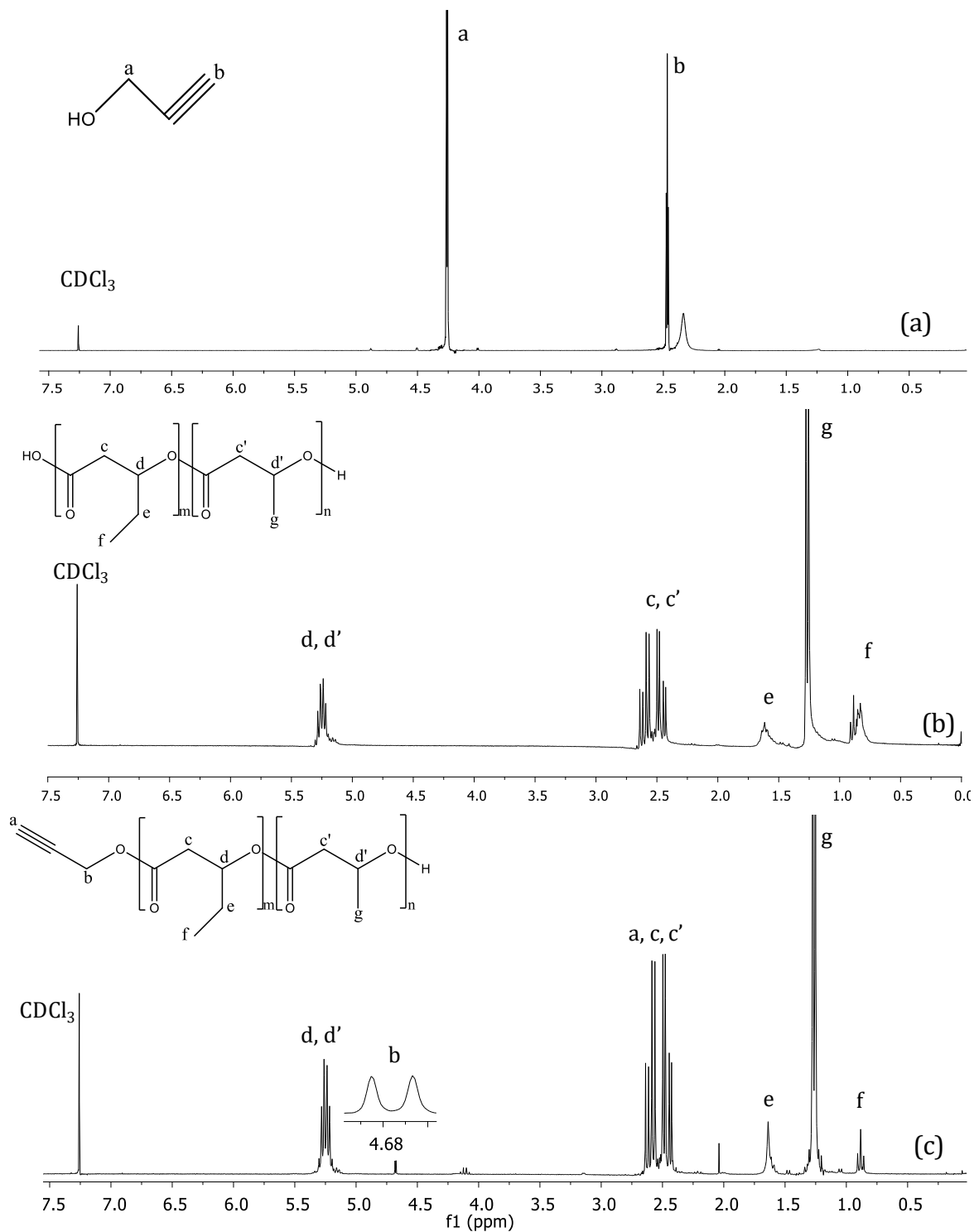
Figura 5.3 Espectros de FTIR do (a) álcool propargílico, (b) PHBHV de partida e (c) do PHBHV-alcino.



Fonte: Autoria própria.

Através dos espectros de FTIR apresentados na Figura 5.3, nota-se a presença de pico de deformação axial da carbonila na região 1722 cm⁻¹. Em 2976 cm⁻¹ e 2929 cm⁻¹ estão os picos característicos da deformação axial assimétrica e simétrica da ligação C-H. A vibração assimétrica acoplada de CC(=O)-O referente ao grupo éster do PHBHV é caracterizada pelo pico em 1278 cm⁻¹. A banda em 3263 cm⁻¹, presente nos espectros apresentados na Figura 5.3.a e Figura 5.3.c, é característica da deformação axial H-C≡ e caracteriza, portanto, a funcionalização do PHBHV com grupo alcino.

Figura 5.4 Espectros de RMN ^1H do álcool propargílico (a), do PHBV de partida (b) e do produto de reação de transesterificação do PHBV com álcool propargílico (c).



Fonte: Autoria própria.

No espectro de RMN ^1H apresentado na Figura 5.4.a observa-se os picos referentes a molécula de álcool propargílico, caracterizados por um duplete em 4,25 (2H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\underline{\text{CH}_2}$ -, "a"), e um triplo em 2,47 (1H, $\underline{\text{HC}}\equiv\text{C}-\text{CH}_2$ -, "b"). Já na Figura

5.4.b o espectro de RMN ^1H mostra a presença de picos referentes ao hidrogênio da cadeia principal do polímero antes de sua transesterificação como δ (ppm) = 5,20-5,28 (1H, $-\underline{\text{CH}}-$ do HB e HV, “d” e “d” respectivamente), 2,42-2,66 (2H, $-\underline{\text{CH}_2}$ do HB e HV, “c” e “c” respectivamente), 1,64 (2H, $-\text{CH}\underline{\text{CH}_2}\text{CH}_3$ do HV, “e”), 1,26 (3H, $-\text{CH}\underline{\text{CH}_3}$ do HB, “g”) e 0,88 (3H, $-\text{CHCH}_2\underline{\text{CH}_3}$ do HV, “f”). Quando comparado com o espectro apresentado na Figura 5.4.c, observa-se a permanência dos picos de prótons característicos do PHBHV, porém nota-se neste a presença do próton proveniente da molécula do álcool propargílico acoplada na extremidade da cadeia de PHBHV em 4,68 (2H, $\text{HC}\equiv\text{C}-\underline{\text{CH}_2}$ -, “b”), ausente no espectro apresentado na Figura 5.4.b, o qual evidencia a funcionalizado do PHBHV com grupo alcino.

Tabela 5.2 Massa molar e dispersidade (\mathcal{D}) do PHBHV e PHBHV-alcino.

Amostra	$M_n(\text{Da})^a$	$M_n(\text{Da})^b$	\mathcal{D}^b
PHBHV	-	114873	2,86
PHBHV-alcino	2242	4049	1,54

Determinado por ^a RMN ^1H e ^b GPC.

Fonte: Autoria própria.

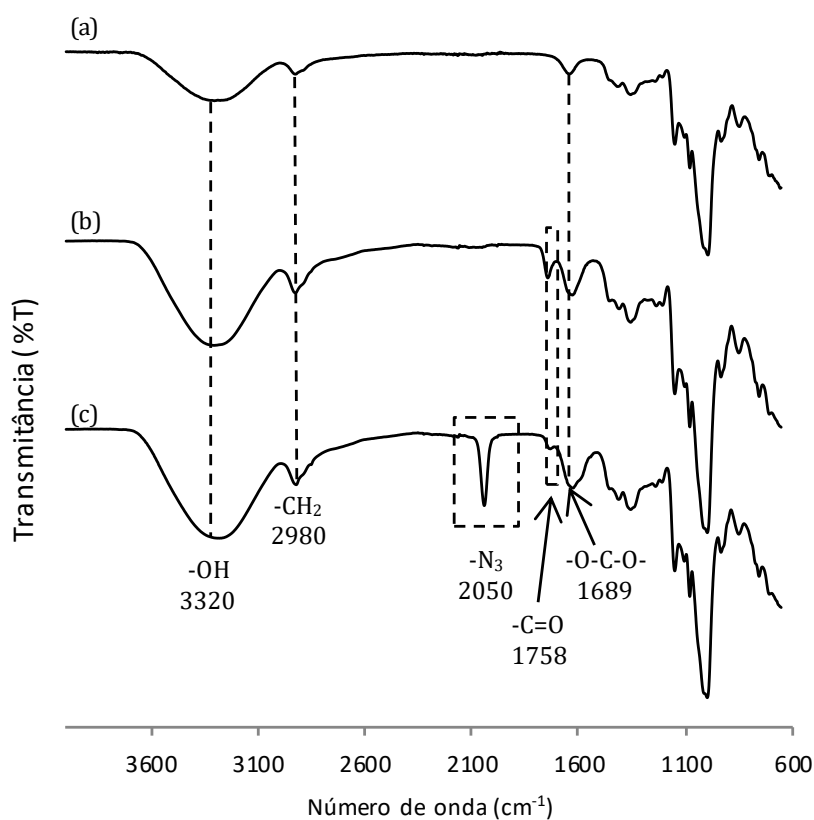
Analisando a Tabela 5.2, observa-se a eficiência da transesterificação do PHBHV, através da redução dos valores de massa molar (M_n) do polímero, após a reação com o álcool propargílico, passando de 114873 Da do PHBHV de partida para 4049 Da do PHBHV-alcino. Além da redução de massa molar, a transesterificação promoveu também a redução da dispersidade do material, reduzindo de \mathcal{D} igual a 2,86 do PHBHV de partida para \mathcal{D} igual a 1,54 do PHBHV-alcino, indicando um aumento na homogeneidade das cadeias do copolímero. Desta forma, o material apresentou-se viável para ser aplicado na próxima etapa de enxertia.

5.3 Modificação química da pululana com brometo de 2-bromopropionila (BPB) seguida pela modificação com azida.

Primeiramente, realizou-se uma análise de massa molar e dispersidade da pululana comercial, via GPC, obtendo-se os valores de M_n igual a 120,284 kDa, M_w igual a 243,743 kDa e D igual a 2,0264. A mesma caracterização não pôde ser realizada para a pululana, após as etapas de modificação e para a Pull-*g*-PCL, visto a insolubilidade dos polímeros modificados nos solventes disponíveis para caracterização via GPC.

A Figura 5.5 apresenta os espectros de FTIR da pululana antes e depois da modificação. Já o RMN ^1H e o XPS da pululana, e de suas modificações encontram-se demonstradas na Figura 5.6 e 5.7, respectivamente, enquanto os termogramas de DSC estão apresentados na Figura 5.8.

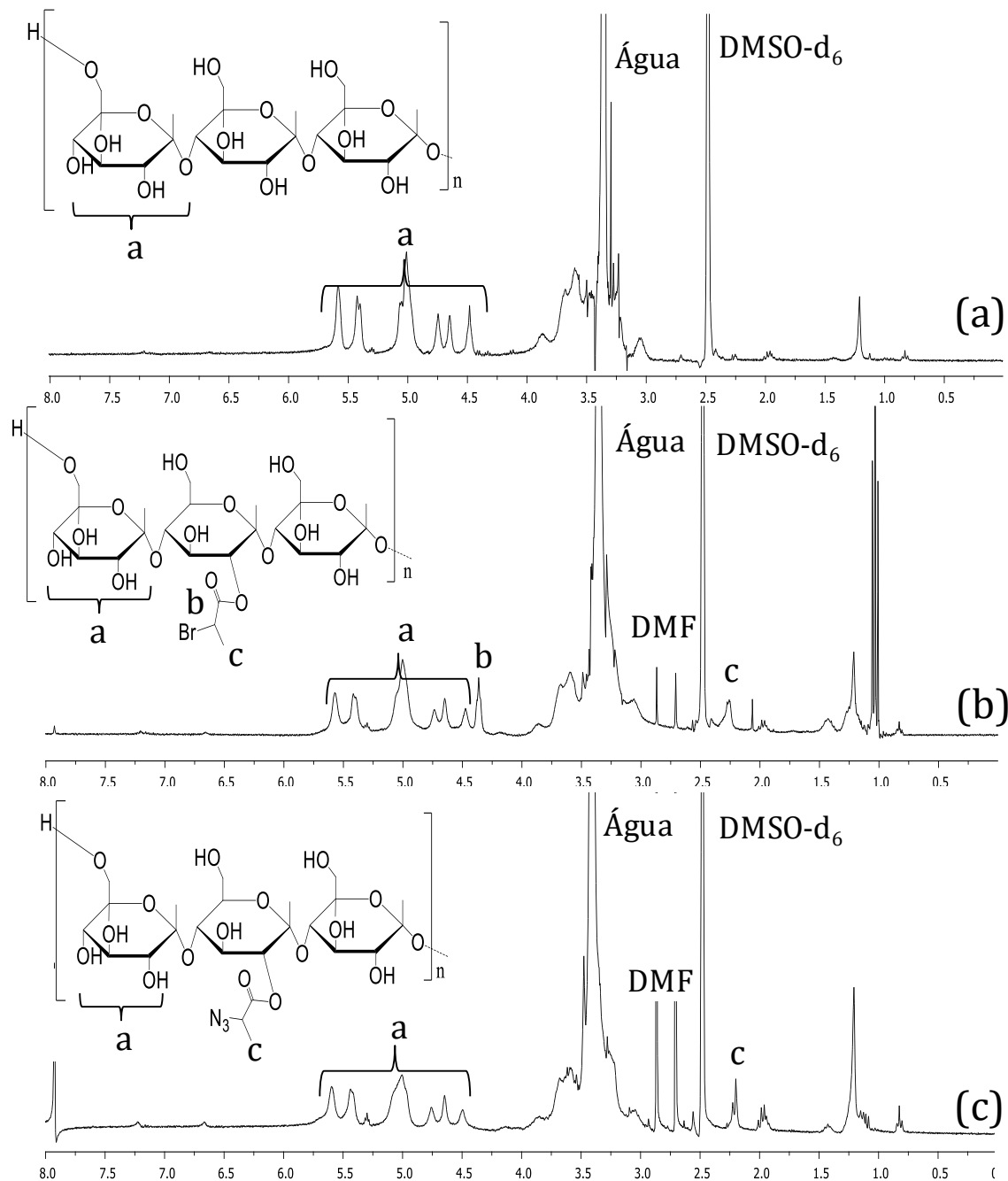
Figura 5.5 Espectros de FTIR da (a) pululana de partida, (b) da pululana funcionalizada com BPB e (c) da pululana funcionalizada com azida



Fonte: Autoria própria.

Os espectros de FTIR da pululana, pululana funcionalizada com BPB e com grupos azida, mostrados na Figura 5.5, fornecem informações condizentes com a modificação química da pululana (SHINGEL, 2002). Primeiramente, observa-se que as hidroxilas da pululana permanecem existentes, conforme bandas de deformação axial -OH em 3320 cm^{-1} , mesmo após substituição realizada pelas moléculas de BPB e, posteriormente, pelos grupos azida, confirmando a substituição parcial das hidroxilas presentes no material. O pico em 1758 cm^{-1} , característico da deformação axial das ligações -C=O , aparece tanto na Figura 5.5.b quanto na Figura 5.5.c, indicando a substituição dos grupos hidroxila da pululana pelo haleto ácido, BPB, resultando no aparecimento do grupo funcional éster ao longo das cadeias de pululana. Finalmente, o pico em 2050 cm^{-1} relacionado à ligação C-N_3 pôde ser claramente evidenciado na Figura 5.5.c, corroborando com os resultados previamente relatados Xue et al. (2015) e confirmando a funcionalização da pululana com grupos azida, como esperado.

Figura 5.6 Espectros de RMN ^1H da pululana de partida (a), da pululana funcionalizada com BPB (b) e da (c) pululana funcionalizada com grupos azida.



Fonte: Autoria própria.

Analisando o espectro mostrado na Figura 5.6, observa-se a presença de picos na região de 5,70-4,40 ppm referentes ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico na ligação α (1-4) e aos grupos hidroxila das unidades de glicose (representado por "a") presente tanto na pululana de partida quanto na pululana

modificada. Além disso, picos na região de 4,00-3,50 ppm, pertencentes aos hidrogênios nas unidades de glicose são observados nos espectros presentes na Figura 5.6 (SHIBATA et al., 2001). Já na Figura 5.6.b, além dos picos de pululana, observa-se a funcionalização da pululana com BPB através do duplete em 2,26 ppm ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{O}-$, "c") e do multiplete em 4,35 ppm ($-\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)\text{O}-$, "b") presentes na estrutura química do BPB, evidenciando que a enxertia de moléculas deste composto na cadeia principal da pululana foi satisfatória. Além disso, de acordo com a Figura 5.6.c, pode-se notar a presença de pico em 2,19 ppm ($-\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)\text{O}-$, "c"), resultante do deslocamento do bromo na pululana modificada (LEONARDIS et al., 2010). Para a determinação quantitativa do grau de substituição dos grupos hidroxila na pululana foram utilizados os resultados RMN ^1H como base de cálculo, de acordo com a metodologia proposta anteriormente, de acordo com a Equação 5.2 (TERAMOTO; SHIBATA, 2006).

$$\frac{A}{3x} = \frac{B}{[1+(3-x)]} \quad (5.2)$$

Onde:

A se refere à ressonância dos grupos metila na molécula de BPB inseridos na cadeia de pululana;

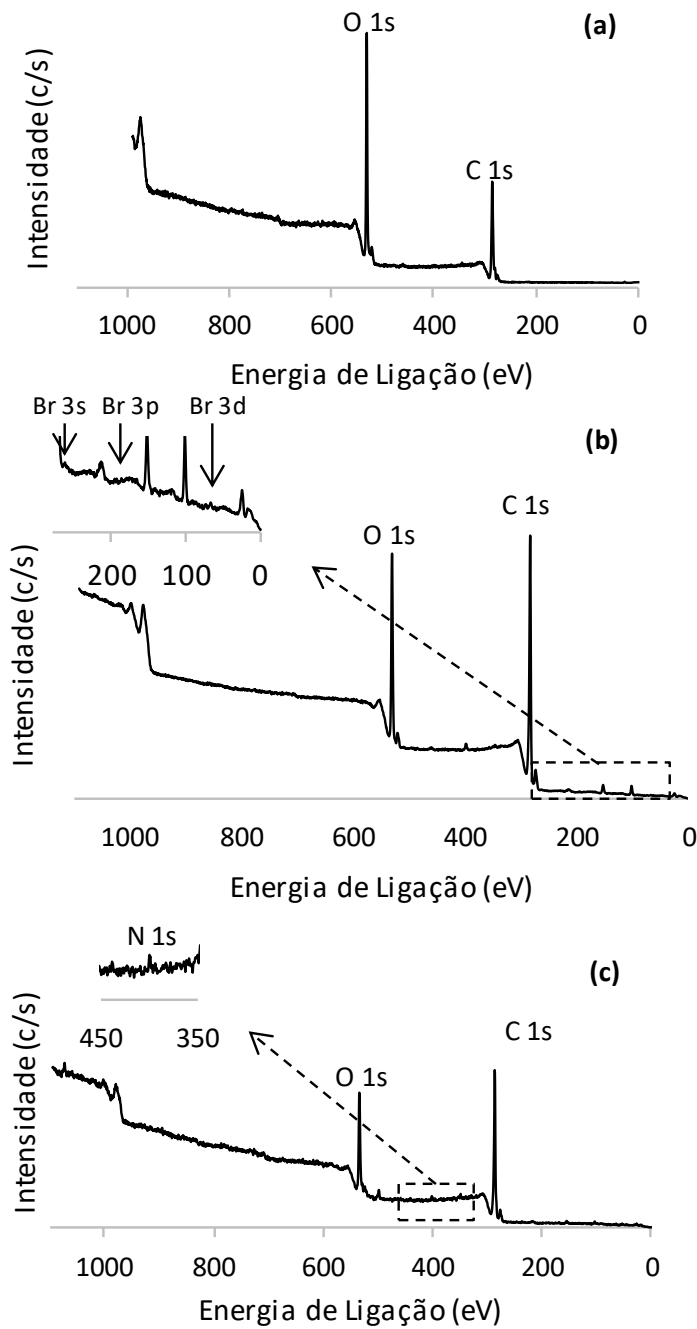
B se refere à ressonância dos prótons presentes nas hidroxilas da unidade glicosídica da pululana mais os prótons ligados aos carbonos anoméricos;

A variável "x" presente na equação representa o número de hidrogênios substituídos na reação de esterificação da pululana. Desta forma, isolando-se "x" e considerando este o grau de substituição (DS), obtém-se a Equação 5.3.

$$DS = \frac{4A}{3B+A} \quad (5.3)$$

A partir da equação 5.3, foi obtido, então, o grau de substituição das hidroxilas da pululana por grupos BPB, equivalente a 0,08, o que significa que para cada cem unidades de glicose em pululana, oito hidroxilas foram substituídas.

Figura 5.7 Diagrama de XPS da pululana não modificada (a), da pululana funcionalizada com BPB (b) e da pululana funcionalizada com grupos azida (c).

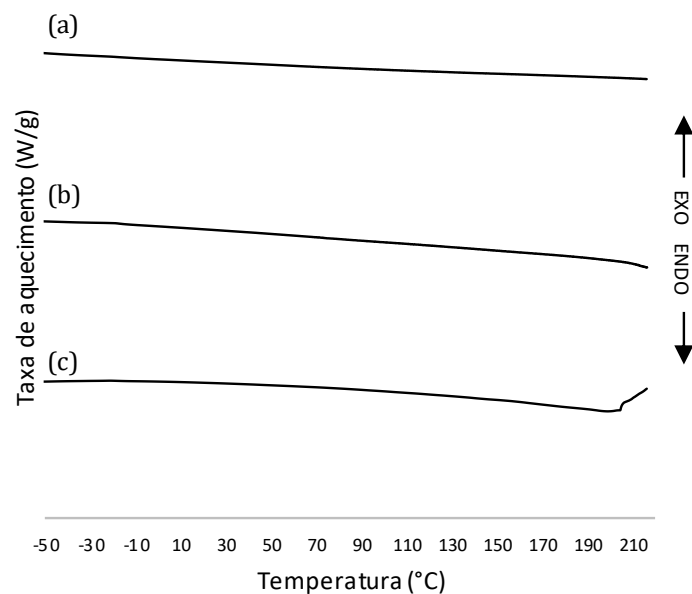


Fonte: Autoria própria.

A partir da Figura 5.7, observa-se que todas as amostras analisadas apresentaram dois elementos principais: carbono e oxigênio, com energia de ligação em torno de 280 eV e 530 eV, respectivamente, ambos pertencentes à cadeia polimérica do polissacarídeo presente. Para a pululana funcionalizada com

BPB (Figura 5.7.b), a presença de bromo (BR) pôde ser evidenciada por três picos a 69,0 eV (Br-3d), 187,8 eV (Br-3p) e 255,0 eV (Br-3s). Outros pequenos picos nesta região implicam a presença de impurezas, principalmente silício, da cola utilizada na fixação das amostras no suporte de aço inoxidável. Na Figura 5.7.c, evidencia-se o desaparecimento do grupo Br após a reação com azida de sódio, e o aparecimento de pico característico na energia de ligação de 400 eV (N1s) confirmou a substituição dos grupos Br por grupos N_3 . Desta forma, através da análise qualitativa elementar obtida pela técnica de XPS, é possível avaliar as modificações realizadas na pululana com as reações de esterificação e de substituição nucleofílica de haleto.

Figura 5.8 Termograma de DSC da pululana não modificada (a), da pululana funcionalizada com BPB (b) e da pululana funcionalizada com grupos azida (c).



Fonte: Autoria própria.

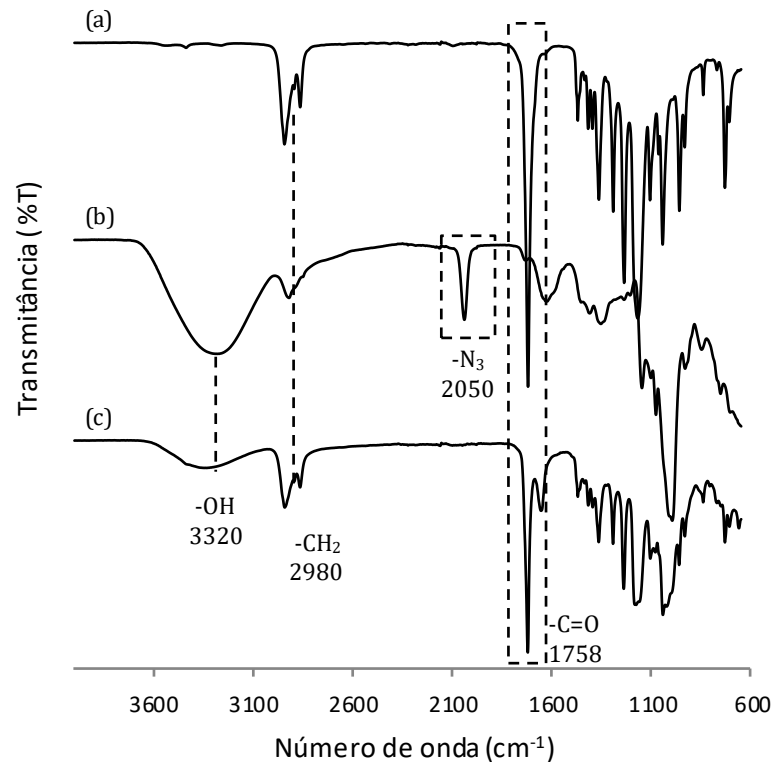
O comportamento térmico da pululana antes e depois da modificação com BPB e grupos azida foi avaliado por DSC e os termogramas são mostrados na Figura 5.8. Não foi detectada temperatura de transição vítrea (T_g) para a pululana não modificada (ver curva a), embora seja relatado na literatura um valor de 240 °C correspondente à T_g da pululana (RATTO; SCHNEIDER, 1998; PRASAD et al.,

2008; DIAB et al., 2001; HILARES et al., 2019; PEREIRA; MAHONEY; EDGAR, 2014). O polissacarídeo será decomposto antes de atingir a temperatura de fusão, pois não há diferença de temperatura suficiente entre a temperatura necessária para romper as ligações intermoleculares e a temperatura de degradação do polímero. Mesmo após as modificações químicas da pululana, não foram observados valores de T_g , nem para PullBr tão pouco para a PullN₃, no entanto, este resultado corrobora com dados previamente relatados na literatura (TERAMOTO; SHIBATA, 2006) confirmando a dificuldade de obtenção de temperaturas de transição para polissacarídeos obtidos de fontes naturais. Tais materiais tendem a ter propriedades bastante variáveis, dependendo do meio de cultura e da retenção de umidade, principalmente no caso de um polímero hidrofílico, como a pululana (WANG et al., 2017).

5.4 Síntese da pululana-*g*-poli(ϵ -caprolactona) Pull-*g*-PCL via *CuAAC*

As Figura 5.9 e 5.10 apresentam respectivamente os espectros de FTIR e RMN ¹H da PCL-alcino, bem como da pululana funcionalizada com azida, e o produto da reação *CuAAC* realizada entre ambos os polímeros. Já na Figura 5.11 encontram-se os diagramas de XPS da PullN₃ e da Pull-*g*-PCL. Em seguida, as Figuras 5.12, 5.13 e 5.14 correlacionam, respectivamente, os resultados de comportamento térmico (DSC), de termogravimetria (TGA) e a cristalinidade (DRX) dos polímeros modificados com o produto final da reação.

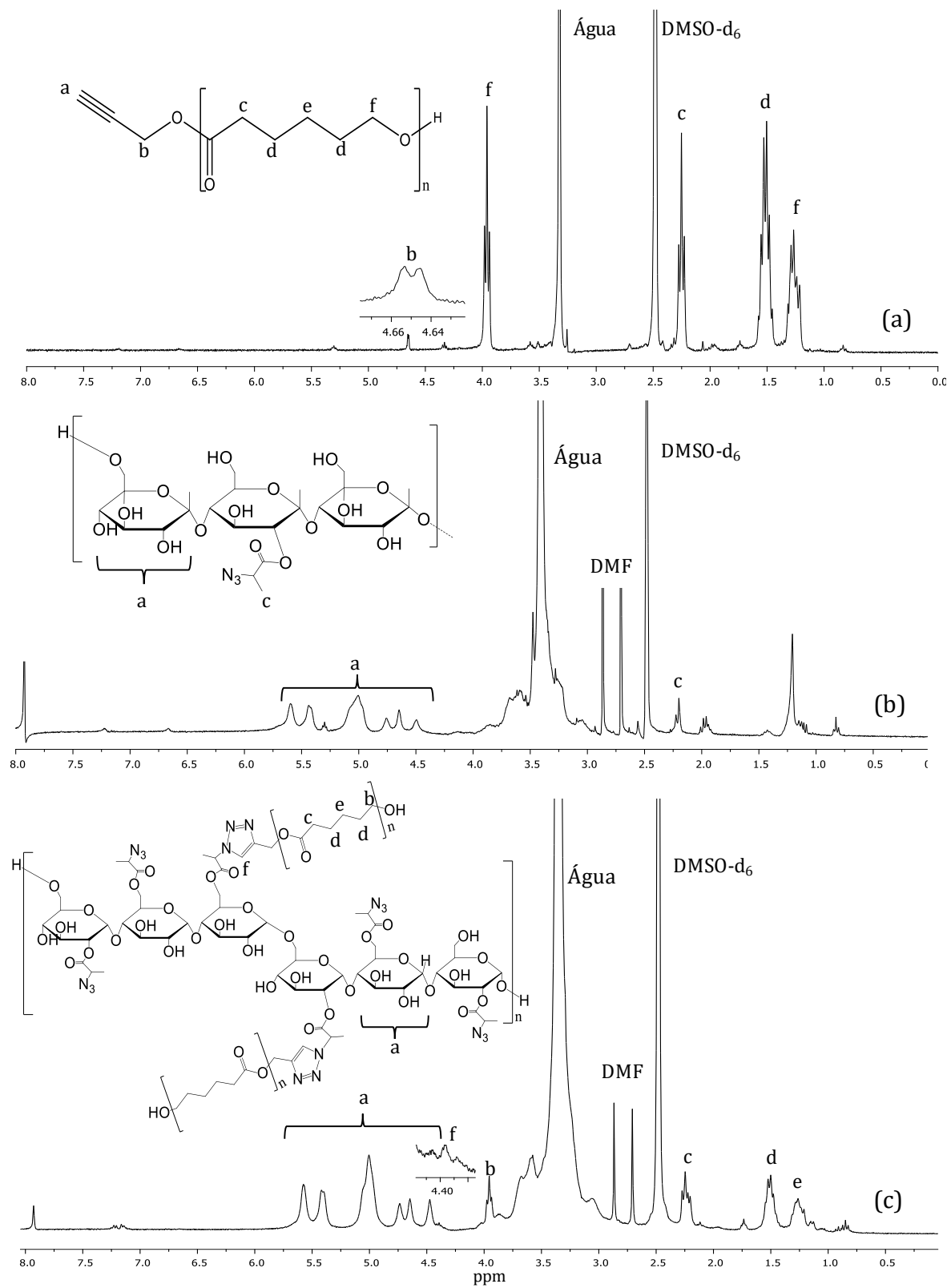
Figura 5.9 Espectros de FTIR da PCL-alcino (a), da PullN₃ (b) e da Pull-g-PCL (c).



Fonte: Autoria própria.

No espectro de FTIR da Pull-g-PCL, mostrado na Figura 5.9.c, o desaparecimento da banda característica da ligação C-N₃ em 2050 cm⁻¹, quando comparado com a Figura 5.9.b, evidencia a enxertia das macromoléculas de PCL ao longo das cadeias principais da pululana via *CuAAC*. Além disso, a presença do pico referente à deformação axial da carbonila em 1758 cm⁻¹ (-C=O) proveniente das cadeias de PCL, conforme apresentado na Fig. 5.9.a, e a presença de bandas de deformação axial -OH em 3320 cm⁻¹, oriundas das hidroxilas remanescentes da pululana (conforme Figura 5.9.b) corroboram com a eficiência da reação *CuAAC*.

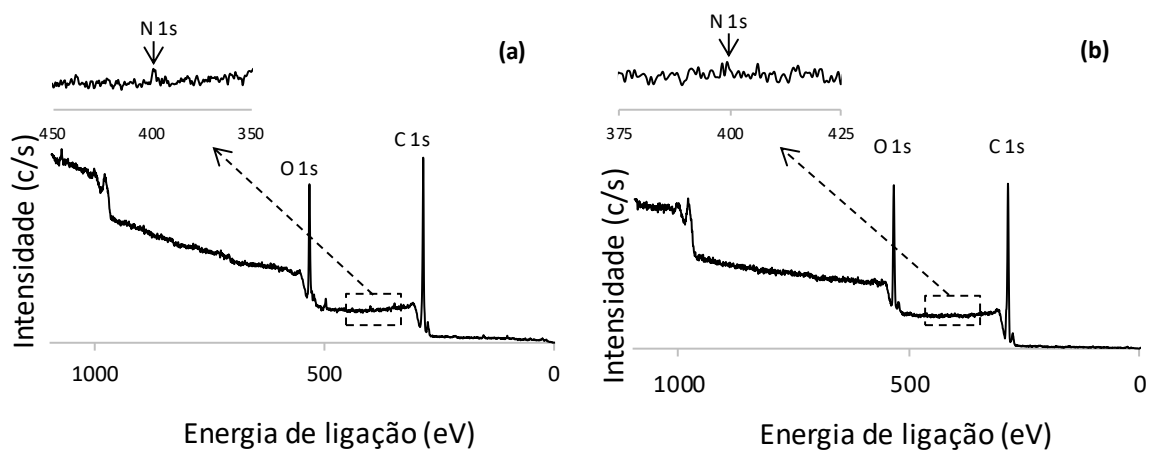
Figura 5.10 Espectros de RMN ^1H da PCL-alcino (a), da PullIN₃ (b) e da Pull-g-PCL (c).



Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.10 apresenta uma comparação entre os espectros de RMN ^1H da PCL-alcino, da PullN₃ e da Pull-g-PCL. Analisando o espectro mostrado na Figura 5.10.c, pode-se observar a presença de picos na região de 5,70-4,40 ppm pertencentes ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico na ligação α (1-4) e os grupos hidroxila das unidades de glicose (representado por “a”) presente na pululana (WILLERSINN et al., 2017). Ademais, os picos de hidrogênio relacionados à PCL podem ser claramente evidenciados por δ (ppm) = 2,30 (2H, $-\text{OC}(=\text{O})\underline{\text{C}}\text{H}_2$, representado por “c”), 1,64 e 1,37 (referente à cadeia alifática, representada respectivamente por “d” e “e”), 4,05 (2H, $-\underline{\text{C}}\text{H}_2\text{OC}(=\text{O})-$, representado por “f”). Por fim, o tripleto proveniente do hidrogênio de álcool propargílico, que após a reação química encontra-se presente no anel triazol da macromolécula, sofreu um deslocamento aparecendo em 4,40 ($-\text{N}-\underline{\text{C}}\text{H}=\text{C}-$, “f”), evidenciando o anel triazol formado a partir da reação química de acoplamento entre azida e alcino.

Figura 5.11 Diagrama de XPS da PullN₃ (a) e da Pull-g-PCL (b).

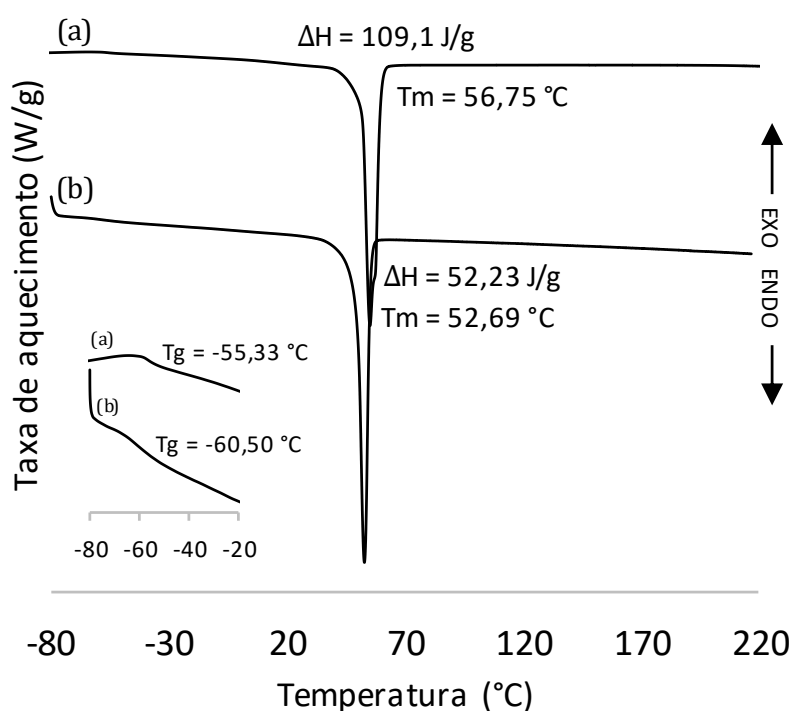


Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.11 mostra os diagramas de XPS da PullN₃ (Fig. 5.11-a) e Pull-g-PCL (Fig. 5.11-b). Ambas as amostras continham dois elementos principais: carbono e oxigênio, com energia de ligação em torno de 280 eV e 530 eV, respectivamente (ZHOU et al., 2018). Observa-se, ainda, a permanência da presença do pico de N1s em 400 eV para ambas as amostras, o que condiz com o fato de que, mesmo após a enxertia da PCL ao longo das cadeias de pululana, o nitrogênio permaneceu presente no material, através da formação do anel triazol,

resultante da ciclo adição 1,3-dipolar entre alcino e azida, indicando o sucesso da reação de enxertia. Outra observação de grande importância obtida através dos diagramas de XPS é a ausência de sinal de energia de ligação em 69 eV, indicando a ausência de cobre residual na amostra Pull-g-PCL (LALLANA et al., 2012). Lallana et al. (2012) mencionaram que o principal problema relacionado à reação CuAAC é a presença de Cu (I) residual, o que não ocorreu neste trabalho, indicando o potencial do copolímero para futuras aplicações em sistemas de administração de medicamentos (BIESINGER, 2017)

Figura 5.12 Termograma de DSC da (a) PCL-alcino e (b) da Pull-g-PCL .



Fonte: Autoria própria.

O termograma de DSC mostrado na Fig. 5.12.a. evidencia o pico de fusão (T_m) e a transição vítrea (T_g) da PCL-alcino em 56,75 ° C e -55,33 °C, respectivamente. Esses valores concordam com os relatados na literatura (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Com a enxertia de PCL nas cadeias de pululana, observou-se uma pequena redução tanto no ponto de fusão do material quanto na temperatura de transição vítrea. A redução dos valores de T_g após a reação de enxertia ocorreu devido à umidade presente na pululana, cuja

hidrofilicidade é característica do material, resultando em um efeito plastificante do copolímero.

Ademais, a diminuição significativa da entalpia de fusão da PCL corrobora com a afirmação de que seu comportamento de cristalinidade foi afetado de acordo com sua enxertia nas cadeias pululana. A redução no grau de cristalinidade da PCL antes e após sua reação com a pululana, pode ser determinada através da equação 5.4.

$$X_c (\%) = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \times 100, \quad (5.4)$$

Sendo:

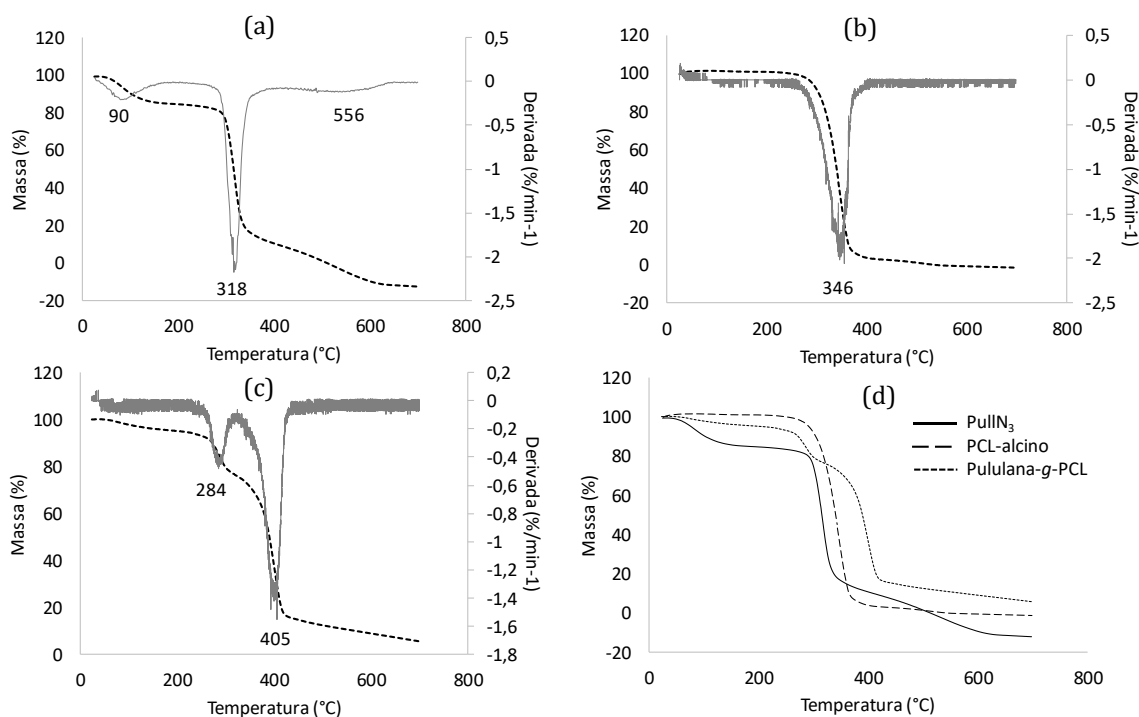
ΔH_m^0 igual à entalpia de fusão da PCL 100% cristalino, cujo valor é equivalente a 136 J.g^{-1} (KESEL et al., 1999).

Através desta equação, foram obtidos os valores de 80,2 %, referentes à cristalinidade da PCL-alcino, e 38,4 % para a Pull-g-PCL, confirmando a redução no grau de cristalinidade do material.

Os resultados das análises termogravimétricas da PullN₃, PCL-alcino e Pull-g-PCL são mostrados na Figura 5.13, possibilitando a avaliação da estabilidade térmica dos materiais de partida e do produto da reação CuAAC. A curva de PCL-alcino (Fig. 5.13.b) apresentou um único estágio de decomposição térmica, na temperatura de 346 °C. Já a pululana apresentou três estágios de perda de massa (Figura 5.13.a). O primeiro pico de perda de massa, em aproximadamente 90 °C, ocorreu devido à vaporização da umidade absorvida pelo material, que possui características hidrofílicas. Já a degradação térmica do segundo pico, T_{max} igual a 318 °C, pode ser considerada a desintegração das cadeias macromoleculares da pululana, seguida pela degradação térmica referente ao terceiro pico, T_{max} igual a 556 °C, da degradação dos subprodutos oriundo do polímero, ou dos anéis sacarídeos do polissacarídeo (ISLAM; YEUM; DAS, 2012; CONSTANTIN et al., 2011). Já na Figura 5.13.c, a degradação térmica do copolímero Pull-g-PCL, é obtida através de dois estágios de degradação, nas temperaturas de 284 °C e 405 °C, sendo o segundo o de maior taxa de degradação do copolímero. Por fim, comparando-se todos os termogramas obtidos, conforme Figura 5.13.d, observa-se que a Pull-g-PCL apresenta maior estabilidade térmica, visto que sua degradação majoritária ocorre a uma temperatura superior em relação à PullN₃ e à PCL-alcino. O mesmo comportamento térmico é relatado na literatura para outros

polissacarídeos, como celulose, por exemplo (ZHOU et al., 2018; HILTUNEN; RAULA; MAUNU, 2011).

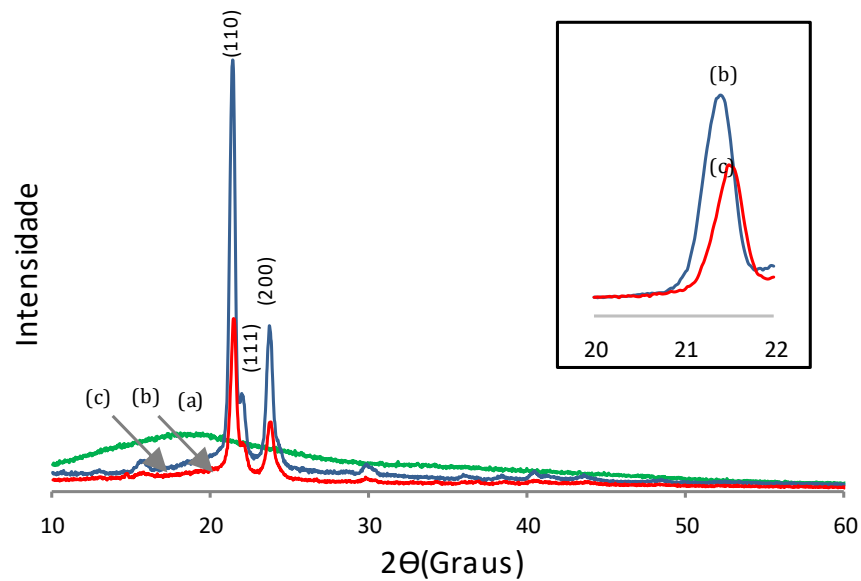
Figura 5.13 Curvas termogravimétricas da (a) PullN₃, (b) PCL-alcino, (c) Pull-g-PCL, com as respectivas derivadas, bem como a (d) correlação entre as curvas termogravimétricas dos reagentes e produto da CuAAC.



Fonte: Autoria própria.

A Figura 5.14 apresenta os difratogramas de Raios-X da PCL-alcino, PullN₃ e Pull-g-PCL. Analisando os difratogramas, a redução da cristalinidade das cadeias de PCL após sua enxertia na cadeia de pululana pode ser notada com a diminuição das conexões gaussianas de (110), (111), (200), presentes tanto na Figura 5.14.b, quanto na Figura 5.14.a (SOWNTHARI; SUTHANTHIRARAJ, 2013). Tais picos são característicos da PCL, cuja presença da estrutura amorfa da pululana promoveu considerável redução de intensidade.

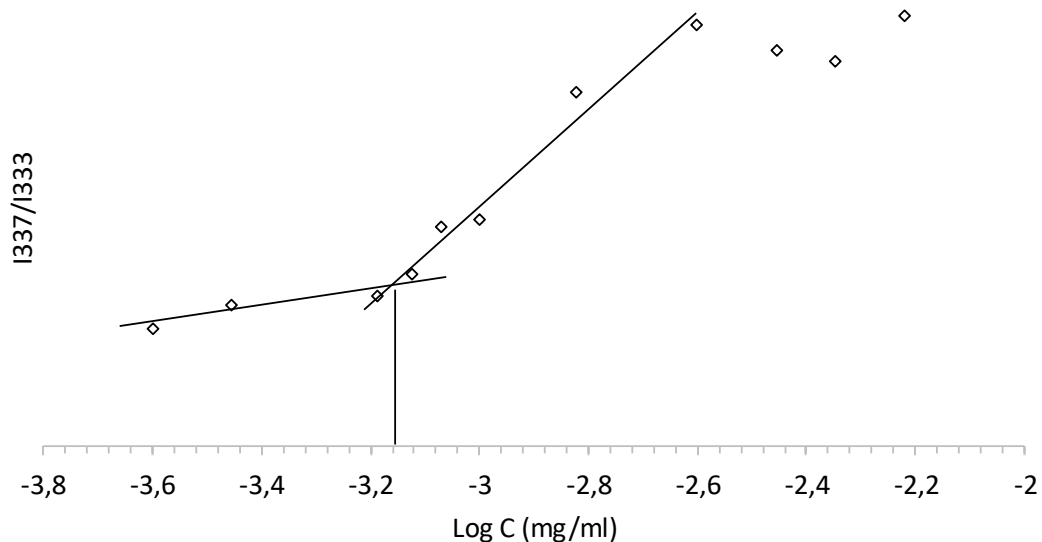
Figura 5.14 Difratoograma de DRX da PullN₃ (a) da PCL-alcino (b) e da Pull-g-PCL (c).



Fonte: Autoria própria.

De forma geral, copolímeros anfifílicos apresentam auto agregação em meio aquoso, resultando na formação de partículas (WILHELM et al., 1991; JEONG et al., 1998). A fim de avaliar tal comportamento, utiliza-se a técnica de fluorescência adicionando ao meio aquoso o pireno, que atua com sonda hidrofóbica no sistema. Conforme a concentração de copolímero aumenta no sistema, a relação entre os picos de intensidade 337 e 333 nm, modifica-se, devido à hidrofobicidade em torno do pireno (SAN MIGUEL et al., 2008). A Figura 5.15 mostra que a relação entre os picos, apresenta uma região achatada, com um aumento sigmoidal, a partir da concentração $6,6 \cdot 10^{-4} \text{ mg.mL}^{-1}$, o que indica a região de concentração crítica de agregação da Pull-g-PCL.

Figura 5.15 Determinação da concentração crítica de agregação, através da comparação da intensidade da razão I337/I333 do espectro de excitação do pireno vs. log c de diversas concentrações de partículas Pull-g-PCL em água. Concentração do Pireno = 6.0×10^{-7} M

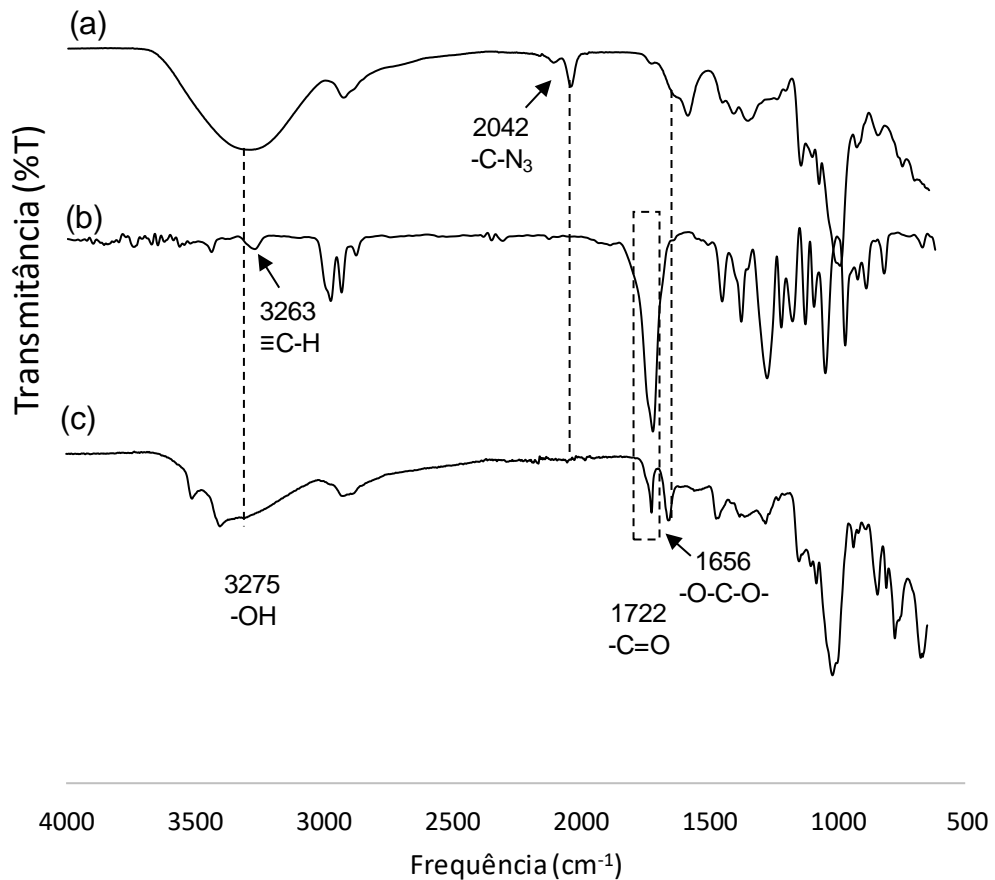


Fonte: Autoria própria.

5.5 Síntese da pululana-g-poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) Pull-g-PHBHV via *CuAAC*

A Figura 5.16 apresenta o espectro de FTIR do PHBHV-alcino, bem como da pululana funcionalizada com azida, e o produto da reação *CuAAC* realizada entre ambos os polímeros. Em seguida, as Figuras 5.17, 5.18 e 5.19 correlacionam, respectivamente, os resultados do comportamento térmico (DSC), de termogravimetria (TGA) e a cristalinidade (DRX) dos polímeros enxertados Pull-g-PHBHV.

Figura 5.16 Espectros de FTIR da PullN₃ (a) do PHBHV-alcino (b) e da Pull-g-PHBHV (c).



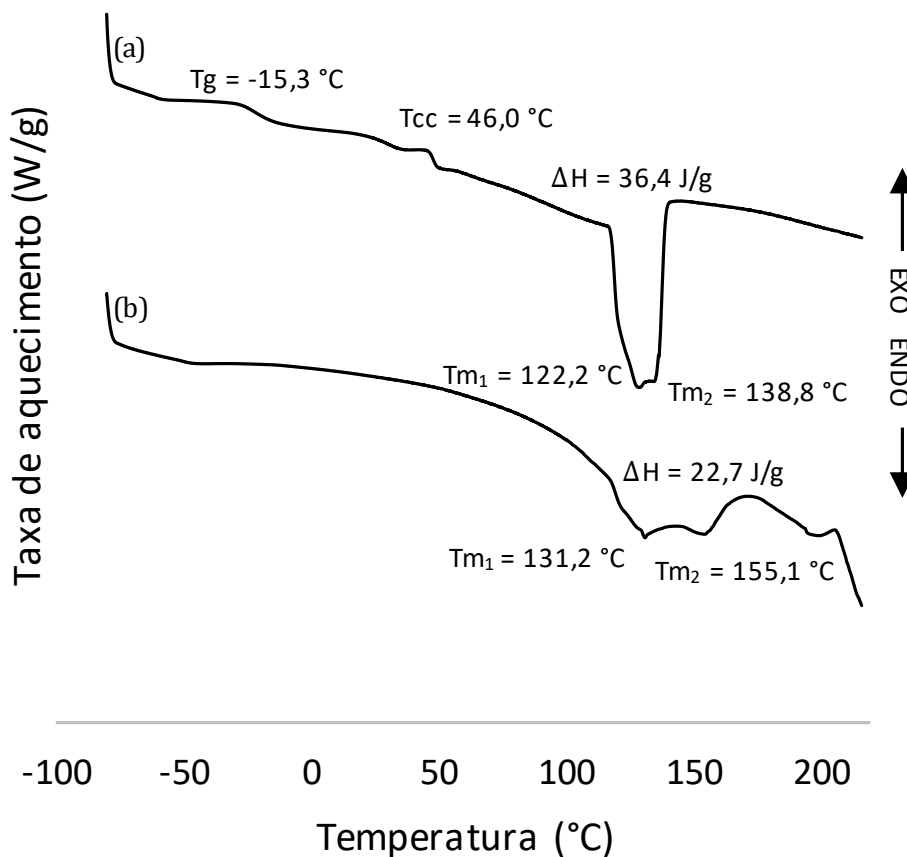
Fonte: Autoria própria.

No espectro de FTIR da Pull-g-PHBHV, mostrado na Figura 5.16.c, o desaparecimento da banda característica da ligação C-N₃ em 2042 cm⁻¹, quando comparado com a Figura 5.16.a, evidencia a enxertia do copolímero PHBHV ao longo das cadeias principais da pululana via *CuAAC*. Além disso, o aparecimento das bandas de deformação axial -OH em 3375 cm⁻¹, e de ligação -O-C-O-, tanto na Figura 5.16.a quanto 5.16.c, caracterizam a presença das hidroxilas da pululana remanescentes no copolímero obtido. Por fim, a presença do pico referente à deformação axial da carbonila em 1722 cm⁻¹ (-C=O) proveniente das cadeias de PHBHV, conforme apresentado na Fig. 5.16.b, corroboram com a eficiência da reação *CuAAC*.

Os termogramas de DSC mostrados na Fig. 5.17 apresentam as temperaturas de fusão *T_m* para o PHBHV-alcino em dois picos, 122,2 °C e 136,8 °C, cuja proximidade dos valores resultou na sobreposição dos picos (Fig.5.17.a).

Esses valores referem-se à fusão-recristalização-refusão do PHBHV, e os valores encontrados aproximam-se de outros previamente relatados na literatura (LIU et al., 2019). Além disso, o copolímero funcionalizado com alcino apresenta uma T_g em $-15,3\text{ °C}$ e uma temperatura de cristalização a frio T_{cc} equivalente a $46,0\text{ °C}$. Este fenômeno de cristalização a frio encontra-se presente quando o material sofre um resfriamento brusco, não havendo tempo para a reorganização das cadeias durante a etapa de resfriamento (BRITO, 2010). Com a enxertia de PHBHV nas cadeias de pululana, observou-se significativa mudança no ponto de fusão da Pull-*g*-PHBHV em relação ao PHBHV-alcino. Além disso, a diminuição da somatória da entalpia de fusão dos picos do PHBHV-alcino, e o desaparecimento do pico de cristalização a frio, em $46,0\text{ °C}$, presente na Figura 5.17.a, e ausente na Figura 5.17.b, corrobora com a afirmação de que seu comportamento de cristalinidade foi afetado de acordo com sua enxertia nas cadeias amorfas de pululana.

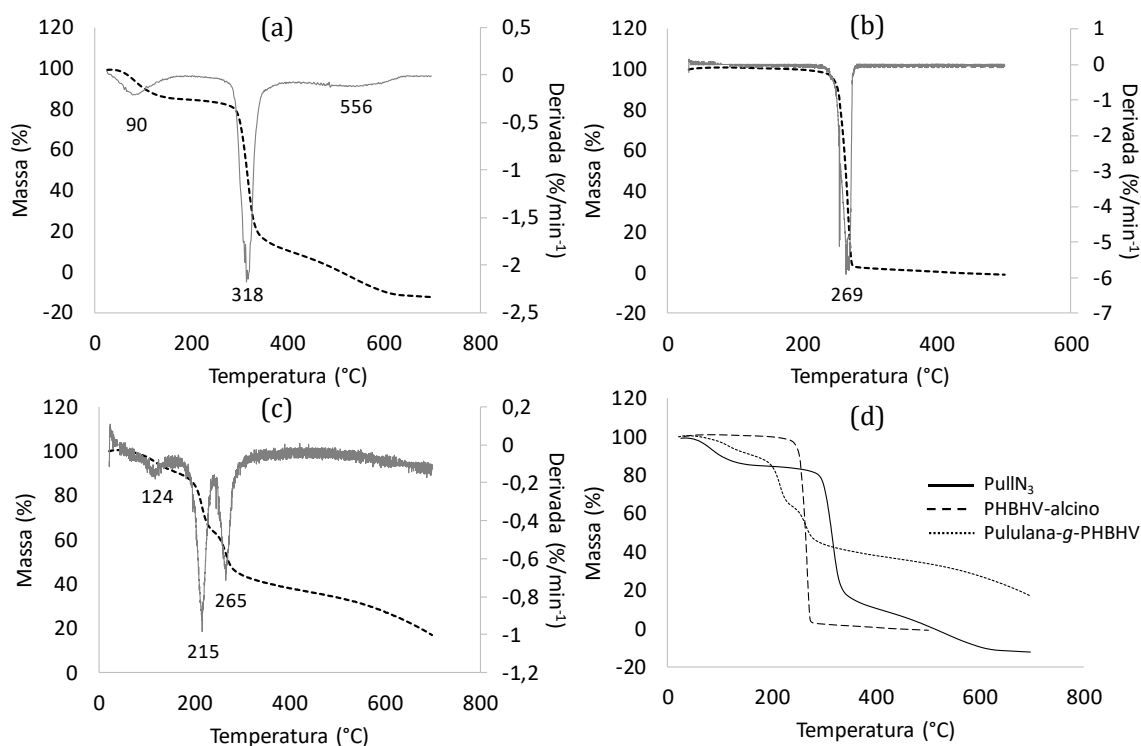
Figura 5.17 Termograma de DSC da PullN₃ (a), da PHBHV-alcino (b) e da Pull-*g*-PHBHV (c).



Fonte: Autoria própria.

As análises termogravimétricas dos polímeros utilizados na reação de cicloadição 1,3-dipolar entre alcino e azida, e seu produto de reação, possibilitaram a avaliação da estabilidade térmica dos materiais. A curva de pululana, Figura 5.18.a, apresentou três estágios de perda de massa, conforme mencionado anteriormente, sendo o primeiro, de T_{max} equivalente à 90 °C, devido à vaporização da umidade absorvida pelo material hidrofílico, o segundo pico T_{max} igual à 318 °C, devido à desintegração das cadeias macromoleculares da pululana, e o terceiro pico T_{max} igual à 556 °C, oriundo da degradação dos subprodutos do polímero, ou seja, dos anéis sacarídeos do polissacarídeo (ISLAM; YEUM; DAS, 2012; CONSTANTIN et al., 2011). Já na Figura 5.18.c, a curva de PHBHV-alcino apresentou um único estágio de decomposição térmica, na temperatura de 269 °C. Para a degradação térmica do copolímero Pull-g-PHBHV, observa-se três estágios de degradação, 124 °C, 215 °C e 265 °C. Por fim, comparando-se todos os termogramas obtidos, conforme Figura 5.18.d, nota-se que a decomposição térmica da Pull-g-PHBHV apresenta valores de temperatura máxima de degradação menores do que dos materiais de partida, indicando uma menor estabilidade térmica ao copolímero.

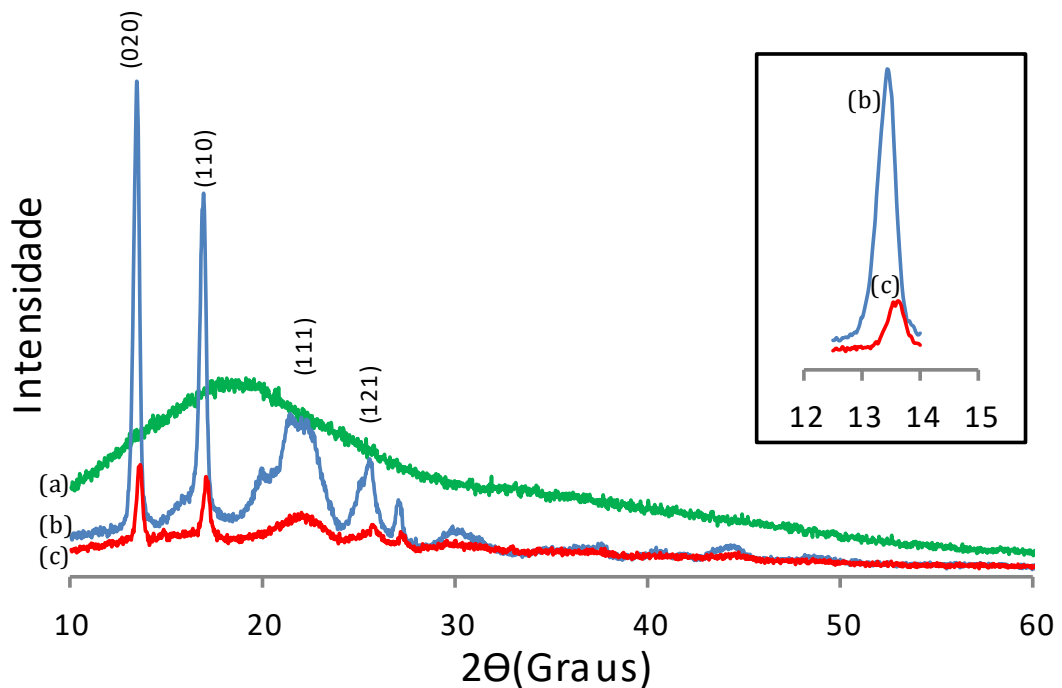
Figura 5.18 Curvas termogravimétricas da (a) PullN₃, (b) PHBHV-alcino, (c) Pull-g-PHBHV, com as respectivas derivadas, bem como a (d) correlação entre as curvas termogravimétricas dos reagentes e produto da CuAAC.



Fonte: Autoria própria.

A análise de DRX (Fig. 5.19.b) confirmou a cristalinidade parcial do PHBHV-alcino, apresentando picos característicos do material, como (020), (110), (111) e (121), por exemplo (BARCELOS et al., 2017). Porém, após a modificação química com a pululana-N₃, cuja estrutura amorfa encontra-se representada no difratograma da Figura 5.19.a, observa-se a redução dos picos de cristalinidade do PHBHV-alcino. Os picos de cristalinidade da Figura 5.19.c, encontram-se presentes, caracterizando a existência do PHBHV na estrutura, porém em menor intensidade, devido à presença da pululana no material.

Figura 5.19 Difratograma de DRX da PullIN₃ (a) do PHBHV-alcino (b) e da Pull-g-PHBHV (c).



Fonte: Autoria própria.

5.6 Obtenção de partículas a partir do copolímero Pull-g-PCL

Tendo em vista os resultados satisfatórios obtidos para a síntese do copolímero anfifílico Pull-g-PCL e sua solubilidade nos solventes DMF e DMSO, este foi utilizado para avaliar sua eficiência no preparo de partículas via nanoprecipitação por diálise e encapsulação, com modificação da cinética de liberação *in vitro*, da indometacina. A Tabela 5.3 apresenta os resultados de diâmetro de partículas (DP) e polidispersidade para as partículas preparadas em dez formulações diferentes, variando-se o tipo de solvente, a quantidade de polímero e de fármaco.

Tabela 5.3 Diâmetro de partículas (DP) e polidispersidade, obtidos para as partículas preparadas, variando-se o tipo de solvente, a quantidade de polímero e de fármaco.

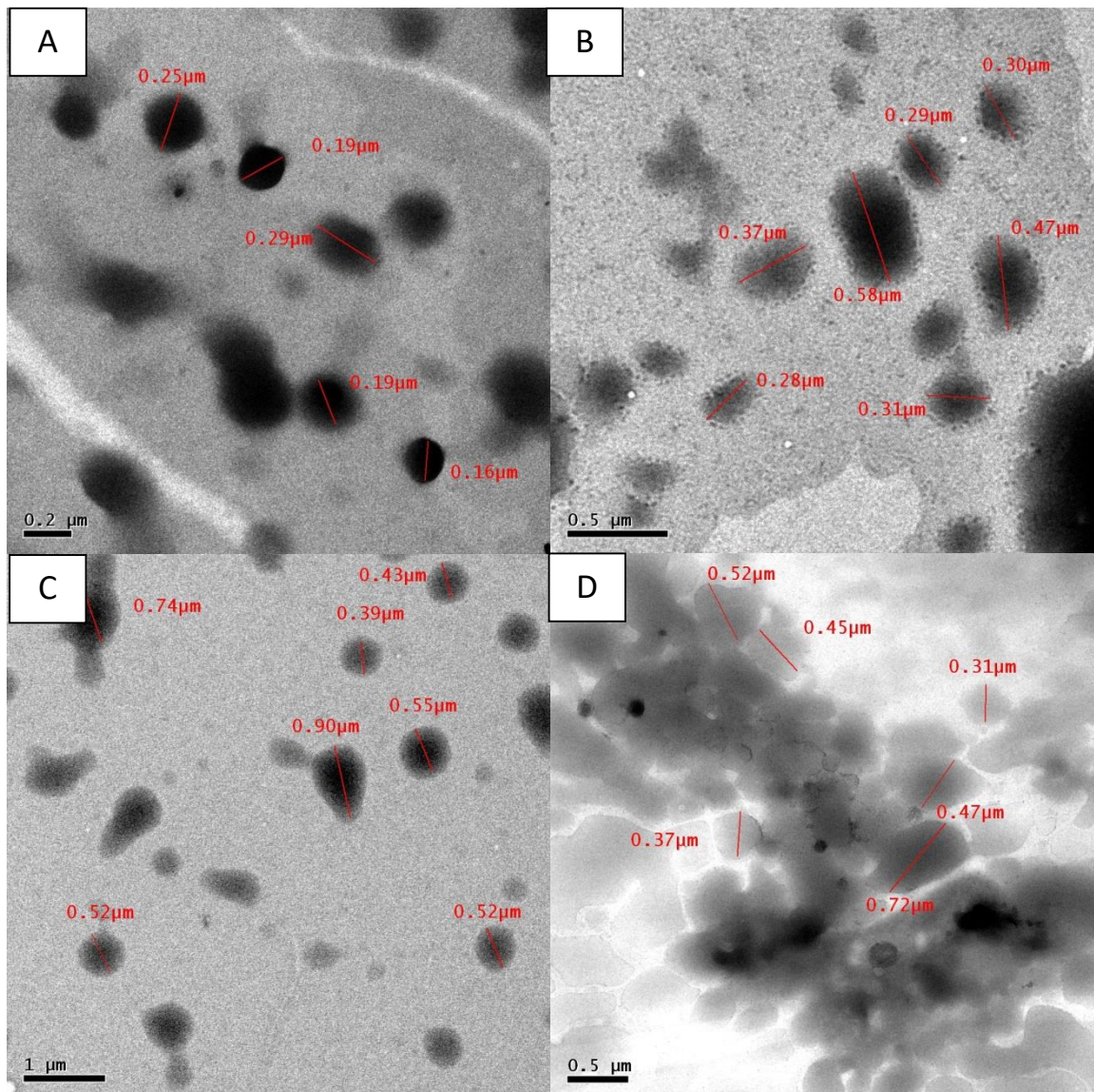
Formulação	Diâmetro de partículas, DP (nm)	Polidispersidade
F1	268,9	0,093
F2	281,2	0,08
F3	367,7	0,062
F4	AGREGOU	-
F5	AGREGOU	-
F6	236,9	0,209
F7	220	0,08
F8	208,6	0,128
F9	273,7	0,143
F10	169,5	0,088

Fonte: Autoria própria.

Pela Tabela 5.3, nota-se que dentre os solventes utilizados para o preparo das formulações, as partículas obtidas através do DMSO, apresentaram menores valores de diâmetro de partícula (F7 à F10), quando comparadas com as partículas obtidas em meio de DMF (F1 à F6). Observa-se, também, que as formulações com maiores concentrações de fármaco em relação ao polímero (F4 e F5), sofreram agregação entre as partículas. O comportamento foi previamente observado por Constantin et al. (2017) para partículas de pululana-*g*-poli(*N*-isopropilacrilamida). As formulações com menores concentração de fármacos, apresentaram os menores valores de diâmetro de partículas, sendo a F6, quando comparada entre as formulação utilizando DMF, e a F10, entre as formulação realizadas com DMSO como solvente.

Através das imagens de microscopia eletrônica de transmissão, apresentadas na Figura 5.20, nota-se que as partículas apresentaram-se de forma esférica. Além disso, observa-se que as formulações com a presença de indometacina (Fig. 5.20.b, Fig. 5.20.c e 5.20.d) apresentam diâmetros de partícula maiores que as formulações sem a adição do fármaco (Fig. 5.20.a), estando os diâmetros entre 300 e 400 nm e 200 e 300 nm, para as partículas com e sem a adição da indometacina, respectivamente.

Figura 5.20 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM) das formulações (a) F2, (b) F3, (c) F7 e (d) F10.



Fonte: Autoria própria.

5.7 Encapsulação e estudo da cinética de liberação *in vitro* da indometacina a partir das partículas de Pull-g-PCL

Para a avaliação da eficiência de encapsulação, utilizou a equação 4.1, resultando nos valores apresentados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 Eficiência de encapsulação da indometacina em partículas de Pull-*g*-PCL a partir da precipitação por diálise.

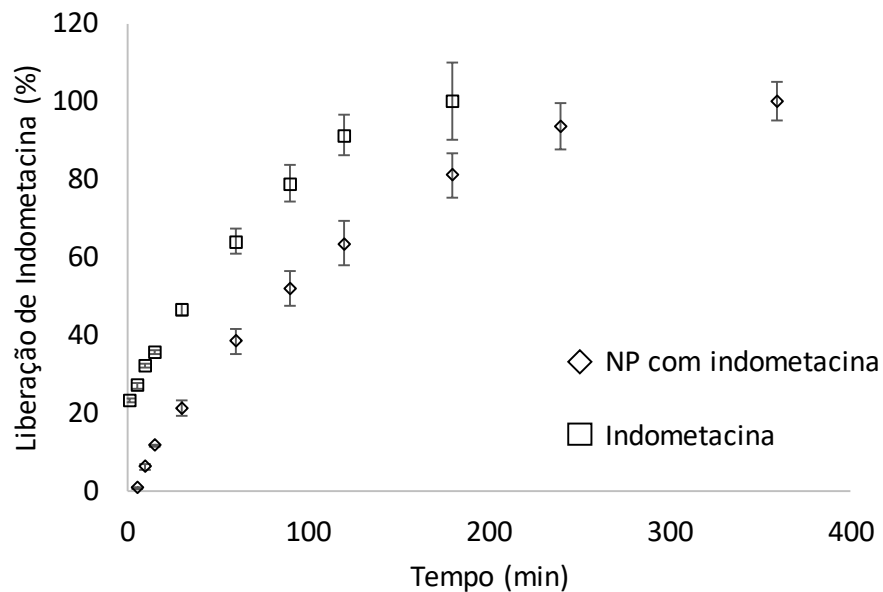
Formulação	Eficiência de Encapsulação (%)
F1	-
F2	-
F3	26,11
F4	AGREGOU
F5	AGREGOU
F6	10,80
F7	-
F8	35,05
F9	33,52
F10	16,50

Fonte: Autoria própria.

Analisando a Tabela 5.4, observa-se que as formulações com maiores concentrações de fármaco em relação ao polímero (F4 e F5), sofreram agregação entre as partículas. Este comportamento foi previamente observado por Constantin et al. (2017) para nanopartículas de pululana-*g*-poli(*N*-isopropilacrilamida). Além disso, observa-se que dentre os solventes utilizados para o preparo das formulações, as partículas obtidas utilizando DMSO como solvente, apresentaram maior eficiência em relação às partículas preparadas com DMF (F3 e F8). Nota-se também, que as formulações com menor concentração de fármaco em relação ao polímero (F6 e F10) apresentaram menores valores de encapsulação. Desta forma, utilizou-se a formulação F8, como base para o estudo da liberação *in vitro* do fármaco, visto que esta apresentou a maior eficiência de encapsulação.

A Figura 5.21 apresenta o perfil de liberação *in vitro* da indometacina a partir das partículas de Pull-*g*-PCL.

Figura 5.21 Curva de liberação de indometacina em função do tempo, realizada em solução tampão PBS, pH 7,4 a 37,0 °C.



Fonte: Autoria própria.

Analisando-se a curva de liberação de indometacina a partir das partículas de Pull-g-PCL, apresentada na Figura 5.21, observa-se que após 360 min de ensaio, atingiu-se 100 % de liberação. Após esse período, a porcentagem de liberação aumentou, ultrapassando 100% e, por essa razão, os dados não são mostrados na figura. Tal fato justifica-se devido à evaporação da solução, que resultou em uma alteração na concentração final de indometacina no meio. Em comparação com a curva de dissolução da indometacina pura, observa-se que logo no primeiro minuto de ensaio, a porcentagem de indometacina dissolvida é superior a 20%, enquanto não observou-se liberação a partir das partículas. Observa-se também, que em 180 min, a dissolução do fármaco já atingiu 100%, enquanto a liberação a partir das partículas neste mesmo tempo foi de, aproximadamente, 80 %. A partir dos dados obtidos, avaliou-se quantitativamente a modificação na cinética de liberação da indometacina a partir das partículas de Pull-g-PCL, através da aplicação do modelo de Korsmeyer-Peppas, dos índices AIC e RMSE e do coeficiente de dissolução, *DE* (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 Resultados do ajuste de curvas e análise cinética de dados de dissolução da indometacina pura e da liberação de indometacina a partir das partículas de Pull-g-PCL, usando o modelo Korsmeyer-Peppas e Eficiência de Dissolução (DE), obtida a partir da análise independente.

Partículas	R^2	K	n	$RMSE$	AIC	DE
Indometacina pura	91,7557	13,4756	0,3908	4,3209	44,0510	61,6655
Pull-g-PCL	95,5659	1,1621	0,8	1,8383	30,3769	35,7748

Fonte: Autoria própria.

A liberação do fármaco a partir de sistemas de liberação imediata e modificada tem sido descrita por várias teorias/modelos cinéticos. Para determinar o mecanismo de liberação da indometacina, as porcentagens cumulativas de indometacina pura dissolvida e de indometacina liberada a partir das partículas (até, aproximadamente 60 %) foram ajustadas ao modelo de Korsmeyer-Peppas, com a aplicação de regressões não lineares. Neste modelo, a constante cinética (K) incorpora características estruturais e geométricas do sistema polimérico e o expoente de liberação (n) caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco (Equação 1, Tabela 4.2). Esses parâmetros, bem como os valores de coeficiente de correlação (R^2), raiz do erro médio quadrático ($RMSE$) e critério de informação de Akaike (AIC) foram determinados usando o software KinetDS®. Os dados obtidos a partir do modelo de Korsmeyer-Peppas para o ensaio de dissolução realizado usando a indometacina pura e encapsulada nas partículas Pull-g-PCL em pH 7.4 e na temperatura de 37 °C estão listados na Tabela 5.5. Pode-se observar que o mecanismo de liberação do fármaco é bem descrito matematicamente pela equação de Korsmeyer-Peppas, considerando os valores de R^2 , AIC e $RMSE$. O modelo de Korsmeyer-Peppas é usado para analisar a liberação de formas farmacêuticas de dosagem polimérica, quando o mecanismo de liberação não é bem conhecido ou quando mais de um tipo de fenômeno de liberação pode estar envolvido (PEPPAS, 1965; SHENG et al., 2006). Peppas (1965) descreve o uso do valor de n para caracterizar os diferentes mecanismos de liberação, alcançando valores de n até 0,45 para difusão (modelo de Fick) e valores de n maiores que 0,45 e menores que 0,89 em um sistema plano, para a transferência de massa de

acordo com um modelo não-Fickiano (COSTA, 2002). Neste trabalho, o valor do expoente de liberação ($n = 0,8$) de acordo com a Tabela 5.5 indica uma difusão anômala e que o mecanismo de liberação da indometacina a partir das partículas de Pull-g-PCL é governado pela transferência de massa de acordo com um modelo não-Fickiano. Observa-se, ainda, que a constante cinética K apresenta uma redução muito significativa para 1,1621, para a indometacina liberada a partir das partículas de Pull-g-PCL, em comparação com o valor obtido para a indometacina pura (13,4756), indicando a eficiência do copolímero anfifílico no controle da liberação *in vitro* do fármaco. Tal resultado é corroborado pela redução, também significativa, do coeficiente de dissolução, de 61,6655 para a indometacina pura, para 35,7748, para a indometacina liberada a partir das partículas de Pull-g-PCL.

6 CONCLUSÕES

A presente pesquisa teve como objetivo a obtenção de copolímeros de Pull-*g*-PCL e Pull-*g*-PHBHV e avaliação de seu uso na encapsulação e liberação *in vitro* de indometacina. Para a obtenção dos copolímeros enxertados foi utilizada a reação *CuAAC* entre alcinos e azidas. Primeiramente, a funcionalização dos polímeros PCL e PHBHV com grupos alcino, via polimerização por abertura de anel e transesterificação com álcool propargílico, foi confirmada através das técnicas de RMN ¹H, FTIR e GPC. A funcionalização da pululana com bromo, seguida da modificação com azida de sódio, foi evidenciada pelas técnicas de RMN ¹H, FTIR, XPS e DSC, verificando as mudanças em suas propriedades térmicas e cristalinidade. Posteriormente, os blocos poliméricos foram conjugados via *CuAAC* para a síntese dos copolímeros anfifílicos Pull-*g*-PCL e Pull-*g*-PHBHV. Análises de RMN ¹H, FTIR e XPS confirmaram a obtenção dos copolímeros. Análises adicionais foram realizadas para demonstrar as variações nos índices de cristalinidade dos materiais, como técnicas de DSC e DRX. Os copolímeros finais possuem propriedades anfifílicas, de crescente interesse em diferentes áreas, incluindo a biomédica, e pôde ser obtido por uma metodologia simples. Cada componente individual utilizado para a obtenção dos copolímeros, tanto a pululana, quanto a PCL e o PHBHV, são biocompatíveis e biodegradáveis e têm tido crescente aplicação em sistemas de liberação controlada de princípios ativos. Por fim, o copolímero enxertado Pull-*g*-PCL foi avaliado conforme sua capacidade de formação de partículas, para utilização em sistemas de liberação controlada de indometacina. As partículas constituídas de Pull-*g*-PCL, apresentaram resultados satisfatórios em termos de diâmetro de partículas (169,5 a 367,7 nm), com encapsulação máxima de indometacina de 35,05 %. A avaliação do perfil de liberação *in vitro* da indometacina a partir dessas partículas, utilizando condições fisiológicas similares à corrente sanguínea (pH 7,4, e temperatura de 37 °C) revelou um comportamento descrito pelo modelo matemático de Korsmeyer-Peppas, considerando os valores de R², AIC e RMSE. O expoente de liberação *n* igual a 0,8, indicou uma difusão anômala e que o mecanismo de liberação da indometacina foi governado pela transferência de massa de acordo com um modelo não-Fickiano. Quando comparados os valores de constante cinética de dissolução da

indometacina livre ($K = 13,4756$) e da indometacina liberada a partir das partículas de Pull-g-PCL ($K = 1,1621$) observa-se a eficiência do copolímero anfifílico no controle da liberação *in vitro* do fármaco.

Finalmente, os resultados obtidos no presente trabalho apontam para o potencial de aplicação dos polímeros e partículas sintetizados, em sistemas de liberação controlada de indometacina ou outros princípios ativos similares.

REFERÊNCIAS

ACIK, G.; SEY, E.; TASDELEN, M. A. Polypropylene-based graft copolymers via CuAAC click chemistry. **eXPRESS Polymer Letters**, v. 12, n. 5, p. 418-428, 2018.

ABDELWAHAB, M. A. et al. Poly[(R)-3-hydroxybutyrate]/poly(styrene) blends compatibilized with the relevant block copolymer. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 50, p. 5151-5160, 2012.

ALLEN, C.; MAYSINGER, D.; EISENBERG, A. Nano-engineering block copolymer aggregates for drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 16, p. 3–27, 1999.

BAJPAI, A. K. et al. Responsive Polymers in Controlled Drug Delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 33, p. 1088–1118, 2008.

BALAJI, Anand B. et al. Natural and synthetic biocompatible and biodegradable polymers. **Biodegradable And Biocompatible Polymer Composites**, p.3-32, 2018.

BALMAYOR, E. R; AZEVEDO, H. S.; REIS, R. L. Controlled Delivery Systems: From Pharmaceuticals to Cells and Genes. **Pharmaceutical Research**, v. 28, p. 1241–1258, 2011.

BARCELOS, M. V. et al. Thermo-Mechanical Properties of P(HB-HV) Nanocomposites Reinforced by Nanodiamonds. **Materials Research Ibero-American Journal of Materials**, v. 20, p. 1-7, 2017.

BAUER, R. Physiology of *Dematium pullulans* de Bary. **Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung**, v. 98, p. 133- 167, 1938.

BELLANI, C. F. et al. Morphological, thermal, and mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone)/poly(ϵ -caprolactone)-grafted-cellulose nanocrystals mats produced by electrospinning. **Journal of Applied Polymer Science**, 133, n. 43445, p. 1-8. 2016.

BERNIER B. The production of polysaccharides by fungi active in the decomposition of wood and forest litter. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 4, p. 195-204, 1958.

BIESINGER, M. C. Advanced analysis of copper X-ray photoelectron spectra. **Surface Science Western**, v. 49, p. 1325-1334, 2017.

BIKIARIS, D. N. Solid dispersions, part I: recent evolutions and future opportunities in manufacturing methods for dissolution rate enhancement of poorly water-soluble drugs. **Expert Opinion in Drug Delivery**, v. 8, p. 1501–1519, 2011.

BRITO, A. C. **Cinética de cristalização isotérmica e não isotérmica a frio do PET e das blendas PET/PHB em diferentes concentrações**. 2010. 80 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

CHANDRA, R. Biodegradable polymers. **Progress in Polymer Science**, v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CONSTANTIN, M. et al. Studies on graft copolymerization of 3-acrylamidopropyl trimethylammonium chloride on pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, p. 926-932, 2011.

CONSTANTIN, M. et al. Smart nanoparticles based on pullulan-g-poly(N-isopropylacrylamide) for controlled delivery of indomethacin. **Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p. 698–708, 2017.

COSTA, P. J. C. Avaliação in vitro da lioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, p. 141-153, 2002.

DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. Poly(ϵ -caprolactone) based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 158, p. 15-33, 2012.

DEGERMENCI, M.; BESLI, P. A.; GENLI, N. Synthesis of a well-defined end-chain macrophotoinitiator of poly(ϵ -caprolactone) by combination of ring-opening Polymerization and click chemistry. **Journal of Polymer Research**, v. 21, p. 540, 2014.

DIAB, T. et al. Physicochemical properties and application of pullulan edible films and coatings in fruit preservation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 8, p. 988±1000, 2001.

DUHEM, N.; DANHIER, F.; PRÉAT, V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery Nicolas. **Journal of Controlled Release**, v. 182, p. 33–44, 2014.

DUMTRIU, S.; DUMITRIU, M. **Hydrogel and general properties of biomaterials**. 1st ed. New York: Marcel Dekker, 1993.

EFENTAKIS, M.; POLITIS, F. Comparative evaluation of various structures in polymer controlled drug delivery systems and the effect of their morphology and characteristics on drug release. **European Polymer Journal**, v. 42, p. 1183–1195, 2006.

FESSI, H., et al. Nanocapsule formation by interfacial deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, p. 1–4, 1989.

FIGUEIREDO, E. C.; DIAS, A. C. B.; ARRUDA, M. A. Z. Impressão molecular: uma estratégia promissora na elaboração de matrizes para a liberação controlada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 361-375, 2008.

FREITAS, L. B. O. et al. A reação “click” na síntese de 1,2,3-triazóis: Aspectos químicos e aplicações. **Química Nova**, v. 34, p.1791-1804, 2011.

GANESHKUMAR, M. et al. Curcumin loaded on pullulan acetate nanoparticles protects the liver from damage induced by DEN. **The Royal Society of Chemistry**, v. 6, p. 5599–5610, 2016.

GIL, M.V.; ARÉVALO, M. J.; LÓPEZ, O. Click Chemistry - What's in a Name? Triazole Synthesis and Beyond. **Synthesis**, v. 11, p.1589-1620, 2007.

GLAIED, O.; DELAITE, C.; RIESS, G. Synthesis of PCL-*b*-PVAc block copolymers by combination of click chemistry, ROP, and RAFT polymerizations. **Polymer Bulletin**, v. 68, p. 607-621, 2012.

GRACIDA, J. et al. Studies of biodegradation of binary blends of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV) with poly(2-hydroxyethylmetacrilate) (PHEMA). **Polymer Degradation and Stability**, v. 83, p. 247–253, 2004.

GUNATILLAKE, P. A.; ADHIKARI, R. Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering. **European Cells and Materials**, v. 5., p. 1-16, 2003.

HASUDA, H. et al. Synthesis of photoreactive pullulan for surface modification. **Biomaterials**, v. 26, p. 2401–2406, 2005.

HAZER, D. B.; KILIÇAY, E.; HAZER, B. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 637-647, 2012.

HILARES, R. T. et al. Low-melanin containing pullulan production from sugarcane bagasse hydrolysate by *Aureobasidium pullulans* in fermentations assisted by light-emitting diode. **Bioresource Technology**, v. 230, p. 76-81, 2017.

HILARES, R. T. et al. Exopolysaccharide (pullulan) production from sugarcane bagasse hydrolysate aiming to favor the development of biorefineries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 127, p. 169–177, 2019.

HE, X.-P., et al. Carbohydrate CuAAC click chemistry for therapy and diagnosis. **Carbohydrate Research**, v. 429, p. 1-22, 2016.

HEIN, C. D.; LIU, X. M.; WANG, D. Click chemistry, a powerful tool for pharmaceutical sciences. **Pharmaceutical Research**, v. 25, p. 2216-2230, 2008.

HEZARKHANI, M.; YILMAZ, E. Pullulan modification via poly(N-vinylimidazole) grafting. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 15, p. 149-156, 2019.

HILTUNEN, M. S.; RAULA, J.; MAUNU, S. L. Tailoring of water-soluble cellulose-*g*-copolymers in homogeneous medium using single-electron-transfer living radical polymerization. **Polymer International**, v. 60, p. 1370–1379, 2011.

HIMO, F. et al. Copper(I)-Catalyzed Synthesis of Azoles. DFT Study Predicts Unprecedented Reactivity and Intermediates. **Journal American Chemical Society**, v. 127, p. 210-216, 2005.

HORNIN, S. et al. Synthetic polymeric nanoparticles by nanoprecipitation. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p. 3838, 2009.

ISLAM, M. S.; YEUM, J. H.; DAS, A. K. Synthesis of poly(vinyl acetate–methyl methacrylate) copolymer microspheres using suspension polymerization. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 368, n. 1, p. 400-405, 2012.

JEONG, Y. I. et al. Clonazepam release from core-shell type nanoparticles in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 51, p. 169-178, 1998.

JEONG, Y., et al. Pharmaceutical Nanotechnology Adriamycin release from self-assembling nanospheres of poly(dl-lactide-co-glycolide)-grafted pullulan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 322, p. 154–160, 2006.

KESEL, C. D. et al. Blends of polycaprolactone with polyvinylalcohol: a DSC, optical microscopy, and solid state NMR study. **Polymer**, v. 40, p. 1969-1978, 1999.

KOLB, H. C.; FINN, M. G.; SHARPLESS, K. B. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 40, p. 2004-2021, 2001.

KOST, J.; LANGER, R. Responsive polymeric delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 327-341, 2012.

KULICKE, W. M.; HEINZE, T. Improvements in polysaccharides for use as blood plasma expanders. **Macromolecular symposia**, v. 231, n. 1, p. 47-59, 2006.

KUMAR, A. et al. Smart polymers: Physical forms and bioengineering applications. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 1205-1237, 2007.

LALLANA, E. et al. Click Chemistry for Drug Delivery Nanosystems. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 1–34, 2012.

LEMECHKO, P. et al. Synthesis of dextran-graft-PHBHV amphiphilic copolymer using click chemistry approach. **Reactive & Functional Polymers**, v. 72, p. 487–494, 2012.

LEMOIGNE, M. Produit de déshydratation et de polymérisation de l'acid β -oxybutyrique. **Bulletin De La Societe De Chimie Biologique**. v. 8, p. 770-782, 1926.

LEONARDIS, P. de et al. Atom transfer radical polymerization synthesis and association properties of amphiphilic pullulan copolymers grafted with poly(methyl methacrylate). **Polymer International**, v. 59, p. 759–765, 2010.

LI, H. et al. High drug loading pH-sensitive pullulan-DOX conjugate nanoparticles for hepatic targeting. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v. 102, p. 150-160, 2014.

LI, S. et al. Synthesis and characterization of three novel amphiphilic dextran self-assembled micelles as potential drug delivery system. **Journal of Materials Science**, v. 52, n. 21, p. 12593–12607, 2017.

LIEBERT, T.; HANSCH, C.; HEINZE, T. Click chemistry with polysaccharides. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, p. 208–213, 2006.

LIECHTY, W. B. et al. Polymers for drug delivery systems. **Annual review of chemical and biomolecular engineering**, v. 1, p. 149-173, 2010.

LIU, Q-S. et al. Reducing the formation of six-membered ring ester during thermal degradation of biodegradable PHBV to enhance its thermal stability. **Polymer Degradation and Stability**, v. 94, p. 8-24, 2009.

LIU, X-B. et al. Environmental biodegradation of haloarchaea-produced poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in activated sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, p. 6893–6902, 2016.

MAJUMDER, N. Click Chemistry in Nano Drug Delivery System and Its Applications in Biology. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**, v. 5, p. 95–105, 2015.

MEDEIROS, S. F. et al. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, p. 139-161, 2011.

MELDAL, M. Polymer “Clicking” by CuAAC Reactions. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 29, n. 12-13, p. 1016-1051, 2008.

MENG, L. et al. Natural Biopolymer Alloys with Superior Mechanical Properties. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 7, n. 2, p. 2792-2802, 2019.

MENG, X.; EDGAR, K. J. “Click” reactions in polysaccharide modification. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 52-85, 2016.

MIDDLETON, J. C.; TIPTON, A. J. Synthetic Biodegradable Polymers as Medical Devices. **Medical Device and Diagnostic Industry News Products and Suppliers**, v. 21, p. 1-8, 1998.

MISHRA, R. K., et al. Synthesis of poly[3-(methacryloylamino) propyl trimethylammonium chloride-co-methacrylic acid] copolymer hydrogels for controlled indomethacin delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, p.3365-3374, 2013.

MOCANU, G. et al. Chemical reaction on polysaccharides V. Pullulan chloroalkylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 39, p. 283–288, 1999.

MONTORO, S. R. et al. Redução da Massa Molecular e Funcionalização do Poli(3-Hidroxibutirato-co-3-Hidroxivalerato) (PHBHV) Via Hidrólise Ácida e Transesterificação com Glicóis. **Polímeros**, v. 21, n. 3, p. 182-187, 2011.

NAGUIB, H. F. et al. Synthesis and thermal characterization of poly (ester-ether urethane) s based on PHB and PCL-PEG-PCL blocks. **Journal of Polymer Research**, v. 18, p. 1217-1227, 2011.

NEDOVICA, V. et al. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1806-1815, 2011.

OKAMOTO, M.; JHON, B. Synthetic biopolymer nanocomposites for tissue engineering scaffolds. **Advanced Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 1487–1503, 2013.

OLIVEIRA, S. A. Dextrana: Revisão sobre uso e possíveis aplicações industriais. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2013.

PEPPAS, M. Analysis of Fickian drug release from polymers. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 60, p. 110-111, 1965.

PEREIRA, J. M. Synthesis of New Pullulan Derivatives for Drug Delivery. 2013. Dissertation for the degree of doctor - Virginia Polytechnic Institute and State University, 2013.

PEREIRA, J. M.; MAHONEY, M.; EDGAR, J. K. Synthesis of amphiphilic 6-carboxypullulan ethers. **Carbohydrate Polymer**, v. 100, p. 65–73, 2014.

POUTON, C. W.; AKHTAR, S. Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 18, p.133, 1996.

PRASAD, P. et al. Miscibility, Thermal, and Mechanical Studies of Hydroxypropyl Methylcellulose/Pullulan Blends. **Journal of Applied Polymer Science**, v.110, p. 444–452, 2008.

PRAJAPATI, S. K., et al. Biodegradable polymers and constructs: A novel approach in drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 120, p. 109-191, 2019.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer Nanoparticles: Preparation Techniques and Size-Control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 887-913, 2011.

RAPOPORT, N. Physical stimuli-responsive polymeric micelles for anti-cancer drug delivery. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 962–990, 2007.

RATTO, J. A.; SCHNEIDER, N. The effect of water interactions on the thermal transition behavior of pullulan. **Polymer Material Science Engineering**, v. 79, p. 469-470, 1998.

ROSADO, C.; SILVA, C.; REIS, C. P. Hydrocortisone-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for atopic dermatitis treatment. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, p. 710–718, 2013.

ROSTOVTSEV, V. V. et al. A Stepwise Huisgen Cycloaddition Process: Copper(I)-Catalyzed Regioselective “Ligation” of Azides and Terminal Alkyne. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 41, p. 2596-2599, 2002.

SAN MIGUEL, V. et al. Biodegradable and thermoresponsive micelles of triblock copolymers based on 2-(N,N-dimethylamino)ethyl methacrylate and ϵ -caprolactone for controlled drug delivery. **European Polymer Journal**, v. 44, p. 3853–3863, 2008.

SHENG, J. J. et al. Solubilization e dissolução do ácido fraco insolúvel, cetoprofeno: efeitos do pH combinado com o surfactante. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 29, p. 306-314, 2006.

SHEN, S.; LI, H.; YANG, W. The preliminary evaluation on cholesterol-modified pullulan as a drug nanocarrier. **Drug Delivery**, v. 21, p. 501–508, 2014.

SHEN, S. C. et al. Stabilized amorphous state of ibuprofen by co-spray drying with mesoporous SBA-15 to enhance dissolution properties. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 1997–2007, 2010.

SHIBATA, M. et al. Chemical modification of pullulan by isocyanate compounds. **Polymers**, v. 42, p. 59–64, 2001.

SHINGEL, K. I. Determination of structural peculiarities of dextran, pullulan and irradiated pullulan by Fourier-transform IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 337, p. 1445–1451, 2002.

SINGH, R. S.; SAINI, G. K.; KENNEDY, J. F. Pullulan: Microbial sources, production and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 515–531, 2008.

SINGH, R. S.; KAUR, N.; KENNEDY, J. F. Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting. **Carbohydrate Polymers**, v. 123, p. 190-207, 2015.

SINGH, M. S.; CHOWDHURY, S.; KOLEY, S. Advances of azide-alkyne cycloaddition-click chemistry over the recent decade. **Tetrahedron**, v. 72, p. 5257-5283, 2016.

SONI, S. R., et al. Synthesis and characterization of a non-cytotoxic and biocompatible acrylamide grafted pullulan – Application in pH responsive controlled drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 753–762, 2018.

SOWNTHARI, K.; SUTHANTHIRARAJ, S. A. Synthesis and characterization of an electrolyte system based on a biodegradable polymer. **eXPRESS Polymer Letter**, v. 7, p. 495–504, 2013.

SPATAREANUA, A. et al. Synthesis, characterization and solution behaviour of oxidized pullulan. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 63–71, 2014.

STAPP, C. Über die reserveinhaltsstoffe und den schleim von *Azotobacter chroococcum*. **Zentbl Bakteriol II**, v. 61, p. 276-292, 1924.

SUI, X. et al. Synthesis of Cellulose-graft-Poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) Copolymers via Homogeneous ATRP and Their Aggregates in Aqueous Media. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2615–2620, 2008.

SUDESH, K.; ABE, H.; DOI, Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 25, p. 1503-1555, 2000.

SUN, B. et al. Polysaccharides as vaccine adjuvants. **Vaccine**, v. 36, p. 5226-5234, 2018.

TERAMOTO, N.; SHIBATA, M. Synthesis and properties of pullulan acetate. Thermal properties, biodegradability, and a semi-clear gel formation in organic solvents. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 476–481, 2006.

TEZUKA, Y. Assignment of chemical shifts of the acetyl proton and acetyl carbonyl carbons by 2D-NMR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 305, p. 155–161, 1998.

TIWARI, G. et al. Drug delivery systems: An updated review. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, p. 2-11, 2012.

TORNØE, C. W.; CHRISTENSEN, C.; MELDAL, M. Peptidotriazoles on Solid Phase: [1,2,3]-Triazoles by Regiospecific Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions of Terminal Alkynes to Azides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 67, p. 3057, 2002.

TOZER, N. T.; ROWLAND, M. **Introdução à Farmacocinética e à Farmacodinâmica**, As Bases Quantitativas da Terapia Farmacológica. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2009.

ULERY, B. D.; NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biomedical applications of biodegradable polymers. **Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics**, v. 49, p. 832-864, 2011.

USFDA. Agency Response Letter: GRAS Notice No. GRN 000099 [Pullulan]. US Food and Drug Administration (US FDA). Maryland: Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN); Office of Food Additive Safety; College Park, 2018.

VARDHAN, H. et al. Long-circulating polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate nanoparticles for tumor targeted docetaxel delivery: Formulation, optimization and in vitro characterization. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, p. 85–94, 2017.

VO, C. L-N.; PARK, C.; LEE, B-J. Corrent trends and future perspective of solids dispersions containing poorly water-soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, p. 799-813, 2013.

WALLEN, L. L.; ROHWEDDER, W. K. Poly-b-hydroxyalkanoate from activated sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 8, p. 576- 579, 1974.

WANG, K. L., et al. Regiocontroll synthesis cellulose-graft-polycaprolactone copolymer (2,3-di-O-PCL-cellulose) by a new route. **eXPRESS Polymer Letter**, v. 11, p. 991–1002, 2017.

WANG, L. et al. Corn starch-based graft copolymers prepared via ATRP at the molecular level. **Polymer Chemistry**, v. 6, p. 3480-3488, 2015.

WILHELM, M. et al. Poly(styrene-ethylene oxide) block copolymer micelle formation inwater: a fluorescence probe study. **Macromolecules**, v. 24, p. 1033–1040, 1991.

WILLERSINN, J. et al. Vesicles of double hydrophilic pullulan and poly(acrylamide) block copolymers: a combination of synthetic- and bio-derived blocks. **Polymer Chemistry**, v. 8, p. 1244-1254, 2017.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER. D.W. The Return of a Forgotten Polymer: Polycaprolactone in the 21st Century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p. 1217-1256, 2010.

WU, Q. et al. Synthesis and self-assembly of a new amphiphilic thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam)/poly(ϵ -caprolactone) block copolymer. **Polymer Bulletin**, v. 71, p. 1-18, 2014.

WU, Q. et al. Synthesis and self-assembly of new amphiphilic thermosensitive poly(N-vinylcaprolactam)/poly(ϵ -caprolactone) block copolymers via the combination of ring-opening polymerization and click chemistry. **Journal of Polymer Research**, v. 20, p. 262, 2013.

XUE C. X. et al. Synthesis of Hyperbranched Poly(ϵ -caprolactone) Containing Terminal Azobenzene Structure via Combined Ring-Opening Polymerization and "Click". **Polymers**, v. 7, p. 1248-1268, 2015.

YANG, X., et al. Amphiphilic polysaccharides as building blocks for self-assembled nanosystems: molecular design and application in cancer and inflammatory diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 272, p. 114-144, 2018.

YU, Y. C.; KANG, H. U.; YOUK, J. H. Synthesis and micellar characterization of thermosensitive amphiphilic poly(ϵ -caprolactone)-*b*-poly(N-vinylcaprolactam) block copolymers. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, p. 1107–1113, 2012.

YOUSAFZAI, M. **Eu sou Malala**: a história da garota que defendeu o direito à educação e foi baleada pelo Talibã. 1. ed. São Paulo: Companhia das Letras, 2013.

ZHANG, H-Z, et al. Pullulan acetate nanoparticles prepared by solvent diffusion method for epirubicin chemotherapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 71, p. 19–26, 2009.

ZHANG, C.; CHUNG, J. W.; PRIESTLEY, R. D. Dialysis Nanoprecipitation of Polystyrene Nanoparticles. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 33, p. 1798-1803, 2012.

ZHANG, Y.; YANG, J. Design strategies for fluorescent biodegradable polymeric biomaterials. **Journal of Material Chemistry B**, v. 1, p. 132-148, 2013.

ZHOU, L. et al. Grafting polycaprolactone diol onto cellulose nanocrystals via click chemistry: enhancing thermal stability and hydrophobic property. **Carbohydrate Polymers**, v.189, p. 331-341, 2018.