



**Universidade Federal de Sergipe  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Programa de Pós-Graduação em Ciência e  
Engenharia de Materiais**

**Tese de Doutorado**

**Novos Polímeros a Base de Ácido  
Glicerofosfórico/Beta-Ciclodextrina  
Reticulado com Ligações Uretânicas:  
preparação e incorporação de  
Ciprofloxacina**

**Mirna Pereira Moreira**

**São Cristóvão**

**FEVEREIRO / 2017**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Moreira, Mirna Pereira  
M838n      Novos polímeros a base de ácido glicerofosfórico/ $\beta$ -ciclodextrina reticulado com ligações uretânicas : preparação e incorporação de ciprofloxacino / Mirna Pereira Moreira; orientador lara de Fátima Gimenez. – São Cristóvão, 2017.  
91 f. ; il.

Tese (doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Sergipe, 2017.

1. Engenharia de materiais. 2. Polímeros. 3. Poliuretanas. 4. Ciprofloxacina. 5. Farmacologia. I. Gimenez, lara de Fátima, orient. II. Título.

CDU: 620:54-126

“Novos Polímeros a Base de Ácido Glicerofosfórico/Beta-  
Ciclodextrina Reticulado com Ligações Uretânicas:  
preparação e incorporação de Ciprofloxacina”.

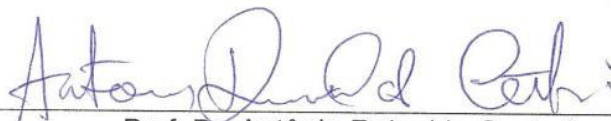
Mirna Pereira Moreira

Tese submetida ao corpo docente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS da Universidade Federal de Sergipe  
como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de DOUTOR em  
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

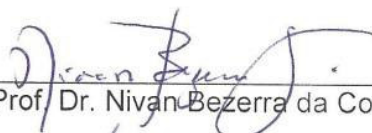
Aprovada por:



Profa. Dra. Iara de Fátima Gimenez



Prof. Dr. Antônio Reinaldo Cestari



Prof. Dr. Nivan Bezerra da Costa Junior



Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araujo



Profa. Dra. Cristiane Xavier Resende

SÃO CRISTÓVÃO, SE – BRASIL.

Fevereiro/2017

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais que sempre me incentivaram e me deram tudo que precisei para minha formação pessoal e educacional, sempre confiantes no meu sucesso, dando muito amor e carinho.

A minha irmã, que sempre me deu forças para derrubar as dificuldades.

A minha orientadora, Iara pela orientação, confiança, incentivo e apoio no decorrer da realização deste trabalho.

Aos meus professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, que contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos meus colegas de laboratório e de pós-graduação pelo auxílio prestado ao referente trabalho.

Aos técnicos e colegas do pólo de Física, química e de ciência e engenharia de materiais e NUPEG /UFS, e RMN da UNAERP (Universidade de Ribeirão Preto) pela atenção com que realizaram algumas das análises apresentadas neste trabalho;

À CAPES pela bolsa concedida.

Resumo da Tese apresentada ao P<sup>2</sup>CEM/UFS como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais (D.Sc.)

NOVOS POLÍMEROS A BASE DE ÁCIDO GLICEROFOSFÓRICO/BETA-CICLODEXTRINA RETICULADO COM LIGAÇÕES URETÂNICAS:  
PREPARAÇÃO E INCORPORAÇÃO DE CIPROFLOXACINA

Mirna Pereira Moreira

Fevereiro/2017

Orientador: Iara de Fátima Gimenez

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais

Nesta Tese foi estudada a síntese de poliuretanos ternários (PUs) à base de diisocianato de hexametileno,  $\beta$ -ciclodextrina e  $\beta$ -glicerofosfato (na forma de ácido e de sal de cálcio), sendo avaliados diferentes parâmetros de síntese, tais como proporção monômero, método de aquecimento (refluxo e microondas), bem como a quantidade de catalisador. As condições mais favoráveis foram fornecidas pela irradiação de microondas e a utilização de ácido  $\beta$ -glicerofosfórico, embora os resultados sugiram que é possível obter PU ternário com o sal de cálcio. Dados de FTIR indicaram a existência de ligações de uréia secundárias na estrutura dos poliuretanos. Após a caracterização dos PU's ternários por espectroscopia de FTIR, XRD e análise térmica, obtiveram-se evidências de que as cavidades de  $\beta$ -ciclodextrina permaneceram ativas para a inclusão de moléculas hóspedes, usando-se fenolftaleína (FF) como sonda. Na sequência, foi avaliada a possibilidade de inclusão do antibiótico ciprofloxacina. A ausência do pico de fusão ciprofloxacina em curvas de DSC indicou que este fármaco está molecularmente disperso dentro do polímero, com as moléculas possivelmente incluídas nas cavidades  $\beta$ -ciclodextrina. Experiências de liberação *in vitro* sugeriram interações não-inclusivas, mostrando também que a utilização de membranas de diálise pode mascarar o perfil de liberação efetiva.

**Palavras-chave:** poliuretano ternário,  $\beta$ -ciclodextrina,  $\beta$ -glicerofosfato, ciprofloxacina, complexo de inclusão, a liberação do fármaco.

Abstract of Thesis presented to P<sup>2</sup>CEM/UFS as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Materials Science and Engineering (D.Sc.)

TERNARY CYCLODEXTRIN POLYURETHANES CONTAINING PHOSPHATE GROUPS: SYNTHESIS AND COMPLEXATION OF CIPROFLOXACIN

Mirna Pereira Moreira

February/2017

Advisor: Iara de Fátima Gimenez

Department: Materials Science and Engineering

Synthesis of ternary polyurethanes (PUs) from hexamethylenediisocyanate,  $\beta$ -cyclodextrin and  $\beta$ -glycerophosphate (acid and calcium salt) was studied varying synthesis parameters such as monomer proportion, heating method (reflux and microwave), and catalyst amount. Favorable conditions were provided by microwave irradiation and use of  $\beta$ -glycerophosphoric acid although the results suggest that it is possible to obtain ternary PUs with the calcium salt. FTIR data indicated the existence of secondary urea linkages. After characterization of ternary PUs by FTIR spectroscopy, XRD and thermal analysis, as well as evidences that the cyclodextrin cavities remained active toward inclusion of guest molecules, the possibility of inclusion of the antibiotic ciprofloxacin was evaluated. Absence of ciprofloxacin melting peak in DSC curves indicated that it is molecularly dispersed within the polymer, possibly included in the cyclodextrin. In vitro release experiments suggested additional non-inclusion interactions, showing also that the use of dialysis membranes may mask the actual release profile.

**Keywords:** *ternary polyurethane,  $\beta$ -cyclodextrin,  $\beta$ -glycerophosphate, ciprofloxacin, inclusion complex, drug delivery*

## ÍNDICE

|                                                                                                                       |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                                                    | <b>IV</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                                                                  | <b>V</b>  |
| <b>1.INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                              | <b>11</b> |
| <b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>                                                                                   | <b>15</b> |
| 2.1. CICLODEXTRINAS.....                                                                                              | 16        |
| 2.2. POLÍMEROS CONTENDO CICLODEXTRINAS.....                                                                           | 18        |
| 2.2.1. Poliuretano á base de ciclodextrinas.....                                                                      | 20        |
| 2.3. FOSFATO DE CALCIO.....                                                                                           | 22        |
| 2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO.....                                                         | 24        |
| 2.5.O FÁRMACO CIPROFLOXACINA.....                                                                                     | 25        |
| <b>3. OBJETIVOS.....</b>                                                                                              | <b>27</b> |
| 3.1. OBJETIVO GERAL.....                                                                                              | 28        |
| 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....                                                                                       | 28        |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                                                                    | <b>29</b> |
| 4.1.MATERIAIS.....                                                                                                    | 30        |
| 4.2. MÉTODOS.....                                                                                                     | 30        |
| 4.2.1. Teste de solubilidade do glicerofosfato de cálcio.....                                                         | 30        |
| 4.2.2. Síntese dos poliuretanos ternários (Ca-Glic e H-Glic).....                                                     | 31        |
| 4.2.3. Avaliação da possibilidade de encapsulação das amostras do polímero com a fenolftaleína (FF).....              | 33        |
| 4.2.4. Estudo da interação do ácido glicerosfórico com o fármaco.....                                                 | 33        |
| 4.2.5. Estudo de incorporação do fármaco nos polímeros obtidos na avaliação da formação de complexos de inclusão..... | 34        |
| 4.2.6. Determinação da solubilidade da ciprofloxacina (fármaco).....                                                  | 34        |
| 4.2.7. Determinação da curva de calibração analítica por espectroscopia de absorção no UV/visível(UV-VIS).....        | 35        |
| 4.2.8. Determinação do perfil de liberação <i>In Vitro</i> .....                                                      | 35        |
| 4.2.9. Modelagem molecular.....                                                                                       | 36        |
| 4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....                                                                                 | 36        |
| 4.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....                                                          | 36        |
| 4.3.2. Difratomia de raios X (XRD).....                                                                               | 37        |
| 4.3.3. Análise termogravimétrica (ATG).....                                                                           | 37        |
| 4.3.4. Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....                                                               | 37        |
| 4.3.5. Espectroscopia de absorção do UV-VISIVEL (UV_VIS).....                                                         | 37        |
| 4.3.6. Ressonância magnética (RMN H <sup>1</sup> ).....                                                               | 37        |

|                                                                                                                                                                                                                   |               |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                                                                                                                                                                            | <b>38</b>     |
| 5.1. SÍNTESE PU TERNÁRIO.....                                                                                                                                                                                     | 39            |
| 5.2. ESTUDOS DA FORMAÇÃO DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO<br>POLIURETANO/CIPRO.....                                                                                                                                       | 52            |
| 5.3. ESTUDO DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i> .....                                                                                                                                                                    | 61            |
| 5.4. ESTUDO COMPUTACIONAL SEMIEMPÍRICO DA ESTRUTURA/<br>ESTABILIDADE DE COMPLEXOS DE INCLUSÃO DE CIPROFLOXACINA<br>EM DIFERENTES CICLODEXTRINAS NATIVAS: $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -<br>CICLODEXTRINA..... | 65            |
| <br><b>6. CONCLUSÕES.....</b>                                                                                                                                                                                     | <br><b>70</b> |
| <br><b>7. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>                                                                                                                                                            | <br><b>73</b> |
| <br><b>8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                                                                     | <br><b>75</b> |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                    |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Representações estruturais da: molécula de $\alpha$ -D-glucopiranosose (a), ligações glicosídicas (b) e molécula da ciclodextrina na forma de cone truncado (c) (ZHOU et al., 2010)..... | 16 |
| Figura 2. Dimensões (diâmetro interno e altura) das CDs: $\gamma$ -, $\beta$ - e $\alpha$ -CD (UYAR et al., 2009).....                                                                             | 17 |
| Figura 3. Cadeias poliméricas contendo ciclodextrinas: a) forma reticulada b) na forma pendular (DAVIS et al., 2004).....                                                                          | 19 |
| Figura 4. Representação de um polímero reticulado contendo ciclodextrinas .....                                                                                                                    | 19 |
| Figura 5. Reação de formação do poliuretano (OLIVEIRA et al., 2009).....                                                                                                                           | 20 |
| Figura 6. a) Estrutura molecular do fármaco; b) complexo de inclusão na cavidade da beta ciclodextrina (CHAO et al., 2002).....                                                                    | 25 |
| Figura 7. Espectros de FTIR para as diferentes condições de reação de acordo com a tabela 1.....                                                                                                   | 40 |
| Figura 8. Espectros de FTIR para os precursores, pré-polímero (PP) e poliuretano ternário (PU ternário-polímero 11 da Tabela 1).....                                                               | 41 |
| Figura 9. Representação esquemática de possíveis estruturas resultantes da reação de grupos isocianato com diferentes grupos: uretânicos, ureia e moléculas de água.....                           | 43 |
| Figura 10. Representação esquemática da formação de cadeias do tipo poliuretano-uréia pela reação de um pré-polímero uretânico com dióis e diaminas.....                                           | 44 |
| Figura 11. Representação estrutural de uma molécula de a) ciclodextrina com a numeração de átomos de carbono; b) glicerofosfato de cálcio.....                                                     | 47 |
| Figura 12. Espectro de RMN de carbono 13 no estado sólido da $\beta$ -CD na sua forma nativa.....                                                                                                  | 47 |
| Figura 13. Espectro de RMN de carbono 13 no estado sólido do glicerofosfato de cálcio.....                                                                                                         | 48 |
| Figura 14. Espectro de RMN de carbono 13 no estado sólido do polímero 11 (Tabela 1).....                                                                                                           | 48 |
| Figura 15. Curvas do TG do polímero (amostra 11) e da $\beta$ -CD.....                                                                                                                             | 49 |
| Figura 16. Difratoograma da $\beta$ -CD e do polímero da amostra 11 da Tabela 1.....                                                                                                               | 50 |
| Figura 17. Curvas de % de fenolftaleína ligada ao polímero a partir da solução 11 após 4h de contato como uma função de massa de polímero . .....                                                  | 51 |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 18. Termograma de DSC do polímero, fármaco (CIPRO) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção de 1:1.....                                                                                                                                                                                                         | <b>53</b> |
| Figura 19. Termograma de DSC do fármaco (CIPRO) e do ácido glicerosfórico (AC Glic).....                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>55</b> |
| Figura 20. Termograma do DSC do fármaco (CIPRO) e das misturas dos complexos de inclusões entre polímero e fármaco em diferentes proporções do fármaco, a) (1:0,5_1:1_1:2) e b) na proporção 0,01.....                                                                                                                                             | <b>56</b> |
| Figura 21. Curvas de TG do polímero,fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção 1:1.....                                                                                                                                                                                                                  | <b>57</b> |
| Figura 22. Curvas de DTG do polímero,fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção 1:1.....                                                                                                                                                                                                                 | <b>58</b> |
| Figura 23. Difrátogramas do polímero,fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção 1:0,1.....                                                                                                                                                                                                               | <b>59</b> |
| Figura 24. Espectros de FTIR do polímero,fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção a)1:1 e b) 1:0,1.....                                                                                                                                                                                                | <b>61</b> |
| Figura 25. Curva de calibração do fármaco.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | <b>62</b> |
| Figura 26. Perfis de libertações: a) Com membrana diálise: fármaco livre, PU de ácido glicerosfórico na forma da mistura em complexo de inclusão (PU H-Glic/CI) e da $\beta$ -CD na sua forma nativa com a mistura em complexo de inclusão ( $\beta$ -CD nativa/CI) b) Sem membrana diálise: fármaco livre, PU Ca-Glic/CI e PU H-Glic/CI.....      | <b>64</b> |
| Figura 27. Estruturas correspondentes aos mínimos de energia, simuladas pelo método PM3 complexos para as diferentes ciclodextrinas, gerados nas duas orientações consideradas. Nas figuras, a identificação dos átomos correspondentes a cada cor é: cinza: carbono; branco: hidrogênio, vermelho: oxigênio, verde: flúor e azul: nitrogênio..... | <b>68</b> |

## ÍNDICE DE TABELAS

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1: Condições e detalhes experimentais das diferentes reações de polimerização realizadas.. .....                                                     | 32 |
| Tabela 2: Números de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) e possíveis atribuições de bandas do FTIR observadas nos espectros (Figura 7).....                          | 42 |
| Tabela 3: Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e possíveis atribuições de bandas observadas nos espectros FTIR para os componentes isolados (Figura 8)..... | 43 |
| Tabela 4: Energias de ligação dos complexos obtidas a partir do método semi-empíricos PM3.....                                                              | 66 |

---

## **1. Introdução**

---

Na literatura podem ser encontrados vários materiais preparados para serem empregados como implantes ósseos, no entanto estes devem apresentar requisitos adicionais tais como biocompatibilidade e biofuncionalidade, a fim de serem considerados capazes de desempenhar a função desejada no organismo (HOANG THI *et al.*, 2010). Atualmente, um dos focos de pesquisas busca evitar rejeições no local do implante, pois uma das principais causas de problemas pós-operatórios é a infecção adjacente ao biomaterial (BROOKS *et al.*, 2015). Esta problemática tem sido combatida com o tratamento de administração intravenosa de potentes antibióticos, contudo devido principalmente à baixa circulação de sangue no tecido ósseo, este procedimento muitas vezes tem um efeito limitado (DUAN *et al.*, 2006). Objetivando compensar esta limitação muitas vezes aumenta-se a dosagem do antibiótico para assegurar que a concentração necessária para combater a infecção chegue à área do implante (MESEGUER-OLMO *et al.*, 2002). Contudo, existe um limite superior da dosagem devido à toxicidade e aos efeitos colaterais que o medicamento pode provocar, fazendo com que muitas vezes a infecção não seja eliminada e o paciente precise ser submetido a uma nova cirurgia.

A literatura demonstra que alguns fármacos têm seus efeitos colaterais reduzidos e suas propriedades terapêuticas potencializadas quando aplicados diretamente em órgãos específicos do corpo humano. Uma maneira para atingir tal objetivo é a utilização de sistemas de transporte e liberação de fármacos (GRANADA *et al.*, 2007). Neste sentido, a liberação local de antibióticos pelo próprio implante seria uma possibilidade de combater essas infecções e garantir uma maior taxa de sucesso para procedimentos cirúrgicos desta natureza, pois a dose eficaz seria liberada sistematicamente exatamente na região onde o risco de infecção é maior. Embora a idéia seja interessante, existem algumas dificuldades para o desenvolvimento de tal material, pois este deverá apresentar propriedades que possibilitem sua utilização tanto como implante quanto carreador de fármaco. Uma alternativa para essa problemática é o desenvolvimento de materiais à base de polímeros com ciclodextrinas (CDs). Na literatura é possível encontrar vários trabalhos que relatam a aplicação de CDs como sistema de transporte e liberação de fármacos através da formação de complexos de inclusão (LEPRETRE *et al.*, 2009; BURGOS *et al.*, 2002). As propriedades atraentes de CDs em formar complexo de inclusão decorrem da capacidade de formar ligações não covalentes com drogas pouco solúveis em água. Essa interação entre ambas proporciona

ao fármaco solubilidade, aumento da estabilidade e ainda promove a liberação controlada de fármacos (TEJASHRI et al., 2013).

Os materiais poliméricos contendo ciclodextrinas apresentam um vasto campo de aplicação, como separações químicas, catálise, processamento de alimentos, excipientes farmacêuticos, entre outros. Já foram descritos também esses polímeros sendo utilizados como materiais para a liberação de drogas na fase pós-cirúrgica de enxertos ósseos (LEPRETE *et al.*, 2009; HOANG THI *et al.*, 2010; HALPERN et al., 2014). Nesta proposta será destacada a classe de polímeros conhecida como poliuretanos (PUs). Devido a propriedades tais como flexibilidade mecânica, biocompatibilidade e de degradação atóxica, polímeros pertencentes a esta classe são comumente usados em diversos dispositivos biomédicos tais como cateteres, corações artificiais, implantes mamários, entre outros (BURKE et al., 2004). Outra característica fundamental dos PUs é a versatilidade de composições, resultante de uma grande variedade de monômeros comercialmente disponíveis, permitindo a concepção de polímeros para executar funções específicas. Neste contexto, os PUs biocompatíveis são muitas vezes utilizados não apenas como implantes para a reparação dos tecidos, mas também como sistemas de liberação de drogas (CHERNG et al., 2013). Os PUs podem ser carregados com moléculas de fármacos por meio de adsorção, bem como a ligação covalente de moléculas de fármaco para segmentos da cadeia. A adsorção pode ser classificada como física ou química, dependendo da natureza das interações, favorecida por grupos funcionais específicos, dependendo da natureza química das drogas. A presença de outros grupos na estrutura polimérica pode também ser vantajosa em alguns casos. Em relação à ligação covalente, moléculas de drogas contendo grupos de hidroxila que poderão reagir com os precursores diisocianato para a formação de uma cadeia polimérica com moléculas que transportam drogas. O uso combinado de sistemas de entrega de droga e dos implantes também pode ser alcançado com polímeros, havendo o combate de infecção num dispositivo *in situ* (MACOCINSHI et al., 2014). No entanto, apesar do grande potencial, a incorporação em PUs é inexplorada neste contexto ao qual está sendo proposto. (XIAO *et al.*, 2011).

Por fim alguns poucos trabalhos indicaram que a incorporação de grupos contendo fósforo à estrutura de PUs abre a possibilidade de aprimorar a atividade fisiológica dos mesmos (SIVRIEV *et al.*, 1990). A preparação de PUs modificados por

grupos fosfato é atraente por várias razões, tais como os potenciais efeitos de grupos iônicos em modificação mecânica e comportamento térmico dos polímeros (JANDOUIN et al., 2012) e o potencial de retardamento de chama de compostos de fósforo (VELENCOSO et al., 2011). Por outro lado, uma alternativa que pode ser vantajosa neste contexto é o uso de glicerofosfato de cálcio que, além de já ter sido incorporado com sucesso a PUs para a geração de ionômeros (KAKATI *et al.*, 1993), já foi demonstrado que tal componente induz a mineralização em culturas de células (BOSKEY *et al.*, 1986), sendo inclusive adicionado rotineiramente aos meios de cultura. Neste contexto, a bioatividade de  $\beta$ -glicerofosfato foi igualmente demonstrada como iniciador de mineralização da matriz extracelular em culturas de células MC3T3-E1 (FratzlZelman et al, 1998).

Diante de todas estas considerações e as oportunidades de pesquisa existentes neste tópico, propomos no presente trabalho a síntese de um material polimérico com ligações uretânicas contendo simultaneamente grupos de  $\beta$ -ciclodextrinas, a fim de propiciar a característica de um sistema de transporte de fármaco visando à minimização de infecções e/ou reações inflamatórias, e grupos glicerofosfato, a fim de aumentar a atividade fisiológica do material, à cadeia polimérica.

Este trabalho, centra-se na síntese de polímero e na caracterização a complexação do antibiótico, ciprofloxacina e em teste de liberação in vitro. O nosso objetivo foi contribuir para o desenvolvimento de um polímero ternário com os componentes citados e mostrar a sua capacidade de inclusão e liberação do antibiótico ciprofloxacina. No entanto, os materiais obtidos têm potencial de atuarem como implantes ósseos através de entrega de agentes terapêuticos para impedir infecções, numa abordagem já descrita em vários trabalhos (BROOKS et al., 2015; LEPRÊTRE et al., 2009) e que poderá ser explorada em trabalhos futuros.

---

---

## **2. Revisão Bibliográfica**

---

---

## 2.1. CICLODEXTRINAS

As ciclodextrinas (CDs) são oligossacarídeos cíclicos formados pela união de moléculas de unidades de  $\alpha$ -D-glucopirranose (Figura 1a) ligadas por ligações glicosídicas  $\alpha(1,4)$  (Figura 1b). A molécula de CD possui uma estrutura semelhante a um cone truncado (Figura 1c), possuindo hidroxilas primárias na parte mais estreita do tronco (C-6), ao passo que os grupos de hidroxila secundárias se encontram na parte mais larga desse tronco (C-2 e em C-3) (Figura 1c) (SZEJTLI, 1998). Possui no seu interior um caráter hidrofóbico, devido ao alinhamento dos hidrogênios em C-3 e C-5 e hidroxilas nas extremidades que podem formar ligações de hidrogênio com o meio aquoso e tornando-se solúveis no mesmo. As CDs mais utilizadas para fins comerciais e científicos são  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -CD formadas por seis, sete e oito unidades de glicose, respectivamente (Figura 1) (DAVIS et al., 2004; SINCH et al., 2002).

As CDs têm a capacidade de formar complexos de inclusão com outras moléculas presentes no meio, através de interações hospedeiro-convidado (DEL VALLE, 2004). Nesses sistemas, a molécula de CD é o hospedeiro e a molécula convidada é a que vai ser complexada na cavidade da CD.

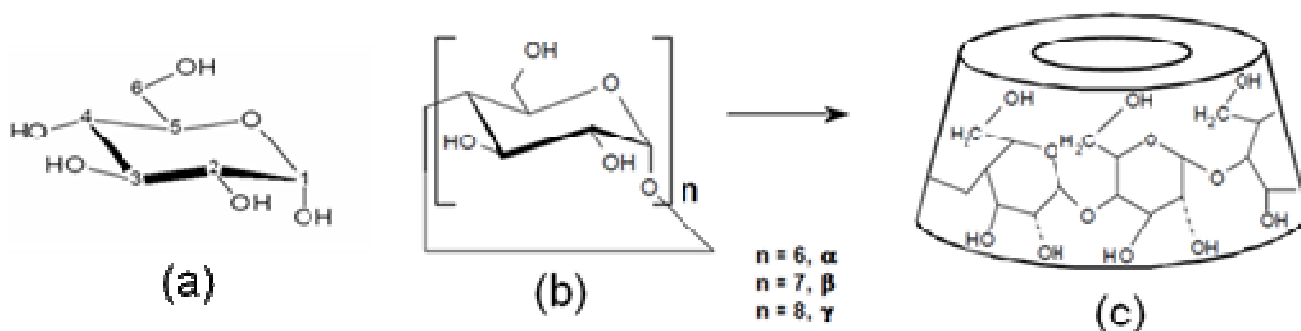


Figura 1: Representações estruturais da: molécula de  $\alpha$ -D-glucopirranose (a), ligações glicosídicas (b) e molécula da ciclodextrina na forma de cone truncado (c) (ZHOU et al., 2010).

O complexo de inclusão pode ser formado com vários compostos sólidos, líquidos e gasosos (DEL VALLE, 2004) como hóspedes, contudo a cavidade hidrofóbica deve ser favorável à acomodação e ao ajuste espacial entre ambas (Figura 2), permitindo sua complexação.

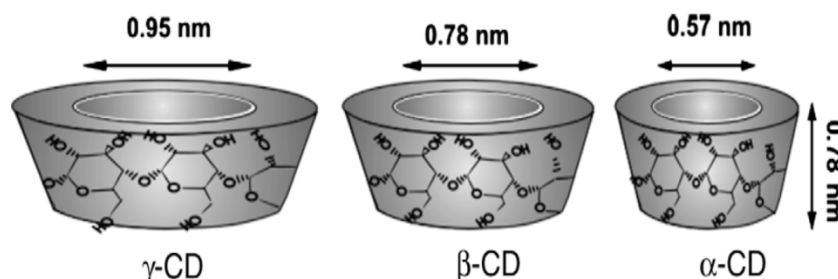


Figura 2: Dimensões (diâmetro interno e altura) da CDs:  $\gamma$ -,  $\beta$ - e  $\alpha$ -CD (UYAR et al., 2009).

As CDs são largamente utilizadas em formulações farmacêuticas para aumentar a solubilidade; estabilidade e biodisponibilidade de medicamentos; volatilidade; aroma (ou sabor) de componentes de alimentos, dentre outras (DEL VALLE, 2004; DAVIS et al., 2004). Adicionalmente, podem ser modificadas quimicamente através da funcionalização das suas hidroxilas primárias e/ou secundárias por diversos grupos funcionais, podendo haver substituição com grupos metilo, hidroxipropilo, ou até mesmo a polimerização da macromolécula, ampliando a gama de aplicações (DODZIUK, 2006; CRINI, 2005; MOCANU *et al*, 2001).

Apesar de a habilidade das CDs de formarem complexos de inclusão ser muito utilizada, a obtenção de novas estruturas deve ser planejada cuidadosamente, pois a estabilidade do complexo resultante vai depender de fatores como tamanho e forma do convidado, bem como da natureza das interações com as ciclodextrinas. As moléculas incluídas normalmente ficam orientadas de modo que se alcance o máximo contato entre a parte hidrofóbica da molécula hóspede e a cavidade da ciclodextrina de natureza apolar (SZEJTLI, 1998). O complexo de inclusão formado se comporta de acordo com um equilíbrio dinâmico, em que se tem a molécula hospede constantemente se associando e dissociando da cavidade da CD (LOFTSSON et al., 1996).

Na solução aquosa a CD se associa a compostos menos polares que a água, tendo ambas forma e dimensão compatíveis. Na formação dos complexos, as moléculas de água que preenchem originalmente a cavidade da CD, estando em um estado

energeticamente menos favorável, são substituídas pela nova molécula. molécula da CD vai atuar então como hospedeira, podendo alojar uma molécula hóspede total ou parcialmente, caso haja compatibilidade para formar o complexo de inclusão. As CDs formam complexos de inclusão com substâncias que possuem tamanho, polaridade e forma geométrica compatível com a dimensão da sua cavidade (SZEJTLI, 1998).

Pelo exposto, fica claro que as CDs, além de apresentarem elevado potencial para inclusão de moléculas hóspedes com propriedades relevantes, podem adicionalmente ser empregadas como monômeros na obtenção de estruturas poliméricas devido à reatividade dos grupos hidroxila.

## **2.2. POLÍMEROS CONTENDO CICLODEXTRINAS**

Muitos autores têm proposto rotas para a formação de cadeias poliméricas contendo unidades de ciclodextrinas, por estas possuírem grupos hidroxila presentes na estrutura do cone, aptas a reagir com diferentes tipos de monômeros (RIBEIRO et al., 2005; LOFTSSON et al., 2004). Estes polímeros têm sido utilizados em aplicações específicas como processos de separação, catálise e liberação de fármacos. Dentro dos diferentes tipos de síntese dos polímeros podemos citar os principais:

1. A reticulação com reagentes bi- ou multifuncionais (Figura 3a), ou seja, as ciclodextrinas atuam como monômeros na sua forma nativa. Ex.: poliuretanos.
2. A polimerização de monômeros contendo unidades ligadas à ciclodextrina (Figura 3b). Neste caso, ciclodextrinas são modificadas com grupos funcionais apropriados à formação de determinados tipos de polímeros.
3. Unindo a estrutura do polímero com a ciclodextrina através de ligações covalentes ou intermoleculares (MOCANU *et al*, 2001; DAVIS *et al*, 2004) , ou seja neste último caso, um polímero já existente é modificado pela ligação de moléculas de ciclodextrina.

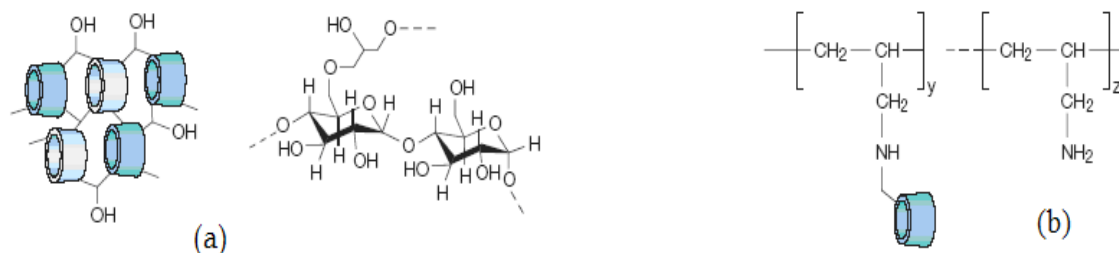


Figura 3: Cadeias poliméricas contendo ciclodextrinas: a) forma reticulada; b) na forma pendular (DAVIS *et al.*, 2004).

Dentre os polímeros contendo CDs, os polímeros reticulados apresentam grande potencial para a encapsulação de fármacos devido ao fato de apresentarem acessibilidade a moléculas convidadas até o interior das estruturas, sendo considerada uma das propostas para esse trabalho. Introduziremos, durante a síntese dos polímeros propriamente ditos, moléculas de CDs nas suas cadeias poliméricas como será detalhado no próximo tópico (Figura 4) (MOCANU *et al.*, 2001).

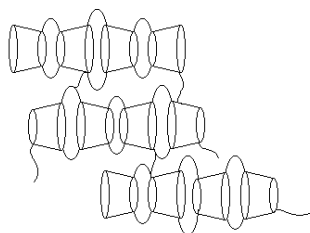


Figura 4: Representação de um polímero reticulado contendo ciclodextrinas.

As sínteses de polímeros contendo CDs vêm cada vez mais sendo aprimoradas para suprirem as necessidades do mercado, sendo estas farmacêuticas, da indústria de alimentos e ambientais. Em nossa proposta, além de utilizarmos um polímero reticulado, escolhemos um polímero pertencente à classe dos poliuretanos, os quais possuem muitas aplicações na área biomédica além de possuírem rotas de síntese bem estabelecidas, reprodutíveis, de baixo custo, simples, dentre outros requisitos.

### 2.2.1. Poliuretanos à base de ciclodextrinas

Os poliuretanos (PUs) são formados em reações que podem ocorrer entre diferentes classes de polióis e diisocianatos, formando ligações uretânicas (Figura 5). Devido à elevada variedade de polióis e diisocianatos disponíveis, é possível obter uma gama elevadíssima de diferentes poliuretanos, sendo possível planejar estruturas apropriadas a aplicações específicas. (SZYCHER, 1999; VILLAR, 1999).

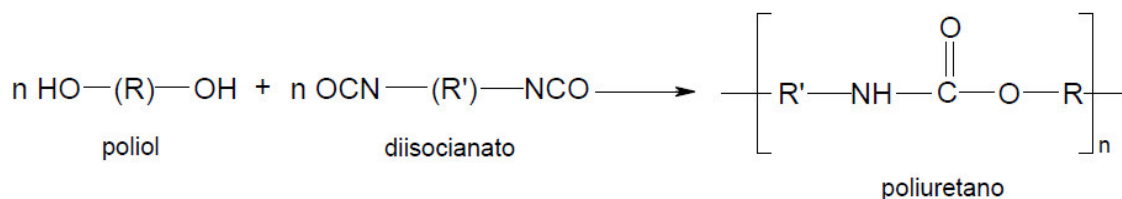


Figura 5: Reação de formação do poliuretano. (OLIVEIRA et al., 2009).

A reação de formação do PU pode ser feita em uma etapa ou em duas. No método de etapa única, todos os constituintes são misturados ao mesmo tempo e o isocianato reage com o poliol de acordo com a reação mostrada na Figura 5. (DODGE, 2003; SZYCHER, 1999). No método envolvendo duas etapas, na primeira a síntese envolve a formação de um pré-polímero que ocorre quando da reação entre diisocianato escolhido e um tipo de poliol escolhido. O chamado pré-polímero apresenta terminações do tipo isocianato, que podem reagir com um segundo tipo de poliol, formando, na segunda etapa, o polímero propriamente dito. (DODGE et al., 2003; SZYCHER et al., 1999).

A maior vantagem dos polímeros da classe PU é que eles podem ser sintetizados a partir de uma elevada variedade de monômeros, levando a materiais que apresentam diferentes propriedades mecânicas e físicas, fato que os torna úteis em algumas aplicações, tais como adesivos, revestimentos, materiais biomédicos, elastômeros e peles sintéticas. Além disso, os PUs têm um grande número de aplicações comerciais (ZIA *et al.*, 2008). Neste contexto, as aplicações específicas dos PUs dependem das propriedades físicas e químicas destes materiais. Tais propriedades dependem das reações ou das misturas com outros polímeros biodegradáveis ou não-biodegradáveis. Como exemplo cita-se aqui o trabalho de SHINDE et al (2015), que utilizaram fibras naturais de Juta para reforçar o material polimérico de uretano e avaliaram as propriedades mecânicas do compósito, concluindo que esse material de

fonte natural contribuiu para resistência a tração e ofereceu boa elasticidade ao compósito produzido.

Além da busca por novas estruturas a base de PUs, a literatura recente também descreve novas abordagens sintéticas, tais como as reações usando aquecimento por microondas. Neste contexto, BISWAS et al (2005) desenvolveram um novo método para sintetizar poliuretano com ciclodextrinas por aquecimento em microondas. Neste trabalho eles desenvolveram a produção de poliuretanos que derivados de  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -CD e três tipos comuns de diisocianatos, aromáticos e alifáticos. Em comparação com o aquecimento convencional, este novo método de síntese economiza energia, reduz significativamente o tempo de reação, e leva a um rendimento semelhante ou melhorado. Os produtos da reação foram caracterizados por espectroscopia de RMN em  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  no estado sólido. Com estequiometria adequada de CD de partida e diisocianato, foram obtidos poliuretanos à base de CD, alguns solúveis e outros insolúveis em água. Os PUs insolúveis foram utilizados na remoção do corante vermelho do Nilo e fenol a partir de água. As aplicações possíveis incluem a remoção de materiais indesejáveis a partir processos em fluxo, incluindo compostos tóxicos ao ambiente tais como corantes e moléculas aromáticas.

Apesar do limitado número de publicações, pode-se perceber o grande potencial dos polímeros de CDs reticulados com ligações uretânicas. Destaca-se o trabalho publicado recentemente, por nosso grupo, no qual VASCONCELOS et al (2016) realizaram a síntese de poliuretano com unidades de  $\beta$ -ciclodextrina e diisocianato de 1,6 hexametileno (HDI) em etapa única. O objetivo do trabalho foi sintetizar *nanoclusters* de ouro acoplando-os nas cavidades da  $\beta$ -CD para aplicações catalíticas. A conclusão foi que os polímeros com  $\beta$ -CD mantiveram a capacidade de acoplar os clusters de Au as cavidades da  $\beta$ -CD e comprovaram que o novo material polimérico apresentou atividade catalítica para a reação do 4-nitrofenol a 4-aminofenol utilizando os clusters como agentes catalisadores para romper a barreira cinética da reação.

Em outro trabalho, foi realizada a síntese de uma série de elastômeros de poliuretano, usando  $\beta$ -CD como agente de reticulação (XIE et al., 2016). Estes polímeros foram reticulados a partir de hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos, diisocianatos aromáticos, e de polioli, sendo avaliada a influência de diisocianato na separação microfase e propriedades de PUs de elastômeros (PUEs). Observaram-se

efeitos significativos na reticulação de  $\beta$ -CD com os vários tipos de polímeros utilizados pelos autores. A adição da  $\beta$ -CD, no HDI, levou à quebra dos segmentos rígidos da cadeia polimérica, influenciando diretamente as propriedades mecânicas do material. As reticulações causadas por  $\beta$ -CD aumentaram a força e a dureza nos PUEs.

Uma vantagem da síntese destes polímeros é a possibilidade de agregar as propriedades das CDs com as das estruturas poliméricas. A fim de ampliar o campo de aplicação, a incorporação de grupos fosfatos à estrutura de poliuretanos pode, em princípio, agregar ao polímero propriedades que permitem sua utilização como possíveis materiais para implantes ósseos.

### 2.3. FOSFATO DE CALCIO

A fase mineral do tecido ósseo em vertebrados é composta principalmente por cálcio e fósforo, fato que explica a razão de materiais baseados em fosfatos de cálcio serem os mais estudados como biomateriais para reposição e regeneração do tecido ósseo. Além disso, apresentam características como excelente biocompatibilidade, bioatividade, ausência de toxicidade, taxa de degradação variável e osteocondutividade (GUASTALDI *et al.*, 2010; VERRON *et al.*, 2010).

Dentre os materiais mais pesquisados no cenário de biomateriais para reposição óssea, a hidroxiapatita (HA) é o mais estudado, uma vez que apresenta similaridade química e estrutural com a fase mineral presente em ossos e dentes.

Neste contexto, busca-se a investigação de outros tipos de fosfatos de cálcio com possibilidade de ligação a cadeias poliméricas, dentre os quais é destacado o glicerofosfato de cálcio. Este tipo de fosfato já foi incorporado a cadeias poliuretânicas para formação de ionômeros para aplicações não biomédicas tais como em membranas e baterias, entretanto no referido caso foi utilizado o glicerofosfato de sódio (KAKATI *et al.*, 1993). A literatura demonstra que o glicerofosfato de cálcio foi utilizado para induzir a mineralização de células ósseas (CHUNG *et al.*, 1992). WANG *et al.* (2010) citam em seus trabalhos que o glicerofosfato apresenta-se como um suplemento osteogênico quando adicionado em culturas de células. Diversos estudos prévios apontaram nesta direção, como por exemplo, o trabalho de ROBINSON *et al.* (1934) que demonstrou que ésteres de fosfatos, como é o caso dos glicerofosfatos, aumentam a velocidade de mineralização e calcificação de cartilagem. Propôs-se que fosfatos orgânicos serviriam

como fonte de fosfato inorgânico (Pi) para o tecido em processo de mineralização, ou seja, átomos de fósforo de origem orgânica passariam a compor uma fase mineral. Mais recentemente, TENENBAUM et al (1982) publicaram dados que indicaram que a adição de glicerofosfato a culturas celulares promoveria a deposição de apatita em torno de osteoblastos e, em um estudo separado, ECAROT-CHARRIER et al (1983) confirmaram que o glicerofosfato causava a mineralização de culturas de osteoblastos. Baseado nestes estudos, o glicerofosfato tem sido usado rotineiramente como suplemento de mineralização. O mecanismo pelo qual o glicerofosfato induz a mineralização está relacionado intimamente à atividade da enzima fosfatase alcalina em culturas de células ósseas (FORTUNA, *et al.*, 1980). Esta enzima é encontrada em todos os tecidos em mineralização e pode liberar Pi a partir de ésteres de fosfato. A hidrólise de fosfatos orgânicos induzida pela fosfatase alcalina pode elevar a concentração local de Pi e propiciar, portanto, condições favoráveis a deposição mineral. Esta possibilidade também é suportada pela observação de que o tratamento de células com inibidores desta enzima causa um bloqueio da deposição mineral.

Por fim, um estudo sistemático a respeito do papel do glicerofosfato na mineralização foi publicado por CHUNG et al (1992), demonstrando que tanto o suplemento de fosfatos inorgânicos quanto de glicerofosfato aumentam a velocidade de deposição mineral. Os resultados mostraram também que claramente o glicerofosfato é hidrolisado pela enzima fosfatase alcalina, contida nas células ósseas, produzindo alta concentração de Pi. Por exemplo, fibroblastos têm uma baixa atividade desta enzima e normalmente não mineralizam, confirmando que esta enzima é requerida para a mineralização mediada pelo glicerofosfato.

Em vistas do que foi exposto, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de investigar a possibilidade de preparar um material que apresentasse características de um sistema carreador de fármaco e também vislumbresse uma aplicação futura como implante ósseo. Dessa maneira, escolheu-se trabalhar com os polímeros da classe dos poliuretanos, uma vez que, já existem materiais manufaturados com esse polímero em aplicações biomédicas. As CDs forneceram as características de um sistema carreador de fármaco e os glicerofosfato de cálcio para aprimorar a atividade biológica do material.

## 2.4. Técnicas de caracterização de complexos de inclusão

Dentre vários métodos para a preparação dos compostos de inclusão, podemos citar a mistura física e a maceração na forma de uma pasta (chamado em alguns casos de malaxagem), que é o método de estudo empregado no presente trabalho (ORGOVÁNYI *et al.*, 2005). Uma vez realizada a preparação dos complexos, é importante caracterizá-los para saber se ocorreu a complexação do fármaco, no presente caso a ciprofloxacina (Figura 6a), com a cavidade da  $\beta$ -CD (Figura 6b). Para isto, diversas técnicas têm sido utilizadas por pesquisadores, como espectroscopia infravermelho, análise térmica, em especial a calorimetria exploratória diferencial (DSC), a difração de raios X, dentre outras (MACOCINSCHI *et al.*, 2014; ORGOVÁNYI *et al.*, 2005). Poucos estudos foram feitos com o fármaco ciprofloxacina e poliuretano, merecendo destaque o trabalho de MACOCINSCHI *et al.* (2014), no qual se descreve a incorporação de ciprofloxacina em filmes de poliuretanos à base de poli(butileno adipato)diol e diisocianato de 4,40-difenilmetano, contendo também grupos ciclodextrina. Eles comprovaram a incorporação do fármaco na matriz polimérica através de técnicas de FTIR (com alterações espectrais), TG/DTG (houve diferença de degradação térmica entre a matriz polimérica com os materiais individuais) e DSC (estudaram a transição vítrea do polímero puro com a incorporação do fármaco em cavidades de BCD, chegando a conclusão que o fármaco incorporado não altera a transição vítrea da matriz polimérica). Além disso, como também realizaram o estudo *in vitro* do fármaco com células bacterianas, ficou comprovada sua eficácia no combate a infecções no local e com células fibroblastos humanas visualizando o crescimento destas na presença da incorporação da ciprofloxacina ao material polimérico.

A técnica de infravermelho permite verificar se ocorreu a complexação entre a molécula hóspede e a CD, uma vez que as bandas responsáveis pela parte da molécula incluída podem ser deslocadas ou suas intensidades têm alteradas (ZANG *et al.*, 2007). A técnica de difração de raios X de pó possibilita verificar se a nova entidade química obtida apresenta diferenças nas fases sólidas em relação ao fármaco sólido original, apesar de na maioria dos casos os complexos de inclusão sólidos serem não cristalinos (BLAGDEN *et al.*, 2007). Mudanças na estabilidade térmica do fármaco também podem ser um indicativo de inclusão, sendo esta uma evidência da formação de um novo composto supramolecular característico dos complexos de inclusão. Na análise de

DSC, o desaparecimento ou o encurtamento do pico referente ao ponto de fusão das moléculas inclusas é considerado uma evidência conclusiva da formação de um complexo. Dentre todas as técnicas de caracterização para complexos de inclusão sólidos, a de DSC é particularmente apontada como um das principais técnicas para confirmação da formação do complexo de inclusão (GIODARNO *et al.*, 2001)

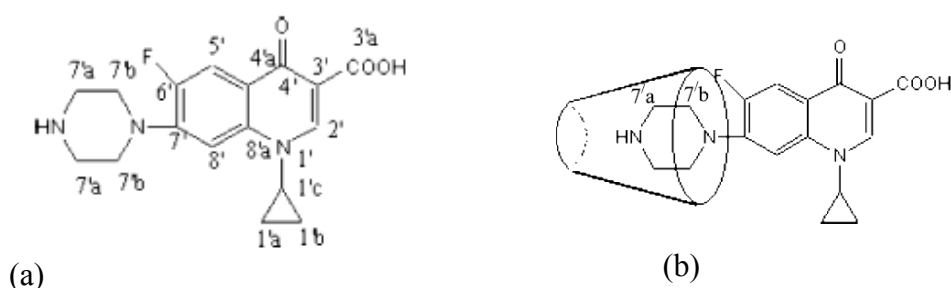


Figura 6: a) Estrutura molecular do fármaco ciprofloxacina; b) complexo de inclusão na cavidade da beta ciclodextrina (CHAO *et al.*, 2002)

A supressão do pico de fusão do fármaco nas curvas DSC pode ser compreendida considerando-se que os cristais moleculares dos fármacos originais são formados por moléculas discretas, que interagem entre si por interações intermoleculares. Para que ocorra a fusão, tais interações devem ser superadas, gerando um sinal na curva DSC em uma temperatura característica da natureza destas interações. Nos complexos de inclusão, cada molécula de fármaco se encontra em uma situação muito diferente desta, interagindo com a cavidade da ciclodextrina, de forma que em princípio não teríamos mais as moléculas do fármaco interagindo entre si tão significativamente. Portanto, o evento associado à fusão do cristal de fármaco "puro" não é mais esperado na curva DSC na mesma faixa de temperatura. O alargamento ou diminuição de intensidade podem indicar que há resíduos do fármaco cristalino, o que é aceitável considerando-se que nenhum dos métodos de formação de complexos de inclusão leva a uma complexação completa.

## 2.5 O FÁRMACO CIPROFLOXACINA

O fármaco ciprofloxacina (Cipro) (Figura 6a) possui a fórmula molecular  $C_{17}H_{18}FN_3O_3$ , com massa molecular  $331,33 \text{ g/mol}^{-1}$ . Apresenta pouca solubilidade em

água (67 mg/L a 293 K), sendo ligeiramente solúvel em ácido acético e metanol, muito pouco solúvel álcool etílico, e praticamente insolúvel em acetona, acetonitrila, acetato de etila, hexano e cloreto de metileno.

O Cipro pertence à classe das quinolonas e é um antibiótico de 2<sup>a</sup> geração desse grupo, sendo a mais ativa às bactérias gram-negativas e utilizada em tratamento de infecções urinárias, respiratórias, gastrointestinais, além de infecções na pele, osso e articulações (PATRICK, 1995). Agentes à base de fluoroquinolonas tem sido cada vez mais usados para combater infecções no tecido ósseo. O Cipro apresenta uma ampla atividade antimicrobiana e uma boa penetração em muitos tecidos incluindo o tecido ósseo. A concentração inibitória mínima do Cipro é baixa para *Staphylococcus aureus* o qual é muito comum como patógeno em osteomielite. Também é eficiente contra muitos microorganismos gram negativos, como as Enterobacteriaceas, que são muitas vezes responsáveis por infecções ósseas, as quais requerem tratamento prolongado com antibióticos (DÉSÉVAUXA et al., 2002).

Desta forma, vislumbrando resolver questões relativas à baixa solubilidade em água, bem como minimizar os efeitos colaterais no organismo e aumentar sua potencialidade na aplicação direta em implantes, tal fármaco foi selecionado para estudo na presente Tese. Vale destacar que o fármaco foi utilizado aqui como sistema-modelo para se verificar a possibilidade de inclusão de moléculas de interesse farmacológico nos polímeros obtidos, bem como seu comportamento durante estudos de liberação *in vitro*. Não era do escopo do presente Trabalho avaliar propriedades farmacocinéticas tampouco realizar estudos *in vivo*, uma vez que o foco principal do estudo foi o planejamento, síntese e caracterização dos polímeros.

---

## **3. Objetivos**

---

### **3.1. OBJETIVO GERAL:**

O objetivo principal desse trabalho foi sintetizar materiais poliméricos contendo  $\beta$ -ciclodextrina/glicerofosfato de cálcio ou ácido glicero-fósforico unidos por ligações uretânicas, bem como estudar a formação de complexos de inclusão e liberação *in-vitro* do antibiótico ciprofloxacina.

### **3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Sintetizar novos polímeros poliuretânicos a base de  $\beta$ -ciclodextrinas/glicerofosfato de cálcio;
- Caracterizar os polímeros sintetizados utilizando as técnicas: Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX), calorimetria exploratória diferencial (CED), análise termogravimétrica (ATG) e ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN  $^{13}\text{C}$ );
- Avaliar a capacidade de inclusão nas cavidades  $\beta$ -ciclodextrina ligadas aos polímeros produzidos, usando como sonda o corante fenolftaleína;
- Estudar a incorporação do fármaco ciprofloxacina nas matrizes poliméricas em diferentes proporções do fármaco;
- Realizar um estudo de simulação teórica da estrutura e estabilidade de complexos de inclusão da ciprofloxacina com diferentes ciclodextrinas ( $\alpha$ -,  $\beta$ - e  $\gamma$ -CD).
- Estuda o perfil de liberação *in vitro* do fármaco;

---

## **4. Materiais e Métodos**

---

#### **4.1. MATERIAIS**

Os materiais utilizados foram: Álcool metílico (Carbo Erba), acetona (Vetec),  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) (Sigma), diisocianato de 1,6 hexametileno (HDI) (Sigma), dimetilformamida (DMF) Synth, octanoato de estanho (catalisador) (Sigma) 95%, glicerofosfato de cálcio (Sigma), a resina Amberlite IR-120 (H) (Sigma), ciprofloxacina (Sigma 98%), fosfato de potássio monobásico P.A. Anidro, fosfato de potássio dibásico P.A. anidro, membrana de diálise com massa molecular de corte em 2000 DA (Sigma).

#### **4.2. MÉTODOS**

##### **4.2.1. Teste de solubilidade do glicerofosfato de cálcio**

Considerando-se que, para as reações de formação dos polímeros aplicando o método de polimerização em solução, é necessário dissolver todos os reagentes de partida em um mesmo solvente a fim de obter uma melhor conversão, estudou-se a solubilidade do glicerofosfato de cálcio (Ca-Glic). Foram realizados testes qualitativos de solubilidade do Ca-Glic sendo, para tanto, adicionadas massas pré-determinadas do reagente sólido em diferentes tubos de ensaio, seguidas da adição lenta de cada solvente (água, DMF, DMSO, éter etílico, álcool etílico, álcool metílico, tolueno). Os tubos foram submetidos à agitação, aquecimento brando em banho de água e resfriamento. Verificou-se que o sólido se dissolve em água mais significativamente com a diminuição da temperatura, sendo praticamente insolúvel nos solventes orgânicos avaliados. Contudo, água não é um solvente conveniente, pois as reações de preparação de poliuretanos não podem ser feitas em solventes contendo grupo hidroxila. Portanto, a fim de propiciar sua solubilização em solventes orgânicos, a solução aquosa de Ca-Glic foi submetida à eluição através de uma resina de troca iônica ácida, como descrito no próximo item. Destacamos aqui que foram feitos testes de polimerização tanto usando Ca-Glic quanto H-Glic.

#### 4.2.2. Síntese dos poliuretanos ternários ( Ca- Glic e H-Glic)

A síntese do polímero foi realizada em duas etapas, a primeira delas envolvendo a formação de um pré-polímero, que é um intermediário reativo com grupos NCO livres produzido pela reação de um diisocianato e polióis. No presente trabalho, usou-se especificamente o diisocianato de hexametileno e, como polióis, glicerofosfato de cálcio (Ca-Glic) e, alternativamente, o ácido glicerofosfórico (H-Glic). Adicionalmente, foram estudados dois métodos distintos de aquecimento: refluxo (convencional) e microondas (modelo CEM MARS) que é relativamente nova na área de polímeros e pode propiciar vantagens em termos de homogeneidade de aquecimento, além do fato dos reatores utilizados imporem pressão ao meio reacional. Isto pode modificar parâmetros tais como a solubilidade dos reagentes, favorecendo a obtenção de novas composições que não poderiam ser obtidas convencionalmente. As diversas condições de reação podem ser encontradas na Tabela 1.

**a) Formação do pré-polímero à base de Ca-Glic** - No caso de uso de Ca-Glic, dissolveu-se diretamente em DMF a quantidade de sólido mostrada na Tabela 1. De modo geral (quantidades específicas referentes aos vários experimentos podem ser vistas na Tabela 1), para a preparação do pré-polímero, a solução resultante foi levada ao reator de microondas (ou balão de refluxo). Adicionou-se a quantidade apropriada de HDI previamente dissolvida em 10 mL de DMF e o catalisador. O sistema foi mantido sob agitação a temperaturas e por tempos variados (Tabela 1) de aquecimento (microondas ou refluxo).

**b) Formação do pré-polímero à base de H-Glic** - No caso de uso do H-Glic, este foi obtido previamente, a partir do Ca-Glic, através do uso de resina de troca iônica ácida Amberlite. Pesou-se 1 g de Ca-Glic e adicionou-se a 100 mL de água destilada, com banho de gelo, sendo mantidos sob agitação até sua solubilização. Em seguida a solução resultante foi submetida à resina de troca iônica ácida acondicionada em uma coluna de vidro, sendo a fase líquida resultante recolhida, congelada e levada a um liofilizador da marca Terroni. O produto resultante se apresenta como um líquido viscoso (xarope) e, para a preparação do pré-polímero, este líquido foi levado ao reator de microondas onde foi dissolvido em 20 mL de DMF. Após isto, o procedimento foi análogo ao descrito para o caso de Ca-Glic.

Na segunda etapa, uma solução de  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) em DMF de acordo com a Tabela 1, foi adicionada ao material resultante da primeira etapa. A mistura foi levada novamente ao microondas (ou balão de refluxo) sob agitação na temperatura e pelo tempo indicados. Após esse período, o polímero foi precipitado em etanol, filtrado e lavado com acetona e seco a vácuo em 80°C por 24 h. O material obtido é o polímero desejado (na forma de pó branco).

**Tabela 1: Condições e detalhes experimentais das diferentes reações de polimerização realizadas**

| Refluxo    |                    |                 |                |           |            |          |           |            |          |
|------------|--------------------|-----------------|----------------|-----------|------------|----------|-----------|------------|----------|
| Reação     | Reagentes          |                 |                | 1ª etapa  |            |          | 2ª etapa  |            |          |
|            | GLIC/DMF (g/mL)    | HDI/DMF (mL/mL) | BCD/DMF (g/mL) | Tempo (h) | Temp. (°C) | Cat. (g) | Tempo (h) | Temp. (°C) | Cat. (g) |
| 1*         | 0.2/10             | 0.85/10         | 0.7/10         | 3.0       | 70         | 0.01876  | 3         | 70         | 0.01876  |
| 2*         | 0.2/10             | 1.70/10         | 0.7/10         | 3.0       | 70         | 0.01876  | 3         | 70         | 0.01876  |
| 3*         | 0.2/10 (ultrasson) | 0.85/10         | 0.7/10         | 3.0       | 70         | 0.01876  | 3         | 70         | 0.01876  |
| 4*         | 0.5/10             | 0.85/10         | ---            | 3.0       | 70         | 0.03753  | 3         | 70         | 0.03753  |
| Microondas |                    |                 |                |           |            |          |           |            |          |
| Reação     | Reagentes          |                 |                | 1ª etapa  |            |          | 2ª etapa  |            |          |
|            | GLIC/DMF (g/mL)    | HDI/DMF (mL/mL) | BCD/DMF (g/mL) | Tempo (h) | Temp. (°C) | Cat. (g) | Tempo (h) | Temp. (°C) | Cat. (g) |
| 5*         | 0.2/10             | 0.61/10         | ---            | 0.5       | 70         | ---      | ---       | ---        | ---      |
| 6*         | 0.2/10             | 0.61/10         | ---            | 1.0       | 70         | ---      | ---       | ---        | ---      |
| 7*         | 0.2/10             | 0.61/10         | ---            | 1.0       | 150        | ---      | ---       | ---        | ---      |
| 8*         | 0.2/10             | 0.61/10         | ---            | 1.0       | 150        | 0.03753  | ---       | ---        | ---      |
| 9**        | 1.0/10             | 0.61/10         | ---            | 1.0       | 70         | 0.01876  | ---       | ---        | ---      |
| 10**       | 1.0/20             | 1.22/-          | ---            | 1.0       | 70         | 0.03753  | ---       | ---        | ---      |
| 11**       | 1.0/20             | 0.985/-         | 1.0/20         | 0.5       | 70         | 0.03753  | 0.5       | 70         | 0.03753  |

\*Ca-Glic

\*\*H-Glic

% de rendimento: reações 1 e 3 (30%); reação de 2 (74%); reação de 11 (40%)

Os rendimentos de algumas amostras também foram calculados com as quantidades demonstradas abaixo da tabela. Note-se que os rendimentos não foram calculadas para essas reações que foram interrompidas na fase de pré-polímero (para o qual a segunda etapa - adição de ciclodextrina não foi realizada). Os valores foram incluídos na tabela abaixo, como indicado embaixo da tabela 1 em % de rendimento: reações de 1 e 3 (30%); reação de 2 (74%); reação de 11 (40%). Na verdade, os rendimentos não foram elevados em todos os casos, o que é consistente com dificuldades na incorporação de glicerofosfato. Por exemplo, em diversos casos, os espectros de FTIR simplesmente não mostram bandas de fosfato ou mostrou bandas fracas, como será esclarecido na Seção de Resultados e Discussão.

#### **4.2.3. Avaliação da possibilidade de encapsulação das amostras do polímero com a fenoltaleína (FF)**

Os experimentos nesta etapa foram baseados nos trabalhos de Makela et al (1988). Preparou-se 100 mL de uma solução estoque de FF (concentração  $3,75 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , usando como meio uma mistura de solventes com proporção de 94% de etanol e 6% de água) e também uma solução tampão carbonato de sódio  $1 \text{ mol.L}^{-1}$ , sendo ambas armazenadas em recipientes tampados e sob ausência de luz. Para preparar a solução de trabalho de FF, diluiu-se 1 mL da solução estoque FF com 9 mL de água destilada. Em seguida foi adicionada uma solução de carbonato de sódio atingindo o pH 10. Essa solução foi acondicionada em seis frascos junto com as amostras do polímero em massas crescentes (10 a 60 mg). Em seguida, os frascos foram cobertos com papel alumínio e submetidos a banho ultrassônico em  $25^{\circ}\text{C}$ , por 4 horas, para garantir que ocorresse a encapsulação (MANTEGMA et al.,2012). Após este período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm. Em seguida foram retiradas alíquotas do sobrenadante, as quais foram analisadas em um espectrofotômetro UV-VIS (marca Carey, modelo 100 Scan), medindo-se a absorbância no comprimento de onda de 552 nm (máximo de absorção da FF). Este teste foi feito em triplicata.

#### **4.2.4 Estudo da interação do ácido glicerosfórico com o fármaco**

Foram preparadas as amostras com 1:1 em proporção molar com 0,012684 g para o fármaco (em forma de pó,  $n = 4 \times 10^{-5}$  moles) e 0,007316 g do ácido glicerofosfórico (em forma líquido viscoso,  $n = 4 \times 10^{-5}$  moles), para caracterizações por FTIR e DSC.

#### **4.2.5 Estudos de incorporação do fármaco nos polímeros obtidos avaliação da formação de complexos de inclusão**

A formação de complexos de inclusão da ciprofloxacina nos polímeros ternários foi realizada através de moagem de componentes sólidos, na presença de quantidades mínimas de álcool metílico em um almofariz de ágata durante 2 horas (amostras identificadas como CI – complexos de inclusão). Diferentes proporções em massa de polímero/fármaco foram avaliadas (1: 2, 1: 1, 1: 0,5, 1: 0,1), sendo também comparadas com as misturas físicas simples, na qual os sólidos foram misturados suavemente sem moagem (amostras identificadas como MF – misturas físicas).

#### **4.2.6 Determinação da solubilidade da ciprofloxacina (fármaco)**

Previamente aos estudos de liberação *in vitro*, foram realizados testes quantitativos de solubilidade do fármaco a fim de propiciar meios apropriados para a liberação. Para isto, foram adicionadas quantidades sólidas de fármaco em tubos de ensaio seguido da adição lenta de cada solvente (água, DMF, tampão fosfato pH 7,4 e ácido acético diluído na concentração de  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ). Os tubos de ensaio foram submetidos á agitação e aquecimento a  $37^\circ \text{C}$  e observou-se que o sólido foi praticamente insolúvel para todos os solventes com exceção do ácido acético, resultado já esperado devido a sua composição química. O ácido acético não é um solvente viável para nossos estudos uma vez que estamos simulando ensaios similares ao do corpo e ao osso. Uma alternativa descrita na literatura foi o uso de soluções de ciclodextrinas nativas em tampão fosfato pH 7,4 como meio de liberação (CHAO *et al.*, 2002), garantindo “condição *sink*”, em que garante-se que toda a massa de fármaco usada no estudo possa ser dissolvida no meio líquido.

#### **4.2.7. Determinação da curva de calibração analítica por espectroscopia de absorção no UV/visível (UV-VIS)**

Para a determinação analítica do fármaco durante os estudos de liberação, foi escolhida neste trabalho a espectroscopia UV/visível. A metodologia empregada na construção da curva de calibração foi baseada na preparação de diferentes concentrações do fármaco em solução tampão fosfato a pH 7,4, na presença de uma concentração fixa de  $\beta$ -CD ( $1 \text{ mmol L}^{-1}$ ), uma vez que este foi o meio escolhido para a liberação. As concentrações do fármaco variaram de  $6 \cdot 10^{-5}$  a  $3 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , na solução tampão descrito acima na presença de  $\beta$ -CD. As leituras de absorbância foram obtidas a um comprimento de onda de 270 nm utilizando o espectrofotômetro UV-VIS (marca Carey, modelo 100 Scan), assim como o branco (o meio usado), em duplicata. A curva analítica linear obtida representa a média das 2 curvas distintas. Foi usada a lei de Lambert-Beer, onde “a absorbância (A) de uma solução é proporcional à concentração da substância na solução e à distância percorrida pelo feixe luminoso que atravessa a solução (caminho óptico)”, como mostra a equação abaixo:

$$A = \epsilon \cdot l \cdot c$$

**Onde**  $\epsilon$  = coeficiente extinção ou absorvidade molar, que é constante para cada substância, (**l**)= caminho ótico, 01 cm (espessura da cubeta) e **c** = à concentração do analito em questão. A absorbância deve ser uma função linear da concentração na faixa em que a curva obtida pode ser utilizada.

#### **4.2.8. Determinação do perfil de liberação *In Vitro***

Para possibilitar comparações de diferentes sistemas, este estudo foi realizado com e sem membranas de diálise (MWCO 2000 Da, Sigma), tanto para complexos de inclusão quanto para o fármaco livre. Em todos os casos, as massas de complexos de inclusão e de fármaco livre e volumes totais utilizados foram escolhidos cuidadosamente, a fim de assegurar condições “sink”, como pontuado anteriormente. No caso dos complexos de inclusão, apesar de terem sido estudadas diferentes proporções em massa de polímero:fármaco, as amostras com proporção 1:0,01

(polímero: fármaco) em proporção de massa foram escolhidos para este estudo por terem a menor fração do fármaco não complexado (como caracterizado por difratometria de raios X). Uma massa de 0,101 g do complexo de inclusão sólido foi acondicionada em sacos de diálise os quais foram suspensos em 500 mL de tampão de fosfato/ $\beta$ -ciclodextrina a pH 7,4 e 25°C (em triplicata, em balões selados), sob agitação constante (taxa lenta, 300 rpm). Foram recolhidas amostras em intervalos de tempo regulares, a partir de 10 minutos iniciais de contato e a absorbância no UV-VISÍVEL lida em 270 nm. Experimentos análogos foram realizadas com o fármaco livre (a mesma massa presente no complexo de inclusão).

#### **4.2.9 Modelagem molecular**

Os complexos foram simulados utilizando-se cálculos de mecânica molecular com campo de força MM3 (ALLINGER, 1989) e as estruturas de mínimo de energia foram consideradas como estruturas de partida para os cálculos semi-empíricos (STEWART, 2007; ROCHA et al, 2006). Nesse caso foram realizados cálculos semi-empíricos com o método PM3 implementado no programa MOPAC2009 no Departamento de Química no laboratório Computacional da UFS, a fim de avaliar as estabilidades relativas dos complexos de inclusão de ciprofloxacina com as três ciclodextrinas mais comuns:  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -ciclodextrina. Duas orientações da molécula ciprofloxacina foram consideradas nos complexos de inclusão: uma com o átomo de F incluído no interior da cavidade (F-in) e a outra com átomo de F de fora da cavidade (F-out).

### **4.3. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS**

#### **4.3.1. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)**

Os polímeros foram caracterizados por FTIR utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR System –Spectrum BX (Departamento de Química – UFS), na faixa espectral de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$ . A técnica empregada para a análise foi a preparação de pastilhas por mistura das amostras com KBr.

#### **4.3.2 Difratometria de raios X (XRD)**

As amostras foram obtidas por difratometria de raios X pelo método do pó, a partir do equipamento Rigaku modelo Mini Flex II. As medidas foram realizadas usando radiação  $\text{CuK}\alpha$  com 30KV e 15 mA na faixa de  $2\theta$  de 10 a 60° com velocidade de varredura de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$  (Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais -UFS).

#### **4.3.3 Análise termogravimétrica (ATG)**

Equipamento SDT 2960, que fornece medidas simultâneas de DTA-TGA em atmosfera  $\text{N}_2$ , em porta-amostras de alumínio sob aquecimento da temperatura ambiente a 700°C a  $10^\circ\text{C/min}$  (Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais- UFS).

#### **4.3.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)**

As curvas de DSC foram obtidas utilizando o equipamento de DSC, modelo 200F3 Maia da NETZSCH sob atmosfera dinâmica de  $\text{N}_2$ , vazão de  $50\text{mL.min}^{-1}$ . As amostras foram pesadas em cadinho de alumina e aquecidas de 30° a 290°C (Departamento de Ciência e Engenharia de Materiais- UFS).

#### **4.3.5 Espectroscopia de absorção no UV-VISÍVEL (UV-VIS)**

As medidas espectroscópicas foram realizadas no equipamento UV-VIS Carey, modelo 100 Scan (Departamento de Química-UFS).

#### **4.3.6. Ressonância magnética (RMN $^1\text{H}$ )**

Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foram medidos no estado sólido pela técnica de HPDEC (duração de pulso de 0,3 s) e rotação no ângulo mágico (MAS) com uma velocidade de rotação de 10 kHz, usando-se um instrumento Bruker AC-300 P NMR Spectrometer, com uma sonda Bruker de 5 mm.

---

## **5. Resultados e Discussões**

---

### **5.1. SÍNTESE PU TERNÁRIO**

A estratégia para sintetizar PU ternários envolveu a preparação de pré-polímeros pela reação de HDI (diisocianato de 1,6 hexametileno) e H-Glic (ácido glicerofosfórico) ou Ca-Glic (glicerofosfato de cálcio), seguido por reação com  $\beta$ -CD ( $\beta$ -ciclodextrina). Particularmente, na primeira etapa ocorre a formação de um pré-polímero através da reação de um di ou poliisocianato, com excesso molar contendo NCO livre para poder reagir, com um di ou poliálcool como dito anteriormente (Figura 5), sendo compostos de grupos -OH do H-Glic ou Ca-Glic no pré-polímero e posteriormente com grupos OH da  $\beta$ -CD. Ou seja, teremos diferentes espécies com grupos -OH ligados ao mesmo polímero através de ligações uretânicas.

Diferentes condições de síntese foram avaliadas de acordo com a Tabela 1, a fim de permitir a incorporação de todos os componentes no polímero. Testou-se: o efeito do método de aquecimento (amostras 1-4: refluxo; amostras 5-11: microondas), as quantidades relativas de precursores e de quantidade de catalisador. Na síntese por microondas, também foi testado o efeito do tempo e temperatura. Devido à possibilidade de taxas de reação melhoradas, testou-se o efeito da presença e ausência de catalisador para o aquecimento por microondas. Finalmente, foi usada na síntese por microondas uma nova condição para evitar a formação de uréia no polímero, como será discutido adiante. Os materiais obtidos através das diferentes condições de síntese foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho (FTIR). Ao analisarmos os espectros de FTIR (Figura 7), observam-se bandas que podem ser atribuídas aos componentes desejados (glicerofosfato e  $\beta$ -ciclodextrina), bem como as bandas de polímero indicativas da sua formação.

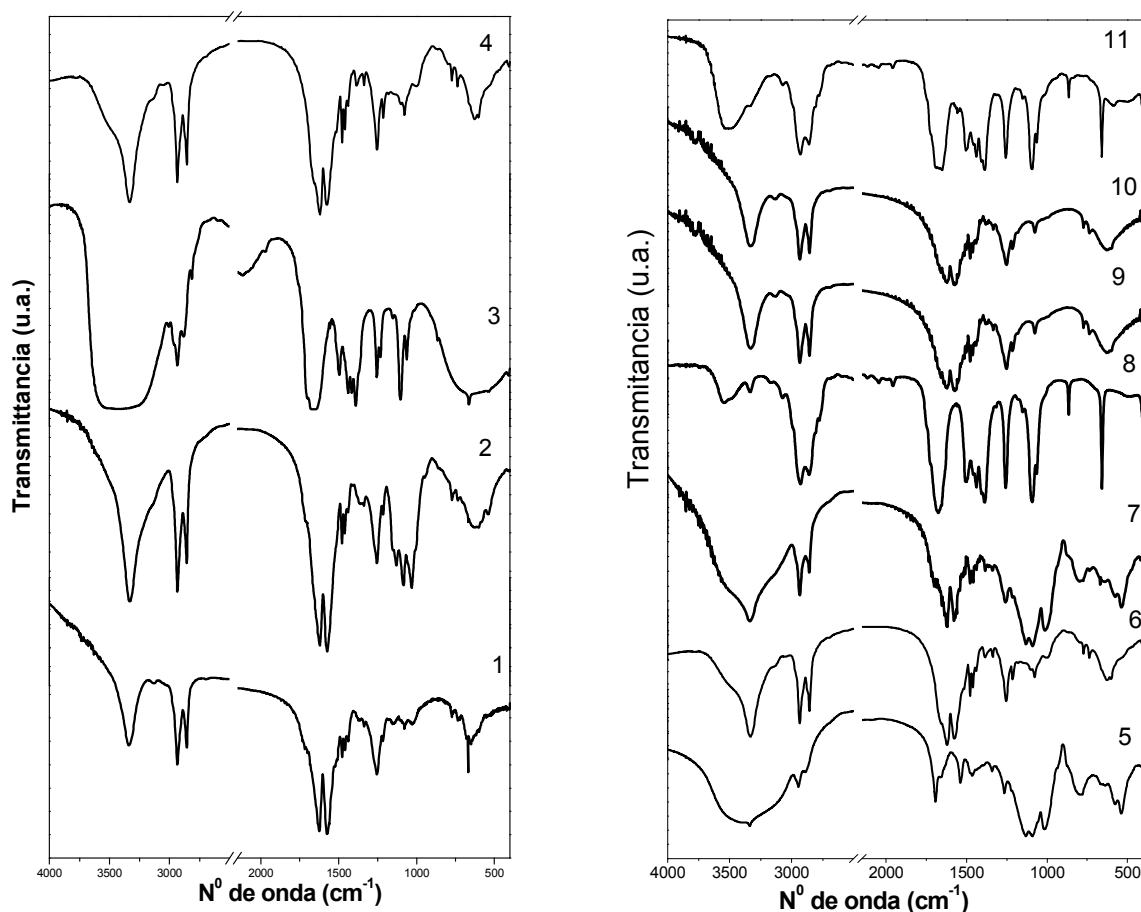


Figura 7: Espectros de FTIR para as diferentes condições de reação de acordo com a Tabela 1.

Na Tabela 2 mostram-se as principais bandas observadas nos espectros dos pré-polímeros e das amostras dos polímeros (Figura 7), enquanto que na Tabela 3 mostram-se atribuições de bandas para as matérias-primas utilizadas (Figura 8) .

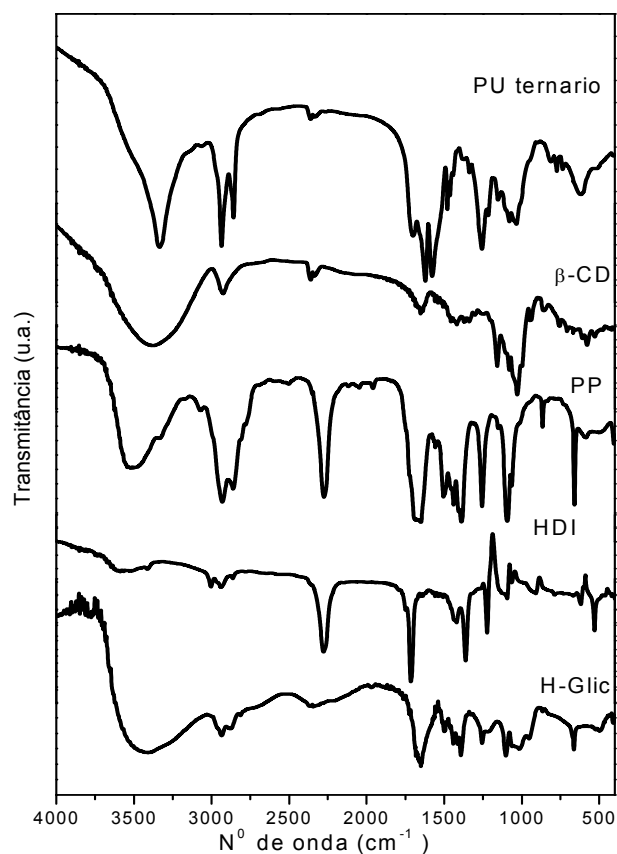


Figure 8: Espectros de FTIR para os precursores, pré-polímero (PP) e poliuretano ternário (PU ternário –polímero 11 da tabela 1)

**Tabela 2- Números de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ) e possíveis atribuições de bandas do FTIR observadas nos espectros (Figura 7)**

| Número de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )       | Grupamento característico de atribuições $\nu$ =estiramento; $\delta$ = deformação | Amostra                 |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 3574-3230 $\text{cm}^{-1}$                | $\nu(\text{O-H})$                                                                  | 3, 5                    |
| 3340 $\text{cm}^{-1}$                     | $\nu(\text{N-H})$                                                                  | 1, 2, 4, 5, 6, 7, 9, 10 |
| 2935, 2880-2850 $\text{cm}^{-1}$          | $\nu(\text{C-H})$                                                                  | todos                   |
| Ombros: 1730, 1720, 1696 $\text{cm}^{-1}$ | $\nu(\text{C=O})$ uretano                                                          | 1, 2, 4, 11             |
| 1680-1640 $\text{cm}^{-1}$                | $\nu(\text{C=O})$ ligação de H                                                     | 3, 8, 11                |
| 1625 $\text{cm}^{-1}$                     | $\nu(\text{C=O})$ ureia                                                            | 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10    |
| 1570, 1550 $\text{cm}^{-1}$               | amina II $\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=O})$                                    | 1, 3, 4, 6, 7, 9, 10    |

|                                   |                                                  |                             |
|-----------------------------------|--------------------------------------------------|-----------------------------|
| 1530, 1507, 1495 cm <sup>-1</sup> |                                                  |                             |
| 1460, 1478 cm <sup>-1</sup>       | ν(C=O)+ δ(N-C-N)                                 | 1, 2, 4, 6, 7, 9, 10        |
| 1438,1415 cm <sup>-1</sup>        |                                                  | 1, 2, 3, 4, 8, 11           |
| 1390, 1385 cm <sup>-1</sup>       | δ(CH <sub>2</sub> ), δ(C-C-H)                    | 2, 3, 4, 6, 7, 8, 11        |
| 1265, 1260 cm <sup>-1</sup>       | amina III δ(N-H)+ ν(N-H)                         | 5, 7                        |
| 1254 cm <sup>-1</sup>             | ν(P=O)                                           | 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11 |
| 1160, 1130 cm <sup>-1</sup>       | ν(P-O-C)                                         | 1,2,5,7                     |
| 1100, 1085 cm <sup>-1</sup>       |                                                  | 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11     |
| 1030 cm <sup>-1</sup>             | acoplamento ν(C-C), δ(O-C-H), δ(C-C-H), δ(C-C-O) | 2                           |
| 995 cm <sup>-1</sup>              | ν(P-O-C-C)                                       | 4,6,8,11                    |

**Tabela 3: Números de onda (cm<sup>-1</sup>) e possíveis atribuições de bandas observadas nos espectros FTIR para os componentes isolados (Figura 8)**

| H-Glic                             |                                                                         | β-CD                               |                                                                      | HDI                                |                                                                         |
|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico de atribuições<br>ν=estiramento;<br>δ = deformação | Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico de atribuições<br>ν=estiramento; δ = deformação | Número de onda (cm <sup>-1</sup> ) | Grupo característico de atribuições<br>ν=estiramento;<br>δ = deformação |
| 3386 cm <sup>-1</sup>              | ν(O-H)                                                                  | 3374 cm <sup>-1</sup>              | ν(O-H)                                                               | 3006 cm <sup>-1</sup>              | ν(C-H)                                                                  |
| 2935,2870 cm <sup>-1</sup>         | ν(C-H)                                                                  | 2920 cm <sup>-1</sup>              | ν(C-H)                                                               | 2937 cm <sup>-1</sup>              | ν(C-H)                                                                  |
| 1652 cm <sup>-1</sup>              | >P=O(O-H)                                                               | 1648 cm <sup>-1</sup>              | δ(H-O-H)                                                             | 2273 cm <sup>-1</sup>              | ν(N-C-O)                                                                |
| 1499, 1440, 1391 cm <sup>-1</sup>  | δ(C-H) de CH <sub>2</sub>                                               | 1457 cm <sup>-1</sup>              | δ(CH <sub>2</sub> ), δ(O-C-H)                                        | 1714 cm <sup>-1</sup>              | ν(C=O)                                                                  |
| 1253 cm <sup>-1</sup>              | ν(P=O)                                                                  | 1420 cm <sup>-1</sup>              | δ(C-C-H), δ(O-C-H)                                                   | 1421 cm <sup>-1</sup>              | δ(CH <sub>2</sub> )                                                     |
| 1104 cm <sup>-1</sup>              | ν(P-O-C)                                                                | 1367 cm <sup>-1</sup>              | δ(C-C-H),δ(O-C-H),δ(C-O-H)                                           | 1363 cm <sup>-1</sup>              | δ(CH <sub>2</sub> )                                                     |
| 1013 cm <sup>-1</sup>              | >P=O(OH)                                                                | 1337 cm <sup>-1</sup>              | δ(C-C-H),δ(O-C-H),δ(H-C-H)                                           | 1223,1093 cm <sup>-1</sup>         | Vibração do esqueleto                                                   |
| 956 cm <sup>-1</sup>               | ν(P-O-C-C)                                                              | 1159 cm <sup>-1</sup>              | acoplamento ν(C-O), ν(C-C),ν(C-C-O)                                  |                                    |                                                                         |
|                                    |                                                                         | 1081 cm <sup>-1</sup>              | acoplamento ν(C-O), ν(C-C),ν(C-C-O)                                  |                                    |                                                                         |
|                                    |                                                                         | 1026 cm <sup>-1</sup>              | acoplamento ν(C-C), δ(O-C-H),                                        |                                    |                                                                         |

Nos espectros de FTIR do glicerofosfato tanto na forma de sal (Ca-GLIC) e na forma ácida (H-GLIC) observam-se principalmente as bandas atribuídas aos modos (alongamentos e flexões) de OH, CH, CH<sub>2</sub>, grupos de P = O e P-O-C, tal como resumido na Tabela 2 (KAKATI, et al., 1993; SIVRIEV, et al., 1990). O espectro de HDI mostra bandas relativas a grupos CH<sub>2</sub> e grupos NCO, além de uma banda a 1714 cm<sup>-1</sup> indicando que este pode se apresentar na forma pré-polimerizada (BELLO et al., 2006). Esta ocorrência é relativamente comum e tem sido previamente relatado que espécies isocianatos são muito reativas (DONG et al., 2001), como ilustrado na Figura 7. Durante a síntese de um poliuretano, várias reações podem ocorrer levando a ramificação, ligação cruzada, ou mudanças na estequiometria dos reagentes. Como resultado, durante as reações dos isocianatos, pode ocorrer a formação de uretano, ureia, alofanato e biureto. Além disso, a presença de água pode levar os grupos de isocianato a formar ácidos carbônicos, que se decompõem em aminas com a liberação de CO<sub>2</sub> gasoso (Figura 9). Estas aminas reagem com isocianatos para formar ureias, alterando assim a sua estrutura e levando um polímero de baixo peso molecular (CAUICH-RODRIGUES et al., 2013). No presente caso, é bastante provável que a presença da banda de carbonila indique a ocorrência de reação com moléculas de água presentes durante o armazenamento do HDI ou nos solventes utilizados. Finalmente, no espectro de FTIR da β-CD a maioria dos modos não pode ser atribuída a uma única vibração molecular, mas a contribuições de modos acoplados (EGYED, 1990).

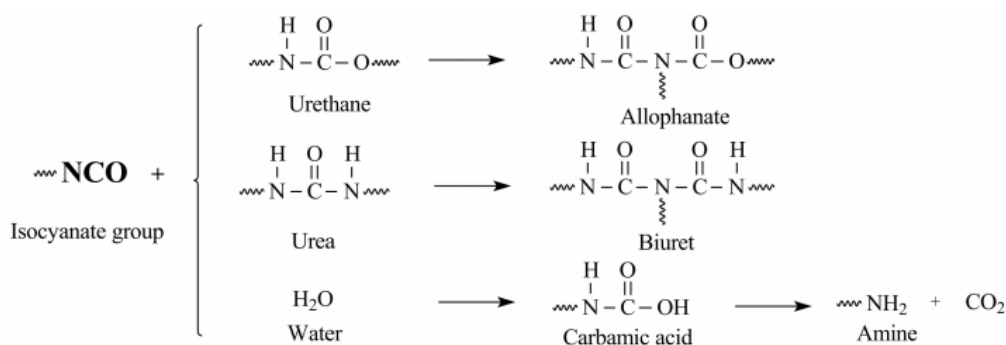


Figura 9: Representação esquemática de possíveis estruturas resultantes da reação de grupos isocianato com diferentes grupos: uretânicos, ureia e moléculas de água.

De acordo com as sínteses realizadas da tabela 1, observa-se que a amostra 1 exibiu um espectro de FTIR típico de polímeros de poliuretano-ureia, como ilustrado na Figura 9 adaptada de CAUICH-RODRIGUES et al (2013). Pode-se observar que, como o isocianato tem a capacidade de reagir tanto com dióis/polióis quanto com diaminas, se estas últimas estiverem presentes em consequência da reação do próprio isocianato com água, podem-se formar tanto ligações uretânicas  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$  quanto ligações do tipo ureia  $-\text{NH}(\text{C}=\text{O})\text{NH}-$ . Isto não chega a ser prejudicial, pois pode, inclusive, modular propriedades mecânicas como mostrado na Figura 10.

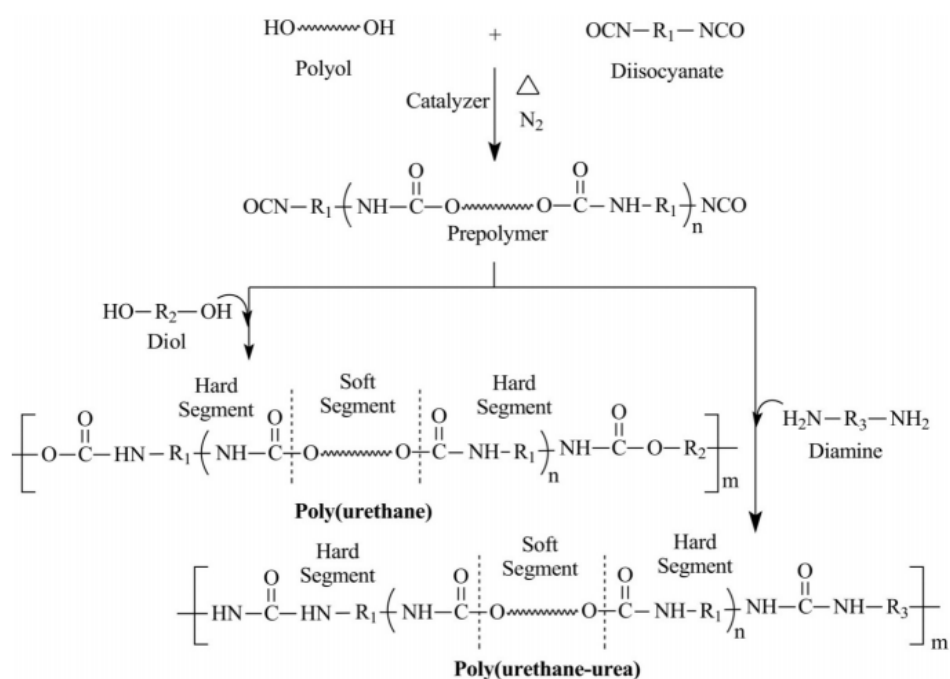


Figura 10: Representação esquemática da formação de cadeias do tipo poliuretano-uréia pela reação de um pré-polímero uretânico com dióis e diaminas.

De acordo com as sínteses sumarizadas na Tabela 1, observa-se que a amostra 1 exibiu um espectro de FTIR típico de polímeros de poliuretano-ureia, com um perfil muito semelhante ao descrito por ZHANG para amostras preparadas a partir de diisocianatos e extensores de cadeia diamina (ZHANG, et al., 2007). O que torna típicos tais espectros de FTIR é a presença de um par de bandas de intensidade similar em  $1625 \text{ cm}^{-1}$  e  $1580 \text{ cm}^{-1}$ , atribuídas respectivamente à vibração pura  $\text{C}=\text{O}$  e a um acoplamento

amina II  $\delta(\text{N-H}) + \nu(\text{C=O})$ . Observa-se também uma banda em  $3340\text{ cm}^{-1}$  atribuída ao estiramento NH. Em comparação com a carbonila uretânica comumente observada acima de  $1700\text{ cm}^{-1}$ , as ligações de ureia são observadas abaixo de  $1700\text{ cm}^{-1}$  devido à ligação de hidrogênio. Como já citado, aqui possivelmente o HDI reagiu parcialmente com moléculas de água presentes nos solventes dando origem as terminações de amina capazes de reagirem com grupos isocianatos, num processo preferido ao invés da reação de HDI com Ca-GLIC. Além disso, as bandas relacionados ao fosfato estão ausentes para a amostra 1. Na amostra 2 a quantidade de HDI foi aumentada em comparação com a amostra 1 e, embora ainda observa-se as ligações de ureia, podendo ser visto também bandas de fosfato e de  $\beta$ -ciclodextrina (ver atribuições na Tabela 3). Outra limitação para a reação do Ca-Glic sob condições de refluxo é a sua baixa solubilidade em DMF. Assim, para a amostra 3 a suspensão de Ca-Glic/DMF foi submetida a imersão em banho ultrassom (US) durante 4 horas antes da reação, de modo a favorecer a dissolução pela quebra de agregados de partículas. No espectro da amostra resultante, a presença de bandas de fosfato, bem como uma banda de carbonila estendendo-se acima de  $1700\text{ cm}^{-1}$  sugerem que o ultrassom melhorou a incorporação do fosfato, embora a banda larga do estiramento OH sugira uma elevada quantidade de terminações que não reagiram. A quantidade de catalisador foi dobrada na amostra 4 o que, segundo o espectro FTIR conduziu a um aumento discreto na quantidade de fosfato incorporado, apesar da predominância de bandas de ureia.

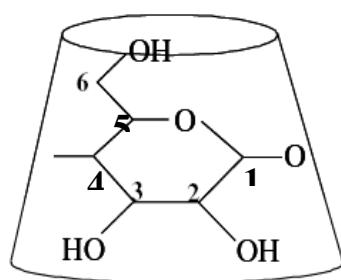
Para as amostras preparadas sob irradiação de microondas, os materiais obtidos após a primeira etapa foram isolados (ou seja, a reação foi terminada pela adição de água ao final da primeira etapa, de formação do pré-polímero. Isto foi realizado a fim de avaliarmos a sua natureza, devido as dificuldades observadas na sua incorporação do Ca-Glic sob refluxo. As reações 5 e 6 foram realizadas a  $70^\circ\text{ C}$ , sem catalisador durante 30 minutos e 1 hora, respectivamente. A amostra 5 exibiu bandas que podem ser atribuídas tanto a presença de grupos NH do polímero, quanto a estiramentos OH em  $3335\text{ cm}^{-1}$  além da banda  $\text{C}=\text{O}$  em  $1695\text{ cm}^{-1}$  e bandas de fosfato cerca de  $1000\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que polimerização ocorreu apenas numa extensão limitada. Com o aumento do tempo de reação, observa-se a formação de ligações de ureia (amostra 6). O efeito do aumento da temperatura na presença e na ausência de catalisador, foi avaliado nas amostras 7 e 8, respectivamente. A falta de catalisador leva à formação de ligações de

ureia, além de uma incorporação significativa grupos fosfato (amostra 7), enquanto que a presença do catalisador evita uma extensa formação de ligações de ureia, favorecendo a incorporação de Ca-Glic (amostra 8). O uso de H-Glic em vez de Ca-Glic foi avaliado nas amostras para 9-11 em diferentes tempos e catalisador a 70°C de temperatura. As condições usadas para 9 e 10 levaram a formação de ureia no pré-polímero com ligeira incorporação de fosfato, enquanto que na amostra de 11 reação de HDI com H-GLIC foi favorecida. Esta última amostra, (11) foi escolhida para reagir com  $\beta$ -CD, e o espectro do polímero resultante é apresentado em comparação com os espectros de precursores (Já discutidos). Além da banda de carbonila uretânica em 1705 cm<sup>-1</sup>, nota-se a presença de bandas de fosfato e de  $\beta$ -CD indicando a formação do PU ternário (HDI-H-Glic e  $\beta$ -CD).

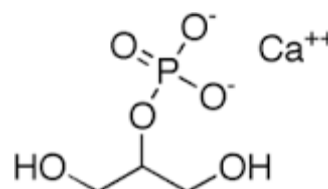
Vale comentar que para esta classe de polímeros, as evidências fornecidas pelos espectros FTIR são consideradas as mais diretas quanto a informações sobre o sucesso da formação dos polímeros, desta forma nem todas as amostras foram caracterizadas pelas técnicas complementares. Neste contexto, a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN <sup>13</sup>C) obtida das amostras sólidas (Figura 11) também foi realizada para complementar nossos estudos, na qual, a  $\beta$ -CD nativa (Figura 12), glicerofosfato de cálcio puro (Figura 13) e a amostra 11 de polímero (Figura 14), foram as amostras escolhidas para tal estudo.

Observa-se no espectro da  $\beta$ -CD nativa (ver Figura 12 para a identificação da numeração dos átomos de carbono) sinais em  $\delta$  = 62,0 (C6), 74,2 (C2,3,5), 83,5 (C4) e 112,4 (C1) ppm, coerentes com dados descritos na literatura por MOHAMED et al (2010). No caso do espectro de glicerofosfato de cálcio observamos sinais em  $\delta$  = 65,0 e 73,2 ppm. Não foi encontrado espectro desta estrutura na literatura, ainda muito pouco explorado para a formação do polímero, no entanto as posições dos sinais são coerentes com a existência de dois ambientes químicos. No espectro do polímero, por sua vez, podem ser observados sinais em posições de deslocamento químico análogos aos presentes nos espectros dos constituintes individuais, além de sinais em  $\delta$  = 31,83 ppm e  $\delta$  = 43,96 ppm atribuídos aos carbonos do HDI. Estas posições são análogas às descritas para poliuretanos a base de ciclodextrinas e diferentes isocianatos (MOHAMED et al., 2010). Por fim, o sinal do carbono da carbonila pode ser observado em  $\delta$  = 161,0 ppm

evidenciando a formação de ligação uretânica, também coerente com a literatura (MOHAMED et al., 2010).



(a)



(b)

Figura 11: Representação estrutural de uma molécula de a) ciclodextrina com a numeração de átomos de carbono; b) glicerofosfato de cálcio

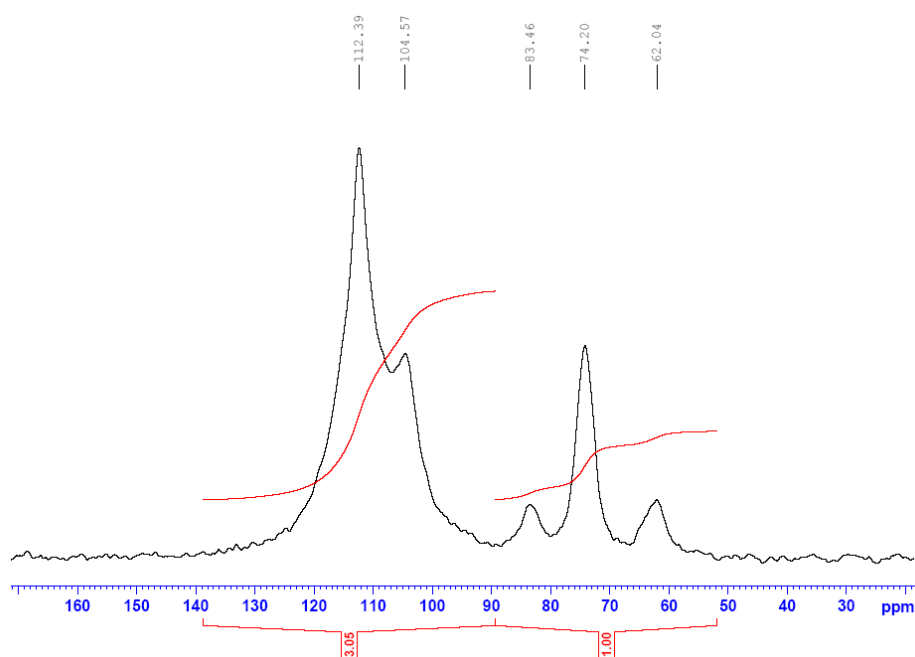


Figura 12: Espectro de RMN de carbono 13 no estado sólido da β-CD na sua forma nativa

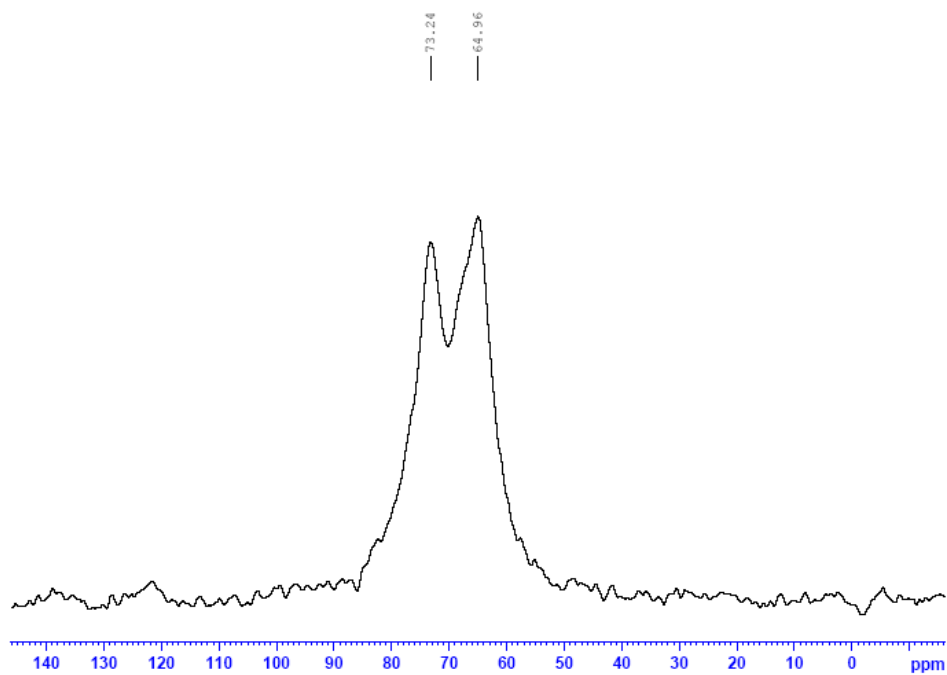


Figura 13: Espectro de RMN de carbono 13 no estado sólido do glicerofosfato de cálcio

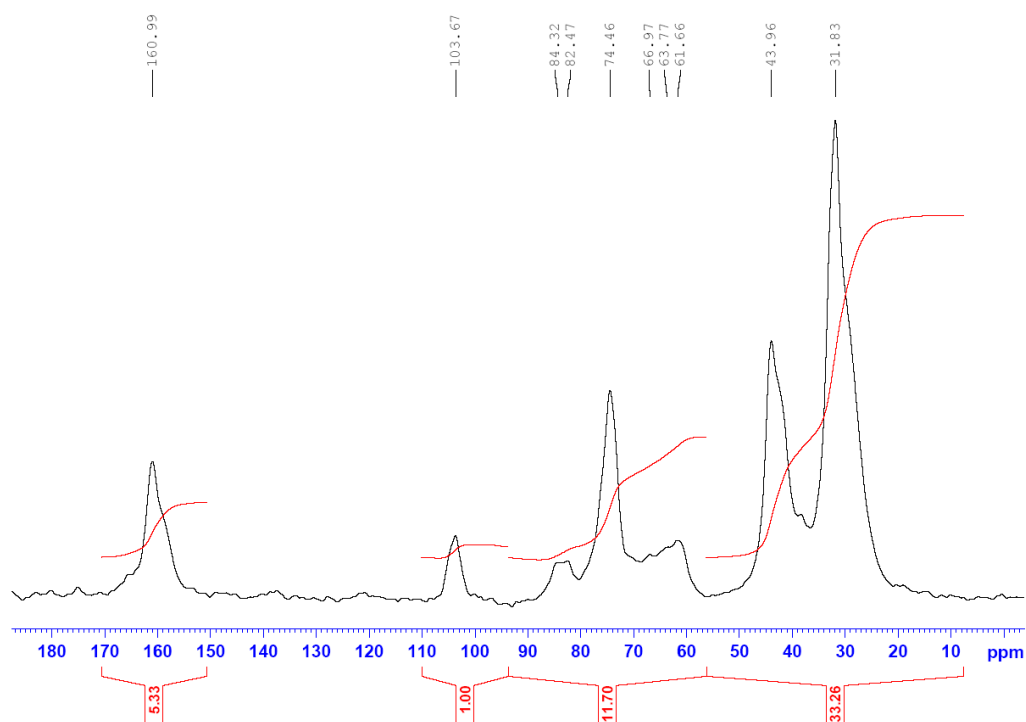


Figura 14: Espectro de RMN de carbono 13 no estado sólido do polímero 11(Tabela 1)

Para complementação dos resultados de espectroscopia no infravermelho, a amostra 11 foi caracterizada também por análise termogravimétrica (TG, Figura 15). Na curva TG da  $\beta$ -CD obtida para comparação, podemos observar dois estágios de decomposição térmica, um em 100 °C devido à perda de água e outro em 300 °C referente à decomposição química da  $\beta$ -CD (ÈHEN et al., 2005). Com relação ao polímero formado, foram observadas três etapas: 1) perda de água até 150 °C, 2) clivagem das ligações uretânicas (a partir de 200 °C); 3) volatilização dos produtos resultantes da decomposição, entre 400 e 500°C. Resultados análogos podem ser verificados na literatura. (GAO et al,2012; BRASKAR et al., 2004)

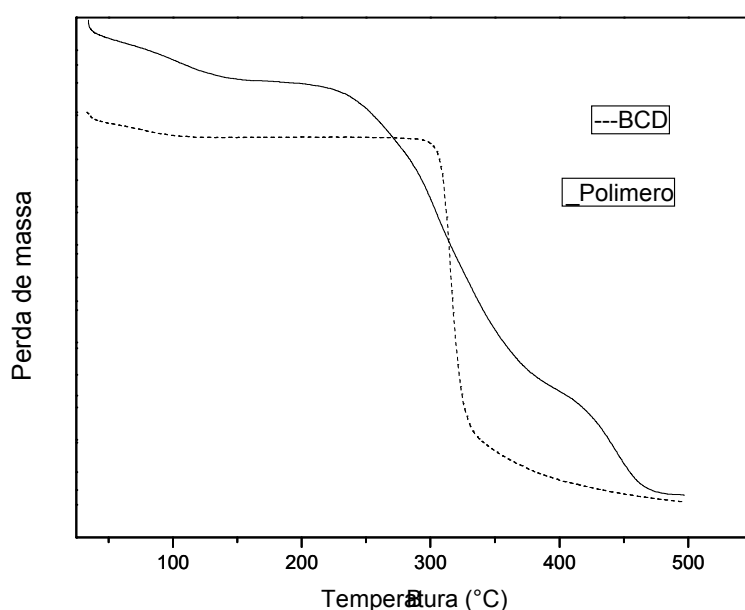


Figura 15: Curvas do TG do polímero (amostra 11) e da  $\beta$ -CD

Como dado complementar na caracterização dos materiais, na Figura 16 estão apresentados os difratogramas de raios X da amostra 11 de polímero e da  $\beta$ -CD, para comparação.

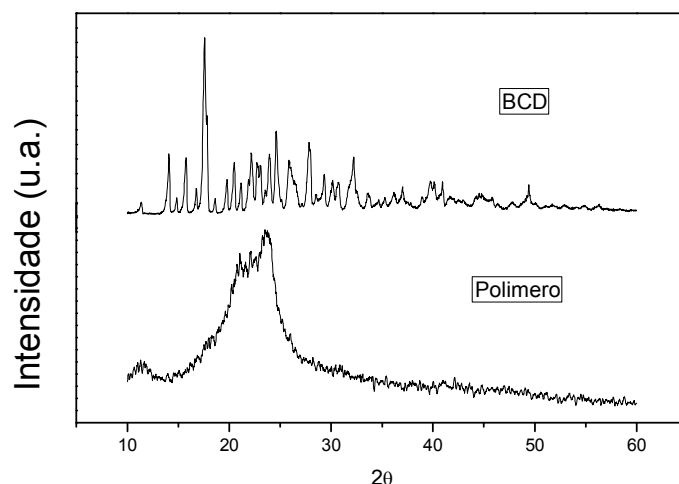


Figura 16: Difrátogramas da  $\beta$ -CD e do polímero da amostra 11 da tabela 1

Observa-se que o polímero apresenta uma estrutura com característica pouco cristalina, com picos de maior intensidade em  $2\theta = 21^\circ$  e  $23^\circ$ , diferente da  $\beta$ -CD que tem um padrão cristalino e um pico com maior intensidade em  $2\theta = 12^\circ$ . Este resultado sugere que a reação entre o pré-polímero e a  $\beta$ -CD ocorreu e fez com que a  $\beta$ -CD perdesse o padrão de cristalinidade inicial, o que é comum após a formação de poliuretanos a partir de polióis originalmente cristalinos. Segundo DA RÓZ et al. (2009) essa perda da organização da estrutura de polissacarídeo pode ser atribuída à formação de ligações cruzadas entre as hidroxilas com as funções isocianato do HDI. CRINI et al (2005) também descreveu que ligações cruzadas reduzem a quantidade de domínios cristalinos em sacarídeos, podendo mudar a natureza cristalina do polímero no estado natural.

Após a caracterização estrutura dos polímeros, foi realizado um estudo para avaliar a manutenção da capacidade de encapsulação da  $\beta$ -CD, quando ligada a um polímero, utilizando uma solução padrão de fenolftaleína (FF) (MORIWAKI et al., 2009). A adição do polímero à solução da FF promoveu a descoloração das soluções com a diminuição da absorbância em 552 nm (Figura 17) mesmo em meio básico em que o corante se apresenta colorido, devido a uma distorção da estrutura da FF causada pelo estabelecimento de ligações de hidrogênio com a ciclodextrina, como descrito na literatura. Este resultado é tomado como evidência da inclusão da FF nas cavidades da

$\beta$ -CD no polímero, indicando que a  $\beta$ -CD mantém a capacidade de formar complexo de inclusão, mesmo depois do polímero formado (MOHAMED et al., 2010).

No presente trabalho, testamos também o efeito de aumentar a massa de polímero em contato com uma solução FF, mantendo constante o tempo de contato. A figura 11 mostra que quanto maior for a massa do polímero, menor a absorbância da fase líquida, indicando que nas massas de polímero mais baixas do estudo, a quantidade de unidades ciclodextrina foi insuficiente para interagir com as moléculas de FF presentes. A partir da massa de 0,04 g, houve a formação de um patamar próximo a 87 % de moléculas de FF ligadas à estrutura do polímero, podendo-se considerar que tal taxa não estabiliza em 100 % devido à existência de um processo de equilíbrio. Isto permite uma estimativa da quantidade de matéria de FF por unidade de massa de polímero. Considerando-se que foram usados 10 mL da solução de FF na concentração inicial  $3,75 \times 10^{-4}$  mol/L; nesta solução, neste volume, a quantidade de matéria inicial de FF é  $3,75 \times 10^{-6}$  moles. A partir da massa de polímero 0,04 g, a porcentagem de FF ligada estabilizou em 87 %, que corresponde a  $3,26 \times 10^{-6}$  moles ligados em 40 mg de polímero e que perfazem aproximadamente  $8 \times 10^{-8}$  mol FF/mg de polímero.

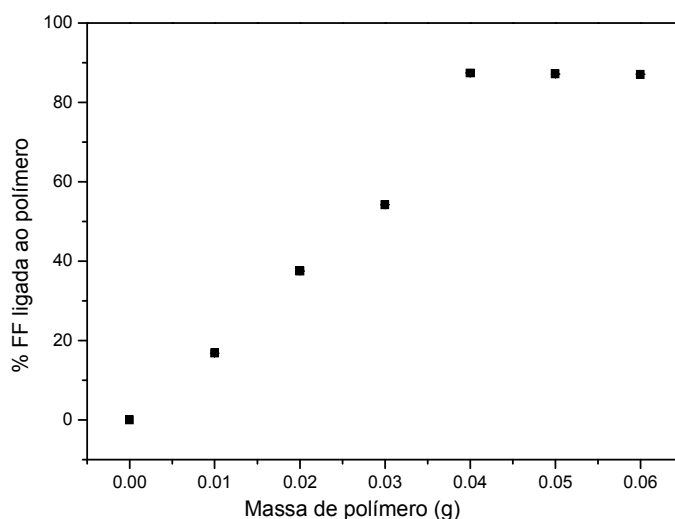


Figura 17: Curva de % de fenolftaleína (FF) ligado ao polímero 11 a partir da solução FF, após 4 h de contato, com massas crescentes de polímero.

## **Estudos da formação de complexos de inclusão poliuretano/cipro**

A capacidade das ciclodextrinas de formar compostos de inclusão baseia-se na versatilidade de suas propriedades físicas e químicas, as quais possibilitam interações intermoleculares do tipo hóspede-hospedeiro com suas moléculas sem que haja o estabelecimento de ligações covalentes entre as espécies. Dentre vários métodos para a preparação dos compostos de inclusão, podemos citar a mistura física e a maceração na forma de uma pasta (chamado em alguns casos de malaxagem), que é o método de estudo nesse trabalho (ORGOVÁNYI et al., 2005). Uma vez preparadas as amostras que podem conter os complexos de inclusão, é importante caracterizá-las para saber se ocorreu a complexação do fármaco, no presente caso a ciprofloxacina (Figura 6b).

Uma das evidências mais importantes da formação de complexos de inclusão em ciclodextrinas pode ser proporcionada por calorimetria exploratória diferencial (DSC) (ORGOVANYI et al., 2005; GIODARMO et al., 2001). Isto também pode ser aplicado para polímeros, com a diminuição ou total ausência de pico de fusão do fármaco no termograma DSC sendo um indicativo da formação dos complexos de inclusão (TEJASHRI et al., 2013). Isto pode ser compreendido considerando-se que os cristais moleculares dos fármacos originais são formados por moléculas discretas, que interagem entre si por interações intermoleculares. Para que ocorra a fusão, tais interações devem ser superadas, gerando um sinal na curva DSC em uma temperatura característica da natureza destas interações. Nos complexos de inclusão, cada molécula de fármaco se encontra em uma situação muito diferente desta, interagindo com a cavidade da ciclodextrina, de forma que em princípio não teríamos mais as moléculas do fármaco interagindo entre si tão significativamente. Portanto, o evento associado à fusão do cristal de fármaco "puro" não é mais esperado na curva DSC na mesma faixa de temperatura. O alargamento ou diminuição de intensidade podem indicar que há resíduos do fármaco cristalino, o que é aceitável considerando-se que nenhum dos métodos de formação de complexos de inclusão leva a uma complexação completa.

Evidências da formação dos complexos de inclusão foram obtidas a partir das curvas térmicas de DSC para o polímero, fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) inicialmente com estequiometria de 1:1 (m:m) (Figura 18). Vale destacar que a opção de se estudar proporções em massa ao invés de proporções em mol se deveu à impossibilidade de se determinar a massa molecular do polímero

pelas técnicas tais como cromatografia de permeação em gel, pois o mesmo é insolúvel nos solventes utilizados nas referidas medidas. A curva de DSC obtida para a Cipro apresenta um pico endotérmico em aproximadamente 274°C, correspondente ao ponto de fusão do fármaco, de acordo com a literatura (LI et al., 2007).

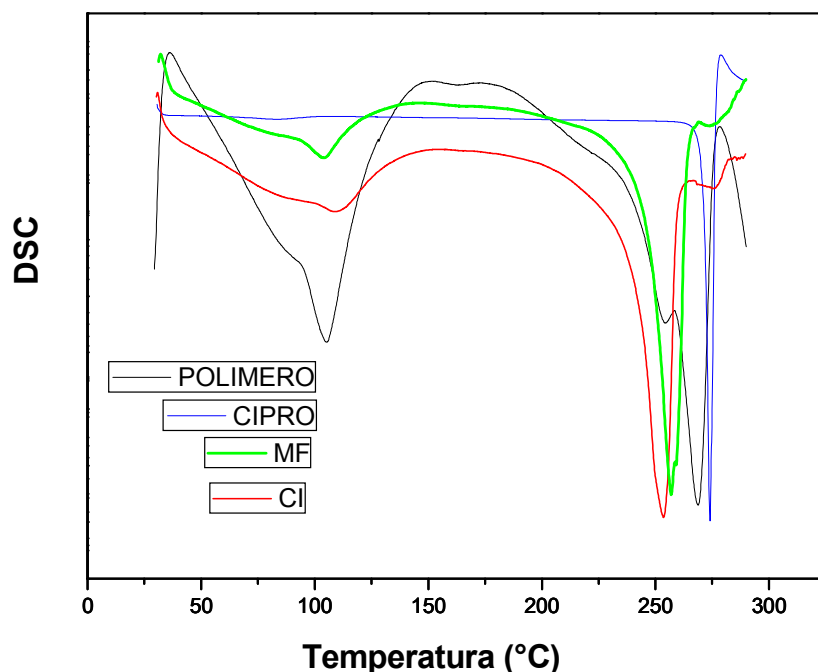


Figura 18: Termograma de DSC do polímero, fármaco (CIPRO) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção de 1:1

Esse pico endotérmico é seguido de outro pico exotérmico em aproximadamente 280°C que está associado à termodecomposição do fármaco. A curva do polímero apresenta três picos endotérmicos em torno de 100°C (referente à perda de água), em 250°C, referente a uma transição de fase e em 270°C, referente ao início da decomposição térmica. No intervalo entre 100°C e 250°C, as curvas DSC das misturas MF e CI apresentaram semelhanças de comportamento em relação à curva do polímero, ou seja, observam-se eventos em 100°C e em 253°C. Porém, o evento observado para o polímero em 270°C não mais é observado, assim como a ausência do pico de fusão do fármaco em 274 °C. Este apresentou uma redução tão significativa de intensidade a

ponto de quase não ser observado, juntamente com um alargamento pronunciado. A hipótese de que o pico em 253°C seja a fusão do fármaco deslocada em mais de 20 °C parece improvável, pois seria um deslocamento muito elevado e, mesmo se todo o fármaco estivesse na forma de partículas isoladas, tal deslocamento somente poderia ser justificado pela ocorrência de fortes interações. Atribuímos o evento em 253°C à transição de fase do polímero. Este desaparecimento do evento de fusão é um dos resultados mais importantes deste trabalho e tem sido aceito, tanto no caso de ciclodextrinas nativas quanto de polímeros contendo ciclodextrinas, como uma evidência muito forte da formação de complexos de inclusão (GIODARNO et al., 2001). Ademais o fato de que a inclusão ocorreu até no caso da mistura física pode ser resultado do fato deste fármaco ser fortemente hidrofóbico, tendo uma solubilidade muito baixa em água e, portanto, forte avidez pela ocupação das cavidades das ciclodextrinas. Por fim, o fato de termos usado o fármaco em excesso, pois a proporção 1:1 em massa representa um excesso em termos molares do fármaco em relação às unidades ciclodextrina no polímero (o que é de difícil quantificação) também sugere que as chamadas interações não-inclusivas estão tendo um papel importante no presente caso. Estas podem ocorrer entre o fármaco e outros grupos presentes na estrutura do polímero, tais como os fosfatos. Tendo isto em vista, as possibilidades de interações do fármaco com o ácido glicerofosfórico foram investigadas por DSC e os resultados são apresentados a seguir (Figura 19).

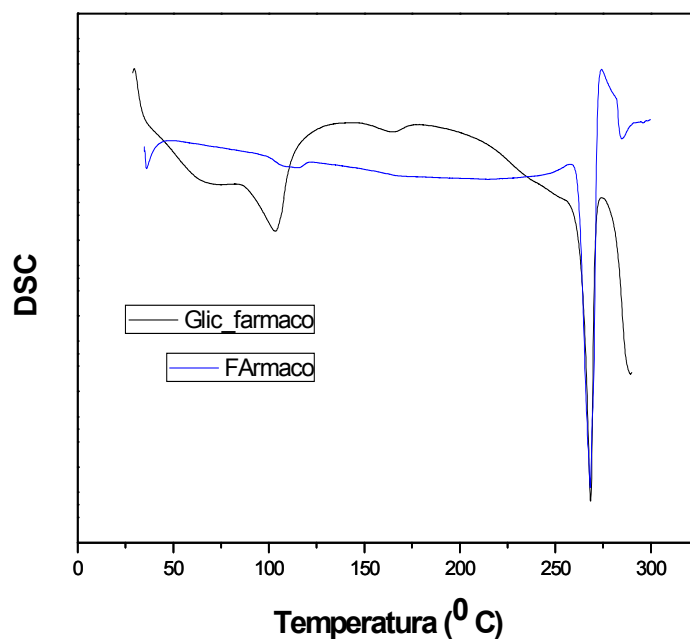


Figura 19: Termograma do DSC do fármaco (Cipro) e da mistura ácido glicerosfórfico: cipro na proporção molar 1:1.

Neste caso, foi obtida uma amostra através da trituração de ácido glicerosfórfico com o fármaco cipro nas mesmas proporções molares (1:1). Percebe-se que a curva do fármaco apresenta uma estabilidade térmica até seu ponto de fusão em 270°C, no entanto na curva da mistura observam-se dois eventos endotérmicos, um pico em 100°C correspondendo a água e outro em 270°C podendo estar associado a eventos de termodecomposição do fármaco. Portanto, podemos afirmar que uma possível interação com os grupos fosfato não tenha sido o fator preponderante para o deslocamento do pico de fusão do fármaco no polímero, considerando que o pico observado em 270°C fosse a fusão. Por fim, as interações podem estar ocorrendo também com a parte externa dos anéis ciclodextrina.

No intuito de obter maiores evidências de interações entre o polímero e o cipro, foram preparadas misturas pelo método de malaxagem em outras proporções do polímero/fármaco. As proporções utilizadas foram de 1:0,1, 1:0,5 e 1:2 (polímero:fármaco), sendo comparadas com a proporção inicial de 1:1. Na análise térmica por DSC (Figura 20a) podemos perceber um comportamento geral análogo ao da análise anterior, ocorrendo o desaparecimento do pico de fusão do fármaco na faixa

de 274°C. Mais especificamente, a amostra de proporção 1:0,5 apresentou um pico em 252 °C, enquanto que na amostra de proporção 1:2 o pico foi observado em 260 °C, sempre com um perfil mais alargado do que o pico de fusão original do fármaco puro. Estes resultados, particularmente a não observação do pico de fusão do fármaco mesmo para uma amostra com proporção mais elevada deste em relação ao polímero, apontam na direção da ocorrência de interações significativas entre o polímero e o fármaco, podendo ser tanto inclusivas quanto não-inclusivas (presença do fármaco molecularmente disperso, não incluído nas cavidades de ciclodextrina). Por fim, uma nova proporção foi preparada desta vez na proporção de 1:0.01 (polímero:fármaco) (Figura 20b), observando-se também que nessa proporção quantidade do fármaco não se fez diferença significativa nos resultados, com o pico sendo observado em 252 °C. Notar que nem todas as proporções estudadas foram selecionadas para as caracterizações adicionais e que a proporção 1:0,1 foi preferida por ter o mesmo comportamento, apesar de uma proporção inferior de fármaco, vantajosa no estudo posterior de liberação *in vitro*, devido à baixa solubilidade e maior facilidade de atingir condições *sink*.

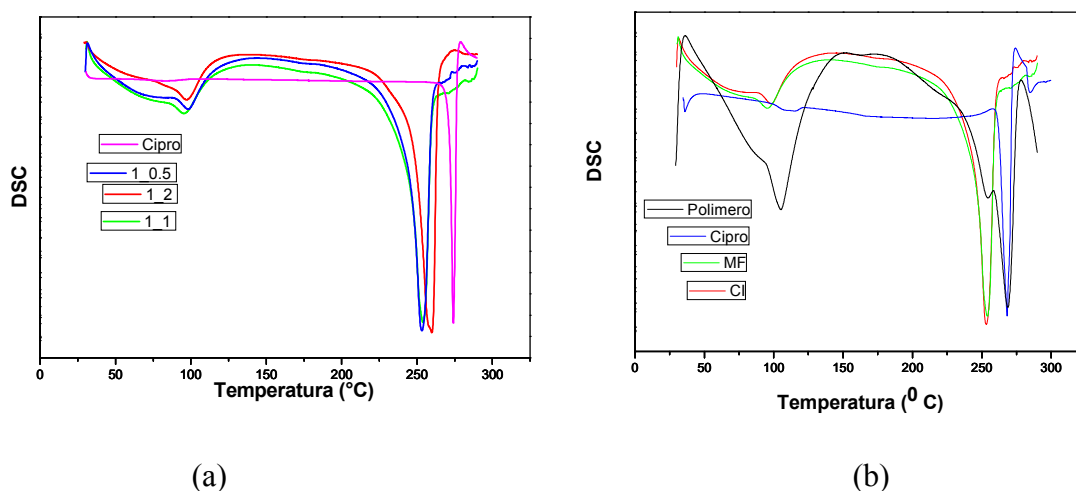


Figura 20: Termograma do DSC do fármaco (CIPRO) e das misturas dos complexos de inclusões entre polímero e fármaco em diferentes proporções do fármaco, a) (1:0,5\_1:1\_1:2) e b) na proporção 0,01.

Foram obtidas também curvas de TG (Figura 21) e DTG (Figura 22) de amostras referentes ao estudo de formação dos complexos de inclusão: polímero e fármaco livres,

bem como o complexo de inclusão obtido por malaxagem e por mistura física. Com relação às curvas de TG do polímero original, foram observadas diferentes regiões mostrando três etapas de perda de massa, sendo atribuídas na primeira faixa de 40°-150°C à liberação de água, seguida pela clivagem das ligações uretânicas e volatilização dos produtos na segunda e terceira em 250°-380°C e 380°-500°C, respectivamente, como já discutido. Os referidos resultados são coerentes com dados da literatura. (GAO et al., 2012; BRASKAR et al., 2004). Por outro lado, o Cipro apresenta duas etapas principais de decomposição: a primeira entre 275-350°C e a segunda no intervalo entre 350-430°C. Nas curvas referentes às amostras MF e CI, pode-se observar comportamento semelhante entre ambas, porém diferentes das curvas dos componentes isolados. Para uma discussão mais embasada, as curvas de DTG são mais apropriadas.

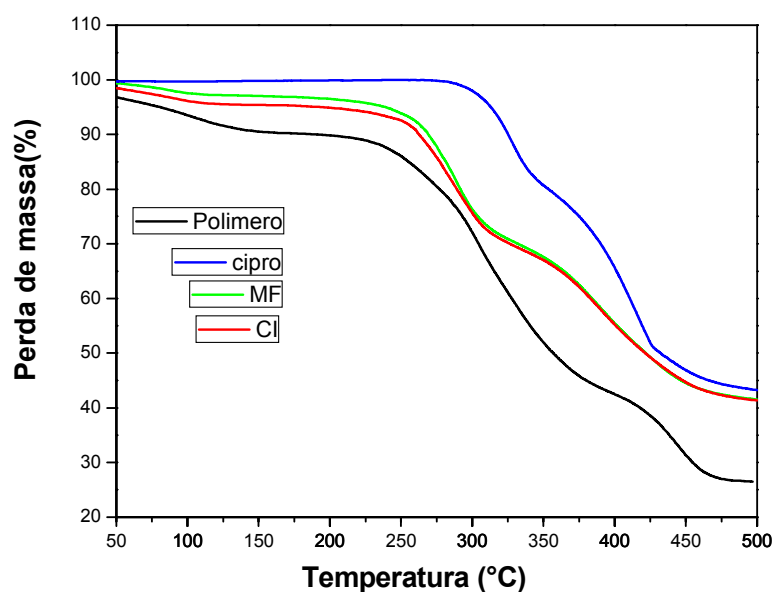


Figura 21: Curvas de TG do polímero, fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção 1:1

Pelas curvas DTG, o início da decomposição ocorre em temperaturas mais baixas do que os componentes isolados e aparentemente mais etapas de decomposição foram registradas, na medida em que os picos dos eventos pareceram desdobrados. Estas diferenças sugerem fortemente que a formação de complexos de inclusão, pois estes se comportam como espécies distintas das originais, ou seja, a presença de novos eventos sinaliza a existência de espécies químicas adicionais. Comportamentos semelhantes de mudanças de termodecomposição nas misturas em sólido com relação aos elementos de partida foram também vistos na literatura (MACOCINSCHI *et al.*, 2013; GIODARNO *et al.*, 2001).

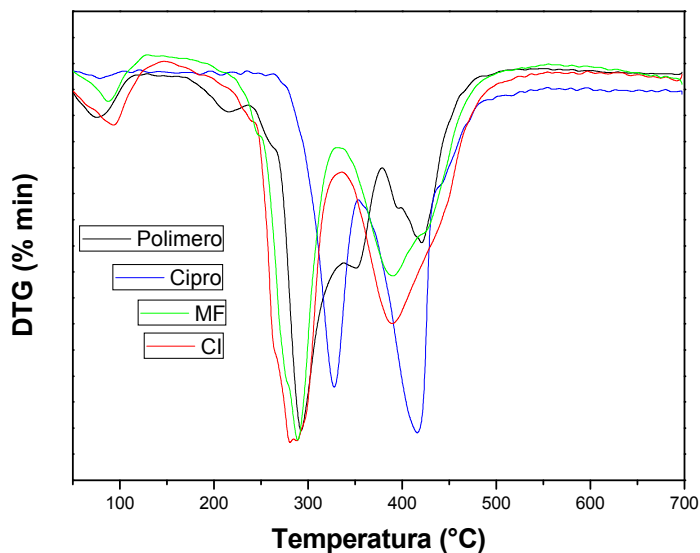


Figura 22: Curvas de DTG do polímero, fármaco cipro e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção 1:1

Como dados complementares sobre a estrutura da mistura física e do complexo de inclusão, as amostras foram analisadas por difratometria de raios X, na proporção 1:0,1 (Figura 23). Notar que nem todas as proporções estudadas foram selecionadas para estas caracterizações adicionais. Os difratogramas da Figura 23 mostram amostras do polímero, do fármaco (cipro) e das misturas MF e CI. Observa-se que o polímero apresenta uma estrutura com característica pouco cristalina, com picos de maior intensidade em  $2\theta = 21^\circ$  e  $23^\circ$ , diferente do fármaco e das misturas MF e CI que têm

um padrão cristalino e picos com maior intensidade em  $2\theta = 27,22^\circ$ ;  $27,08^\circ$  e  $27,20^\circ$  respectivamente. Verifica-se que tanto na MF quanto no CI os picos do fármaco estão presentes, com intensidades progressivamente reduzidas na MF e significativamente reduzidas no CI, além de apresentarem perfis alargados. Se por um lado a existência de picos indica a presença resquícios de cristais isolados de fármaco não complexado, por outro lado as alterações no perfil (tais como os picos adicionais em  $2\theta = 12,8^\circ$  e  $19,6^\circ$ ) indicam que estes cristais podem ser apenas residuais e que houve a formação dos complexos de inclusão em extensão significativa. Relatos na literatura podem ser encontrados, caracterizando diferenças nas amostras das misturas com os componentes isolados, como surgimento ou o desaparecimento de picos ou mudanças nas intensidades e largura indicam a formação do complexo de inclusão (CUNHA- FILHO et al., 2007; SONG et al., 2006 ).

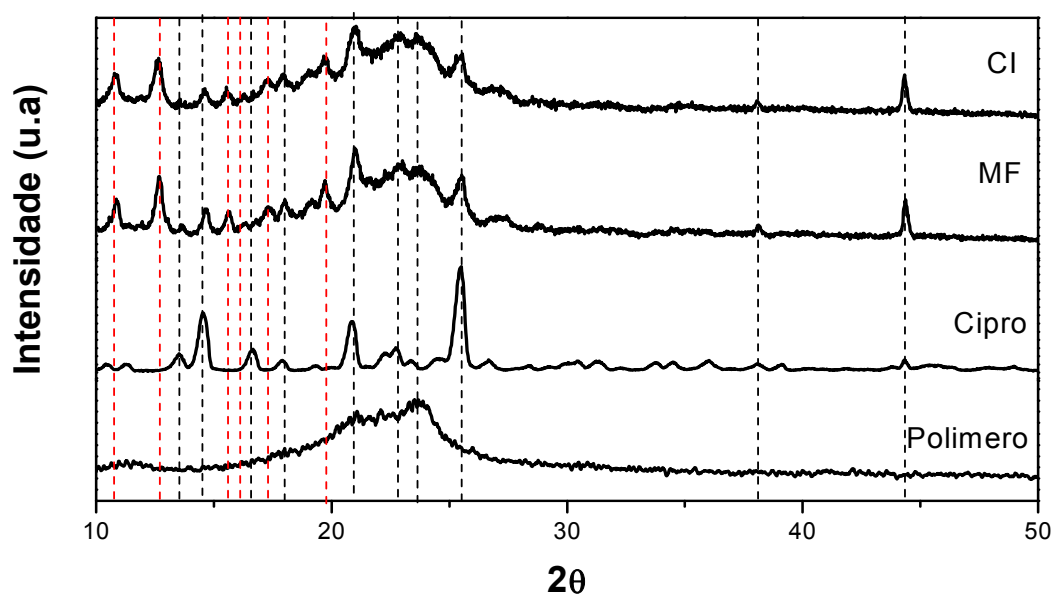


Figura 23: Difrátogramas do polímero, fármaco (Cipro) e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção 1:0,1

Como técnica complementar também foi realizada caracterização por espectroscopia FTIR, de amostras obtidas nas proporções de polímero:fármaco 1:1

(Figura 24a) e 1:0,1 (Figura 24b). Para as amostras na proporção 1:1, comparando-se os perfis dos espectros do complexo de inclusão com os do polímero e do fármaco livres, pode-se constatar que as bandas do fármaco predominam abaixo de  $2000\text{ cm}^{-1}$  (provavelmente pela proporção maior de fármaco) e que houve um alargamento na região em torno de  $3500\text{ cm}^{-1}$  (estiramentos OH), sugerindo a ocorrência de ligações de hidrogênio. A razão disto é que, na ausência de ligações de hidrogênio, grupos como NH e OH geram bandas de estiramento estreitas. Quando interagem com outras espécies através de ligações de hidrogênio, isto causa perturbações na força destas ligações e, conseqüentemente, nas distâncias de ligação, refletindo em uma faixa de valores e alargando a banda de estiramento. Para a mistura física, as bandas do fármaco também predominam abaixo de  $2000\text{ cm}^{-1}$ , havendo uma manifestação menos pronunciada em torno  $3500\text{ cm}^{-1}$ . Para as amostras na proporção 1:0,1, observa-se uma situação um pouco diferente abaixo de  $2000\text{ cm}^{-1}$  com a presença de bandas tanto do polímero quanto do fármaco, neste caso pela diminuição da proporção de fármaco, situação que ocorre também para a mistura física. Para esta proporção, houve a presença de bandas pronunciadas, com um relativo grau de alargamento em torno de  $3500\text{ cm}^{-1}$ , sugerindo que neste caso a técnica de mistura física também possa levar a interações. Por fim, podemos observar nos espectros de ambas as proporções que, de uma forma geral, não houve o aparecimento de novas bandas que pudessem confirmar inequivocamente a formação dos complexos de inclusão com comportamento drasticamente distinto em relação às espécies livres, todavia os perfis dos espectros são compatíveis com a ocorrência de interações entre as espécies.

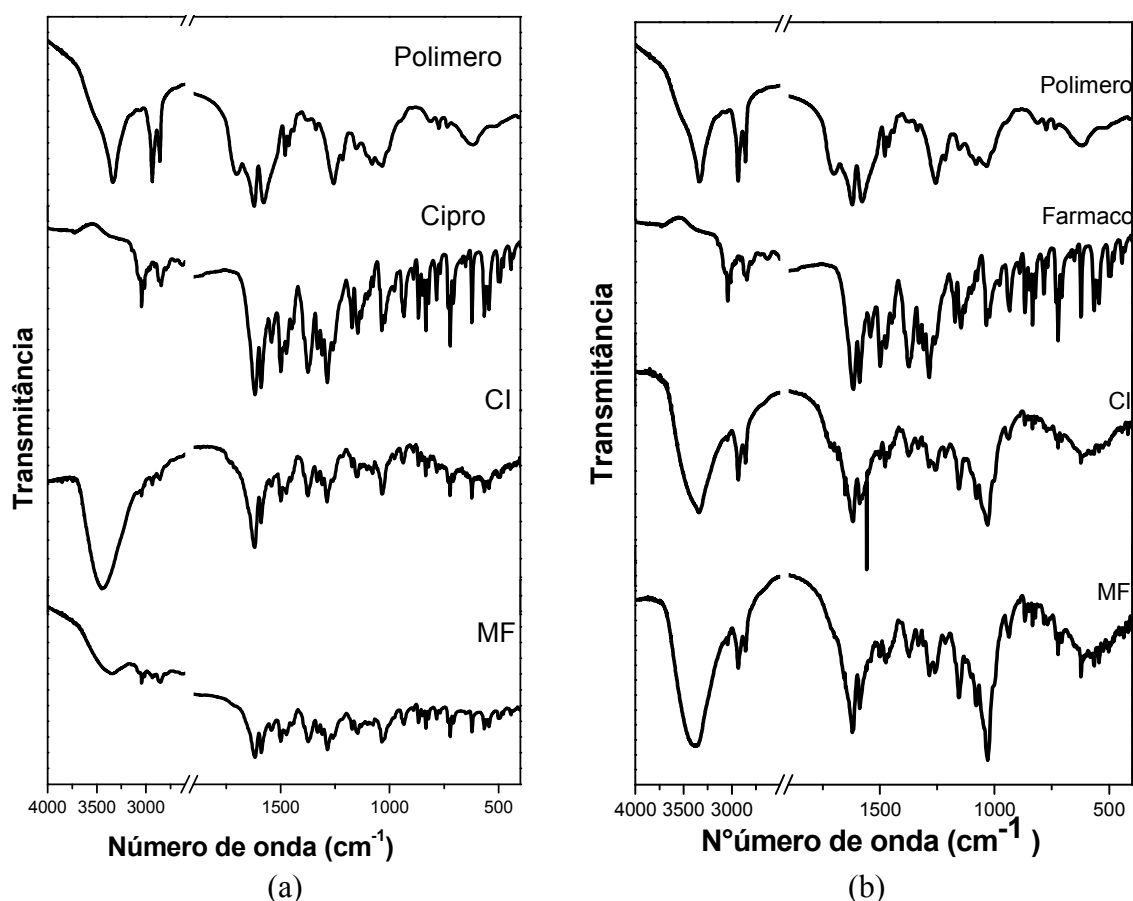


Figura 24: Espectros de FTIR do polímero, fármaco cipro e das misturas: física (MF) e complexo de inclusão (CI) na proporção a) 1:1 e b) 1:0,1

### Estudo de liberação *in vitro*

Neste tópico, dando continuidade aos estudos do fármaco incorporado ao polímero, para o perfil de liberação foi necessário validar o método de determinação analítica das concentrações de fármaco liberadas, por espectroscopia UV/visível, por meio da construção da curva de calibração analítica (Lei de Lambert-Beer). Após a determinação desta curva, a mesma foi usada para calcular a concentração do fármaco. A curva analítica do estudo foi construída a partir de cinco concentrações diferentes do fármaco, entre  $6 \cdot 10^{-5}$  e  $3 \cdot 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato na presença de uma concentração fixa de  $\beta$ -ciclodextrina (a fim de aumentar a solubilidade do fármaco no meio líquido e garantir condições *sink*), determinando-se as absorvâncias em 270 nm

utilizando espectrofotômetro UV-VIS. Note-se que o uso de  $\beta$ -ciclodextrina no meio de liberação foi baseado na capacidade desta em aumentar a solubilidade do cipro em meio aquoso, em uma estratégia que tem sido usada, no caso de outros fármacos, pelo uso de outros tipos de solubilizadores como micelas. Os dados obtidos foram representados em um gráfico (Figura 25), revelando comportamento linear na faixa de concentrações estudadas.

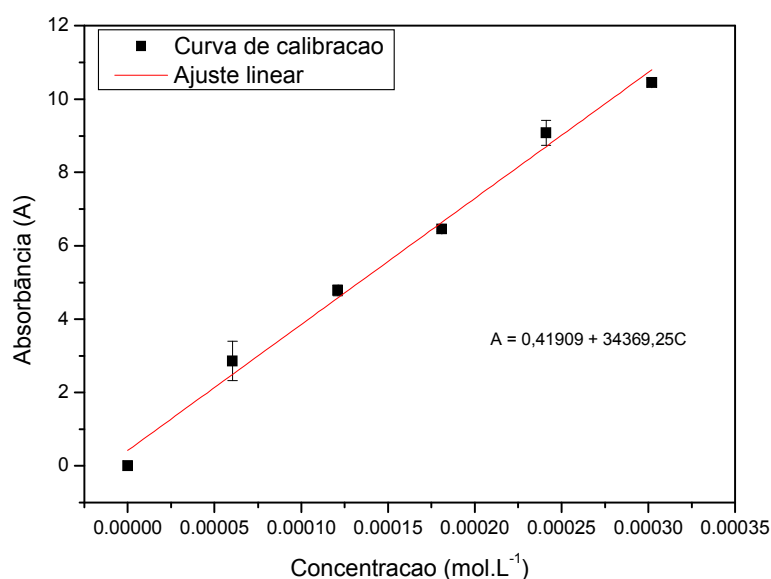


Figura 25: Curva de calibração do fármaco

O tratamento dos dados por regressão linear gerou uma reta com equação  $A = 0,41909 + 34369,25C$  (onde A = absorbância e C = concentração molar), apresentado coeficiente de correlação da curva analítica em 0,98931. Isso nos leva a observar que a curva obedeceu a Lei de Lambert-Beer nas concentrações analisadas apresentando um coeficiente de correlação satisfatório. Na literatura são muitos os trabalhos que se utilizam desse recurso para se obter as concentrações do fármaco. CAZEDEY et al (2012) em estudos de cloridrato de ciprofloxacina para uso oftálmico utilizaram os parâmetros analíticos por espectroscopia UV-Vis. CHORILLI et al (2007) utilizaram esse método juntamente com estudos da solubilidade para confirmar o complexo de inclusão da cafeína em dextrinas e, por fim, ANSARI et al (2011) em estudos do uso resveratrol em material polimérico com dextrinas optaram por usar o método espectrofotométrico da curva de calibração para dar prosseguimento aos estudos *in vitro*

e *in vivo* para provar que o material estudado conseguiu aumentar a solubilidade, estabilidade e a permeação do fármaco.

Na sequência, realizou-se o estudo do perfil de liberação *in vitro* do fármaco a partir do polímero, na proporção de 1: 0,01. Testes *in vitro* foram analisados tanto na presença quanto na ausência de membrana de diálise (Figura 26). A razão do uso da membrana foi facilitar a separação de partículas suspensas dos polímeros para a realização das medidas espectroscópicas, uma vez que estes são insolúveis no meio de liberação. No entanto, a literatura indica que a permeação através da membrana pode se constituir em uma barreira cinética mais importante do que o próprio processo de liberação. Neste contexto, foram realizados os seguintes testes comparativos: a) com membrana (Figura 26 a): PU obtido com H-Glic/cipro, complexo de inclusão  $\beta$ -CD(nativa)/cipro na proporção molar 1:1 (usando a mesma massa de cipro contida no complexo com o polímero neste mesmo estudo) e cipro livre; b) sem membrana (Figura 24 b): PU obtido com H-Glic/cipro, PU obtido com Ca-Glic/cipro e cipro livre.

Observa-se, na Figura 26 a, com exceção do complexo de inclusão  $\beta$ -CD(nativa)/cipro, que o perfil de liberação com a membrana não foram significativamente diferentes para o fármaco livre e amostra a partir do polímero, indicando que a principal barreira cinética em ambos os casos foi a permeação das moléculas do fármaco através dos poros da membrana. Ou seja, uma vez liberado a partir do polímero, o fármaco se comportou similarmente à sua forma livre. Este é um ponto importante, pois o uso de membranas de diálise nos estudos de liberação *in vitro* é um dos métodos mais comuns para avaliar a cinética de liberação a partir de sistemas de distribuição de fármacos e o estudo cinéticos da permeação da membrana tem sido cada vez mais reconhecido (MODI et al., 2013; ZAMBITO et al., 2012). Por outro lado, no caso do complexo de inclusão  $\beta$ -CD(nativa)/cipro, a permeação de drogas através da membrana é melhorada em comparação com o fármaco livre. Isto sugere que o fármaco livre tem uma permeabilidade de membrana mais lenta que é, no entanto aumentado, pela presença de  $\beta$ -CD. Um comportamento similar foi observado na liberação de acetazolamida em HP $\beta$ CD (GRANERO et al., 2008), sendo discutido que a ciclodextrina solubiliza o fármaco mantendo-o na superfície da membrana e favorecendo a permeação.

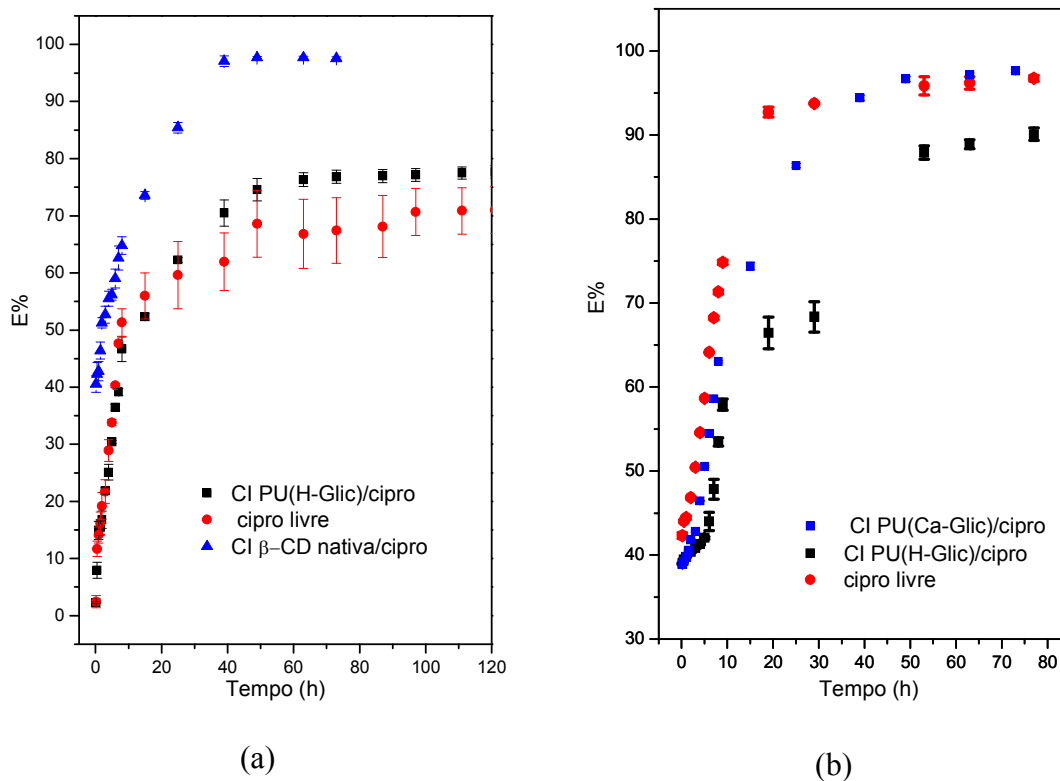


Figura 26: Perfis de liberações: a) Com membrana diálise: fármaco livre, PU de ácido glicerosfórico na forma da mistura em complexo de inclusão (PU H-Glic/CI) e da  $\beta$ -CD na sua forma nativa com a mistura em complexo de inclusão ( $\beta$ -CD nativa/CI) b) Sem membrana diálise: fármaco livre, PU Ca-Glic/CI e PU H-Glic/CI

No entanto, os testes realizados sem membrana para perfil de liberação do fármaco livre foram descritos recentemente para polímeros de ciclodextrina (Lauro et al., 2013; Marcos et al., 2016). Assim, nos nossos estudos, a barreira imposta pela difusão através da membrana foi capaz de mascarar diferenças entre o fármaco livre e complexado. O fármaco livre tem um perfil de dissolução típica de duas etapas com uma etapa de liberação brusca inicial (0-10 h), seguido por uma liberação mais lenta, até chegar ao patamar. Provavelmente, devido à baixa solubilidade aquosa, são necessárias várias horas para dissolver o sólido. Foram avaliados dois polímeros diferentes: um preparado a partir de um H-Glic (amostra 11) e outro de Ca-Glic (amostra 8) da Tabela I. O CI a partir de H-Glic (PU H-Glic/CI) mostrou um comportamento distinto quando comparado com o fármaco livre, com etapa inicial lenta (0-5 h), seguido por um

aumento na liberação até 10 h, uma fase intermediária entre 10-30 horas com liberação mais lenta seguida de um aumento até chegar o final a 80 h, com 90 % do fármaco liberado. Esta percentagem é inferior ao do fármaco livre na mesma hora (97%). Isto mostra diferentes interações com o polímero envolvendo a inclusão nas cavidades  $\beta$ -CD e também interações não inclusivas com diferentes grupos funcionais presentes na estrutura do polímero. Resultados semelhantes ao nosso trabalho, também foram observados por LEPRÊTRE et al (2009) para a liberação do fármaco ciprofloxacina em hidroxiapatite funcionalizado com polímeros de ciclodextrina, em que essa interação não conduziu a um prolongamento significativo do tempo de liberação e sim reduziu o efeito inicial da liberação (LEPRÊTRE et al ., 2009). Avaliamos o comportamento das fases de liberação do fármaco livre e do fármaco incluído a partir de H-Glic e Ca-Glic. Aparentemente, um passo mais lento de liberação do fármaco incluído na fase inicial é observado em comparação ao fármaco livre, depois nota-se uma liberação mais lenta do fármaco incluído H-Glic em comparação aos outros, com uma % maior de liberação no final. Isto sugere a existência de um sítio de ligação preferencial para o fármaco na estrutura do polímero, provavelmente, nas cavidades de ciclodextrina. Esse estudo mostra que o fármaco incluído a partir do H-Glic foi o melhor polímero para a liberação, sendo mais lenta e com uma % final de liberação mais elevada.

### **Estudo computacional semiempírico da estrutura/estabilidade de complexos de inclusão de ciprofloxacina em diferentes ciclodextrinas nativas: $\alpha$ -, $\beta$ - e $\gamma$ -ciclodextrina**

Geralmente, a caracterização detalhada de como ocorre a acomodação de moléculas convidadas nas cavidades de ciclodextrinas, ou seja, da estrutura exata do complexo, é realizada por medidas de RMN bidimensional, particularmente pelas técnicas de ROESY e NOESY. No entanto, tais medidas exigem que os complexos estejam em solução, nos solventes normalmente utilizados em medidas de RMN. Infelizmente, os complexos obtidos aqui com as ciclodextrinas ligadas às cadeias poliméricas são insolúveis e, adicionalmente, as técnicas de RMN de estado sólido ainda não são aplicadas à obtenção dos espectros bidimensionais necessários. Portanto, para fornecer subsídios ao entendimento de como ocorrem as interações entre o fármaco cipro e as cavidades de  $\beta$ -ciclodextrina, foram realizados cálculos teóricos através de

métodos computacionais semiempíricos do tipo PM3 na Tabela 4. Os cálculos das ciclodextrinas foram realizados permitindo a rotação livre das moléculas de fármaco dentro da cavidade sem impor qualquer restrição sobre as posições atômicas e ângulos de ligação para a molécula do hospedeiro. Foram consideradas duas orientações possíveis do fármaco, adentrando sempre pela extremidade maior da ciclodextrina: pela terminação próxima ao átomo de flúor (F-in) e pela terminação oposta contendo grupo ácido (F-out). A entalpia (energia de ligação) do complexo de inclusão foi calculada como sendo a diferença entre as energias das espécies ligadas e a soma das energias das espécies separadas. Estes valores foram associados à estabilidade relativa das duas orientações, sendo que os valores mais baixos (mais negativos) para a energia de ligação correspondem ao complexo mais estável. Esta é a abordagem usual para comparar estabilidades dos complexos de inclusão de ciclodextrina simulados (ver, por exemplo, em alguns relatos de trabalhos anteriores: (MACEDO et al., 2012; KUBOTA et al., 2011; ARAUJO et al., 2009).

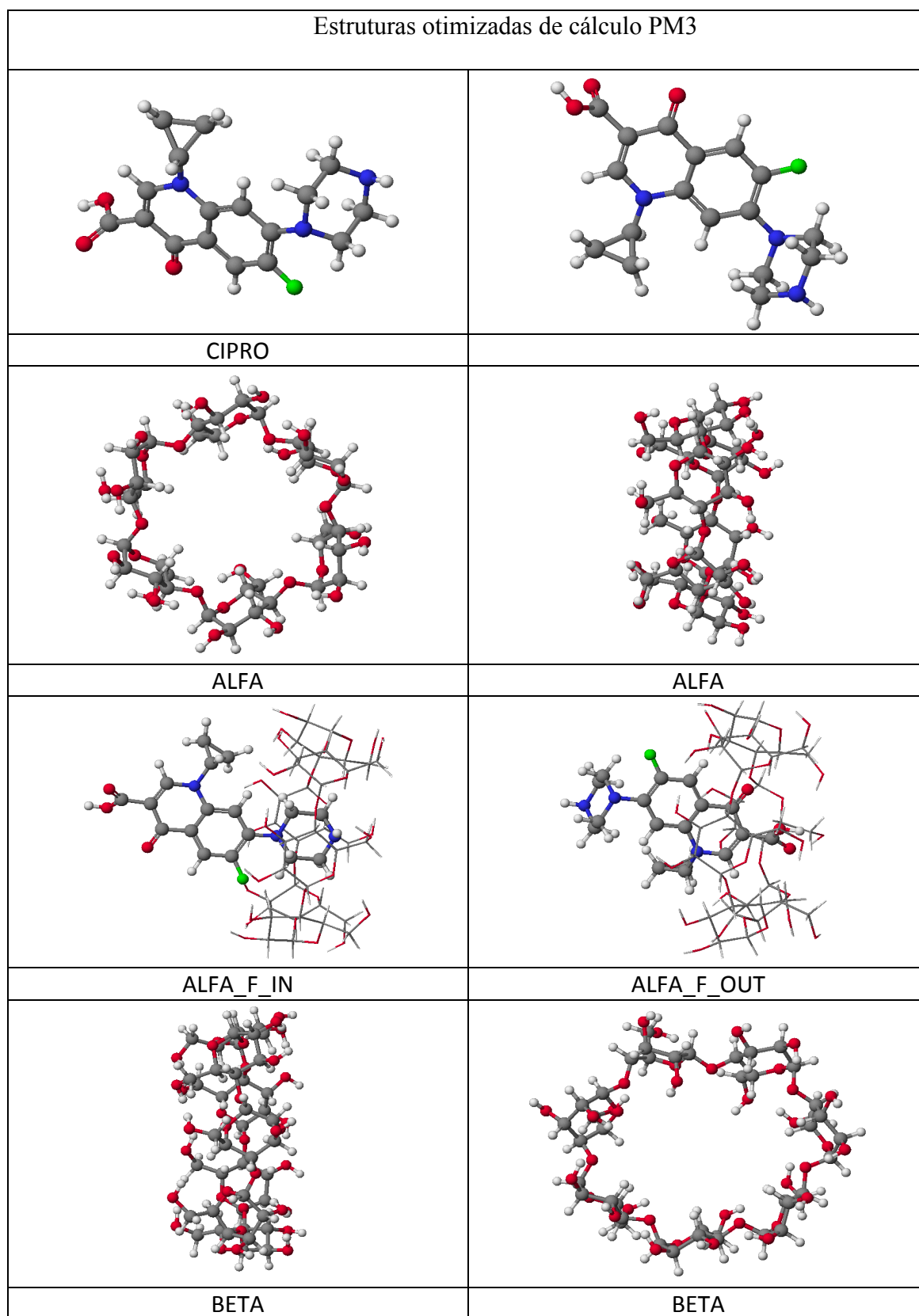
**Tabela 4: Energias de ligação dos complexos obtidas a partir do método semi-empíricos PM3**

| Complexo 1:1 | Energias de ligação (kcal mol <sup>-1</sup> ) |
|--------------|-----------------------------------------------|
|              | PM3                                           |
| ALFA_F_IN    | -15.0                                         |
| ALFA_F_OUT   | 4.3                                           |
|              |                                               |
| BETA_F_IN    | -16.9                                         |
| BETA_F_OUT   | -4.7                                          |
|              |                                               |
| GAMA_F_IN    | -11.9                                         |
| GAMA_F_OUT   | -6.6                                          |

As estruturas moleculares mais estáveis para os complexos de inclusão de acordo com os cálculos semi-empíricos PM3

Este tipo de simulação também permite a representação das estruturas resultantes, que correspondem aos mínimos de energia obtidos a partir dos cálculos. A

Figura 27 mostra as estruturas dos complexos para as diferentes ciclodextrinas, gerados nas duas orientações consideradas.



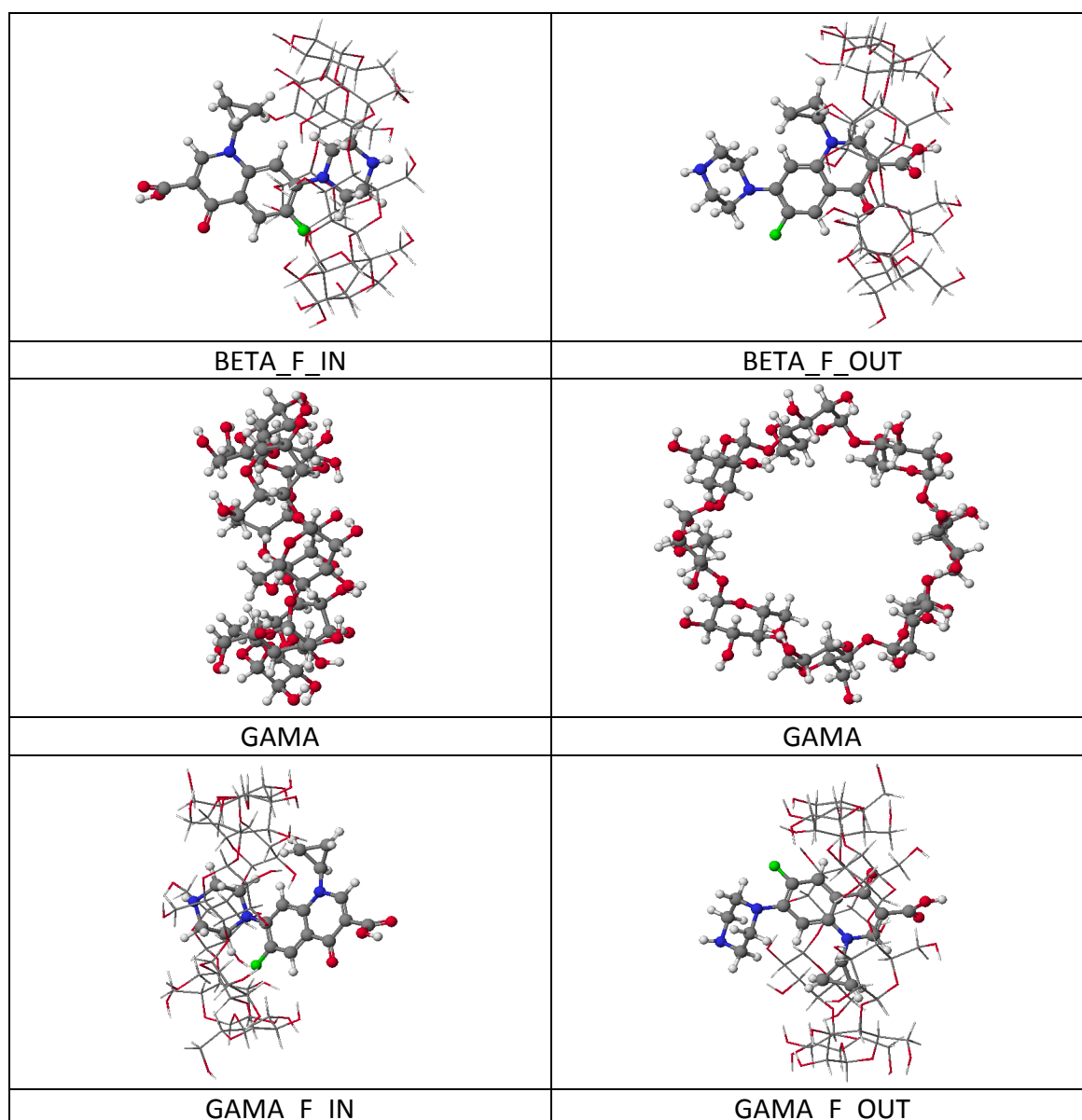


Figura 27: Estruturas correspondentes aos mínimos de energia, simuladas pelo método PM3 complexos para as diferentes ciclodextrinas, gerados nas duas orientações consideradas. Nas figuras, a identificação dos átomos correspondentes a cada cor é: cinza: carbono; branco: hidrogênio, vermelho: oxigênio, verde: flúor e azul: nitrogênio.

Como pode ser vista na Tabela 4, a orientação F-in pode ser considerada a mais estável para todas as ciclodextrinas consideradas, uma vez que apresentou os valores mais negativos. Com relação às diferentes ciclodextrinas, inclusive para justificar a razão pela qual não foram preparados polímeros com diferentes ciclodextrinas nesta Tese, vale destacar que mesmo no caso de complexos do cipro com ciclodextrinas

nativas, somente a  $\beta$ -CD foi estudada. Os complexos de inclusão de ciprofloxacina em  $\beta$ -CD já foram relatados experimentalmente na literatura (AITHAL et al., 1996; CHAO et al., 2004) sendo caracterizados por meio de técnicas apropriadas evidenciando que a orientação preferencial é a F-in, o que foi confirmado também aqui. Em segundo lugar, comparando as estabilidades dos complexos com  $\alpha$ -,  $\beta$ -, e  $\gamma$ -ciclodextrina, pode-se observar que, de acordo com a Tabela 4, o complexo com  $\beta$ -CD é de fato o mais estável. Este resultado está de acordo com um estudo recente de RAJENDIRAN et al (2016) em que as estabilidades relativas de uma série de agentes antimicrobianos com fluoroquinolonas  $\alpha$ - e  $\beta$ -ciclodextrina foram calculados usando o mesmo método semiempírico usado aqui: PM3. Os autores observaram que, entre os seis complexos estudados, a  $\beta$ -CD/CIP (ciprofloxacina) é o mais estável, seguido por  $\alpha$ -CD/CIP (ciprofloxacina),  $\beta$ -CD/SPA (esparfloxacina),  $\alpha$ -CD/OFL (ofloxacina),  $\beta$ -CD/OFL (ofloxacina) e  $\alpha$ -CD/SPA (esparfloxacina). Esta referência não considera a  $\gamma$ -ciclodextrina, mas os nossos resultados indicaram que, no caso da ciprofloxacina, o complexo seria menos estável sendo a  $\beta$ -CD considerada a melhor para a complexação do fármaco escolhido. Os resultados teóricos sugerem que considerando os valores energéticos calculados pelos métodos semi-empíricos, a provável encapsulação da ciprofloxacina acontece na orientação do anel não aromático inserido na cavidade para a  $\beta$ -CD.

---

---

## **6. Conclusões**

---

---

- Avaliação das condições de síntese, principalmente por espectroscopia de infravermelho mostrou que dependendo das condições, a reação de diisocianato de 1,6 hexametileno (HDI) com água pode ocorrer numa extensão considerável, gerando moléculas terminadas em amina capazes de reagir com grupos isocianato e levando a predominância dos segmentos de poliureia onde a incorporação de grupos fosfato foi prejudicado neste caso.
- O aquecimento por microondas para a realização da síntese do polímero do ácido glicerosfórico foi favorecida na reação de HDI usando como precursor o fosfato, obtendo-se pré-polímeros capazes de reagir ainda com  $\beta$ -ciclodextrina ( $\beta$ -CD) e formar poliuretano (PU) ternários.
- O PUs ternários na forma ácido glicerosfórico (H-GLIC) foram escolhidos para o estudos, em diferentes proporções do fármaco e foi analisado diferentes técnicas de caracterização (FTIR-TG\DTG-DRX-DSC) a mais importante para a formação e confirmação do complexo de inclusão foi a de DSC. Foi possível verificarmos a interação do polímero com a ciprofloxacina (fármaco), e que houve a complexação com a cavidade da  $\beta$ -CD.
- A utilização de fenolftaleína (FF) como sonda, nos nosso estudo mostrou que as massas crescentes dos polímeros podem verificar que quanto maior a massa do polímero menor é absorção da FF no sobrenadante, indicando que a formação de complexos de inclusão foi bem sucedida.
- O efeito das interações com o perfil de liberação do fármaco não conduziu a uma prolongamento significativo do tempo de liberação, mas reduziu o efeito da liberação observada para o fármaco livre. Avaliação dos polímeros preparados a partir de ácido glicerosfórico (H-GLIC) e do glicerosfosfato de cálcio (Ca-GLIC) mostraram que em ambos os casos, a liberação do fármaco atingiu um patamar até 90% de liberação do fármaco, que é ligeiramente menor do que a do fármaco livre para a mesma hora (97%).
- A utilização da técnica da ressonância magnética de  $C^{13}$  foi muito importante para nosso estudo, pois mostrou que tanto os precursores usados individualmente como a incorporação destes no polímero propriamente dito foram confirmados nos sinais característicos do polímero.

- A modelagem molecular nos mostrou que a  $\beta$ -CD é a molécula mais estável para a complexação do fármaco.

---

## **7. Perspectivas para Trabalhos Futuros**

---

- Estudar outras incorporações na cavidade da  $\beta$ -CD para saber o comportamento do novo material polimérico;
- Estudar a utilização da enzima fosfatase alcalina no polímero e verificar se realmente ela faz hidrólise nas cadeias de fosfato liberando o fósforo (P);
- Realizar estudos de liberação desses íons em ambiente biológico;
- Propor uma nova rota de sinterização para cada uma das amostras onde a criação do novo material polimérico seja ainda mais inovador.

---

---

## **8. Referências Bibliográficas**

---

---

- AITHAL, K. S., UDUPA, N. "Physicochemical study of ciprofloxacin with  $\beta$ -cyclodextrin", *Pharmacy and Pharmacology Communications*, v. 2, pp. 451-455, 1996.
- ALLINGER, N., YUH, Y. H., LII, J. H. "Molecular mechanics - the MM3 force-field for hydrocarbons", *Journal of the American Chemical Society*, v. 111, pp. 8551-8566, 1989.
- ANSARI, K. A., VAVIA, P. R., TROTTA, F., CAVALLI, R. "Cyclodextrin-based nanosponges for delivery of resveratrol: in vitro characterisation, stability, cytotoxicity and permeation study", *American Association of Pharmaceutical Scientists*, v. 12, pp. 279-286, 2011.
- ARAUJO, M. V. G., MACEDO O. F. L., NASCIMENTO C. C., CONEGERO, L.S., BARRETO, L. S., ALMEIDA, L. E., COSTA-JR, N. B., GIMENEZ, I. F. "Characterization, phase solubility and molecular modeling of  $\alpha$ -cyclodextrin/pyrimethamine inclusion complex.", *Spectrochimica. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 72, pp. 165-170, 2009.
- BECKMAN, E. J., HOLLINGER, J. O., DOLL, B. A., GUELCHER, S. A., ZHANG, J. (2015). *Biodegradable polyurethanes and uses thereof*. US patent. US20150093821 A1.
- BELLO, D., SMITH, T. J., WOSKIE, S. R., STREICHER, R. P., BOENIGER, M. F., REDLICH, C. A., LIU, Y. "An FTIR investigation of isocyanate skin absorption using in vitro guinea pig skin", *Journal of Environmental Monitoring*, v.8, pp. 523–529, 2006.
- BERTAUI, M., JORG, G. "Saccharides as efficacious solubilisers for highly lipophilic compounds in aqueous media". *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 12, pp. 2973–2983, 2004.
- BHASKAR, M., ARUNA, P., JEEVAN, R. J. G. " $\beta$ -Cyclodextrin-polyurethane polymer as solid phase extraction material for the analysis of carcinogenic aromatic amines", *Analytica Chimica Acta*, v. 509, pp. 39–45, 2004.
- BISWAS, A., APPEL, M., LIU, Z., CHENG, H. N. "Microwave-assisted synthesis of cyclodextrin polyurethanes", *Carbohydrate Polymers*, v. 133, pp. 74-79, 2005.

- BLAGDEN, N., DE MATAS, M., GAVAN, P.T., YORK, P. “Crystal engineering of active pharmaceutical ingredients to improve solubility and dissolution rates”, *Advanced. Drug Delivery Reviews*, v. 59, pp. 617–630, 2007.
- BROOKS, B. D., SINCLAIR, K. D., GRAINGER, D. W., BROOKS, A. E. “A Resorbable Antibiotic-Eluting Polymer Composite Bone Void Filler for Perioperative Infection Prevention in a Rabbit Radial Defect Model”, *Plos One*, v. 10, pp. 1-19, 2015.
- BURKE, A., HASIRCI, N. “Polyurethanes in biomedical applications”, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 553, pp. 83-101, 2004.
- Cauich-Rodríguez, J. V., Chan-Chan, L. H., Hernandez-Sánchez, F., Cervantes-Uc, J. M. (2013). Degradation of Polyurethanes for Cardiovascular Applications. *Advances in Biomaterials Science and Biomedical Applications*, pp. 51-82.
- CAZEDEY, E. C. L., SALGADO, H. R.N. “Spectrophotometric determination of ciprofloxacin hydrochloride in ophthalmic solution”, *Advances in Analytical Chemistry*, v. 2, pp. 74-79, 2012.
- CHAO, J., MENG, D., LI, J., XU, H., HUANG, S. “Preparation and study on the novel solid inclusion complex of ciprofloxacin with HP- $\beta$ -cyclodextrin”, *Spectrochimica. Acta, Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 60, pp. 729-734, 2004.
- CHERNG, J. Y., HOU, T. Y., SHIH, M. F., TALSMA, H., HENNIK, W. E. “Polyurethane-based drug delivery systems”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 450, pp. 145–162, 2013.
- CHORILLI, M., DE MATOS, R. C., TSUKAMOTO, J., DE OLIVEIRA, A. G., SCARPA, M. V. “Efeitos de complexos moleculares com b-ciclodextrina e hidroxipropil-b-ciclodextrina na solubilidade da cafeína”, *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, pp.141-144, 2007.
- CHUNG, C. H., GOLUB, E. E., FORBES, E., TOKUOKA, T., SHAPIRO, I. M. “Mechanism of Action of  $\beta$ -Glycerophosphate on Bone Cell Mineralization”, *Calcified Tissue International*, v. 51, pp. 305-311, 1992.

- CRINI, G. “Recent developments in polysaccharide-based materials used as adsorbents in wastewater treatment”, *Progress in Polymer Science*, v. 30, pp. 38–70, 2005.
- CUNHA-FILHO, M. S. S., SÁ-BARRETO, L. C. L. “Utilização de ciclodextrinas na formação de complexos de inclusão de interesse farmacêutico”, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, pp. 1-9, 2007.
- DA RÓZ, A. L., CURVELO, A. A. S., GANDINI, A. “Preparation and characterization of cross-linked starch polyurethanes”, *Carbohydrate Polymers*, v. 77, pp. 526, 2009.
- DAVIS, M. E., BREWSTER, M. E. “Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future”, *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, pp. 1023-1035, 2004.
- DEL VALLE, E. M. “Ciclodextrinas and their uses: a review”, *Process Biochemistry*, v. 39, pp. 1033–1046, 2004.
- DÉSÉVAUXA, C., DUBREUIL, P., LENAERTS, V. “Characterization of crosslinked high amylose starch matrix implants 2. In vivo release of ciprofloxacin”, *Journal of Controlled Release*, v. 82, pp. 95–103, 2002.
- DODGE, J., 2003, *Polyurethanes and Polyureas*. In: *Synthetic Methods in Step-Growth Polymers*. 1 ed., New York, John Wiley & Sons.
- DODZIUK, H., 2006, *Cyclodextrin and Their Complexes – Chemistry, Analytical Methods, Applications*. 1 ed., Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- DONG, G. C., SUN, J. S., YAO, C. H., JIANG, G. J., HUANG, C. W., LIN, F. H. “A study on grafting and characterization of HMDI-modified calcium hydrogenphosphate”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 3179–3189, 2001.
- ECAROT-CHARRIER, B., GLORIEUX, F. H., VAN DER REST M., PEREIRA, G. “Osteoblasts isolated from mouse calvaria initiate matrix mineralization in culture”, *The Journal of Cell Biology*, v. 96, pp. 639-643, 1983.
- EGYED, O. “Spectroscopic studies on  $\beta$ -cyclodextrin”, *Vibrational Spectroscopy*, v. 1, pp. 225–227, 1990.
- ÉHEN, Z., GIORDANO, F., SZTATISZI, J., JICSINSZKY, L., NOVÁK, C. S. “Thermal characterization of natural and modified cyclodextrins using TG-MS

- combined technique'', *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 80, pp. 419–424, 2005.
- FONTANANOVA, E., DI PROFIO, G., CURCIO, E., GIORNO, L., DRIOLI, E. "Functionalization of polymeric membranes by impregnation and in situ cross-linking of a PDMS/ $\beta$ -cyclodextrin network", *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 57, pp. 537–543, 2007.
- FORTUNA, R., ANDERSON, H. C., CARTY, R. P., SAJDERA, S. W. "Enzymatic characterization of the matrix vesicle alkaline phosphatase isolated from bovine fetal epiphyseal cartilage", *Calcified Tissue International*, v. 30, pp. 217–225, 1980.
- FRATZL-ZELMAN, N., FRATZE, P., HORANDER, H., GRABNER, B., VARGA, F., ELLINGER, A., KLAUSHOFER, K. "Matrix mineralization in MC3T3-E1 cell cultures initiated by  $\beta$ -glycerophosphate pulse", *Bone*, v. 23, pp. 511–520, 1998.
- GAO, Z., PENG, J., ZHONG, T., SUN, J., WANG, X., YUE, C. "Biocompatible elastomer of waterborne polyurethane based on castor oil and polyethylene glycol with cellulose nanocrystals", *Carbohydrate Polymers*, v. 87, pp. 2068–2075, 2012.
- GARCIA, M. G., "Síntesis de ciclodextrinas multivalente y evaluación de sus propiedades como sistemas transportadores de fármaco", *Tese de doutorado*, Departamento de Química Orgánica, Universidad de Sevilla, 2005.
- GARCIA-ZUBIRI, I. X., GONZÁLEZ-GAITANO, G., ISASI, J. R. "Isosteric heats of sorption of 1-naphtol and phenol from aqueous solutions by  $\beta$ -cyclodextrin polymers", *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 307, pp. 64–70, 2007.
- GIBAS, I., JANIK, H. "Review: synthetic polymer hydrogels for biomedical applications", *Chemistry & Chemical Technology*, v. 4, pp. 297–304, 2010.
- GIODARNO, F., NOVAK, C., MOYANO, J. R. "Thermal analysis of cyclodextrins and their inclusion compounds", *Thermochim Acta*, v. 380, pp. 123–151, 2001.
- GRANERO, G. E., MAITRE, M. M., GARNERO, C. LONGHI, M. R. "Synthesis, characterization and in vitro release studies of a new acetazolamide-HP- $\beta$ -CD-

- TEA inclusion complex”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, pp. 464-470, 2008.
- GUASTALDI, A. C., APARECIDA, A. H. “Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos”, *Química Nova*, v. 33, pp. 1352-1358, 2010.
- HALPERN, J. M., GORMLEY, C. A., KEECH, M. A., VON RECUM, H. A. “Thermomechanical properties, antibiotic release, and bioactivity of a sterilized cyclodextrin drug delivery system”, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, pp. 2764–2772, 2014.
- JAUDOUIN, O., ROBIN, J-J., LOPEZ-CUESTA, J-M., PERRIN, D., IMBERT, C. “Ionomer-based polyurethanes: a comparative study of properties and applications”, *Polymer International*, v. 61, pp. 495–510, 2012.
- KAKATI, D., GEORGE, M. H. “Polyurethane ionomers containing phosphate groups”, *Polymer*, v. 34, pp. 4319–4324, 1993.
- KHAN, A. R., FORGO, P., STINE, K. J., D’SOUZA, V. T. “Methods for selective modifications of cyclodextrins”, *Chemical Reviews*, v. 98, pp. 1977-1996, 1998.
- KUBOTA, D., MACEDO, O. F. L., ANDRADE, G. R. S., CONEGERO, L. S., ALMEIDA, L. E., COSTA-JR, N. B., GIMENEZ, I. F. “Structural and theoretical-experimental physicochemical study of trimethoprim/randomly methylated- $\beta$ -cyclodextrin binary system”, *Carbohydrate Research*, v. 346, pp. 2746-2751, 2011.
- LAURO, M. R., CARBONE, C., AUDITORE, R., MUSUMECI, T., SANTAGATI, N. A., AQUINO, R. P., PUGLISI, G. “A new inclusion complex of amlodipine besylate and soluble  $\beta$ -cyclodextrin polymer: preparation, characterization and dissolution profile”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 76, pp. 19–28, 2013.
- LEPRETRE, S., CHAI, F., HORNEZ, J.-C. , VERMET, G., NEUT, C., DESCAMPS, M., HILDEBRAND, H. F., MARTEL, B. “Prolonged local antibiotics delivery from hydroxyapatite functionalised with cyclodextrin polymers”, *Biomaterials*, v. 30, pp. 6086-6093, 2009.

- LI, X., ZHI, F., HU, Y. "Investigation of excipient and processing on solid phase transformation and dissolution of ciprofloxacin International", *Journal of Pharmaceutics*, v. 328, pp. 177–182, 2007.
- LOFTSSON, T., BREWSTER, M. E. "Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization", *Journal Pharmaceutical Sciences*, v. 85, pp. 1017-1025, 1996
- LOFTSSON, T., MASSON, M. "The effects of water-soluble polymers on cyclodextrins and cyclodextrin solubilization of drugs", *Journal of Drug Delivery Science Technology*, v. 14, pp. 35-43, 2004.
- MACEDO, O. F. L., ANDRADE, G. R. S., CONEGERO, L. S., BARRETO, L. S., COSTA-JR, N. B., GIMENEZ, I. F., ALMEIDA, L. E., KUBOTA, D. "Physicochemical study and characterization of the trimethoprim/2-hydroxypropyl- $\gamma$ -cyclodextrin inclusion complex.", *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 86, pp. 101-106, 2012.
- MACOCINSCHI, D., FILIP, D., VLAD, S., TUCHILUS, C. G., CRISTIAN, A. F., BARBOIU, M. "Polyurethane/ b-cyclodextrin/ ciprofloxacin composite films for possible medical coatings with antibacterial properties", *Journal of Materials Chemistry B*, v.2, pp.681–690, 2014.
- MAKELA, M. J., KORPELA, T. K., PUISTO J., LAAKSO, S. V. "Nonchromatographic Cyclodextrin Assays: Evaluation of Sensitivity, Specificity, and Conversion Mixture Applications", *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 36, pp. 83-88, 1988.
- MANTEGNA, S., BINELLO, A., BOFFA, L., GIORGIS, M., CENA, C., CRAVOTTO, G. "A one-pot ultrason-assisted water extraction/cyclodextrin encapsulation of resveratrol from *Polygonum cuspidatum*", *Food Chemistry*, v. 130, pp. 746-750, 2012
- MARCOS, X., PEREZ-CASAS, S., LLOVO, J., CONCHERO, A., ALVAREZ-LORENZO, C. "Poloxamer-hydroxyethyl cellulose-a-cyclodextrin supramolecular gels for sustained release of griseofulvin", *International Journal of Pharmaceutics* v. 500, pp. 11–19, 2016.

- MARTIN, D. J., WARREN, L. A. P., GUNATILLAKE, P. A. McCARTHY, S.J., MEIJS, G. F., SCHINDHEL, M. K., “New methods for the assessment of in vitro and in vivo stress crackling in biomedical polyurethanes”, *Biomaterials*, v. 22, pp. 973-978, 2001.
- MOCANU, G., VIZITIU, D., CARPOV, A. “Cyclodextrin polymers”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 16, pp. 315-342, 2001.
- MODI, S., ANDERSON, B. D. “Determination of Drug Release Kinetics from Nanoparticles: Overcoming Pitfalls of the Dynamic Dialysis Method”, *Molecular Pharmaceutics*, v. 10, pp. 3076–3089, 2013.
- MOHAMED, M. H., WILSON, L. D., HEADLEY, J. V. “Estimation of the surface accessible inclusion sites of b-cyclodextrin based copolymer materials”, *Carbohydrate Polymers*, v. 80, pp. 186–196, 2010.
- MOHAMED, M. H., WILSON, L. D., HEADLEY, J. V., PERU, K. M. “Investigation of the sorption properties of b-cyclodextrin-based polyurethanes with phenolic dyes and naphthenates”, *Journal of Colloid and Interface Science* v. 356, pp. 217–226, 2011.
- MORIWAKI, C., MAZZER, C., PAZZETTO, R., MATIOLI, G. “Produção, purificação e aumento da performance de ciclodextrina glicosiltransferases para produção de ciclodextrinas”, *Química Nova*, v. 9, pp. 2360-2366, 2009
- OLIVEIRA, R., SANTOS, D., COELHO, P. “Ciclodextrinas: formação de complexos e sua aplicação farmacêutica”, *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde*. Porto: Edições Universidade Fernando Pessoa, v. 6, pp. 70-83, 2009.
- ORGOVANYI, J., POPPL, L., OTTA, K. H., LOVA, G. A. “Thermoanalytical method for studying the guest content in cyclodextrin inclusion complexes”, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 81, pp. 261–266, 2005.
- PATRICK, G. L., 1995, An introduction to medicinal chemistry. New York: Oxford University Press.
- RAJENDIRAN, M., MOHANDOSS, T., THULASIDHASAN, J. “Encapsulation of ciprofloxacin, sparfloxacin, and ofloxacin drugs with  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrins:

- spectral and molecular modelling studies”, *Physics and Chemistry of Liquids: An International Journal*, v. 54, pp. 193-212, 2016.
- RIBEIRO, L.; CARVALHO, R.; FERREIRA, D & VEIGA, F. “Multicomponentes complexes formation between vipocetine, cyclodextrins, tartaric acid and watersoluble polymers monitored by NMR and solubility studies”. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 1, pp 1-13, 2005.
- ROBINSON, R., ROSENHEIM, A. H. “Calcification of hypertrophic cartilage in vitro”, *Biochemical Journal*, v. 28, pp. 684-698, 1934.
- ROCHA, G. B., FREIRE, R. O., SIMAS, A. M., STEWART, J. J. P. “RM1: A reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I”, *Journal of Computational Chemistry*, v. 27, pp. 1101-1111, 2006.
- SALIPIRA, K. L., KRAUSE, R. W., MAMBA, B. B., MALEFETSE, T. J., CELE, L. M. DURBACH, S. H. “Cyclodextrin polyurethanes polymerized with multi-walled carbon nanotubes: Synthesis and characterization”, *Materials Chemistry and Physics*, v. 111, pp. 218–224, 2008.
- SHIDE, S., SALVE, A.V. “Experimental Evaluation of Tensile Strength and Young’s Modulus of Woven Jute fiber and Polyurethane Composite”, *International Journal of Engineering Research*, v, 4, pp. 446-449, 2015.
- SINGH, M., SHARMA, R., BANERJEE, U. C. “Biotechnological applications of cyclodextrins”, *Biotechnology Advances*, v. 20, pp. 341-359, 2002.
- SIVRIEV, H., GEORGIEV, S., BORISSOV, G. “Phosphorus-containing polyurethanes, prepared by modification”, *European Polymer Journal*, v. 26, pp. 73-76, 1990.
- SONG, L. X., TENG, C. F., YANG, Y. “Preparation and characterization of the solid inclusion compounds of  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclodextrin with phenylalanine (D-, L- and DL-Phe)”, *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, v. 54, pp. 221- 232, 2006.
- STEWART J. J. P. “Optimization of parameters for semiempirical methods V: Modification of NDDO approximations and application to 70 elements”, *Journal of Molecular Modeling*, v. 13, pp. 1173-1213, 2007.

- SZEJTLI, J. "Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry", *Chemical Reviews*, v. 98, pp. 1743–1754, 1998.
- SZYCHER, M., 1999, *Handbook of Poliurethanes*, 1 ed. New York, CRC Press.
- TEJASHRI, G., AMRITA, B., DARSHANA, J. "Cyclodextrin based nanosponges for pharmaceutical use: A review", *Acta Pharmaceutica*, v. 63, pp. 335–358, 2013.
- TENENBAUM, H. C., HEERSCHKE, J. N. M. "Differentiation of osteoblasts and formation of mineralized bone in vitro", *Calcified Tissue International*, v. 34, pp. 76-79, 1982.
- UYAR, T., BESENBACHER, F. "Elektrospinning of Cyclodextrin Functionalized Polyethylene Oxide (PEO) Nanofibers", *European Polymer Journal*, v. 45, pp. 1032-1037, 2009.
- VASCONCELOS, D. A., KUBOTA, T., SANTOS, D. C., ARAUJO, M. V. G., TEIXEIRA, Z., GIMENEZ, I. F. "Preparation of Au<sub>n</sub> quantum clusters with catalytic activity in  $\beta$ -cyclodextrin polyurethane nanosponges", *Carbohydrate Polymers*, v. 136, pp. 54–62, 2016.
- VELENCOSO, M. M., GUTIERREZ, C., RAMOS, M. J., GARCIA-MARTINEZ, J. C., DE LUCAS, A., RODRIGUEZ, J. E. "Production of polyether polyols using phosphate calcium salt", *Journal of Macromolecular Sciences Part A: Pure and Applied Chemistry*, v. 48, pp. 569–576, 2011.
- VERMETTE, P., GRIESSER, H. J., LAROCHE, G., GUIDOIN, R., 2001, *Biomedical Applications of Polyurethanes*. 1 ed., Austin Texas, Eureka.com.
- VERRON, E., KHAIROUN, I., GUICHEUX, J., BOULER, J. M. "Calcium phosphate biomaterials as bone drug delivery systems: a review", *Drug discovery today*, v. 15, pp. 547-552, 2010.
- VILLAR, W. D., *Química e tecnologia dos poliuretanos*, 1999, 2ª ed, Rio de Janeiro, Vilar Consultoria Técnica LTDA.
- XIE, A., ZHANG, M., INOUE, S. "Influence of diisocyanate on polyurethane elastomers which crosslinked by  $\beta$ -cyclodextrin", *Open Journal of Organic Polymer Materials*, v. 6, pp. 99-111, 2016.

- WANG, L., STEGEMANN, J. P. “Thermogelling Chitosan and Collagem Composite Hydrogels initiated with  $\beta$ -Glycerophosphate for Bone Tissue Engineering”, *Biomaterials*, v. 31, pp. 3976-3985, 2010.
- ZAMBITO, Y., PEDRESCHI, E., DI COLO, G. “Is dialysis a reliable method for studying drug release from nanoparticulate systems? A case study”, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 434, pp. 28– 34, 2012.
- ZHANG, J-Y., DOLL, B. A., BECKMAN, E. J., HOLLINGER, J-O. “Three-Dimensional Biocompatible Ascorbic Acid-Containing Scaffold for Bone Tissue Engineering”, *Tissue Engineering*, v. 9, pp. 1143–1157, 2003.
- ZHANG, S., REN, Z., HE, S., ZHU, Y., ZHU, C. “FTIR spectroscopic characterization of polyurethane-urea model hard segments (PUUMHS) based on three diamine chain extenders”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 66, pp. 188–193, 2007.
- ZHANG, X., ZHANG, Y., ZHONG, D. “Investigation and physicochemical Characterization of Clarithromycin-Citric Acid-Cyclodextrins Ternary Complexes”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 33, pp. 163-171, 2007.
- ZHOU, J., RITTER, H. “Cyclodextrin functionalized polymers as drug delivery systems”. *Polymer Chemistry*, v. 1, pp.1552-1559, 2010.
- ZHOU, Z., JIANG, J. G. “Detection of ibuprofen and iprofloxacin by solid-phase extraction and uv/vis spectroscopy”, *Journal of Applied Spectroscopy*, v. 79, pp. 459-464, 2012.
- ZIA, K., M., BARIKANI, M., ZUBER, M. , BHATTI, I., A., SHEIKH, M., A. “Molecular engineering of chitin based polyurethane elastomers”, *Carbohydrate Polymers*, v. 74, pp. 149–158, 2008.