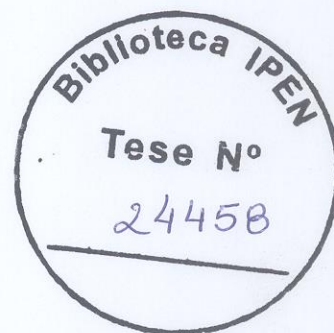




Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Síntese, Caracterização e Citotoxicidade de Hidrogéis Poliméricos
Para Imobilização de Fármaco Empregado no Tratamento de
Leishmaniose**

MARIA JOSÉ ALVES DE OLIVEIRA



**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear-Materiais.**

**Orientador:
Dr.^a. Duclerc Fernandes Parra**

**SÃO PAULO
2008**



Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**Síntese, Caracterização e Citotoxicidade de Hidrogéis Poliméricos
Para Imobilização de Fármaco Empregado no Tratamento de
Leishmaniose**

MARIA JOSÉ ALVES DE OLIVEIRA

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciências na Área
de Tecnologia Nuclear Materiais.**

**Orientador:
Dr^a Duclerc Fernandes Parra**

**SÃO PAULO
2008**

A meus pais, Maria do Carmo e Geraldo por terem me ensinado a ter perseverança para alcançar meus objetivos. A meus irmãos, Maria da Guia e Marcos pelo apoio e incentivo. E as minhas filhas, Ana Cláudia, Aline e Andréia, razão maior da minha vida.

“Eterno, é tudo aquilo que dura uma fração de segundo, mas com tanta intensidade, que se petrifica e nenhuma força jamais o resgata”.

(Carlos Drummond de Andrade)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter iluminado meu caminho e guiado os meus passos, e por assim permanecer na grande jornada que ainda tenho pela frente.

A minha orientadora Dr^a. Duclerc Fernandes Parra pela confiança, pelo incentivo, pela amizade e pela orientação.

Ao Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares (IPEN/CNEN-SP) pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida.

A Empresa Brasileira de Radiações (EMBRARAD) pela irradiação das matrizes de hidrogéis.

Ao Sr. Eleosmar Gasparin do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN/CNEN-SP pelas análises térmicas.

A Sizie O. Rogero do Centro de Química e Meio Ambiente (CQMA) do IPEN/CNEN-SP pelas análises de citotoxicidade.

Ao Sr. Celso Vieira do Centro de Ciência e Tecnologia dos Materiais do IPEN/CNEN-SP, pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Ao Dr. Valdir Sabbaga Amato da Divisão de Clínica de Moléstias Infecciosas e Parasitárias de HC-FMUSP pelo fornecimento das ampolas de Glucantime e pelo interesse de colaborar com o projeto.

Aos meus amigos do CQMA: Adriana Napoleão, Cláudia Tomiyama, Cláudia Felinto, Camila, Edson Takeshi, Geise Ribeiro, Heloisa Zen, Harumi Otaguro, Henrique Perez, João Batista, Josiane Zini, Jorge Vaz, José Pereira, Liana Key, Luis Filipe, Luiz Cláudio Stopa, Mitiko Myamura, Nelson Bueno, Pedro Forter, Pedro Vicente, Patrícia

Ponce, Paula Paganini, Rodrigo Shinzato, Tamiris Oliveira, Washington Oliani, pelo carinho e o apoio que recebo desde que cheguei ao IPEN.

Aos meus amigos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, em especial: a Elisangela Sousa, Flávia Motta, Kelly Leme, Júlio Carreiro, Silvia Boffa, Vilmária Aparecida e Willian Linn, pelo apoio e acima de tudo pelo carinho, incentivo e amizade.

Ao Dr. Ademar Benévolo Lugão por sua colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho e pela oportunidade de participar do grupo de Polímeros.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas.....	xv
Resumo	xvii
Abstract	xviii
1 – INTRODUÇÃO.....	1
2 – OBJETIVOS	3
3 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 Polimerização e reticulação	4
3.1.1 Poli(álcool vinílico) (PVAL)	6
3.1.2 Poli(N-vinil-2-pirrolidona)	8
3.1.3 Poli(glicol etilênico)	9
3.5 Membranas de hidrogéis poliméricos.....	11
3.6 Síntese de hidrogéis poliméricos	13
3.6.1 Processo de reticulação por irradiação ionizante de fonte gama..	13
3.6.2 Processo de reticulação térmica	14
3.6.3 Processo de reticulação química	15
3.7 Sistemas de liberação de fármaco	16
3.8 Leishmaniose	20
3.8.1 As características do gel apropriado para liberação desejada no tratamento cutâneo da leishmania.	21
3.8.2 Antimoniatos pentavalentes (Glucantime).....	22
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Materiais utilizados para reticulação por radiação gama, química térmica.....	24
4.2 Métodos	24
4.2.1 Preparo da solução para síntese das membranas	24
4.2.2 Reticulação por radiação ionizante	24

4.2.3 Reticulação Térmica	25
4.2.3.1 Formulação PVAI / PVP / PEG	25
4.2.3.2 Formulação PVAI / PEG	25
4.2.4 Reticulação Química	26
4.2.4.1 Formulação PVAI / PVP / Ácido cítrico	26
4.2.4.2 Formulação PVAI /1,5% PEG / Ácido cítrico	26
4.3 - MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	26
4.3.1 Intumescimento	26
4.3.2 Fração gel	27
4.3.3 Termogravimetria TGA	27
4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial DSC	27
4.3.5 Citotoxicidade	28
4.3.6 Infravermelho IR	29
4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV	29
4.3.8 Espectrofotômetro UV-visível	29
4.3.9 Curva padrão de calibração para identificação de antimônio.....	29
4.3.9.1 Procedimento	29
4.3.10 Liberação de Fármaco.....	30
4.3.11 Formulação empregadas nas sínteses dos hidrogéis PVAI e PVA.....	31
5 – RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1 Reticulação gama PVAI+PVP+Ágar + PEG	32
5.1.1 Intumescimento	32
5.1.2 Fração gel	33
5.1.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)	33
5.1.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)	36
5.1.5 Análise de infravermelho (IR)	37
5.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	38
5.1.7 Membranas de Hidrogéis	39
5.1.8 Citotoxicidade	39

5.2 - RETICULAÇÃO TÉRMICA PVAI+PVP+PEG	40
5.2.1 Intumescimento	40
5.2.2 Fração gel	41
5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA).....	42
5.2.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	43
5.2.5 Análise de infravermelho (IR).....	44
5.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
5.2.7 Membranas de hidrogéis obtidas por síntese térmica	46
5.2.8 Citotoxicidade	46
5.3 RETICULAÇÃO TÉRMICA PVAI+PEG COM ESTERILIZAÇÃO.....	47
5.3.1 Intumescimento	47
5.3.2 Fração gel	48
5.3.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)	49
5.3.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	51
5.3.5 Análise de Infravermelho (IR).....	52
5.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	53
5.3.7 Membranas de hidrogéis de PVAI + PEG obtidas por ciclos térmicos.....	53
5.3.8 Citotoxicidade	54
5.4 – RETICULAÇÃO QUÍMICA PVAI+PVP+ÁCIDO CÍTRICO.....	54
5.4.1 Intumescimento	55
5.4.2 Fração gel	55
5.4.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)	56
5.4.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	57
5.4.5 Análise de infravermelho (IR).....	59
5.4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	60
5.4.7 Matrizes de hidrogéis PVP+PVAI+Ácido cítrico	61
5.4.8 Citotoxicidade	61
5.5 - RETICULAÇÃO QUÍMICA PVAI+PEG+ÁCIDO CÍTRICO.....	62
5.5.1 Intumescimento	62

5.5.2 Fração gel	63
5.5.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA).....	63
5.5.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	65
5.5.5 Análise de infravermelho (IR).....	67
5.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	68
5.5.7 Matrizes de hidrogel químico	68
5.5.8 Citotoxicidade	69
5.5.9 Liberação do glucantime.....	69
5.5.9.1 Absorbância, desvio padrão e concentração das membranas de hidrogéis.....	71
6 CONCLUSÃO	74
7 PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS.....	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 - Reação de hidrólise do PVAc em meio alcoólico/alcálico (alcoólise).....	7
FIGURA 2 - Tautomeria entre o álcool vinílico e acetaldeído.....	7
FIGURA 3 - Reação de obtenção de PVP.....	8
FIGURA 4 - Estrutura dos radicais de PVP produzidos por radiação ionizante.....	9
FIGURA 5 - Fórmula estrutural do poli(glicol etilênico).....	9
FIGURA 6 - Radicais de PEG formados a partir de radiação ionizante em água.....	10
FIGURA 7 - Segmento de cadeia de um hidrogel sendo submetido ao intumescimento (A) antes e (B) depois.....	12
FIGURA 8 - Reticulação intermolecular das cadeias do polímero em solução.....	14
FIGURA 9 - A estrutura tri-dimensional reticulada do hidrogel por ciclos térmicos representação dos cristalitos	14
FIGURA 10 - Diagrama esquemático da possível reação de esterificação do PVAI com o ácido cítrico	16
FIGURA 11 - Comparação entre o sistema de liberação controlada de fármaco e o sistema de administração por dose convencionais.....	17
FIGURA 12 - Configurações macromoleculares dos polímeros hidrofílico durante processo de dissolução do nanofármaco nos sistemas matriciais[60] (adaptado de Narasimhan e Peppas, 1997).....	19
FIGURA 13 - Lesão cutânea causada por Leishmania.....	21
FIGURA 14 - Fórmula molecular do Glucantime.....	23
FIGURA 15 - Curva de calibração do Sb (V).....	30
FIGURA 16 - Resultado de intumescimento das matrizes de hidrogéis de PVAI + PVP + Ágar obtidas por radiação gama dose 25 kGy/h, variando-se a concentração de PEG.....	32
FIGURA 17 - Curvas de termogravimetria (TGA) das matrizes de hidrogéis PVP + PVAI +Ágar variando a concentração de PEG, obtidos por irradiação gama dose 25 kGy.....	34
FIGURA 18 - Curvas de DTGA das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP+Ágar variando-se a concentração de PEG.....	35

FIGURA 19 - DSC das matrizes de hidrogéis PVAI / PVP / Ágar obtidas por radiação gama com dose de 25kGy variando-se a concentração de PEG.....	36
FIGURA 20 - Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis obtidas por radiação gama 25 kGy.....	38
FIGURA 21 - Micrografia em MEV superfície de fratura (2000x) das membranas de hidrogel PVAI+PVP (A) 0,5% PEG e (B) 2,0% PEG.....	38
FIGURA 22 - Membranas de hidrogéis PVAI+PVP (A) 0,5 % de PEG (B) 2,0 % PEG	39
FIGURA 23 - Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.....	39
FIGURA 24 - Curva de intumescimento das matrizes de hidrogéis obtidas por ciclo térmico compostas de PVAI+PVP variando-se a concentração de PEG	40
FIGURA 25 - Curvas TGA dos hidrogéis obtidos por ciclo térmico PVAI+PVP variando-se a concentração de PEG	42
FIGURA 26 - Curvas de DTGA dos hidrogéis obtidos por ciclo térmico PVAI+PVP variando-se a concentração de PEG	42
FIGURA 27 - Curvas DSC das matrizes de hidrogéis de PVAI + PVP obtidos ciclos térmico variando a concentração de PEG.....	44
FIGURA 28 - Espectros de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis obtidas por ciclo térmico variando-se a concentração de PEG....	45
FIGURA 29 - Micrografias em MEV da superfície de fraturadas matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação térmica PVAI+PVP variando-se a concentração de PEG (A) 0,5% (B) 2,0%	45
FIGURA 30 - Fotos das matrizes de hidrogéis sintetizada com PVP+PVAI+PEG por ciclos térmicos.....	46
FIGURA 31 - Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro, obtidas por ciclos térmicos.....	46
FIGURA 32 - Curvas de intumescimento em água das matrizes de hidrogel de PVAI com diferentes concentrações de PEG (A) antes da esterilização (B). Após esterilização.....	47
FIGURA 33 - TGA curvas de hidrogéis de PVAI / PEG: (A) hidrogéis antes da esterilização (B) Hidrogéis esterilizados.....	50

- FIGURA 34 - (A)** Gráfico DTGA das matrizes de hidrogéis PVAI variando-se a concentração de PEG (B) Após esterilização gama 25 kGy.....50
- FIGURA 35 - (A)** Curvas DSC PVAI matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação térmica, variando a porcentagem de PEG (B) Esterilizado por radiação gama 25 kGy.....51
- FIGURA 36 -** Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis obtidos por ciclo térmico variando a concentração de PEG.....52
- FIGURA 37 -** Micrografias em MEV da superfície de fratura das membranas de hidrogéis PVAI+PEG obtidas por reticulação térmica variando-se a concentração de PEG (A) 0,5 % (B) 2,0%53
- FIGURA 38 -** Membranas de hidrogéis PVAI obtidas por reticulação térmica variando-se a concentração de PEG.....53
- FIGURA 39 -** Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.....54
- FIGURA 40 -** Curvas de intumescimento da matriz de PVAI + PVP variando-se a concentração de ácido cítrico.....55
- FIGURA 41 -** Resultado de análise química de hidrogéis PVAI / PVP / PVAI+PVP+2,0 e 4,0% de ácido cítrico.....56
- FIGURA 42 -** Curvas de derivadas DTGA.....57
- FIGURA 43 -** Curvas DSC primeira fusão PVP + PVAI variando-se a porcentagem de ácido cítrico.....58
- FIGURA 44 -** Mecanismo que ocorre na reticulação do PVAI envolvendo o ácido cítrico.....59
- FIGURA 45 -** Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas das hidrogéis obtidos por reticulação química variando a concentração do ácido cítrico.....60
- FIGURA 46 -** Micrografia em MEV da superfície de fratura para as matrizes de hidrogéis PVAI+PVP variando-se a concentração de ácido cítrico (A) 0,5% (B) 2,0%61
- FIGURA 47 -** Fotos das matrizes de hidrogéis PVP+PVAI+Ácido cítrico, obtidos por reticulação química (A) Antes do intumescimento (B) Após o intumescimento.....61

FIGURA 48 - Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.....	62
FIGURA 49 - Curva de intumescimento das matrizes de hidrogéis de PVAI + PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.....	63
FIGURA 50 - Curvas de TGA das matrizes de hidrogéis PVAI+ 1,5% de PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.....	64
FIGURA 51 - DTGA das matrizes de hidrogéis PVAI+ 1,5% de PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.....	64
FIGURA 52 - Curvas de DSC das matrizes de hidrogéis PVAI + 1,5% de PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.....	66
FIGURA 53 - Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis obtidos por PVAI+ 1,5% PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.....	67
FIGURA 54 - Micrografia em MEV superfície de fratura (2000x) das matrizes de hidrogéis PVAI + 1,5% de PEG variando-se a concentração de ácido cítrico (A) 0,5% (B) 2,0%	68
FIGURA 55 - Hidrogel PVAI + PVP + 1,5% PEG + ácido cítrico (A) 2,0% (B) 3,0 % ..	68
FIGURA 56 - Curvas de viabilidade celular pela incorporação do vermelho neutro das matrizes de hidrogéis PVAI+1,5% PEG, obtidas por reticulação química variando-se a concentração de ácido cítrico,	69
FIGURA 57 - Curvas da liberação do glucantime das matrizes de hidrogéis obtidas pelo processo químico, gama e térmico.....	70

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados de absorvâncias relativas à variação da concentração de Sb (V) na solução padrão.....	30
TABELA 2 - Formulações utilizadas nas sínteses dos hidrogéis de PVAI e PVP obtidas por reticulação gama, processo térmico e reticulação gama.....	31
TABELA 3 - Fração gel (%) das matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação gama, dose 25 kGy variando-se a concentração de PEG.....	33
TABELA 4 - Resultados da perda de massa, resíduo e T_{onset} das matrizes de hidrogéis reticuladas por radiação gama, com dose de 25 kGy variando-se a concentração do PEG	35
TABELA 5 - As principais bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de hidrogéis poliméricos PVA+PVP+PEG.....	37
TABELA 6 - Porcentagem (%) da fração de gel das matrizes de hidrogéis PVAI + PVP conforme a variação da concentração (%) de PEG, obtidas por reticulação térmica.....	41
TABELA 7 - Apresenta os valores de T_{onset} e o teor de resíduos das membranas de hidrogéis reticuladas por ciclos térmicos 25 kGy.....	43
TABELA 8 - Valores de fração gel das matrizes de hidrogel composto de PVAI variando a concentração de PEG, obtidas por reticulação térmica.....	49
TABELA 9 - Valores de T_{onset} e os resíduos das matrizes de hidrogéis obtidos por reticulação térmica esterilizados e não esterilizados,.....	49
TABELA 10 - Resultados da T_m das matrizes de hidrogéis antes e depois da esterilização por radiação gama dose 25 kGy.....	51
TABELA 11 - Bandas de infravermelho encontradas nas matrizes PVA+PVP.....	52
TABELA 12 - Fração gel em porcentagem (%) das matrizes de hidrogel obtidas por reticulação química.....	56
TABELA 13 - Resultados T_{onset} , perda de massa e resíduo das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP+ácido cítrico, obtidos por reticulação química.....	57
TABELA 14 - Apresenta os valores de T_m das matrizes de hidrogéis PVP+PVAI + ácido cítrico	58

TABELA 15 - São apresentadas as principais bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de hidrogéis PVA+PVP variando-se a concentração de ácido cítrico.....	60
TABELA 16 - Apresenta a fração gel em porcentagem (%) das matrizes de hidrogéis PVAI + 1,5% de PEG variando a concentração de ácido cítrico, obtidas por reticulação Química.....	63
TABELA 17 - T_m e perda de massa das membranas de hidrogéis.....	65
TABELA 18 - Apresenta os valores dos picos de fusão (T_m) para os hidrogéis reticulação química PVAI+1,5% PEG variando-se o ácido cítrico.....	66
TABELA 19 - Apresenta as principais bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de hidrogéis PVA+1,5% PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.	67
TABELA 20 - Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por reticulação química PVAL+PVP+ 2,0% de ácido cítrico, comprimento de onda 500 nm.....	71
TABELA 21 - Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por reticulação gama PVAI+PVP+Ágar+ 0,5% PEG, comprimento de onda 500 nm.....	72
TABELA 22 - Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por processo térmico PVAI+PVP+2,0% PEG comprimento de onda 500 nm.....	72
TABELA 23 - Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por processo térmico PVAI+ 2,0% PEG, comprimento de onda 500 nm.....	73

Síntese, Caracterização e Citotoxicidade de Hidrogéis Poliméricos Para Imobilização de Fármaco Empregado no Tratamento de Leishmaniose

Maria José Alves de Oliveira

RESUMO

Hidrogéis foram obtidos a partir de Poli(N-2-vinil pirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(glicol etilênico) (PEG). Os processos de obtenção foram: 1) Processo de irradiação gama utilizando fonte de ^{60}Co , 2) processo de reticulação física a partir de ciclos térmicos de resfriamento e aquecimento 3) reticulação por esterificação química em presença de ácido cítrico e ácido clorídrico como catalisador. Os hidrogéis obtidos foram caracterizados por técnicas de Termogravimetria (TGA), Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), fração gel, grau de intumescimento, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e citotoxicidade por teste de vermelho neutro. Processos diferentes de obtenção mostraram que hidrogéis de PVAI/PVP resultam em diferentes características e que a presença de PEG é essencial para as propriedades da membrana. O comportamento de citotoxicidade demonstrou similaridade com as curvas de controle negativo indicando que as matrizes não apresentam toxicidade. Maior estabilidade térmica foi observada nas membranas obtidas pelos processos de reticulação por irradiação gama e reticulação por agente químico como demonstrado no deslocamento das temperaturas de decomposição do PVAI associado a maior estabilidade do retículo formado. A imobilização do glucantime foi realizada nas membranas que apresentaram maior reticulação obtidas pelos diferentes processos. A liberação do fármaco foi verificada no período de 24 horas constatando-se diferença de cinéticas entre as membranas. As características físico-químicas como a integridade, homogeneidade, intumescimento e citotoxicidade demonstram que as membranas sintetizadas possuem qualidades apropriadas de hidrogéis capazes de liberar fármacos em aplicações biomédicas.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND CITOXICITY OF POLYMERIC HYDROGELS FOR USE TO IMOBILIZATION AND DRUG RELEASE ON LEISHMANIOSE TREATMENT

Maria José Alves de Oliveira

ABSTRACT

Hydrogels were obtained with poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP), poly(vinyl alcohol) (PVAI) and poly(ethylene glycol) (PEG). The process of obtention was: 1) irradiation process using ^{60}Co gamma source, 2) Crystallizing process of freezing/thawing thermal cycles, and 3) crosslink by chemical reaction with citric acid in chloride acid as a catalyses. The hydrogels obtained were characterized by thermogravimetry Analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC), gel content, swelling, scanning electronic microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) e and citotoxicity by neutral red test. Different processes showed the PVAI/PVP hydrogels have distinct characteristics and the presence of PEG is essential to the membranes properties. Citotoxicity behavior was similar to negative control curves indicating that matrices have not toxicity. Higher thermal stability was observed in membranes obtained by gamma and chemical process was showed in displacement of PVAI decomposition temperature associated to higher crosslink stability. Glucantime immobilization was done in membranes that showed higher crosslinking obtained by different processes. Drug delivery was observed in period of 24 hours and similar results were achieved. The different processes of PVAI/PVP hydrogels have performed PEG. The characteristics of homogeneity, integrity, no citotoxicity and swelling of the systemized membranes are qualities of suitable hydrogels for drug delivery and biomedical applications.

1 – INTRODUÇÃO

As modificações estruturais em polímeros têm sido de grande interesse tanto comercial quanto científico para obtenção de novos materiais para uso farmacêutico e biomédico. Essas modificações podem ser obtidas na presença de um agente reticulante ou adicionando-se um segundo polímero por emprego de radiação gama [1-2-3], ou reticulação física pelo processo de ciclos térmicos por congelamento e descongelamento [4-5-6], reticulação por agente químico [7-8-9-10], ou radiação de feixe de elétrons [11-12-13], efeito fenton [14] e radiação no ultravioleta [15].

Hidrogéis, ou géis contendo água, são polímeros caracterizados por sua hidrofilicidade e insolubilidade em água. Em meio aquoso, esses hidrogéis intumescem (ou incham) até um volume de equilíbrio, mas preservam seu formato original. A hidrofilicidade é devida à presença de grupos solúveis em água como: $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-SO_3H$, entre outros presentes na cadeia polimérica [16].

A insolubilidade e a estabilidade destes géis são devidas à presença de uma rede tridimensional. O intumescimento resulta de um balanço entre as forças de dispersão atuando nas cadeias hidratadas e as forças coesivas devido às ligações covalentes cruzadas. Outras interações características também estão presentes, entre elas as interações eletrostáticas e de dipolo-dipolo [17] tornando-se o grau e a natureza das ligações cruzadas responsáveis por suas características no estado intumescido. As propriedades mecânicas dos hidrogéis dependem principalmente da rigidez original das cadeias poliméricas, do tipo de retículo, da densidade das ligações cruzadas e do intumescimento como resultado do balanço hidrofílico e hidrofóbico [18].

O desenvolvimento dos hidrogéis como biomateriais começou em 1940 quando se descobriu que esse material por causa da sua hidrofilicidade poderia ser utilizado para a substituição de tecidos orgânicos ou para outras aplicações biomédicas [18]. Recentemente descobriu-se que esses hidrogéis são excelentes suportes para liberação de droga e macromoléculas bioativas, surgindo assim a idéia do Sistema de Liberação Controlada, um conceito promissor que deverá substituir as técnicas convencionais do uso de drogas (comprimidos, injeções e pulverizações) [19]. Foi em decorrência do sucesso dessas

propriedades e de suas avançadas aplicações que, nos últimos 40 anos, pesquisadores de renome como Nikolaos Peppas, Janusz Rosiak, Edward Merrill, Robert Langer, Michael Sefton, Joseph Kost e Richard Korsmeyer, entre outros, voltaram seus estudos para esse campo.

Seguindo nesta mesma linha de pesquisa e com base em trabalhos da literatura, a proposta deste trabalho é preparar hidrogéis a base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), poli(álcool vinílico) (PVAI) e poli(glicol etilênico) (PEG). Os hidrogéis serão obtidos por três diferentes processos.

Uma aplicação potencial de membranas é sobre superfície cutânea em tecidos lesados. A Leishmaniose cutânea é causada por um protozoário do gênero *Leishmania* transmitida por mosquitos flebotomídeos, clinicamente é caracterizado por febre prolongada, palidez, emagrecimento e feridas de difícil cicatrização na pele. Vários reservatórios têm sido identificados, na área urbana o cão é a principal fonte de infecção; no ambiente silvestre destacam-se as raposas e os marsupiais. O homem insere-se no ciclo epidemiológico como hospedeiro eventual, mas em áreas epidêmicas pode ser considerado reservatório, podendo ocorrer a transmissão homem-vetor-homem, sem necessidade dos canídeos [20].

De acordo com o Dr. Valdir S. Amato responsável pelo Laboratório de Doenças Parasitárias do Hospital das Clínicas – Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo (HC-FMUSP), para a tentativa de liberação controlada de fármaco em aplicação cutânea a membrana deve possuir as seguintes características: maciez, flexibilidade e uma liberação lenta do fármaco.

2 – OBJETIVOS

O trabalho tem por objetivo principal a síntese dos hidrogéis a partir do poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), poli(álcool vinil) (PVAI), poli(glicol etilênico) (PEG), por métodos distintos: processo de radiação, por reação química e por processo físico.

As características desses hidrogéis como: intumescimento, fração gel, temperatura de decomposição, temperatura de fusão (T_g), citotoxicidade, entre outras serão determinadas após a reticulação por irradiação gama, por reticulação química e processo térmico e estabelecendo-se suas distinções.

Uma prévia seleção será feita entre as matrizes de hidrogéis sintetizadas que apresentem as características de flexibilidade, maciez e elevada fração gel para incorporação de antimoniato (V) na matriz.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

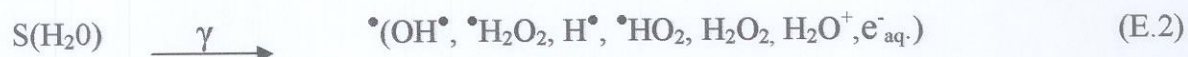
3.1 Polimerização e reticulação

A interação da radiação ionizante com composto orgânico produz, principalmente, espécies excitadas, cátions, ânions e radicais livres. Quando os polímeros são irradiados estas espécies formadas podem ficar aprisionadas por algum tempo causando transformações denominadas efeitos pós-irradiação.

A maior parte do estudo dos efeitos da radiação sobre polímeros leva em conta apenas as reações subseqüentes à formação de radicais livres [21], sendo que os sistemas de polimerização estudados estão centrados nos monômeros que sofrem reação de polimerização ou nos polímeros que sofreram modificação por radiação [22]. A radiação ionizante em materiais orgânicos, geralmente, contendo carbonos quaternários na cadeia principal tende a degradá-los por reações de cisão enquanto que os demais tendem a formar radicais facilitando as reações de reticulação.

O processo de polimerização via radical livre induzido por radiação ionizante envolve as etapas de iniciação (E.1 a 3), propagação (E.4 a 6) e terminação (E.7 e 8), segundo o esquema [23]:

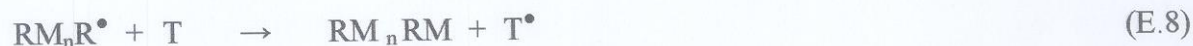
1) Iniciação.



2) Propagação



3) Terminação



Onde: R^\bullet = radical livre de iniciação

M = monômero

RM_n^\bullet = cadeia intermediária propagando-se

n = equivale às várias repetições dos monômeros

T = inibidor (ou terminador)

T^\bullet = radical não propagador

S = Solvente aquoso

Este processo pode levar à formação de uma estrutura reticulada. As reações de terminação ocorrem com um radical intermediário e um radical livre iniciador, ou entre dois radicais intermediários ou ainda entre espécies radicalares oxidadas. Durante a irradiação de polímeros outras reações ocorrem como; cisão de cadeias poliméricas, formação de duplas ligações, enxertia e recombinação de radicais formados entre outras. Para reduzir o efeito inibidor do oxigênio molecular nas reações via radical livre os monômeros devem ser irradiados em atmosfera isenta de O_2 de preferência inerte (N_2). Quando a água, o componente de maior fração nos sistemas aquosos, sofrendo radiólise produz espécies radicalares como OH^\bullet , $^\bullet H_2O_2$, H^\bullet , $^\bullet HO_2$, H_2O_2 , H_2O^+ , e^-_{aq} que participam de reações com as cadeias poliméricas.

De modo geral, alguns polímeros quando submetidos à radiação ionizante na cadeia principal tendem a degradar e/ou reticular [24]. A ligação cruzada ocorre entre cadeias poliméricas longas por meio de ligações covalentes geradas por tratamento químico ou radiação, podendo formar uma rede. Na reticulação as moléculas poliméricas se ligam quimicamente formando uma única molécula, de massa molar média maior. No processo de reticulação por radiação, se o polímero for irradiado por tempo considerável o material eventualmente, tornar-se-à uma molécula gigante. As alterações físicas provenientes da reticulação incluem aumento da temperatura de transição vítrea. Ocorrem

pouca ou quase nenhuma alteração física para a fase cristalina. Há efeitos importantes em altas temperaturas (acima da fusão do polímero).

Com respeito aos mecanismos propostos para a reticulação podemos citar a ocorrência dos seguintes fenômenos: cisão de cadeias, migração de radicais e reação de grupos não saturados. A quebra de ligação de uma cadeia polimérica com a formação de um átomo de hidrogênio, seguido da retirada de um segundo átomo de hidrogênio de uma molécula próxima provoca a formação de hidrogênio molecular (H_2), (E.8; E.9). Dois radicais poliméricos (macrorradicais) podem combinar-se formando uma reticulação (E.7).



As reações de grupos não saturados com o átomo de hidrogênio para formar radicais poliméricos (macrorradicais), favorecem a recombinação de dois (E.10).



Estes processos podem ocorrer de forma individual ou concomitantemente. Apesar de nenhuma destas explicações ser completamente aceita, admite-se que, para cada excitação ou ionização, são formados um radical polimérico e um átomo de hidrogênio. Alguns desses átomos de hidrogênio, devido a sua energia cinética, produzem radicais poliméricos secundários. Pares de radicais adjacentes, formados pela radiação ou por átomos de hidrogênio, podem unir-se formando macrorradicais [25].

A modificação de polímeros tem sido de grande interesse tanto comercial quanto científico [26]. Dentre esses polímeros destacam-se o Poli(álcool vinil) (PVAI), Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e Poli(glicol etilênico) (PEG) por apresentarem ótimas características físico-químicas e biocompatibilidade com tecidos vivos[27].

3.1.1 Poli(álcool vinílico) (PVAI)

A modificação química de polímeros é uma estratégia bastante usada para se obter polímeros com propriedades específicas para determinadas aplicações. Um exemplo clássico da modificação química de polímeros é o poli(álcool vinílico) (PVAI), que em razão da aplicação industrial é obtido com diferentes graus de hidrólise, o que depende da porcentagem dos grupos acetato do poli(acetato de vinila) (PVAc), de partida, figura 1[28].

A estrutura molecular do PVAI é muito simples, a unidade monomérica possui uma hidroxila como grupo pendente. O polímero é sintetizado a partir da hidrólise do poli(acetato de vinila) (PVAc). Devido ao equilíbrio tautomérico do álcool secundário o polímero não é isento de uma pequena quantidade de aldeído correspondente [29], figura 2.

O grau de hidrólise afeta diretamente a solubilidade do PVAI em água. Quanto maior o grau de hidrólise maior solubilização em água. No intervalo de grau de hidrólise de 85-95% a solubilização é possível de 20 a 40 °C. Grupos acetatos residuais enfraquecem as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares possibilitados por hidroxilas, nesse caso a temperatura de dissolução será acima de 70 °C.

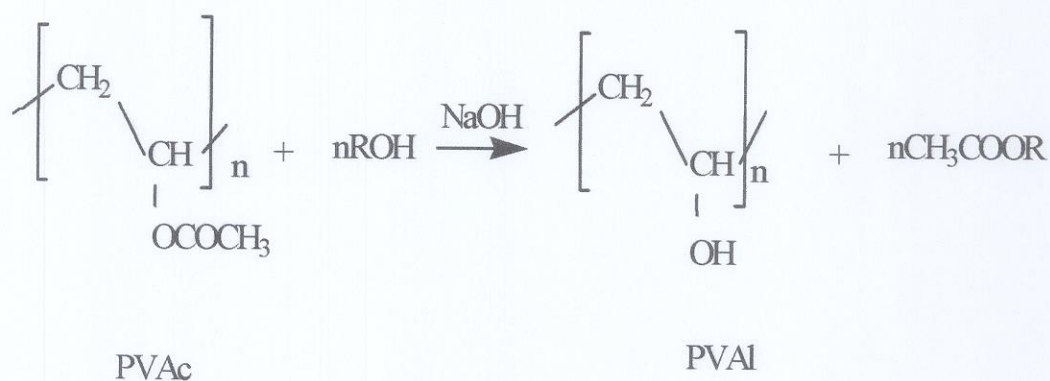


FIGURA 1 – Reação de hidrólise do PVAc em meio alcoólico/alcalino (alcoólise).

São encontrados na literatura vários estudos feitos [30, 31] relacionados a investigação do efeito da radiação gama por ^{60}Co nas propriedades físicas do PVAI em fibras, hidrogéis e filmes irradiados em solução aquosa.

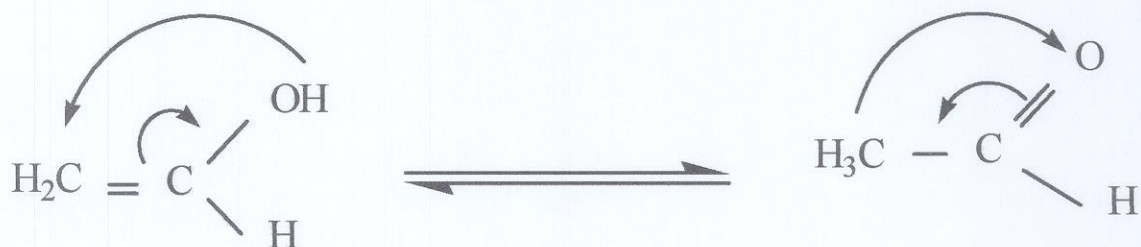


FIGURA 2 - Tautomeria entre o álcool vinílico e acetaldeído.

A preparação por processo físico de hidrogéis de PVAI em solução aquosa, por congelamento e descongelamento, vem sendo investigada para aplicações farmacêuticas e biomédicas, por ser isento de subprodutos durante a reticulação, o que contribui com menor toxicidade do hidrogel considerando-se também a sua biocompatibilidade com tecidos vivos [32].

3.1.2 Poli(N-vinil-2-pirrolidona)

Poli(N-vinil-2-pirrolidona) também conhecido por polivinilpirrolidona PVP, é um homopolímero sintético que foi obtido por *Reppe* e colaboradores no início da 2ª Guerra a partir da polimerização da amida cíclica N-vinil-2-pirrolidona. O PVP é sintetizado por meio da polimerização em cadeia, geralmente, via radical livre, em soluções aquosas com iniciação química. O PVP é um pó branco, solúvel em água e altamente polar e que possui características anfóteras [33]. Estas características são indispensáveis em um hidrogel [34]. A figura 3 apresenta a reação de obtenção de PVP.

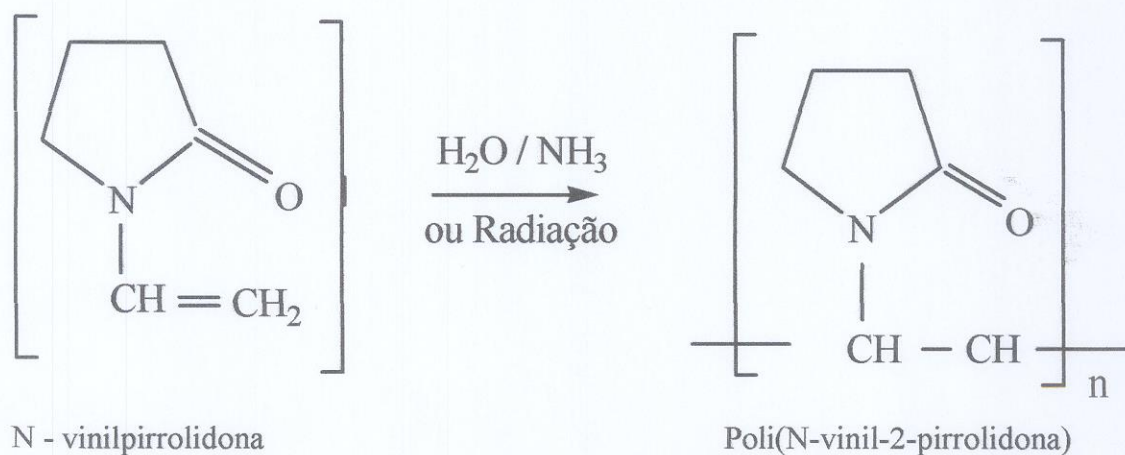


FIGURA 3 - Reação de obtenção de PVP [33].

Devido à característica estrutural anfipática (macromolécula que apresenta uma região hidrofílica), possuindo grupos metilênicos hidrófobos e grupos amídicos hidrófilos, o PVP é solúvel em muitos solventes orgânicos e água na qual forma ligação de hidrogênio nos grupos imida [34].

O PVP é utilizado, em cosméticos devido a suas propriedades emulsivas, de espessamento, por ser emoliente e solubilizante, em produtos têxteis aumentando a capacidade de tingimento em fibras hidrófobas, em bebidas fermentadas como clarificante, em produtos farmacêuticos como expensor do volume de plasma. Também é utilizado, em sistemas liberadores de drogas atuando como retardante de absorção em medicamentos injetáveis (antibióticos e hormônios), curativos, aglutinantes em cápsulas, implantes de cartilagem, pele artificial, córnea artificial, lentes de contato e implantes cardiovasculares.

O PVP em solução aquosa sob radiação ionizante sofre influência principalmente da ação dos radicais OH^\bullet sendo desprezível a influência dos $\text{e}^-_{(\text{aq})}$ (elétrons aquosos) e dos radicais H^\bullet (espécies produzidas na radiólise da água). As estruturas prováveis dos macrorradicais de PVP obtidos pela abstração de hidrogênio pelos radicais hidroxílicos (OH^\bullet) são mostradas na figura 4.



FIGURA 4 - Estrutura dos radicais de PVP produzidos por radiação ionizante [33].

3.1.3 Poli(glicol etilênico)

O poli(glicol etilênico) (PEG), é um homopolímero termoplástico, obtido pela polimerização catalítica do óxido de etileno. É uma resina branca caracterizada pela fórmula estrutural, mostrada na figura 5.

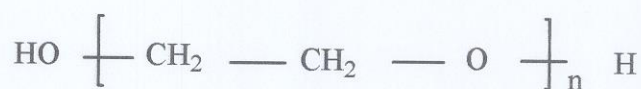


FIGURA 5 - Fórmula estrutural do poli(glicol etilênico).

As resinas obtidas a partir do óxido de etileno são apresentadas com uma ampla variedade de massas molares, sendo classificadas como poli(glicol etilênico), as que possuem massa molar média inferior a 10^5 e como poli(óxido de etileno), as que possuem massas molares médias acima deste valor.

O poli(glicol etilênico) é solúvel em água e em vários solventes orgânicos, particularmente em hidrocarbonetos clorados à temperatura ambiente. A viscosidade de suas soluções depende de sua concentração, da massa molar média e, acentuadamente, da temperatura.

O poli(glicol etilênico) tem baixo grau de toxicidade (LD_{50} em ratos > 30 mg/kg) não causando irritação nem sensibilidade à pele. PEG com massa molar inferior a 1000 é absorvido no intestino e excretado por meio das fezes e urina. A absorção intestinal decresce com o aumento da massa molar.

O PEG é utilizado em embalagens para alimentos, em adesivos, produtos de limpeza, ácidos, detergentes, lubrificantes, tintas, na indústria de cosméticos, na indústria têxtil, na indústria farmacêutica, borrachas, hidrogéis, sol-gel [35]. Por ser facilmente modificado quimicamente, baixo custo e a mais interessante entre todas as propriedades do PEG é certamente a sua elevada solubilidade em água.

Na presença de água e, preferencialmente, na ausência de oxigênio molecular nas reações via radical livre, alguns monômeros devem ser irradiados em atmosfera inerte (isenta de O_2). A radiação ionizante produz radicais hidroxilas ($\cdot\text{OH}$) e hidrogênio ($\text{H}\cdot$) proveniente da água que atacam as cadeias de PEG aleatoriamente, criando radicais nos átomos de carbono, vizinhos ao oxigênio, como é mostrado na figura 6.



FIGURA 6 - Radicais de PEG formados a partir de radiação ionizante em água [35].

O poli(glicol etilênico) exerce o papel de plastificante em membrana hidrofílica à base de PVP, proporcionando uma maior flexibilidade e extensibilidade, facilitando o manuseio da membrana. Segundo a comissão de Nomenclatura da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), um plastificante é uma substância ou material incorporado a outro material (geralmente um plástico ou elastômero), para aumentar sua flexibilidade, trabalhabilidade ou extensibilidade e resistência ao impacto. O plastificante reduz a viscosidade da substância fundida e diminui a sua temperatura de transição de segunda ordem, bem como, o módulo de elasticidade.

Os plastificantes são moléculas geralmente monoméricas não voláteis, ou polímeros de baixa massa molar, líquidos em sua maioria, que quando misturadas com polímeros polares, ou que formem ligações de hidrogênio, posicionam-se entre as ligações intermoleculares e aumentam o espaço entre as ligações adjacentes. Estas moléculas devem ser polares ou formar ligações de hidrogênio. O resultado desta ação é uma diminuição na resistência das forças intermoleculares, ou seja, diminui a força coesiva entre as cadeias poliméricas, decrescendo a resistência mecânica e aumentando a flexibilidade [34]. O PEG pode ser considerado um plastificante primário ou químico, pois existem forças de atração do PEG com o PVP e PVAI.

3.5 Membranas de hidrogéis poliméricos

A história do desenvolvimento dos hidrogéis como biomateriais começou em 1940, quando o PMMA - Poli(Metacrilato de metila) substituiu o vidro na fabricação de lentes rígidas, devido a suas propriedades ópticas, inatividade fisiológica, dureza e facilidade de processamento. Nos anos 60, o pHEMA surgiu como um material candidato para a manufatura de lentes de contato gelatinosas [36]. Por sua vez, surgiram outros polímeros que apresentaram características semelhantes como o PVAI, PVP, PEG, entre outros.

Em 1976, Langer e Folkman [37] mostraram que macromoléculas como os polipeptídios podiam ser liberadas a partir de matrizes de hidrogéis de pHEMA (HYDRON[®]) e de PVAI, embora os tempos de liberação com essas matrizes fossem bem menores comparados à liberação de proteínas, a partir de copolímeros de etileno acetato de vinila.

Um ano depois, Peppas e Merrill [38-39] sintetizaram um material, PVAI reticulado por meio de radiação com feixe de elétrons, que tinha a capacidade de simular tecido natural e prevenir a coagulação sanguínea. Os hidrogéis de PVAI foram escolhidos por possuir tensão superficial baixa e facilidade em se ligar covalentemente à heparina (substância que atua como anti-coagulante). Possíveis aplicações para esse material foram sugeridas, tais como biomembranas para transporte seletivo de macromoléculas, devido à sua estrutura na forma de rede e à sua capacidade de modificar os tamanhos desta quando as condições de irradiação forem variadas.

As membranas hidrofílicas à base de poli(n-vinil-2-pirrolidona) (PVP) são conhecidas por sua inércia química e propriedades adequadas a aplicações biomédicas. Membranas desse tipo foram patenteadas por Rosiak et al. [40] e são comercializadas desde 1990. Elas apresentam em sua composição: poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP), poli(glicol etilênico) (PEG) e ágar.

Membranas hidrofílicas à base de hidrogéis apresentam potencialidades para aplicações nas mais diversas áreas, destacando-se entre elas a área biomédica. São membranas compostas por sistemas poliméricos reticulados ou entrelaçados [41], ou por um copolímero enxertado, em que um deles forma o esqueleto principal e o outro uma ramificação [42], com capacidade de reter grande quantidade de água ou fluidos biológicos. Membranas hidrofílicas caracterizam-se pela capacidade de se expandir pela absorção de água. Se forem totalmente desidratadas podem intumescer até o estado de equilíbrio e retornar a sua função em forma original. Esta é uma propriedade essencial apresentada pelos hidrogéis, que permite a sua utilização como interfaces biocompatíveis com uma ampla variedade de aplicações [43], além da molhabilidade e permeabilidade a substâncias biologicamente ativas.

As interações positivas fortes entre a estrutura química do polímero e a água, como por exemplo: ligações de hidrogênio aumentam a força responsável pelo intumescimento. Quando a água penetra no polímero, as cadeias poliméricas que, na maioria dos casos estão em uma conformação de equilíbrio são esticadas, o que é ilustrado esquematicamente pela figura 7.

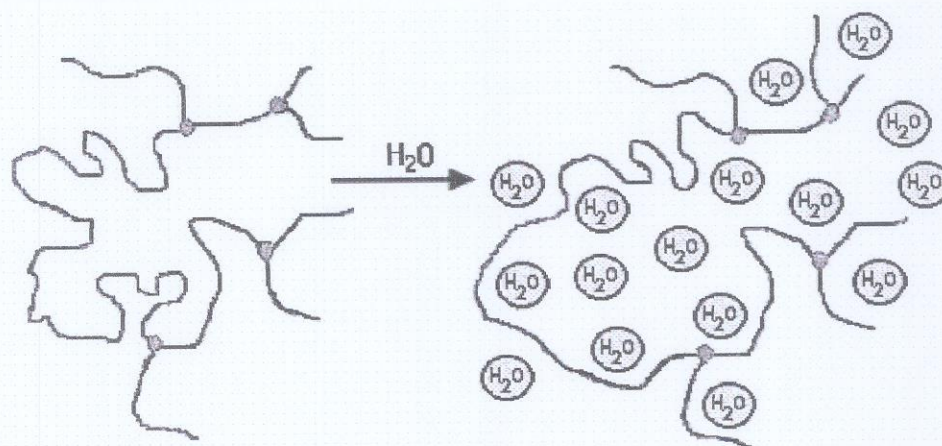


FIGURA 7 - Segmento de cadeia de um hidrogel sendo submetido ao intumescimento (A) antes e, (B) depois [43].

Uma vez que as cadeias sejam alongadas a configuração que, inicialmente, se encontrava em equilíbrio (situação a) é natural que sofra uma força resistiva. Assim, a força osmótica que promove a entrada de água no sistema é contrabalanceada pela força das cadeias poliméricas que resistem à expansão. Neste ponto, o intumescimento será alcançado. Quanto maior a reticulação, maior será a força de resistência que as cadeias exercerão para se alongar. Conseqüentemente, sistemas altamente reticulados demonstram baixo grau de intumescimento.

Membranas hidrofílicas à base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) e poli(álcool vinílico) (PVAI) são conhecidas por sua inércia química e propriedades biomédicas adequadas, sendo utilizadas como recobrimento em ferimentos de queimaduras, próteses vasculares, membranas artificiais cartilaginosas para hemodiálise, uso veterinário, na agricultura, liberação de fármaco, entre outras aplicações [4].

3.6 – Síntese de hidrogéis poliméricos

3.6.1 Processo de reticulação por irradiação gama

As modificações causadas por radiação ionizante em polímeros dependem das condições de processamento, ou seja, tipo de radiação, presença de oxigênio ou diferentes atmosferas, aditivos, solventes, grau de cristalinidade e homogeneidade do material polimérico que irá absorver a energia, etc. Os equipamentos de uso industrial utilizam a radiação γ proveniente principalmente do ^{60}Co .

Em alguns sistemas físicos pode formar malhas que são emaranhados de cadeias juntas por dois pontos, figura 8. Se as condições desse sistema o permitem a irradiação das cadeias, então, há probabilidade de recombinação de radicais formando uma reticulação química. Uma vez formados esses radicais eles precisam se aproximar para haver combinação formando a reticulação química [12].

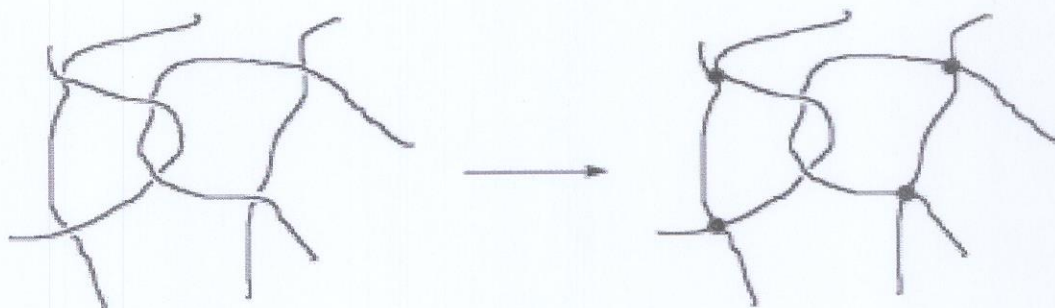


FIGURA 8 - Reticulação intermolecular das cadeias do polímero em solução [44].

3.6.2 Processo de reticulação térmica

A solução aquosa de PVA pode dar origem a hidrogéis resistentes por reticulação térmica, processo físico que consiste em ciclos térmicos de congelamento e descongelamento. Este procedimento resulta na formação dos cristalitos que servem como ligações físicas tornando o material insolúvel na água. As vantagens principais destes hidrogéis fisicamente reticulados de PVAI são: atoxicidade, não carcinogenese e ótima biocompatibilidade e praticidade de obtenção. Entretanto, como tais materiais são semicristalinos, a presença de um segundo polímero pode causar mudanças significativas na morfologia conduzindo a um aumento do inchamento quando em contato com soluções aquosas ou fluidos biológicos [28], figura 9.



FIGURA 9 – A estrutura tri-dimensional reticulada do hidrogel obtida por ciclos térmicos [28], representação dos cristalitos.

3.6.3 Processo de reticulação química

Hidrogéis obtidos por síntese química, em geral, envolvem reações de esterificação a partir de álcoois poliméricos. Os ácidos carboxílicos reagem com álcoois para formar ésteres por meio de uma reação de condensação conhecida como esterificação.

As reações de esterificação são catalisadas por ácidos. Elas se desenvolvem muito lentamente na ausência de ácidos fortes, mas alcançam o equilíbrio em poucas horas quando um ácido carboxílico e um álcool são refluxados com pequenas quantidades, por exemplo, de ácido sulfúrico ou ácido clorídrico. A reação catalisada controla a quantidade de éster formado [45].

Para que haja reticulação entre cadeias de polímeros, pelo menos uma condição deve ser satisfeita, ou seja, o agente reticulante deve ter, no mínimo, dois grupos funcionais disponíveis [46]. Exemplo da reticulação química está ilustrado na figura 10.

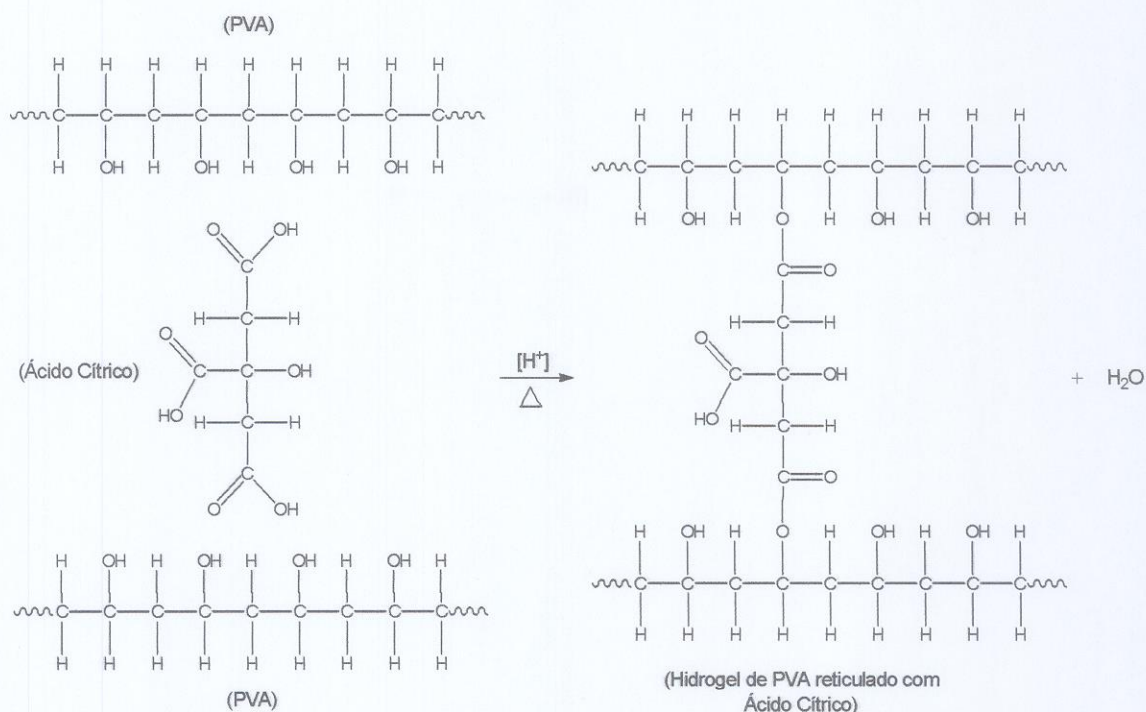


FIGURA 10 – Diagrama esquemático da possível reação de esterificação do PVAI com o ácido cítrico.

3.7 Sistemas de liberação de fármaco

Há um corrente interesse em materiais nanoestruturados devido ao seu potencial em várias áreas científicas e tecnológicas, como catálise, materiais ortopédicos, liberação controlada de fármacos e bioencapsulação. Hoje em dia, este interesse envolve novos métodos de preparação muito interessantes, como por exemplo, a formação de nanopartículas sólidas a partir da liofilização de dispersões de polifosfato de alumínio, em meio aquoso, utilizando componentes de sistemas estritamente inorgânicos [47, 48].

Neste contexto, a utilização destes sistemas em liberação controlada de fármacos envolve um vasto campo de estudos e tem reunido muitos esforços, atualmente, na área de nanopartículas, nanogéis e hidrogéis.

Estes esforços estão representados pelas novas estratégias para a veiculação de ingredientes ativos [49], os quais incluem aplicações importantes da ciência de polímeros sintéticos e naturais e de soluções de surfactantes e o preparo de espécies coloidais, administração de vacinas de DNA [50-51], além da utilização de técnicas transdérmicas [52]. Este empenho por parte de pesquisadores do mundo todo se justifica, pois sistemas de

liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos [53]. Nas formas de administração convencionais (spray, injeção, pílulas) a concentração da droga na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Como cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica.

O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser visualizado na Figura 11.

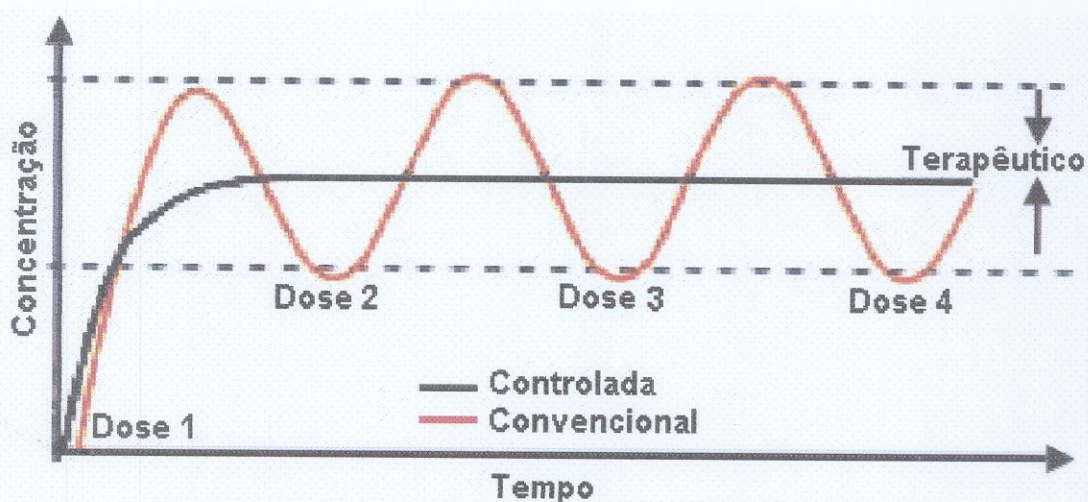


FIGURA 11 – Comparação entre o sistema de liberação controlada de fármaco e o sistema de administração por dose convencional [54].

A nanotecnologia tem representado um importante avanço no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos, devido a facilidades de atingir o alvo específico (tumor) sem provocar danos às outras células vizinhas [55-56].

Atualmente diversos estudos têm sido desenvolvidos em nanociência para encapsulamento de fármacos em formas diminutas a finalidade que atinjam alvos de ações

sem serem percebidos pelo sistema imunológico. O termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a dois tipos de estruturas diferentes, nanoesferas e nanocápsulas em dimensões menores que $0,1 \mu\text{m}$ [57].

Os métodos de preparação das nanopartículas poliméricas são baseados na polimerização *in situ* ou precipitação de polímeros pré-formados. Esses carreadores são nanoagregados matriciais (nanoesferas) ou vesiculares (nanocápsulas). As propriedades de liberação dessas nanopartículas são freqüentemente comparadas umas com as outras, assim como são comparadas com as propriedades de liberação de fármacos a partir de nanoemulsões.

Várias estratégias têm sido empregadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos. As tradicionais matrizes são preparadas hoje com excipientes e tecnologias que as tornam mais sofisticadas, homogêneas e reprodutíveis, possibilitando o controle da liberação de fármacos mais adequado.

A tecnologia de liberação controlada de fármaco é um campo relativamente novo e, por consequência, a investigação nesse terreno tem sido extremamente fértil dando lugar a muitos descobrimentos. Recentemente novos desenvolvimentos no campo biomédico estão sendo realizados com o propósito de avaliar a utilização dos hidrogéis como um sistema para liberação controlada de drogas a partir da combinação de vários biopolímeros sintéticos e naturais. Esta investigação é principalmente justificada pela similaridade das propriedades físicas dos hidrogéis com as dos tecidos vivos [58].

Entre os polímeros sintéticos hoje existentes o poli(álcool vinílico) (PVAI) tem sido intensamente investigado, devido a excelente compatibilidade com tecidos vivos. Apesar do grande número de pesquisas utilizando esses sistemas, ainda pouco se conhece sobre o perfil de difusão de drogas em matrizes poliméricas reticuladas de PVAI.

A estabilidade das nanopartículas no hidrogel depende fortemente das dimensões das partículas, das interações com a camada polimérica (gel) e da propriedade de intumescimento. A difusão do fármaco é obviamente afetada pelo tipo de configuração molecular [58].

Os principais métodos de imobilização de um composto bioativos em uma superfície polimérica são por adsorção via interações eletrostáticas, ligante-receptor, emparelhamento e ligação covalente. Uma adsorção não covalente pode ser desejável, para certa aplicação de liberação de droga. No entanto, a imobilização usando as ligações covalentes oferece maiores vantagens, fornecendo vínculos mais estáveis entre os compostos e maior interação com a superfície do polímero. Com relação à mudança na estrutura da camada de gel, as cadeias poliméricas passam pelos três tipos diferentes de rearranjos espaciais representados na Figura 12.

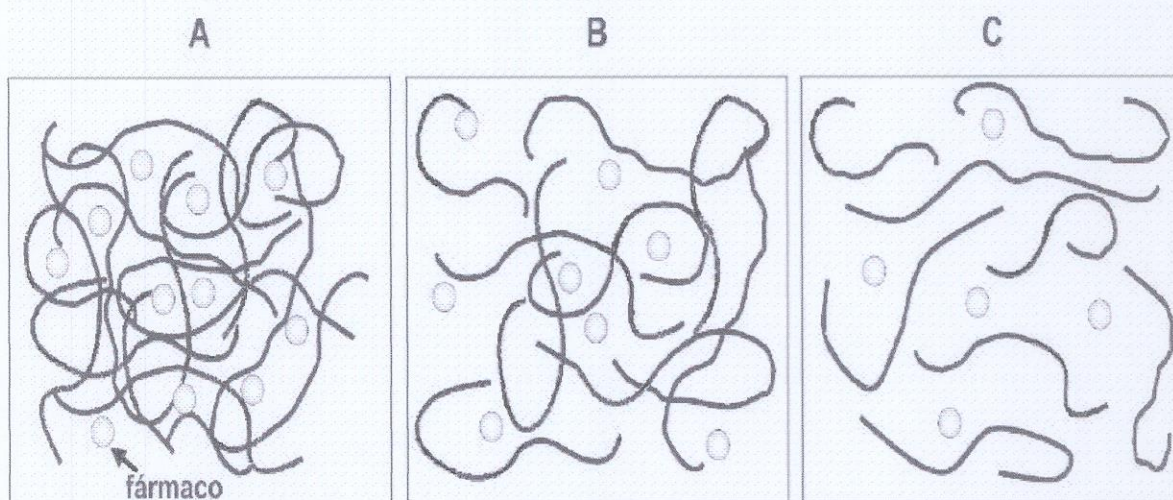


FIGURA 12 – Configurações macromoleculares dos polímeros hidrofílicos durante o processo de dissolução de nanofármacos nos sistemas matriciais [60] (adaptado de Narasimhan e Peppas, 1997).

Antes de iniciar a dissolução (quando o polímero está em quantidade superior ao fármaco), predominam as interações polímero - polímero e ocorre o primeiro tipo de configuração, em que as cadeias poliméricas estão compactadas e completamente integradas umas nas outras. Trata-se do tipo concentrado ou compactado, designado por "camada borrachosa intumesciente" (Fig. 8 A). Nesta fase o fármaco encontra-se também aprisionado entre estas cadeias poliméricas, sendo mais lenta a sua liberação.

O início da etapa de dissolução conduz ao segundo tipo de rearranjo espacial, designado por semi-diluído (Fig. 8 B). Este tipo corresponde à camada limite de difusão, situada na parte externa da interface camada de gel/solvente. A concentração do solvente na matriz aumenta progressivamente e verifica-se diluição das cadeias poliméricas em

virtude do aumento das interações água-polímero. Nesta camada limite ainda existe alguns pontos de interação entre as cadeias poliméricas e as partículas de fármaco circulantes entre elas.

Finalmente, o polímero assume a terceira configuração macromolecular, designada por tipo diluído (Fig. 8 C). Nesta configuração, as cadeias poliméricas estão completamente separadas umas das outras e dispersas no líquido de dissolução, perfeitamente individualizadas e movendo-se livremente com movimentos Brownianos. Neste momento, completa-se a liberação do fármaco restante ainda contido no interior da matriz para o líquido de dissolução [61].

3.8 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, amplamente distribuída em todo mundo, que afeta o homem e os animais.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) inclui a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose da mucosa (LM). A LTA também conhecida como leishmaniose mucocutânea, conhecida vulgarmente como úlcera de Bauru ou ferida-brava, distribui-se amplamente no continente americano, estendendo-se do Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina [62].

No Brasil, em toda sua extensão tem sido observado um aumento significativo da ocorrência da doença, constituindo, portanto, uma das infecções dermatológicas que merecem maior atenção. É uma doença endêmica que é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões localizadas múltiplas ou únicas em áreas expostas da pele que frequentemente se ulceram, como ilustrado na figura 13.

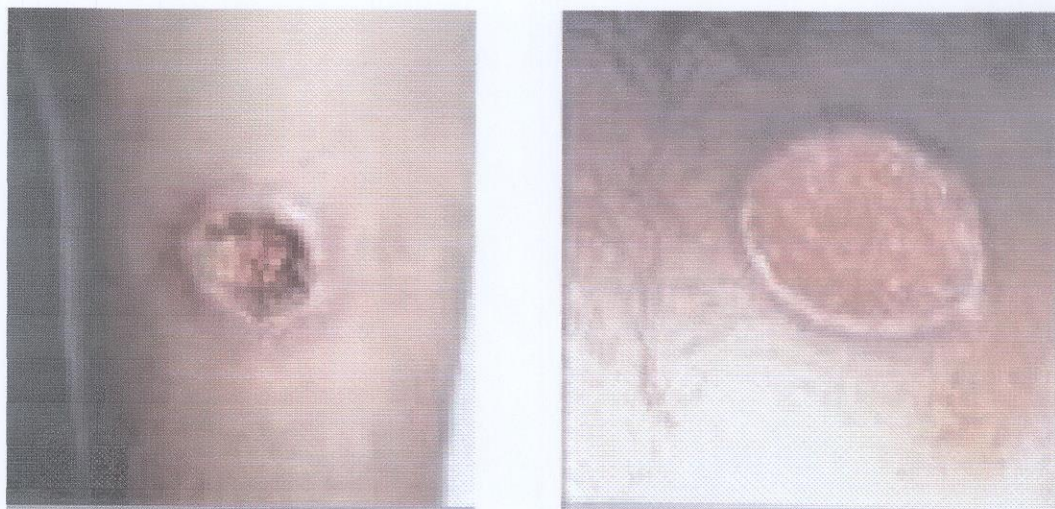


FIGURA 13 - Lesões cutâneas causadas por *Leishmania* [63].

O vetor para esse protozoário, é um mosquito (Ordem Diptera, Classe Insecta), primitivamente descrito no gênero *Phlebotomus*, e do qual já foram descritas várias espécies conforme a região em que é encontrado. Na Europa, Ásia e África, prevalece ainda essa mesma denominação (*Phlebotomus*) para esse agente vetor. No Brasil e nas Américas, é esse vetor agora caracterizado por razões entomológicas, no gênero *Lutzomyia*, porém com espécies ainda por serem definidas [20].

Diante do desconforto causado pela aplicação dos fármacos para terapia da leishmaniose cutânea e ainda dos efeitos colaterais dos fármacos [64] propõe-se o desenvolvimento de hidrogéis de fácil utilização sobre superfície cutânea. Estes terão a função de liberar o fármaco da matriz de PVAI + PVP. O fármaco proposto para a incorporação na matriz é o glucantime, que é aplicado por via endovenosa ou muscular, provocando muitos efeitos colaterais além de ser dolorosa a sua aplicação. No entanto, com a aplicação diretamente no local do ferimento, esses efeitos colaterais serão amenizados, tornando-se mais confortável para o paciente.

3.8.1 As características do gel apropriado para a liberação desejada no tratamento cutâneo da leishmania.

A proposta de um hidrogel para liberação de fármaco em tratamento de leishmaniose deve obedecer a certas exigências. A leishmaniose provoca um ferimento de

difícil cicatrização e essa cicatrização se dá de fora para dentro, formando uma crosta. Portanto a troca de curativo com muita frequência pode acarretar a retirada desta crosta retardando a cicatrização. A dualidade da membrana aplicada em forma de curativo deve ser de cerca de dez dias, o que possibilita a troca em período mínimo de cinco dias. Sob o ponto de vista físico a membrana deve ser flexível e de elevada maciez. Quanto ao aspecto da matriz de hidrogel para a liberação de fármaco deve ser íntegro e ausente de rachaduras ou bolhas formada durante o processo de sínteses. Deve propiciar uma liberação lenta em um intervalo mínimo de 0 a 60h.

3.8.2 Antimoniato pentavalente (Glucantime)

Atualmente no Brasil, os medicamentos à base de antimônio são utilizados como primeira escolha na terapia da leishmaniose. Apresentam eficiência no tratamento das diversas formas de leishmaniose, e são conhecidos como os antimoniatos pentavalentes (Glucantime®) figura 14. São drogas de uso parenteral e média toxicidade podendo apresentar vários efeitos colaterais, como dores musculares e articulares, náuseas, vômitos, dores abdominais, alterações hepáticas, distúrbios cardíacos, febre e cefaléia. Além dos efeitos colaterais a aplicação da droga é muito dolorosa para o paciente [65].

O antimoniato de metilglucamina é especialmente eficaz no tratamento de leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. O medicamento provoca regressão rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença, bem como provoca a esterilização do parasita.

Devido às baixas dosagens e tratamento descontínuo começam a ocorrer falhas na terapia e, conseqüentemente, aumento das formas resistentes de parasitas. A Organização Mundial da Saúde preconiza que as doses de antimoniais não devem ultrapassar 20 mg/kg/dia, não podendo ultrapassar o limite de 850mg de antimônio, devido à sua toxicidade.

Após administração endovenosa ou intramuscular, o antimoniato de metilglucamina é rapidamente absorvido e, praticamente, 90% é excretado nas primeiras 48 h pelos rins [65]. Em conseqüência, faz-se necessária a administração de doses elevadas do fármaco, em regime contínuo, para garantir um elevado teor de antimônio nos tecidos e

assim, obter a eficácia do tratamento. Antimoniais pentavalentes são, geralmente, dez vezes menos tóxicos em células de mamíferos, quando comparados aos antimoniais trivalentes (tártaro emético), utilizados primeiramente por Viana em 1912 [65]. Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente ao óbito. O antimônio ainda pode ser detectado no cabelo do paciente tratado com antimoniais pentavalentes após um ano do término do tratamento [66].

As duas primeiras injeções devem conter apenas a metade das doses indicadas, a fim de verificar a sensibilidade do paciente pelo medicamento. Um acompanhamento da creatinina, pesquisa de proteinúria e um controle eletrocardiográfico são necessários no decorrer do tratamento.

Apesar do uso do antimoniato pentavalente há cinquenta anos, ainda não foi apresentada na literatura a estrutura e composição definitiva permanecendo indeterminadas, tornando-se complicada a determinação de um método totalmente confiável no doseamento do fármaco [67]. A figura 14 apresenta a fórmula molecular do glucantime. A Farmacopéia Brasileira deixou em aberto discussões para que possam ser apresentadas monografias com resultados a respeito de métodos de doseamento.

A droga de segunda escolha no tratamento da leishmaniose é a Anfotericina B, é um antibiótico derivado de uma cepa de *Streptomyces nodosus*, sendo indicada para o tratamento da leishmaniose, mas apresentando menor eficiência no tratamento.

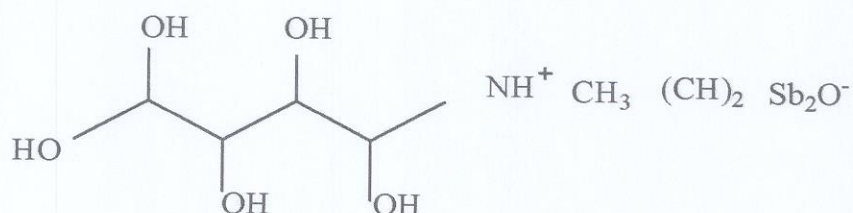


FIGURA 14 – Fórmula molecular do Glucantime [67].

4 - MATERIAIS

4.1 Materiais utilizados para a reticulação por radiação gama, química e térmica.

Poli(álcool vinil) (PVAI) ($M_w = 85000$, grau de hidrólise 98,4%) CelvolTM 325 fornecido pela Dermet Agekem. Poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) *Kollidon* 90F proveniente da Basf, Poli(etileno glicol) (PEG 300) fornecido pela *Oxiteno*, Ágar tipo técnico extraído de algas *Ágarophytes* fornecido pela Oxoid, ácido cítrico (99,9 %) fornecido pela Merck e ácido clorídrico (HCl) da Labsynth. Glucantime fornecido pelo Dr. Valdir Sabbaga Amato do Laboratório de Investigação-Médica Parasitológica do HC-FMUSP. Antimoniato de potássio Sb (V) fornecido pela Vetec, Tartarato de antimônio de potássio (III) P.A. da Synth, *Pyragallol red* fornecido pela Sigma e Solução *Buffer* (pH = 2) preparado com 0,2 M KCl e 0,2 M HCl fornecidos pela Synth.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Preparo da solução para síntese das membranas

As formulações elaboradas para reticulação gama, térmica e química foram obtidas a partir da dissolução em água de PVAI (10 % m/v) utilizando-se chapa aquecedora com agitador magnético e temperatura entre 80 e 85 °C por um período de 40 minutos. Para a solubilização total do PVAI com 10% de PVP (m/v) utilizou-se aquecimento com agitador magnético e temperatura de 90 °C até a solubilização do PVP, por um período de 5 minutos.

4.2.2 Reticulação por radiação ionizante

A reticulação por radiação foi empregada para obtenção de hidrogéis a partir de PVAI e PVP. A irradiação foi realizada com fonte ⁶⁰Co, Gama modelo 220 da Inst. Eng. *Atomic-Canada*, operando a 5,72 kGy h⁻¹ (Localizada na Empresa *Embrarad / CBE*).

Após a dissolução dos reagentes PVAI e PVP conforme descrito no item 4.2.1, foram adicionadas às formulações 1,0% de Ágar com diferentes concentrações 0,5 - 2,0 - 4,0 % de PEG 300.

4.2.4 **Revisão** As matrizes de hidrogéis foram obtidas por camada a partir de espalhamento da solução a quente em suportes de poli(cloreto de vinila) (PVC) (8,0 x 13,5 mm), formando camadas de aproximadamente 3,0 mm de espessura. Quando esfriadas à temperatura ambiente foram cobertas com filmes resistentes de polietileno e seladas, para proteção e então enviadas para irradiação gama. A partir de procedimento prévio de variação da dose de radiação aplicada (10 a 30 kGy) estabeleceu-se que a melhor dose de radiação para as formulações foi a de 25kGy. A escolha da dose foi determinada de acordo com a flexibilidade da membrana formada.

4.2.3 Reticulação física por ciclos térmicos

4.2.3.1 Formulação PVAI / PVP / PEG

4.2.3.1 **For** A síntese de hidrogéis por reticulação térmica foi executada com solução aquosa de PVAI / PVP e PEG; por meio de ciclos de congelamento e descongelamento. Em seguida foram preparadas três diferentes formulações pela adição do PEG nas proporções 0,5%; 2,0 % e 4,0 %, em soluções de PVAI / PVP mesma proporção de 10% respectivamente, seguidas de aquecimento por 5 minutos a 85 °C. Foram colocados em placa de *Petri*, 35 mL para a formação da matriz de hidrogel. Manteve-se à temperatura ambiente por 10 horas em seguida congelando-se a -24 °C durante 14 horas o que completou o ciclo. Este ciclo foi repetido dez vezes.

4.2.3.2 Formulação PVAI / PEG

4.2.3.2 **For** A síntese de hidrogéis por reticulação térmica foi realizada com solução aquosa de PVA e PEG por meio de ciclos de congelamento e descongelamento. Em seguida foram preparadas três diferentes formulações pela adição do PEG nas proporções 0,5%; 2,0 % e 4,0 %, em soluções de PVAI, seguidas de aquecimento por 5 minutos a 85 °C. 35 mL da solução foram colocados em placa de *Petri*, para a formação da matriz de hidrogel. Manteve-se a temperatura ambiente por 10 horas e em seguida congelando-se a -24 °C durante 14 horas o que completou o ciclo. Este ciclo foi repetido dez vezes sendo uma parte das amostras desses hidrogéis analisada e outra submetida à radiação ionizante para esterilização com dose de 25 kGy e analisada posteriormente para avaliação da influência da irradiação no processo de esterilização.

4.2.4 Reticulação Química

4.2.4.1 Formulação PVAI / PVP / Ácido cítrico

Esta etapa de síntese foi feita a partir de solução de PVP e PVAI utilizando-se ácido cítrico como agente de reticulação. As formulações foram elaboradas com diferentes proporções de ácido cítrico. Após a dissolução separada dos polímeros PVAI e PVP juntaram-se as duas soluções e adicionou-se o ácido cítrico. A reticulação química foi iniciada usando como catalisador o HCl à temperatura de 80 °C por cinco minutos. Da solução final foram colocados 35mL em placas de *Petri* com 85 mm de diâmetro e deixados à temperatura ambiente por cinco dias para completar a reticulação. Por último, as amostras foram lavadas em água destilada para extração de possíveis resíduos ácidos indesejáveis.

4.2.4.2 Formulação PVAI / 1,5 % PEG / Ácido cítrico

Esta etapa de síntese foi feita a partir de solução de PVP e 1,5 % de PEG utilizando ácido cítrico como agente de reticulação. Após a dissolução do PVAI juntou-se 1,5% de PEG e foram elaboradas as formulações com diferentes proporções de ácido cítrico. A reticulação química foi iniciada usando-se como catalisador o HCl à temperatura de 80 °C por cinco minutos. Da solução final foram colocados 35mL em placas de *Petri* com 85 mm de diâmetro e deixados à temperatura ambiente por cinco dias para completar a reticulação. Por último, as amostras foram lavadas em água destilada para extração de possíveis resíduos ácidos indesejáveis.

4.3 MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Intumescimento

As amostras foram imersas em água destilada e pesadas em intervalos de tempo até um período total de 60h para a determinação do grau de intumescimento (ou inchamento). O resultado foi obtido usando-se a equação A. De acordo com a norma ASTM D 570 [68].

$$\text{Intumescimento (\%)} = [(ms-md)/md] \times 100 \quad (A)$$

cuja unidade é $\text{g H}_2\text{O g}^{-1}$ e na qual m_s é a massa do polímero intumescido e m_d a massa do polímero seco.

4.3.2 Fração gel

A fração do gel foi obtida a partir das amostras secas. Foram pesadas e colocadas em gaiola de aço inox (500 *mesh*) e imersas em água fervendo dentro de balões acoplados ao destilador de refluxo, por um período de 12h. A amostra extraída foi secada em estufa a 60 °C até que se obtivesse massa constante e a fração gel do material foi calculada pela equação B. De acordo com a norma ASTM D 2765 [69].

Para os hidrogéis obtidos por reticulação térmica a extração foi conduzida à temperatura de 45 a 55 °C por um período de 10h, condições relativamente suaves devido à fragilidade deste tipo de retículo formado.

$$\text{Fração gel (\%)} = (m_f - m_i) \times 100 \quad (\text{B})$$

Na qual: m_i é a massa da amostra seca antes da extração e m_f a massa final da amostra após a extração e secagem.

A fração gel indica a parte insolúvel, cujo valor é atribuído à fração polimérica reticulada.

4.3.3 Termogravimetria TG

As matrizes de hidrogéis secos foram submetidas a ensaios de caracterização térmica a partir de análise termogravimétrica de TGA/DTGA em aparelho *Mettler-Toledo* SDTA/851^e (taxa de aquecimento: 10 °C min^{-1} de 25 a 600 °C, sob fluxo de N_2 (10 mL min^{-1})). As temperaturas de início e fim da decomposição foram registradas.

4.3.4 Calorimetria Exploratória Diferencial DSC

A caracterização por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) foi feita em aparelho *Mettler-Toledo* DSC822^e. As amostras de hidrogéis poliméricos secos foram então submetidas ao aquecimento com velocidade de 10 °C min^{-1} , de 25 a 400 °C, sendo verificados os eventos entálpicos e as alterações provenientes dos diferentes processos de

reticulação: por radiação gama, agente químico e ciclos térmicos. As temperaturas de fusão e de transição vítrea foram registradas. O aparelho foi aferido com índio de ponto de fusão 156 °C e entalpia de fusão 24,75 J g⁻¹.

4.3.5 Citotoxicidade

O ensaio foi realizado a partir do uso da linhagem celular: NCTC Clone 929, da *American Type Culture Collection* (ATCC). O cultivo em meio mínimo de *Eagle* (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1 mM de piruvato de sódio (MEM-uso).

Foram empregadas microplacas de 96 *wells*: distribuídos 200µL da suspensão celular contendo 5.10⁵ células/mL em cada poço e a placa incubada em estufa úmida a 37 °C com 5% CO₂ por 24h.

O preparo de extratos por diluição segue o procedimento normalmente empregado. A diluição foi seriada utilizando-se 1,5 mL de (MEM-uso) em cada frasco, preparando-se 5 diluições: 100, 50, 25, 12,5 e 6,25%. O meio de cultura da microplaca é substituído pelos extratos diluídos dos controles das amostras em triplicatas.

1- Controle positivo: solução estoque fenol 0,2% em PBS (solução tampão fosfato salina pH 7,4).

Solução de uso: solução estoque diluído 1/10 com MEN-uso.

2 – Controle negativo: materiais poliméricos grãos de PVC (Dacarto) – 0,3g *pellets* em 5mL MEN-uso em estufa a 37 °C por 24h.

3 - Amostras: polimérica 1cm² de área superfície por mL MEN- uso por 24h a 37 °C.

- A microplaca é colocada em estufa de CO₂ por 24h.

- Os extratos são substituídos por solução de vermelho neutro e a placa deixada por 3h para incorporação do corante vital.

- Microplaca lavada duas vezes com PBS e uma vez com solução de lavagem.

- Colocada ao leito de ELISA: agitação por 10 min e leitura em 540nm com filtro de referência de 620nm.

- Obtenção da curva de concentração do extrato em função de % de viabilidade celular.

Equipamentos utilizados:

Microscópio invertido marca *Olympus*. Estufa incubadora de CO₂ modelo CB150, marca *Binder* e leitora automática de microplacas modelo RC *Sunrise* da *Tecan* [70]. Os testes foram realizados no laboratório de biomateriais do CQMA.

4.3.6 Infravermelho IR

Os espectros de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis sintetizadas nesse trabalho foram registrados na faixa espectral de 4.000 a 400 cm⁻¹, utilizando-se pastilhas KBr, num espectrômetro FTIR-BOMEM Modelo MB-100, da Central Analítica do Instituto de Química – USP. As membranas foram secas antes de fazer as análises.

4.3.7 Microscopia Eletrônica de Varredura MEV

Utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura da marca PHILIPS XR-30 alocado no Centro de Ciência e Tecnologia de Materiais (CCTM) do IPEN-CNEN/SP para analisar a superfície de fratura das membranas de hidrogéis, as fraturas foram feitas em nitrogênio líquido e recobertas com ouro [71].

4.3.8 Espectrofotômetro UV-visível

Para o doseamento do Glucantime foi usado o espectrofotômetro UV-Visível (absorbância) da Micronal Modelo B582 com referência de uma amostra em branco e utilizando-se cubetas de quartzo de 4 mL. O comprimento de onda determinado foi de 500 nm para o Sb(V).

4.3.9 Curva padrão de calibração para identificação de antimônio

4.3.9.1 Procedimento

Foram usados 3,0 mL de buffer solução de pH = 2,0, 2,0 mL da solução vermelho pirogalol e uma solução de 0,5 a 2,5 µg mL⁻¹ de antimoniato de potássio (Sb V) e foram colocados em balão volumétrico de 10 mL e completados com água destilada. Esperou-se trinta minutos para formar o complexo e foi feita a leitura no comprimento de onda de 500 nm. três alíquotas foram usadas para cada valor de concentração de Sb (V). Os valores de leitura de absorbância para as soluções padrão são apresentados na tabela 1. A respectiva a curva de calibração [72], esta ilustrada na figura 15.

4.3.10 Liberação do Fármaco

As amostras dos hidrogéis com a concentração do fármaco foram colocadas em frascos com 10 mL de água e colocadas em uma centrífuga com temperatura controlada a 37,8 °C. Após 1 hora do início do experimento foi colhida uma alíquota de 1 mL a cada hora por um período de 6 horas e outra alíquota de 1 mL após 24 horas de ensaio.

TABELA 1-Resultados de absorvâncias relativas a variação de concentração de Sb (V) na solução padrão.

Alíquotas das soluções (μL)	Absorvância do Sb(V)*
0,5	0,77
1,0	0,80
1,5	0,90
2,0	0,93
2,5	1,05

* - A absorvância média foi calculada segundo a média aritmética realizada por leitura da absorvância de 3,0 alíquotas diferentes para cada valor de concentração de Sb(V).

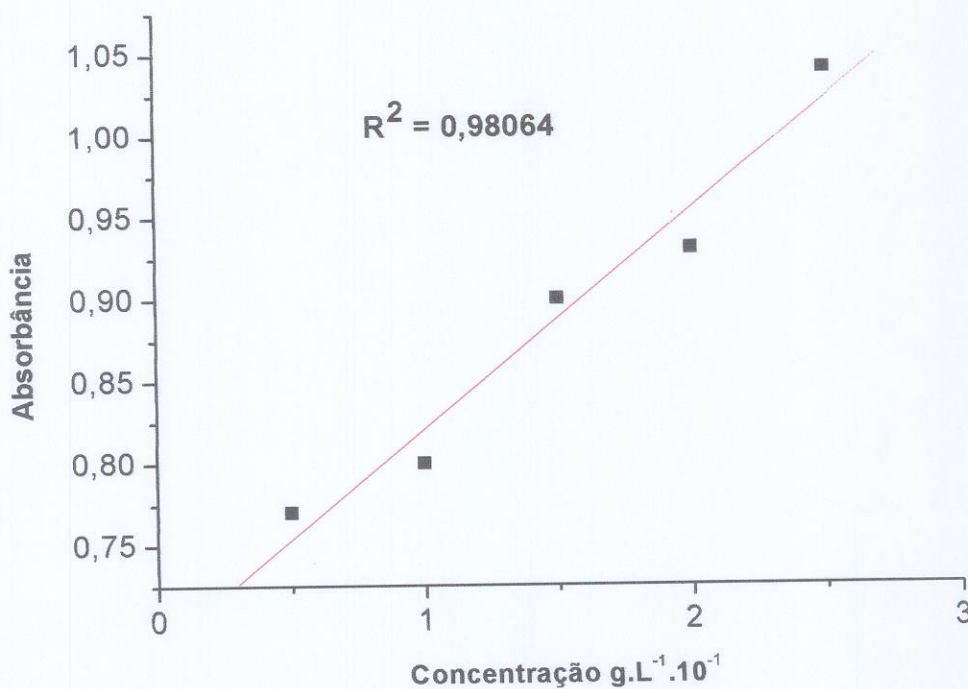


FIGURA 15 - Curva de calibração do Sb(V).

4.3.11 Formulações empregadas nas sínteses dos hidrogéis de PVAI e PVP.

As formulações usadas neste trabalho estão apresentadas na tabela 2, contendo os polímeros usados PVAI, PVP e PEG bem como demais reagentes, Ágar, ácido cítrico e ácido clorídrico de acordo com os métodos de reticulação.

TABELA 2 – Formulações utilizadas nas sínteses dos hidrogéis de PVAI e PVP. Obtidos por reticulação gama, processo térmico e reticulação química.

	Formulação	Processo	PVAI %	PVP %	Ágar %	PEG %	Ácido cítrico%	HCl %
1	PVAI+PVP+PEG+Ágar	γ	10	10	1,0	0,5	-	-
2	PVAI+PVP+PEG+Ágar	γ	10	10	1,0	2,0	-	-
3	PVAI+PVP+PEG+Ágar	γ	10	10	1,0	4,0	-	-
4	PVAI+PVP+PEG	ΔT	10	10	-	0,5	-	-
5	PVAI+PVP+PEG	ΔT	10	10	-	2,0	-	-
6	PVAI+PVP+PEG	ΔT	10	10	-	4,0	-	-
7	PVAI+PEG	ΔT	10	-	-	0,5	-	-
8	PVAI+PEG	ΔT	10	-	-	2,0	-	-
9	PVAI+PEG	ΔT	10	-	-	4,0	-	-
10	PVAI+PVP+Ác. cítrico	Q	10	10	-	-	0,5	0,5
11	PVAI+PVP+Ác. cítrico	Q	10	10	-	-	2,0	0,5
12	PVAI+PVP+Ác. cítrico	Q	10	10	-	-	3,0	0,5
13	PVAI+PEG+Ác. cítrico	Q	10	-	-	1,5	0,5	0,5
14	PVAI+PEG+Ác. cítrico	Q	10	-	-	1,5	2,0	0,5
15	PVAI+PEG+Ác. cítrico	Q	10	-	-	1,5	4,0	0,5

γ = Irradiação gama; ΔT = Processo físico por ciclos térmicos e Q = Processo reticulação com agente químico.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Reticulação gama PVAI+PVP+Ágar + PEG

A partir de testes prévios com dose de radiação variando entre 10 a 30 kGy constata-se que apenas as membranas irradiadas na dose de 25 kGy apresentaram integridade física satisfatória. Com a finalidade de comparação das propriedades foram irradiadas matrizes ausentes de PEG ou Ágar: PVAI + PVP, PVAI e PVP. Nestes casos houve apenas a formação de gel líquido, portanto, como não ocorreu a formação de membranas, impossibilitando análises comparativas.

5.1.1 Intumescimento

As curvas de intumescimento resultantes das matrizes de hidrogéis PVP + PVAI + Ágar + PEG estão ilustradas na figura 16. Observou-se que a concentração do PEG influencia diretamente no equilíbrio de intumescimento, a matriz de hidrogel com 0,5 % foi a que intumescceu menos se comparada às concentrações 2,0% e 4,0% de PEG. No equilíbrio, os resultados para PVP + PVAI + Ágar + PEG 0,5, 2,0 e 4,0 % foram respectivamente, 44,2, 56,5 e 70,8 %.

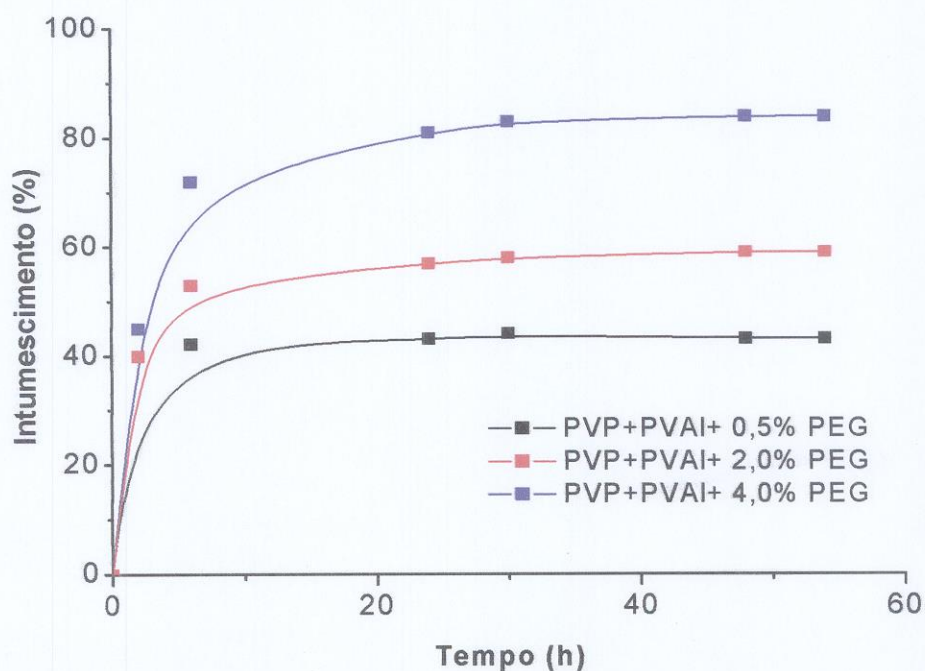


FIGURA 16 – Resultado de intumescimento das matrizes de hidrogéis de PVAI + PVP + Ágar obtidas por irradiação gama dose 25 kGy, variando-se a concentração de PEG.

5.1.2 Fração gel

Os resultados da fração gel apresentados na tabela 3 indicam valores decrescentes com o aumento de concentração do PEG. A matriz de hidrogel com concentração de 0,5 % apresenta maior fração gel, se comparada com as concentrações 2,0 e 4,0% de PEG justificando o menor intumescimento. O PEG foi usado como um plastificante para aumentar a mobilidade e flexibilidade das membranas. Os plastificantes são geralmente moléculas monoméricas não voláteis ou polímeros de baixa massa molar, líquidos em sua maioria, que quando misturadas com polímeros polares, ou que formem ligações de hidrogênio, posicionam-se entre as ligações intermoleculares e aumentam o espaço entre as ligações adjacentes [73-74]. Estima-se que quando aumenta a concentração do PEG, o espaço entre as ligações adjacentes torna-se maior dificultando a reticulação entre as cadeias poliméricas e diminuindo a formação do gel.

O sistema PVAI / PVP tem sido muito estudado nas duas últimas décadas. Etzeberria A. et. al. estudaram a miscibilidade do sistema PVAI / PVP em função do grau de hidrólise do PVAI pela técnica de DSC [75]. Os resultados calorimétricos indicam que há miscibilidade total entre o PVAI e o PVP nos casos em que o grau de hidrólise do PVAI é igual ou maior a 70%. Neste trabalho foi usado PVAI com grau de hidrólise 98,4 %. A fração do gel obtido é referente aos dois polímeros o PVP e o PVAI, portanto, o valor acima de 50% do gel obtido é aceitável porque houve uma miscibilidade entre os dois polímeros nas condições em que foram submetidos, com o mesmo valor de massa, tanto para o PVAI quanto para o PVP.

TABELA 3 – Fração gel (%) das matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação gama, dose 25 kGy, variando-se a concentração de PEG.

Amostras	Fração gel %
PVAI + PVP + Ágar + PEG 0,5 %	78,1
PVAI + PVP + Ágar + PEG 2,0 %	60,9
PVAI + PVP + Ágar + PEG 4,0 %	49,8

5.1.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)

As membranas reticuladas por radiação gama apresentam maior estabilidade térmica, conforme observado na figura 17, quando comparadas aos polímeros puros PVAI

e ao PEG. O primeiro evento de decomposição do PVAI (283 °C) está relacionado à perda de hidroxila e o segundo à decomposição da cadeia polimérica que ocorre a 408,5 °C, tabela 4. O evento de decomposição atribuído ao PVAI apresenta-se menos deslocado em comparação com o evento de decomposição do PVP 410,7 °C. Nota-se que, quando aumenta a concentração do PEG, ocorre uma diminuição da estabilidade térmica em função da presença desse plastificante, o que é atribuído à desorganização das cadeias poliméricas necessitando de menor temperatura para degradar. Supõe-se que ele limite a organização das cadeias. Também foi observada a presença de resíduos após a decomposição dos polímeros, que não foram totalmente decompostos na temperatura submetida. A figura 18 apresenta as curvas das derivadas primeiras da análise termogravimétrica (DTGA), evidenciando o aumento da estabilidade térmica pelo deslocamento da temperatura máxima de decomposição do PVAI. Isso pode ser associado ao efeito da radiação na reticulação do PVAI.

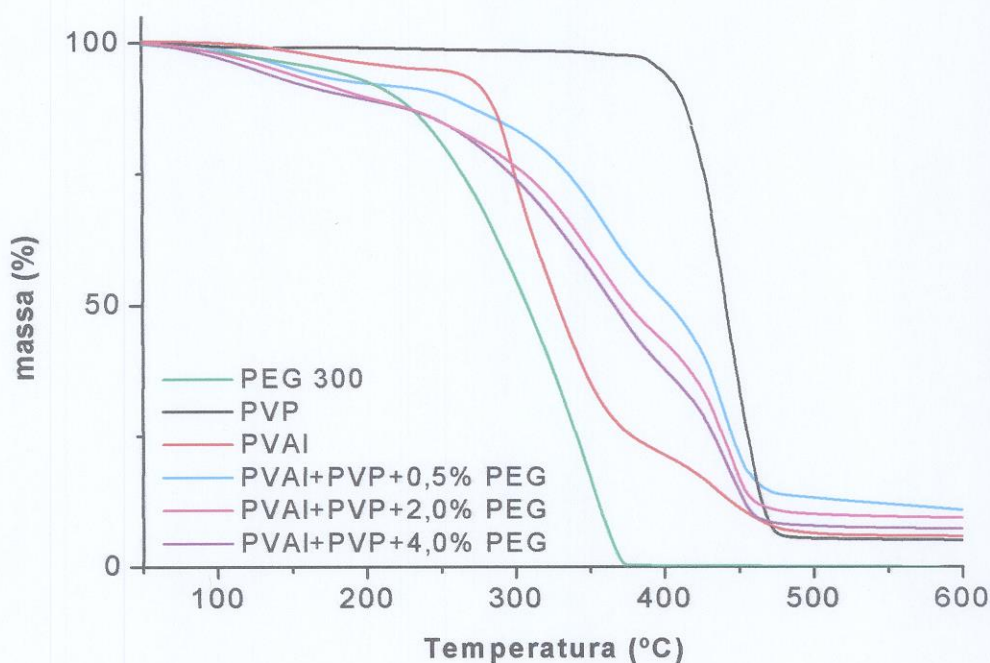


FIGURA 17 - Curvas de termogravimetria (TGA) das matrizes de hidrogéis PVP + PVAI + Ágar, variando-se a concentração de PEG, obtidos por irradiação gama a 25 kGy.

As membranas apresentam perfil de decomposição de estabilidade térmica intermediária entre os polímeros puros PVP e PVAI. Na tabela 4 estão representados os resultados de início de decomposição (T_{onset}) das matrizes de hidrogéis reticuladas por radiação gama a 25 kGy. A água residual do processo é observada por uma perda ao redor

de 100 °C. Um pequeno evento ao redor de 200 °C melhor observado na DTGA (fig. 18) e refere-se à perda do PEG.

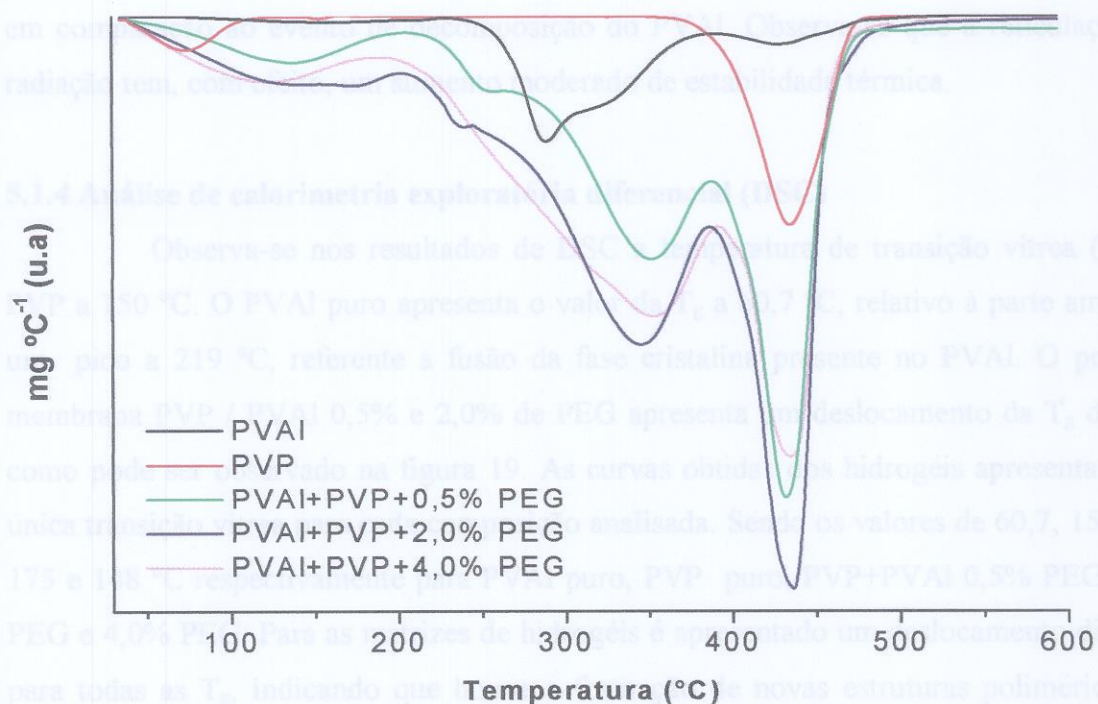


FIGURA 18 – Curvas de DTGA das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP+Ágar variando-se a concentração de PEG.

TABELA 4 - Resultados da perda de massa, do resíduo e T_{onset} das matrizes de hidrogéis reticuladas por radiação gama, variando-se a concentração do PEG.

	1ª T (°C) (água)	2ª T (°C)	3ª T (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
PVP puro*	-	-	410,7	95,2	4,8
PVAI puro*	-	283,3	408,3	94,1	5,9
PVP + PVAI + Ágar + 0,5 PEG	105	318	422,0	89,2	10,8
PVP + PVAI + Ágar + 2,0 PEG	105	316	420,0	90,6	9,4
PVP + PVAI + Ágar + 4,0 PEG	105	315	421,0	92,8	7,2

* Não submetidos à irradiação gama e T= temperatura inicial de degradação.

A segunda T_{onset} refere-se a um evento da desidratação do PVAI, a terceira T_{onset} refere-se à decomposição do PVP e contribuição do segundo evento do PVAI. O evento de decomposição atribuído ao PVP 410,7 °C, apresenta-se pouco deslocado nas membranas em comparação ao evento de decomposição do PVAI. Observa-se que a reticulação por radiação tem, com efeito, um aumento moderado de estabilidade térmica.

5.1.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Observa-se nos resultados de DSC a temperatura de transição vítrea (T_g) do PVP a 150 °C. O PVAI puro apresenta o valor da T_g a 60,7 °C, relativo à parte amorfa, e um pico a 219 °C, referente a fusão da fase cristalina presente no PVAI. O perfil da membrana PVP / PVAI 0,5% e 2,0% de PEG apresenta um deslocamento da T_g do PVP como pode ser observado na figura 19. As curvas obtidas dos hidrogéis apresentam uma única transição vítrea para cada composição analisada. Sendo os valores de 60,7, 150, 170, 175 e 148 °C respectivamente para PVAI puro, PVP puro, PVP+PVAI 0,5% PEG, 2,0% PEG e 4,0% PEG. Para as matrizes de hidrogéis é apresentado um deslocamento diferente para todas as T_g , indicando que houve a formação de novas estruturas poliméricas. As curvas da fig. 19 obtidas por DSC refere-se a primeira varredura.

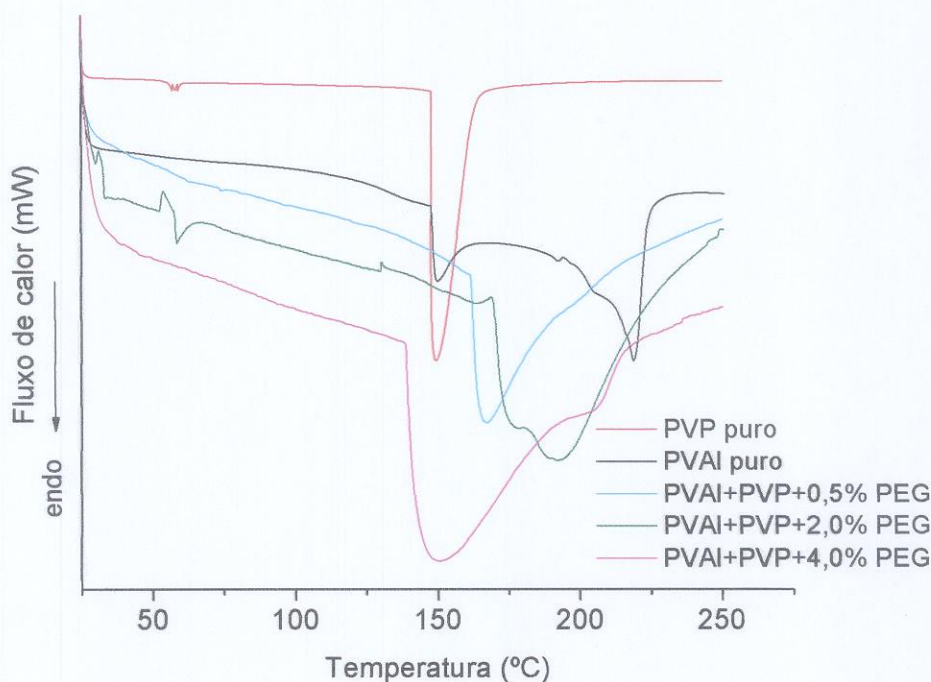


FIGURA 19 – DSC das matrizes de hidrogéis PVAI / PVP / Ágar obtidas por radiação gama com dose de 25 kGy, variando-se a concentração de PEG.

5.1.5 Análise de infravermelho (IR)

A espectroscopia de infravermelho foi usada nesse trabalho para verificar a identidade das várias estruturas de forma comparativa. As principais bandas de IR encontradas nos espectros das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP+PEG estão descritas na tabela 5.

TABELA 5 - As principais bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de hidrogéis poliméricos PVA+PVP+PEG.

Bandas (cm^{-1})	Estiramento relativo
3000-3500	O-H PVAI
1142	C-O PVAI
1666	C=O PVP
1290	C-N PVP
600-550	N-C-O PVP
1150-1060	C-O-C PEG
1070-1095	C-O-C PVAI

A banda larga na região de 3000 a 3500 cm^{-1} observado na figura 20, é relativa ao estiramento do O-H presente em todas as amostras. Atribuindo uma grande distribuição de pontes de hidrogênio entre os grupos hidroxila, os picos referentes aos hidrogéis apresentam menor intensidade nessa região e essa intensidade está relacionada com a quantidade de O-H presente na amostra. Portanto, a reticulação diminuiu o número de hidroxilas livres. Para o PVAI puro aparece um pico a 1730 cm^{-1} que foi associado à presença de impureza do PVAI. Por ser um produto sintetizado a partir do poli(acetato de vinila). O PVAI de acordo com o grau de hidrólise pode conter resíduos de grupos acetato.

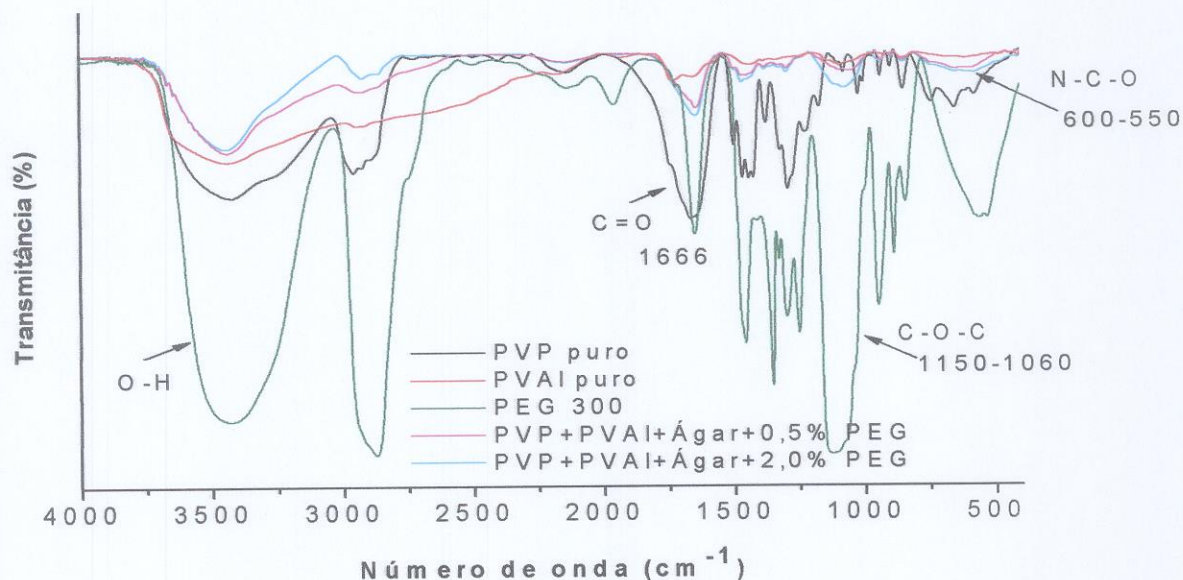


FIGURA 20 – Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis obtidas por irradiação gama a 25 kGy.

5.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das membranas estudadas estão ilustradas na figura 21. As análises das membranas foram feitas de forma qualitativa. Para a membrana de hidrogel na fig. 21a, da micrografia da superfície de fratura pode ser observada homogeneidade com pouca rugosidade, com desníveis entre os blocos formando camadas em forma de lâminas. Na fig. 21b observa-se que com o aumento da concentração do PEG 2,0% aumenta - se a rugosidade da amostra. Nas condições submetidas de análise não foi possível verificar a presença de poros.

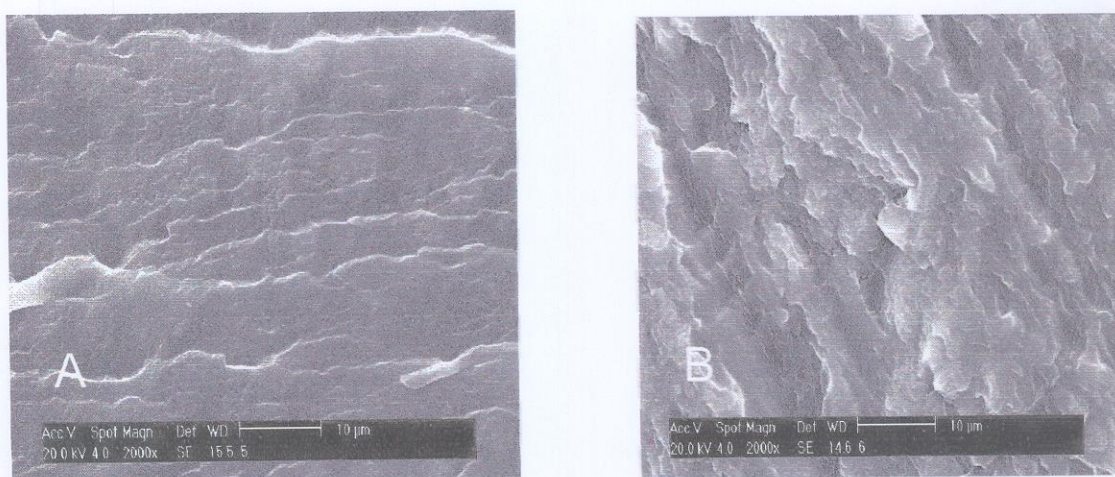


FIGURA 21 – Micrografias em MEV da superfície de fratura das membranas de hidrogel PVAI+PVP (A) 0,5% PEG (B) 2,0% PEG

5.1.7 Membranas de Hidrogéis

A figura 22 ilustra as matrizes de hidrogéis preparadas por radiação gama a 25 kGy, como um material flexível e macio.

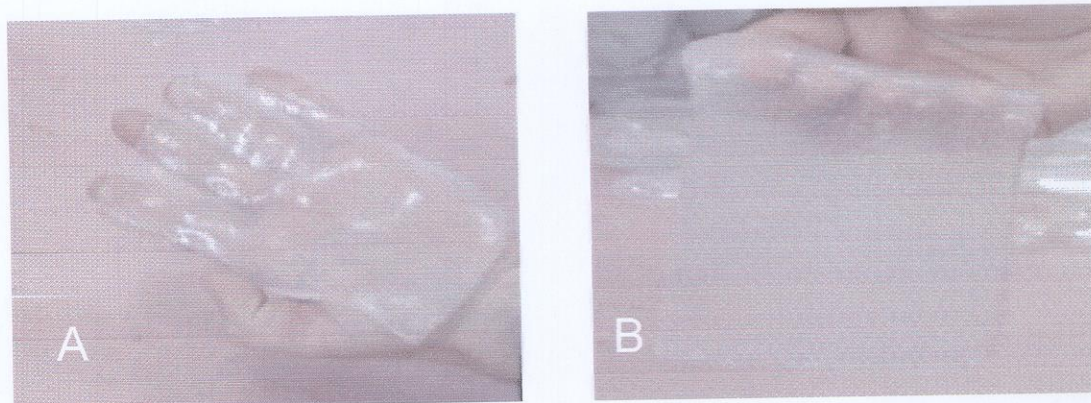


FIGURA 22 – Membranas de hidrogéis PVAI+PVP (A) 0,5 % de PEG (B) 2,0 % PEG.

5.1.8 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade mostrou comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, não apresentaram toxicidade como pode ser observado na figura 23. Desta forma, é possível afirmar que os hidrogéis sintetizados por reticulação gama, desenvolvidos nesse trabalho não causam morte ou prejuízo à população celular sendo, portanto, caracterizados como não-citotóxicos. Além disso, este teste garante que não houve contaminação em quantidade significativa durante o processamento, não comprometendo o experimento.

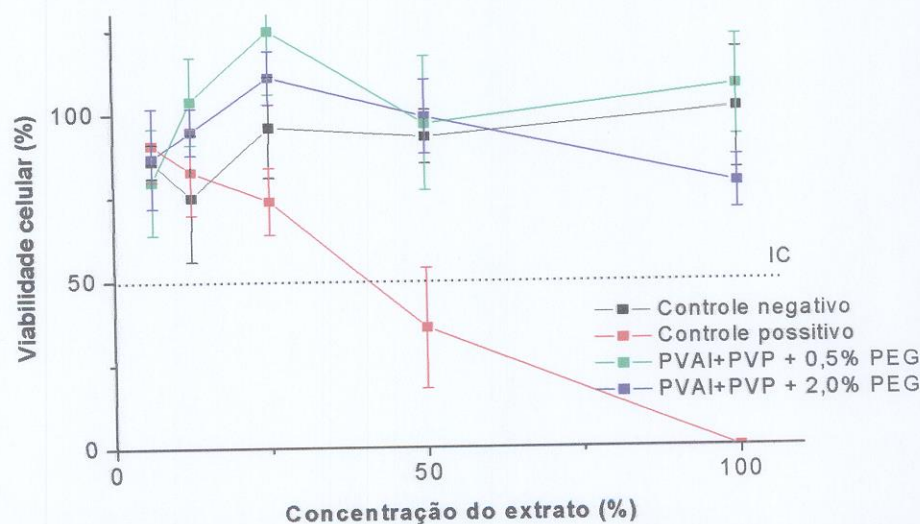


FIGURA 23 – Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.

5.2 RETICULAÇÃO TÉRMICA PVAI+PVP+PEG

5.2.1 Intumescimento

Na reticulação térmica foram mantidas as concentrações do PVAI e PVP variando-se apenas o PEG em 0,5%, 2,0% e 4,0%. As matrizes de hidrogéis físicos foram obtidas por ciclos de congelamento e descongelamento, no total de dez ciclos.

Como pode ser observado na figura 24 o perfil de intumescimento das membranas físicas obtidos por ciclos de congelamento e descongelamento revelam um intumescimento rápido nas primeiras cinco horas e após esse intervalo o intumescimento é lento até obter-se um equilíbrio. Na matriz contendo 2,0% de PEG observou-se um menor intumescimento se comparado aos demais. Os hidrogéis de PVAI+PVP 0, 0,5, 2,0 e 4,0% de PEG são respectivamente, 105,0, 76,0, 54,0 e 74,1%. Os dados indicam que há um limite de concentração do PEG que altera a reticulação física das membranas e acima dessa concentração há uma tendência a difundir-se para fora do hidrogel, mantendo-se a superfície da matriz com excesso de PEG.

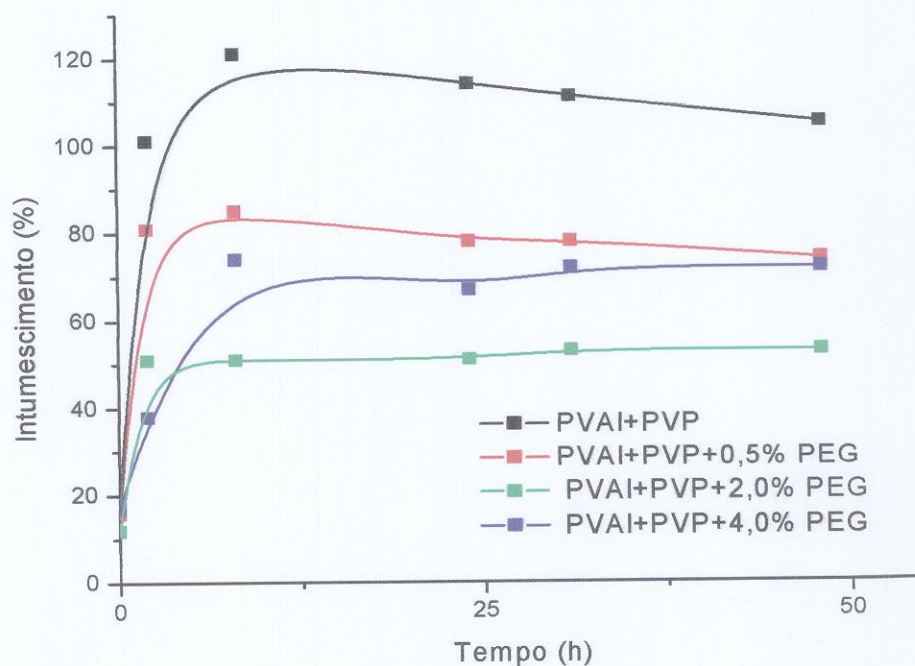


FIGURA 24 – Curva de intumescimento das matrizes de hidrogéis obtidas por ciclo térmico compostas de PVAI+PVP, variando-se da concentração de PEG.

5.2.2 Fração gel

Na tabela 6 estão apresentados os resultados de fração gel das amostras, a matriz de hidrogel contendo 2,0% de PEG apresenta maior porcentagem de gel, se comparado às concentrações 0,5 e 4,0%, corroborando com a menor taxa de intumescimento. Acima dessa concentração de PEG observa-se que a porcentagem de gel físico não aumenta.

TABELA 6 – Porcentagem (%) da fração de gel das matrizes de hidrogéis PVAI + PVP conforme a variação da concentração (%) de PEG, obtidas por reticulação térmica.

Membranas	Fração gel (%)
PVAI + PVP	10,1
PVAI + PVP + 0,5 % PEG	23,5
PVAI + PVP + 2,0 % PEG	40,7
PVAI + PVP + 4,0 % PEG	32,7

5.2.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)

O perfil de decomposição do PVAI apresenta dois eventos, o primeiro ocorrendo por volta de 272,3 °C, associado à perda de água por desidroxilação e o segundo por volta de 408,3 °C, atribuído a decomposição da cadeia principal do PVAI. Para o PVP observa-se um evento relacionado à degradação, com temperatura de início de decomposição em 410,4 °C. Os dois eventos de decomposição que são observados nas matrizes de PVAI+PVP+PEG, referem-se às decomposições do PVAI e do PVP, respectivamente, como pode ser observado nas figuras 25 e 26. Também foi observado a presença de resíduos que não foram decompostos na temperatura submetida aos polímeros.

FIGURA 26 – Curvas de DTGA dos hidrogéis obtidos por ciclo térmico PVAI+PVP, variando-se a concentração de PEG.

Os hidrogéis foram desidratados a 50 °C a vácuo até peso constante para a obtenção das análises térmicas, para evitar a interferência da água. A tabela 7 mostra que

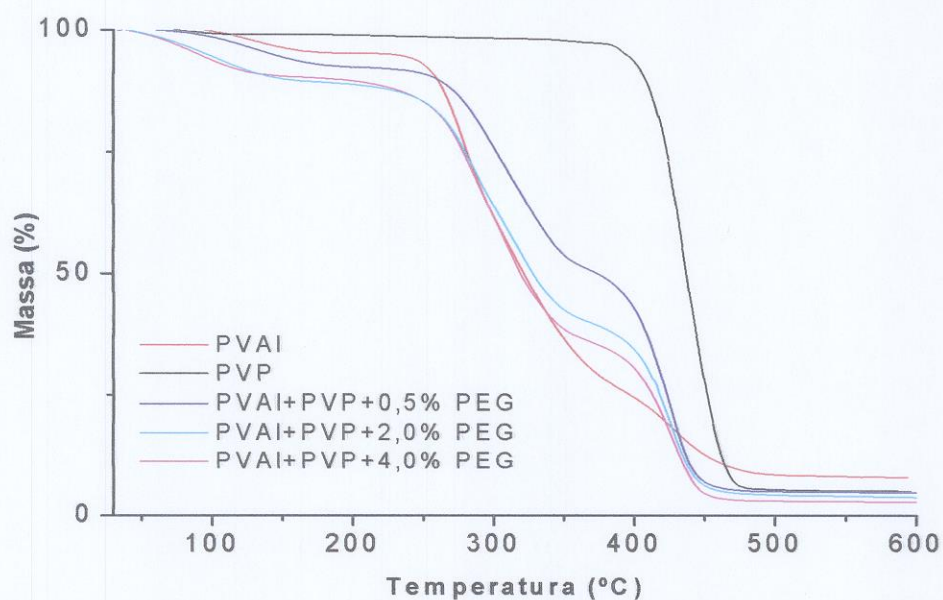


FIGURA 25 – Curvas de TGA dos hidrogéis obtidos por ciclo térmico PVAI+PVP variando-se a concentração de PEG.

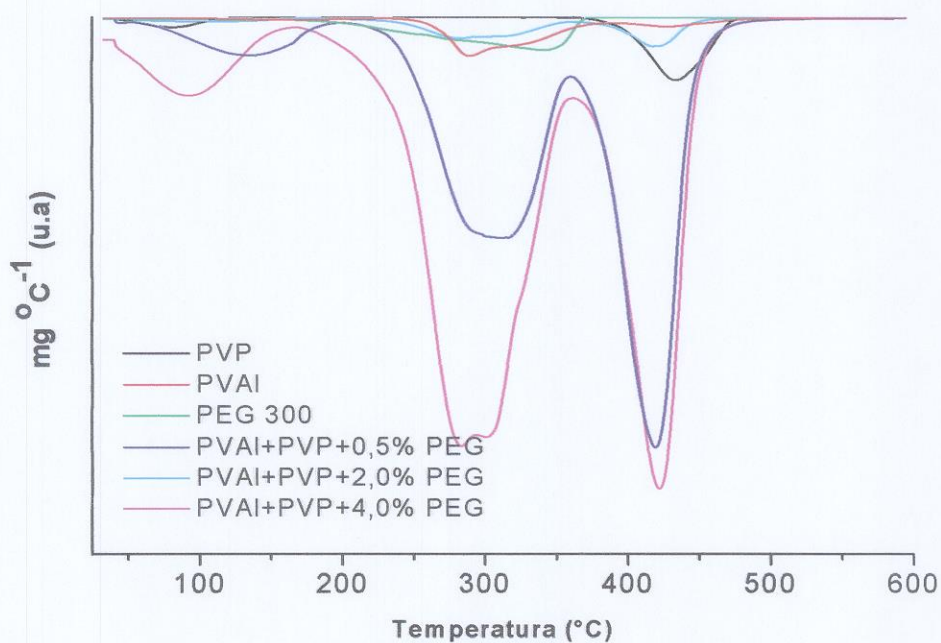


FIGURA 26 – Curvas de DTGA dos hidrogéis obtidos por ciclo térmico PVAI+PVP, variando-se a concentração de PEG.

Os hidrogéis foram desidratados a 50 °C a vácuo até peso constante para a obtenção das análises térmicas, para evitar a interferência da água. A tabela 7 mostra que

ainda ficou uma fração de água representada pelo primeiro evento ao redor de 80 °C. Esse evento se estende até 180 °C para alguns casos indicando a perda concomitante do PEG.

TABELA 7 - Apresenta os valores de T_{onset} e o teor de resíduos das membranas de hidrogéis reticuladas por ciclos térmicos.

Membranas	1ª T (°C) (água)	2ª T (°C)	3ª T (°C)	Resíduo (%)
PVAI puro	-	272,3	408,3	5,9
PVP puro	-	-	410,4	5,9
PEG 300	-	257,7	-	-
PVAI + PVP + 0.5% PEG	100	277,2	406,4	5,0
PVAI + PVP + 2.0% PEG	80	258,2	408,4	4,0
PVAI + PVP + 4.0% PEG	80	257,3	408,3	3,0

Observa-se para as membranas de 2,0 e 4,0 % um deslocamento relativamente pequeno da T_{onset} atribuída, principalmente, ao PVAI para temperatura inferior. No entanto, na DTGA não há deslocamento da temperatura de decomposição. Isso indica que não há formação de retículo químico. Da mesma forma observa-se que para o evento principal de decomposição do PVP praticamente não ocorreu nenhuma alteração de T_{onset} ou temperatura máxima decomposição (T_{max}).

5.2.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A temperatura de transição vítrea para o PVP é a 150 °C, e a essa temperatura há também a contribuição do evento de desidratação intrínseco da parte cristalina do PVAI. O PVAI puro apresenta os valores de T_g a 60,7 °C da parte amorfa e um pico a 219 °C referente à fusão da fase cristalina presente no PVAI. Como resultado das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP, variando-se as concentrações de PEG. Na figura 27 observa-se um deslocamento com valores maiores de temperatura apresentando uma deformação dos picos que estão representando a T_g . Os valores da transição vítrea para cada composição

analisada foram: 180, 170 e 165 respectivamente para PVAI+PVP 0,5%, 0,2% e 4,0% de PEG. Verifica-se também próximo a 217 °C um ombro relativo à fusão do PVAI.

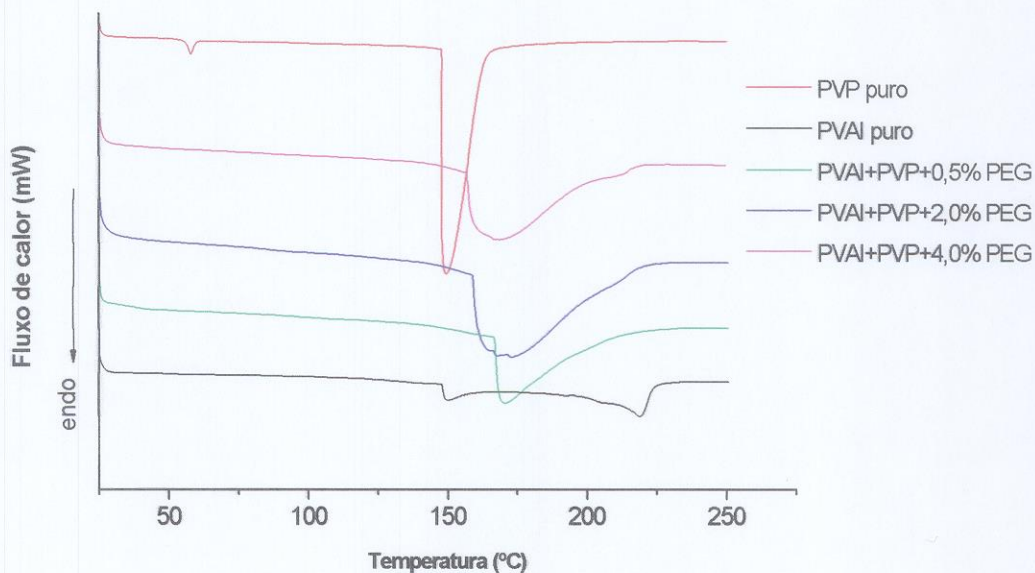


FIGURA 27 – Curvas de DSC das matrizes de hidrogéis de PVAI + PVP obtidos ciclos térmico, variando a concentração de PEG.

5.2.5 Análise de infravermelho (IR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho observados na figura 28 apresentam uma banda larga na região de 3500 cm^{-1} atribuída ao estiramento do grupo O-H. Observa-se para a matriz de hidrogel com 2,0% de PEG um pico mais alargado na região $3500\text{ a }3000\text{ cm}^{-1}$ indicando a interferência do PEG. A presença de picos na região $1070 - 1095\text{ cm}^{-1}$ é relativo ao estiramento do grupo C-O-C do PVAI sobreposto ao sinal do PEG (C-O-C) e em 1666 cm^{-1} é atribuído ao estiramento C=O do PVP. Os espectros não evidenciam a interação química do PEG, PVP e PVAI, apenas constata a presença dos componentes nas membranas.

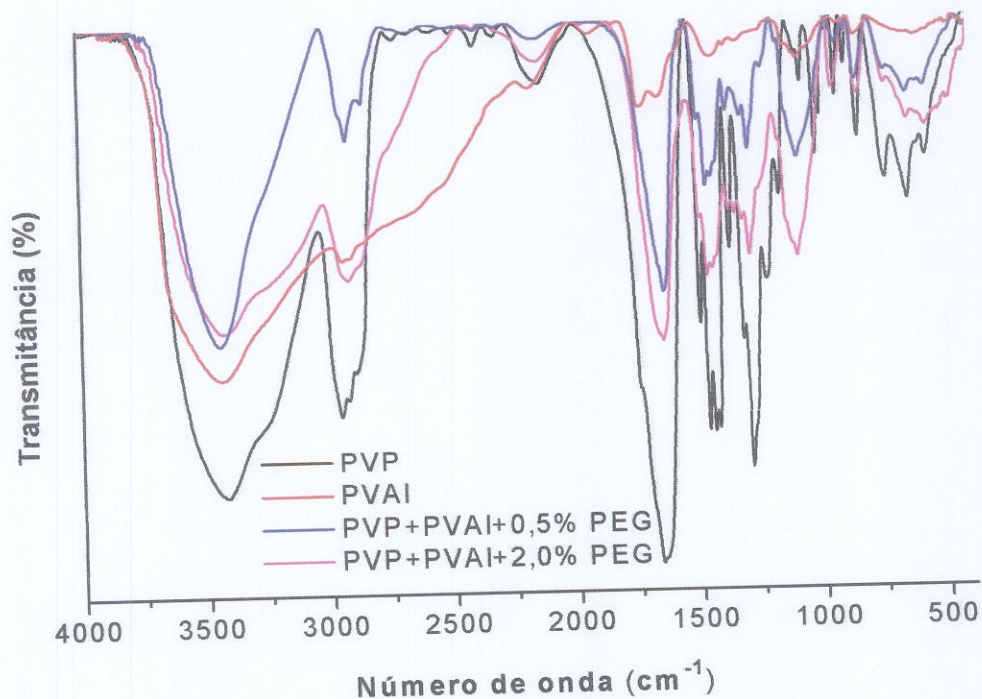


FIGURA 28 – Espectros de absorção na região do infravermelho das matrizes de hidrogéis obtidas por ciclo térmico variando-se a concentração de PEG.

5.2.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP obtidas por reticulação térmica variando-se a concentração de PEG são ilustradas na figura 29. As análises das membranas foram feitas de forma qualitativa. A micrografia na superfície de fratura apresenta homogeneidade com semelhante perfil de rugosidade para as matrizes 0,5% e 2,0% PEG.

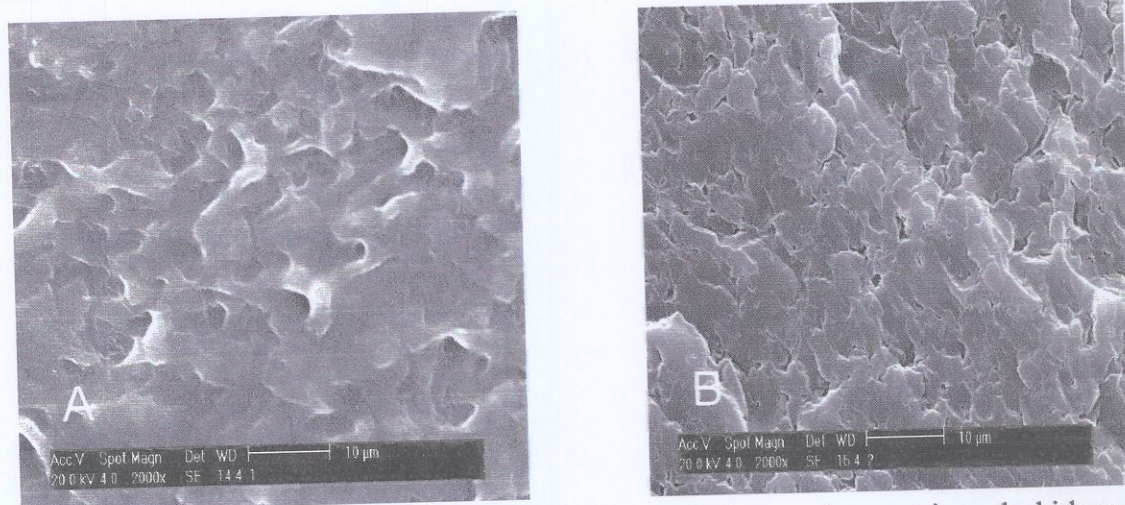


FIGURA 29 – Micrografias em MEV da superfície de fratura das matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação térmica PVAI+PVP variando-se a concentração de PEG (A) 0,5% (B) 2,0%.

5.2.7 Membranas de hidrogéis obtidas por síntese térmica

A Figura 30 ilustra as matrizes de hidrogéis preparadas por ciclo térmico como um material flexível e macio. A cor esbranquiçada é típica da cristalização do PVAI.

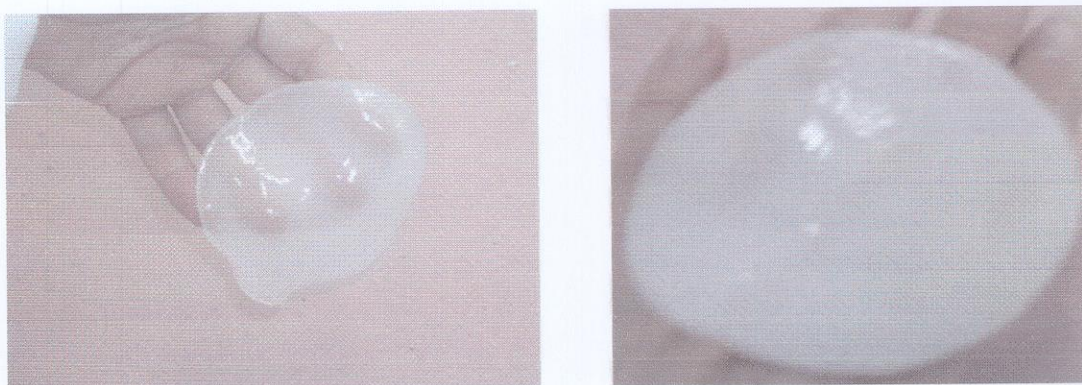


FIGURA 30 – Fotos das matrizes de hidrogéis sintetizadas com PVP+PVAI+PEG por ciclos térmicos.

5.2.8 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade mostrou comportamento semelhante ao controle negativo, ou seja, as membranas testadas não apresentaram toxicidade, como pode ser observado na figura 31 pelo resultado negativo. Desta forma, é possível afirmar que os hidrogéis sintetizados por reticulação térmica são, portanto, caracterizados como não-citotóxicos. Além disso, este teste garante que não houve contaminação durante o experimento.

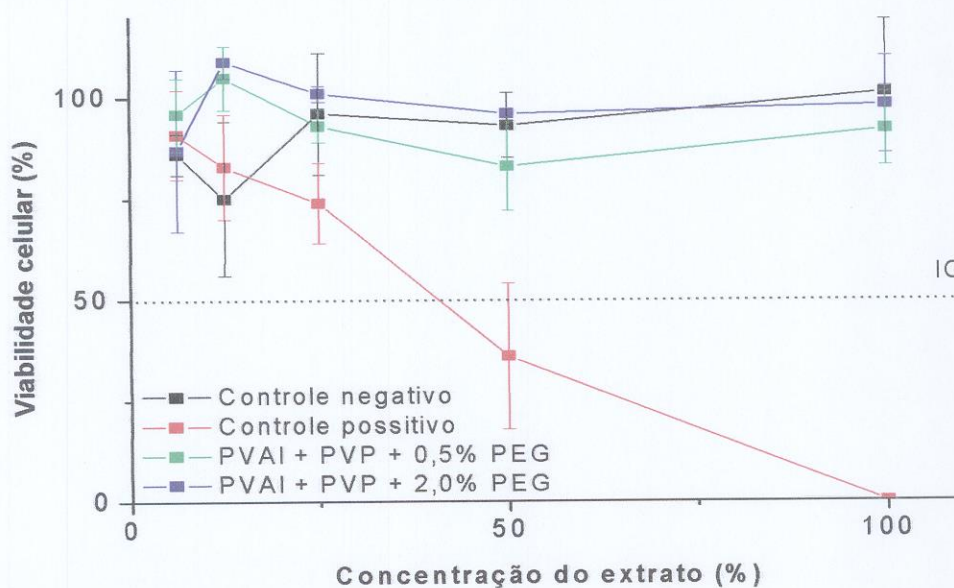


FIGURA 31 – Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro, obtidas por ciclos térmicos.

5.3 RETICULAÇÃO TÉRMICA PVAI+PEG COM ESTERILIZAÇÃO

5.3.1 Intumescimento

As membranas de hidrogéis físicos foram obtidas por ciclos de congelamento por 14h a $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ e descongelamento e por 10h a temperatura ambiente, assim completando um ciclo de 24h e esse ciclo foi repetido por dez vezes. Além de simples síntese foi verificada a influência do processo de radiação nas membranas físicas que foram esterilizadas por irradiação gama, a 25 kGy.

Pode ser observado na figura 32, o perfil do intumescimento em água dos hidrogéis em função do tempo, antes e depois da esterilização.

Nos perfis de intumescimento (fig. 32) das matrizes, obtidas por congelamento e descongelamento com PEG podem ser observados valores mais elevados do que da matriz de PVAI (linha preta). O equilíbrio de água foi alcançado após 50h. Também foi observado que as matrizes que contêm o PEG incham mais intensamente do que a membrana 10% de PVAI puro. O mecanismo de formação do hidrogel ocorre com o congelamento da água, os cristais de água forçam as moléculas de PVAI a se separarem em outra fase. Comprimindo-se as moléculas de PVAI essas se cristalizam fazendo com que a solução dê forma a um gel fisicamente reticulado. A partir de subseqüentes descongelamentos dos cristais de gelo há a formação do retículo até um equilíbrio que foi observado com dez ciclos.

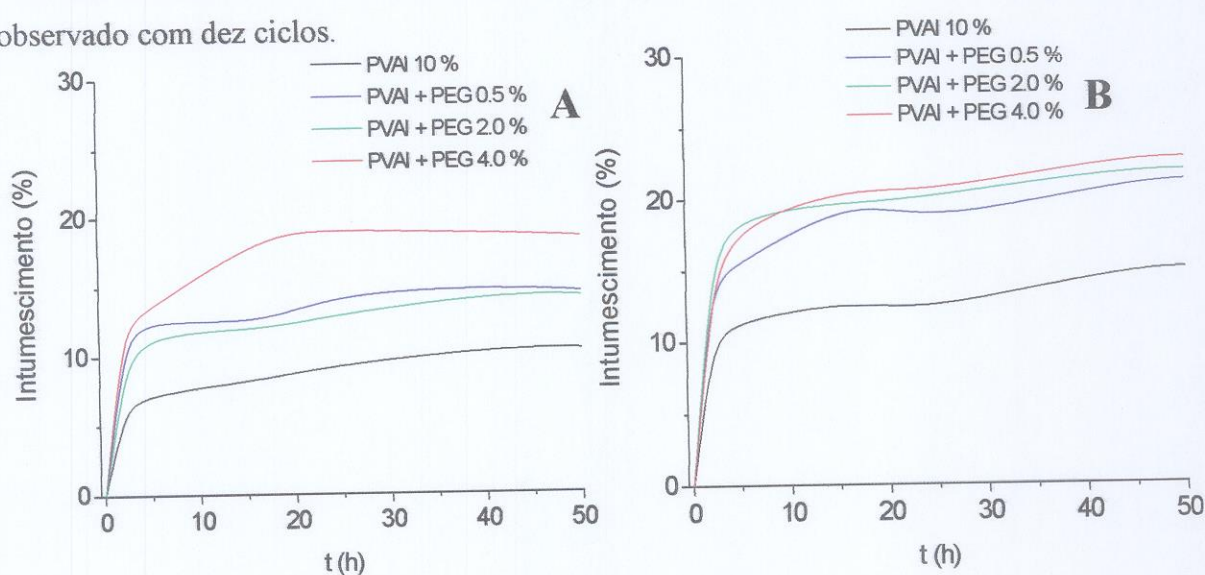


FIGURA 32 – Curvas de intumescimento em água das matrizes de hidrogéis de PVAI com diferentes concentrações de PEG. (A) antes da esterilização (B) após esterilização.

Um número maior de ciclos não influenciou na formação do retículo físico. Estes resultados mostram que em presença de PEG formam-se membranas de PVAI mais densas de que em relação as membranas de PVAI na presença de PVP. O equilíbrio de intumescimento em água das matrizes de hidrogéis com diferentes concentrações de PEG, 0, 0,5, 2,0 e 4,0 %, obtidos por reticulação térmica normal foram respectivamente 9,7; 13,0; 13,4% e 18,7% e nas reticuladas esterilizadas foram 14,3; 20,8; 21,0 e 22,4%.

Os perfis de intumescimento das membranas esterilizadas foram modificados como efeito do processo da radiação nos hidrogéis poliméricos. Da mesma forma o percentual de inchamento em água (fig. 32) foi obtido após 60h. Observou-se que o intumescimento aumenta na presença de PEG, porém não aumenta linearmente com sua concentração. Sendo os valores do intumescimento mais elevados após a esterilização, postula-se que o retículo físico do PVAI cristalizado sofreu perturbação e provavelmente foi destruído por radiação durante a esterilização em todos os casos aumentando a porcentagem de água absorvida.

5.3.2 Fração gel

Os resultados de fração gel estão apresentados na tabela 8. Observa-se um efeito do PEG no sentido de diminuir o conteúdo do gel, o que justifica o aumento dos valores do inchamento. Após a esterilização os percentuais de gel aumentam em todas as matrizes incluindo o PVAI esterilizado. O retículo físico obtido termicamente não é destruído pela radiação, mas é realçado (tab. 8), principalmente na presença do PEG. O valor baixo da fração gel foi associado a separação dos cristais provocado pela alta temperatura submetida a esse tipo de reticulação.

O gel obtido por ciclos térmicos é definido como gel físico, suas cadeias são formadas por ligações iônicas e pode ser convertido em polímero por aquecimento. Observou-se que durante o processo de esterilização a rede foi modificada também pela formação de ligações cruzadas na competição com a cisão de cadeia que ocorre nos segmentos de cadeia não reticuladas termicamente. Essas ligações cruzadas resultantes de radicais formados durante a esterilização, alteram o gel insolúvel indicando a formação de estrutura diferente no polímero.

TABELA 8 – Valores de fração gel das matrizes de hidrogel composto de PVAI obtidas por reticulação térmica, variando a concentração de PEG.

Amostras	Gel não esterilizado (%)	Gel esterilizado (%)
PVAI 10 %	7,9	10,0
PVAI + PEG 0,5 %	5,7	11,4
PVAI + PEG 2,0 %	5,7	12,0
PVAI + PEG 4,0 %	4,8	8,8

5.3.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)

Os perfis de decomposição das amostras estão apresentados nas figuras 33a, e 33b, observar-se que para todas as amostras analisadas a presença de resíduos após a decomposição dos polímeros necessitando de maior temperatura para total degradação. Os valores de T_{onset} estão na tabela 9, observou-se que a matriz com 2,0% PEG esterilizada alcançou temperatura maior para o início da decomposição, provavelmente, devido à organização dos cristais formados pela reticulação. Também foi observada uma variação de temperatura significativa no início da decomposição das matrizes com 2,0 e 4,0% após a esterilização, quando comparadas com as matrizes antes da esterilização.

TABELA 9 – Valores de T_{onset} e de resíduos das matrizes de hidrogéis, obtidos por reticulação térmica, esterilizados e não esterilizados.

Amostras	T_{onset}	Resíduo (%)	T_{onset} esterilizado	Resíduo (%) esterilizado
PEG 300 puro	259,0	-	ND	ND
PVAI puro	273,3	5,9	ND	ND
PVAI + PEG 0,5 %	270,1	4,5	266,0	7,6
PVAI+ PEG 2,0%	278,5	5,8	279,8	5,4
PVAI + PEG 4,0 %	294,5	4,3	267,8	6,0

ND - Não determinado; T_{onset} : início de temperatura de degradação.

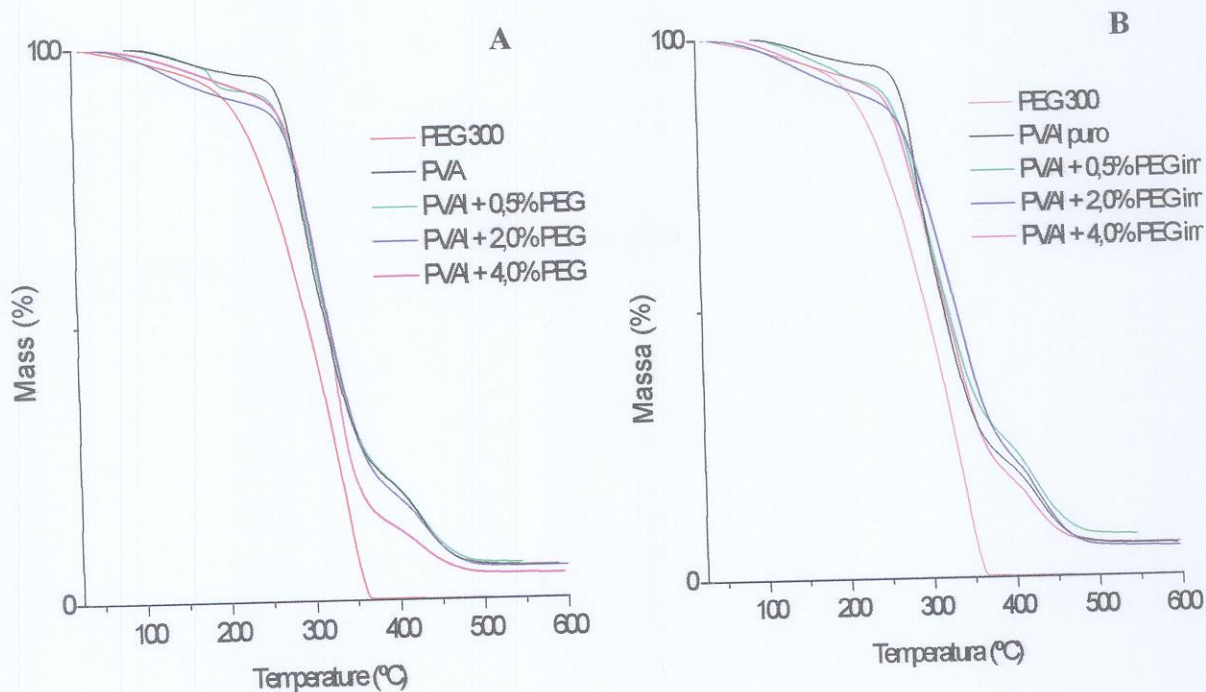


FIGURA 33 – Curvas TGA de hidrogéis de PVAI / PEG: (A) hidrogéis antes da esterilização (B) hidrogéis esterilizados.

Apesar do perfil da derivada primeira DTGA ser semelhante, como podem ser observado. Figuras 34a e 34b, os hidrogéis esterilizados apresentam diferença nos valores de T_{onset} mais estáveis após da esterilização.

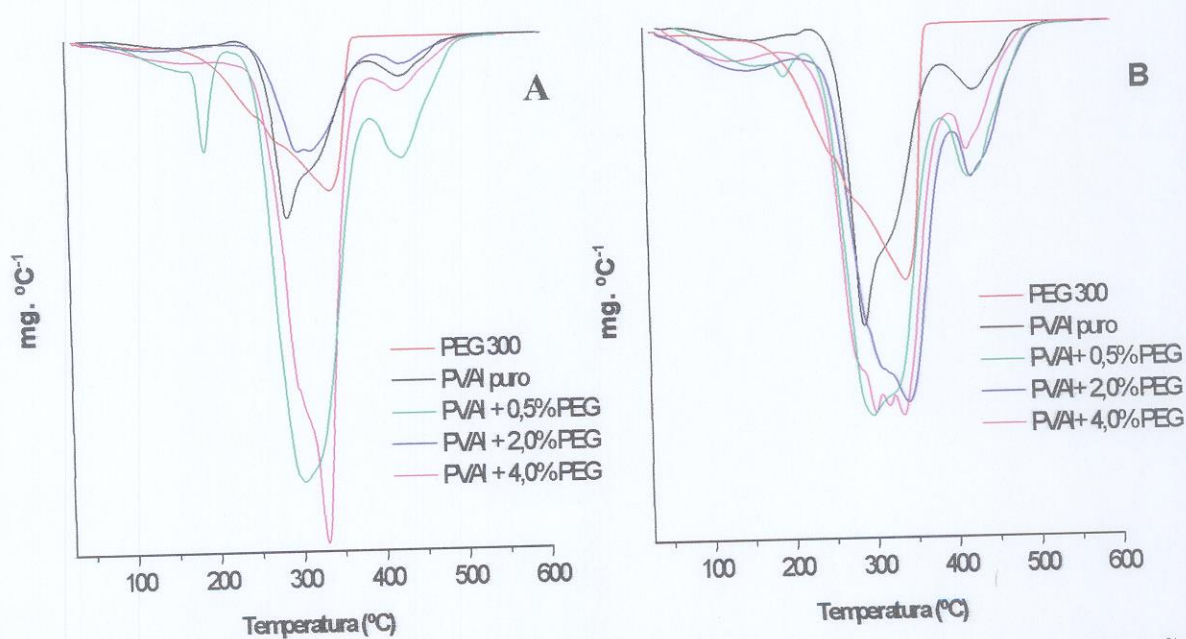


FIGURA 34 – Gráfico DTGA das matrizes de hidrogéis PVAI variando-se a concentração de PEG (A) Antes da esterilização (B) Após esterilização por radiação gama 25 kGy.

5.3.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A tabela 10 apresenta a variação nos valores dos T_f (picos de fusão) da parte cristalina do PVAI das matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação térmica antes da esterilização e depois da esterilização por radiação gama.

TABELA 10 – Resultados da T_f das matrizes de hidrogéis antes e depois da esterilização por irradiação gama a 25 kGy.

	Não esterilizados (T_m °C)	Esterilizados (T_m °C)
PVAL Puro*	150/217	ND
PVAL + PEG 0,5 %	183/201	198
PVAL + PEG 2,0 %	155/205	169/208
PVAL + PEG 4,0 %	152/210	161/212

ND/* - Amostras puras e não esterilizada.

Na figura 35a e 35b podem ser observados picos de fusão atribuído ao PVAI do retículo físico formados na amostra PVAI + 0,5 % PEG e nas demais matrizes apresentam-se picos com menor intensidade relativos à desidroxilação e fusão do PVAI..

Os perfis das curvas de DSC podem confirmar as alterações provocadas pelo efeito da radiação gama durante o período de esterilização. Na fig. 35b relativas às membranas de hidrogéis esterilizados e desidratados observa-se a persistência de cristais de PVAI pelo pico de fusão a 198 °C.

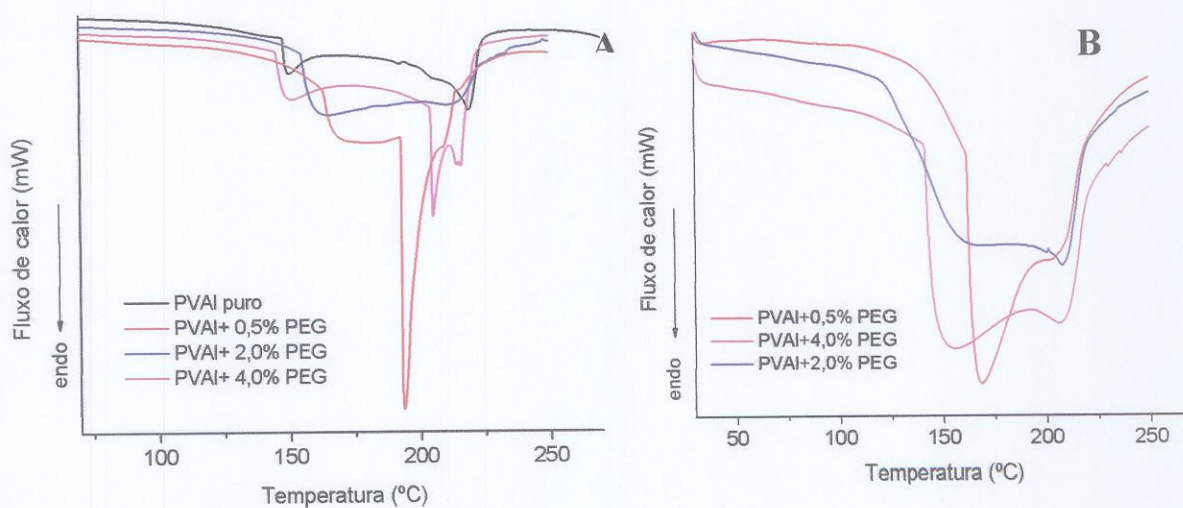


FIGURA 35 – Curvas DSC PVAI matrizes de hidrogéis obtidas por: (A) reticulação térmica variando-se a porcentagem de PEG (B) Esterilizados por radiação gama a 25 kGy.

5.3.5 Análise de Infravermelho (IR)

Na tabela 11 estão representados os valores dos picos de estiramento encontrados. Na análise de FTIR para as matrizes de hidrogéis reticuladas pelo processo térmico. Há um indicativo de que a reação do PVAI com 0,5% de PEG promova um estreitamento no pico de O-H como efeito da formação de ligação de hidrogênio entre as cadeias na intensidade da banda do O-H formando ligações de hidrogênio entre as cadeia do PVAI e do PEG [76], como pode ser observado na figura 36. Observa-se que os demais picos não foram deslocados.

TABELA 11 - Bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de PVA+PVP.

Bandas (cm^{-1})	Estiramento relativo
3000-3500	O-H PVAI
1142	C-O PVAI
1150-1060	C-O-C PEG
1070-1095	C-OH PVAI

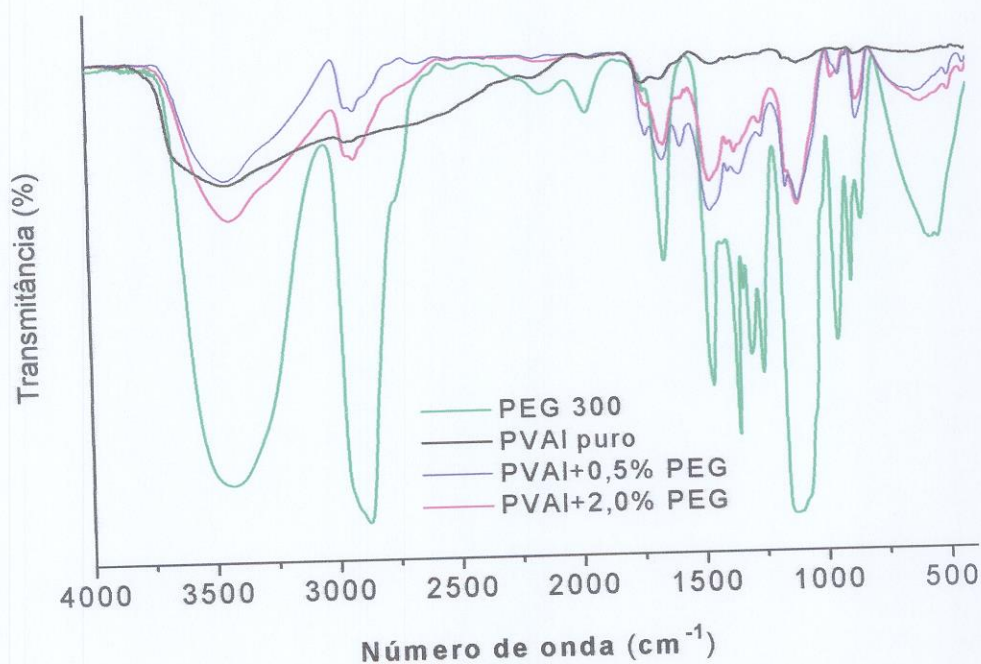


FIGURA 36 – Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis obtidos por ciclo térmico variando a concentração de PEG.

5.3.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das membranas de hidrogéis figura 12 apresentam homogeneidade com aglomerados em forma de lâminas para a concentração 0,5% de PEG. Quando se aumenta a concentração do PEG para 2,0% o material não apresenta separação em placas.

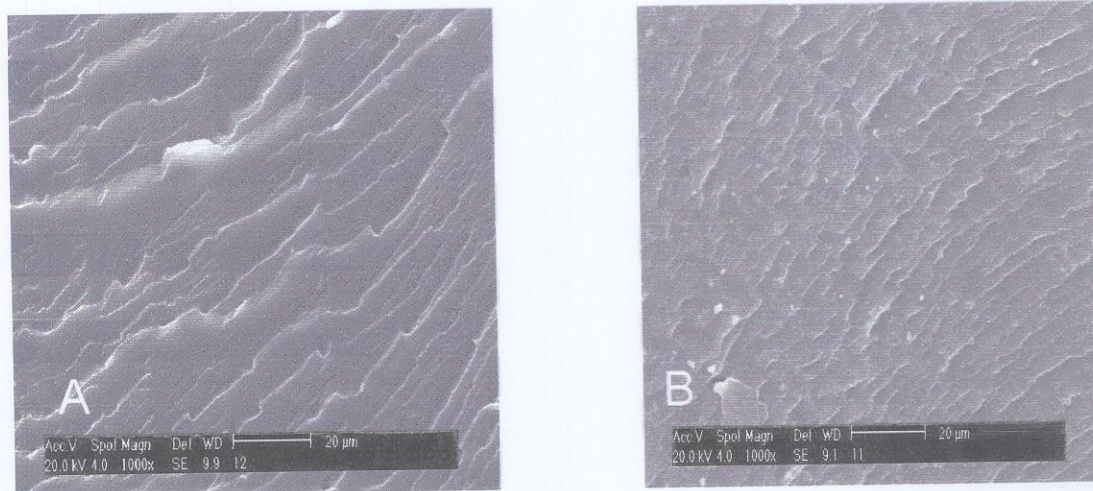


FIGURA 37 – Micrografias de MEV da superfície de fratura das membranas de hidrogéis PVAI+PEG obtidas por reticulação térmica variando-se a concentração de PEG (A) 0,5 % (B) 2,0%

5.3.7 Membranas de hidrogéis de PVAI + PEG obtidas por ciclos térmicos

A Figura 38 ilustra as matrizes de hidrogéis preparados por ciclo térmico como um material flexível e macio. A cor esbranquiçada é típica da cristalização do PVAI.



FIGURA 38 - Membranas de hidrogéis PVAI obtidas por reticulação térmica variando-se a concentração de PEG.

5.3.8 Citotoxicidade

O teste de citotoxicidade mostrou comportamentos semelhantes ao controle negativo, ou seja, as membranas não apresentaram toxicidade. Todos os extratos apresentaram resposta negativa. Desta forma, é possível afirmar que os hidrogéis sintetizados por reticulação térmica, são caracterizados como não-citotóxicos, como pode ser observado na figura 39.

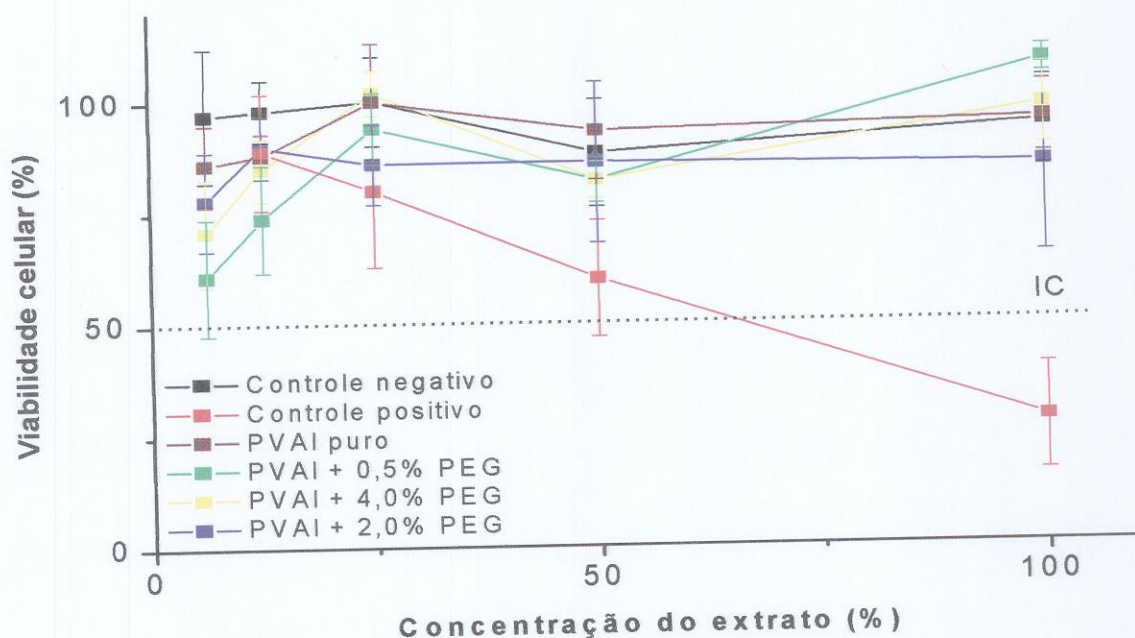


FIGURA 39 – Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.

5.4 – RETICULAÇÃO QUÍMICA PVAI+PVP+ÁCIDO CÍTRICO

As membranas de hidrogéis obtidas por reticulação química foram sintetizadas usando ácido cítrico como agente reticulante e ácido clorídrico como catalisador. Para uma mesma relação de PVAI / PVP variou-se a concentração do ácido cítrico. A concentração máxima utilizada foi de 3,0% de ácido cítrico que apresentou características estáveis. Também foi preparada uma matriz PVP + PVAI sem agente reticulante para comparação. Quando colocada em água a membrana desintegrou-se impossibilitando as análises e indicando que este sistema sem agente reticulante não se mantém estável.

5.4.1 Intumescimento

A figura 40 mostra as curvas de intumescimento das membranas de reticulação química. A matriz PVAI + PVP + 0,5 % de ácido cítrico intumesce relativamente mais do que as matrizes com 2,0 e 3,0 % de agente reticulante. Quando aumenta a concentração do ácido cítrico diminui o intumescimento, o que é atribuído ao aumento da reticulação da membrana. Os valores de equilíbrio de intumescimento em água das matrizes de hidrogéis com diferentes concentrações 0,5, 2,0 e 3,0% de ácido cítrico foram respectivamente 58,7, 44,5 e 40,4%.

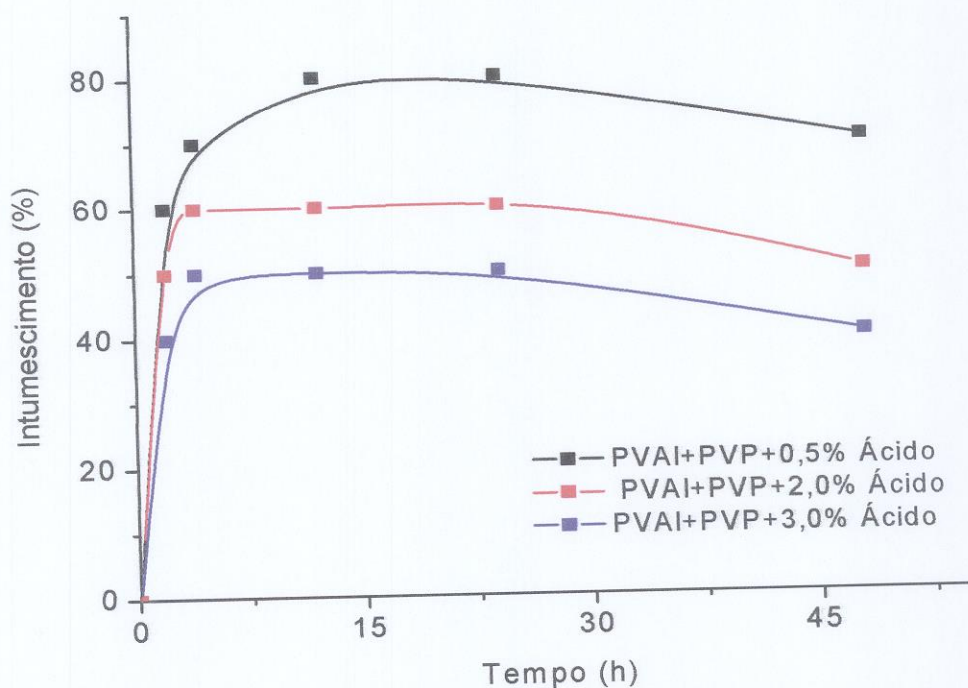


FIGURA 40 – Curvas de intumescimento da matriz de PVAI + PVP variando-se a concentração de ácido cítrico.

5.4.2 Fração gel

O conteúdo de fração gel está associado à extensão de reticulação da matriz. A tabela 12 apresenta a porcentagem da fração gel das matrizes de hidrogéis. O resultado está também relacionado à capacidade de intumescimento, quanto maior o grau de reticulação da matriz menor é o grau de intumescimento e isto, foi verificado nas formulações preparadas.

TABELA 12 – Fração gel em porcentagem (%) das matrizes de hidrogel obtidas por reticulação química.

Membrana	Fração gel (%)
PVP + PVAI + 0,5 ácido cítrico	40,0
PVP + PVAI + 2,0 ácido cítrico	59,6
PVP + PVAI + 3,0 ácido cítrico	67,1

5.4.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)

Importante ressaltar que a membrana reticulada apresenta um resultado de maior estabilidade térmica como observado na figura 41. O evento de decomposição do PVAI que se inicia em 273 °C é deslocado para uma temperatura superior de 80 °C de tabela 13, nas concentrações utilizadas no estudo evidenciando o aumento da estabilidade térmica. O evento de decomposição do PVP não sofre alterações significantes. Os valores de perda de massa das membranas e de resíduo final são praticamente os mesmos.

Como pode ser observado na figura 42, as curvas de DTGA comprovam o aumento da estabilidade térmica pelo deslocamento da temperatura máxima de decomposição do PVAI, a reticulação química modifica a estrutura do polímero dificultando a sua decomposição. Observa-se na mesma figura que o PVP se mantém com a mesma T_{max} .

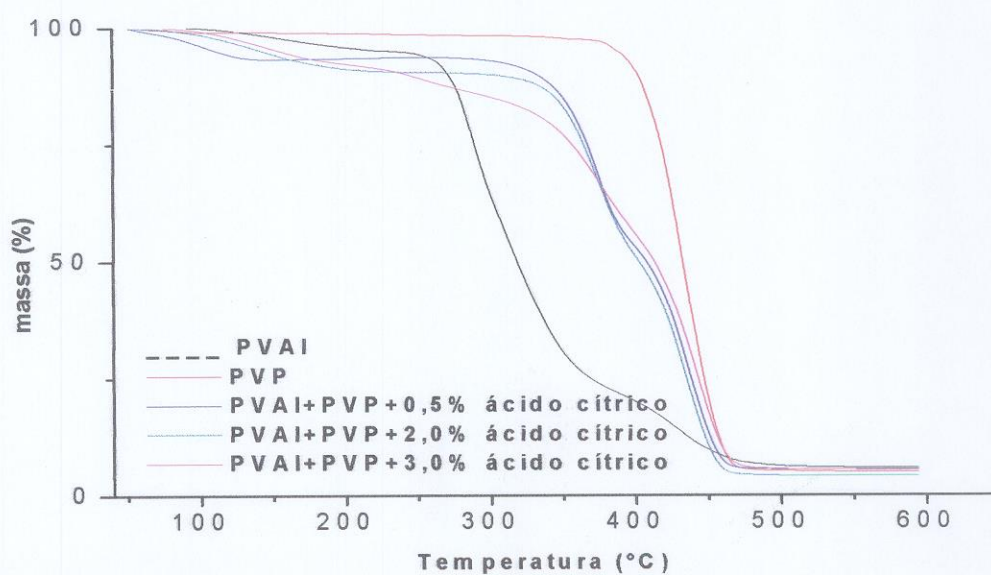


FIGURA 41 – Curvas de decomposição térmica dos hidrogéis por reticulação química, variando-se a concentração de ácido cítrico.

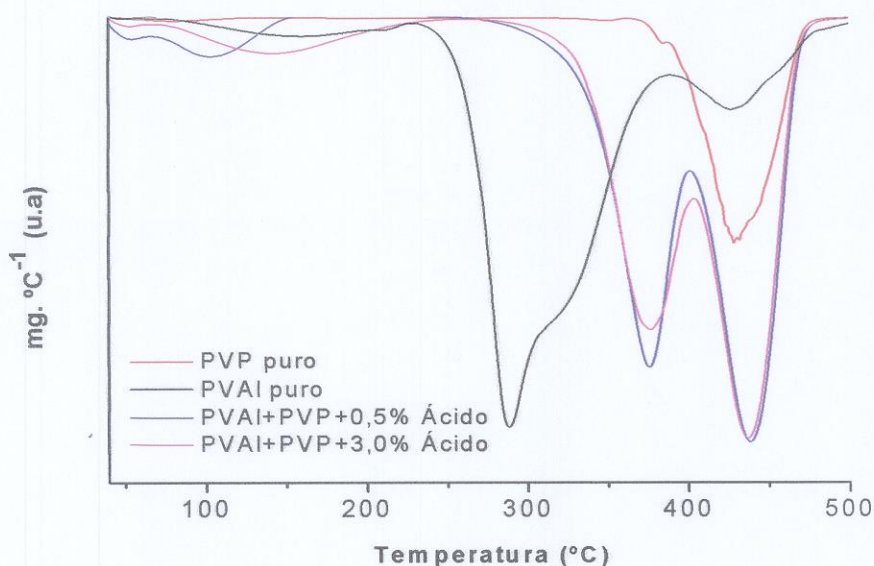


FIGURA 42 – Curvas de DTGA de hidrogéis PVAI / PVP por reticulação química.

TABELA 13 - Resultados da T_{onset} da perda de massa e do resíduo das matrizes de hidrogéis PVAI+PVP+ácido cítrico, obtidos por reticulação química.

	1ª T (°C) (água)	2ª T (°C)	3ª T (°C)	Perda de massa (%)	Resíduo (%)
PVP puro	-	-	410,7	95,2	4,8
PVAI puro	-	273,3	408,3	94,1	5,9
PVP + PVAI + 0,5 ácido	105	349,0	425,3	94,4	5,6
PVP + PVAI + 2,0 ácido	105	358,0	424,3	95,8	4,2
PVP + PVAI + 3,0 ácido	105	358,0	424,7	94,5	5,5

T= Temperatura inicial de decomposição do evento.

Há também uma diferença de cerca de 15°C para o início de decomposição do terceiro evento. Atribui-se essa diferença à contribuição do terceiro evento da decomposição do PVAI reticulado pois a estabilidade da pirrolidona ao ataque ácido torna pouco provável a ocorrência de reticulação no PVP.

5.4.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Como pode ser observado na figura 43 as curvas de DSC o pico localizado a 150 °C atribuído ao PVP não sofreu deslocamento, porém nesse evento também há a contribuição de desidratação do PVAI. O pico atribuído à fusão do PVAI (219 °C) é

deslocado de cerca de 5 – 9 °C com diminuição de intensidade. Isto indica que com a reticulação química do PVAI diminuem as cadeias livres para cristalização. Os valores das curvas de DSC foram associados a segunda varredura.

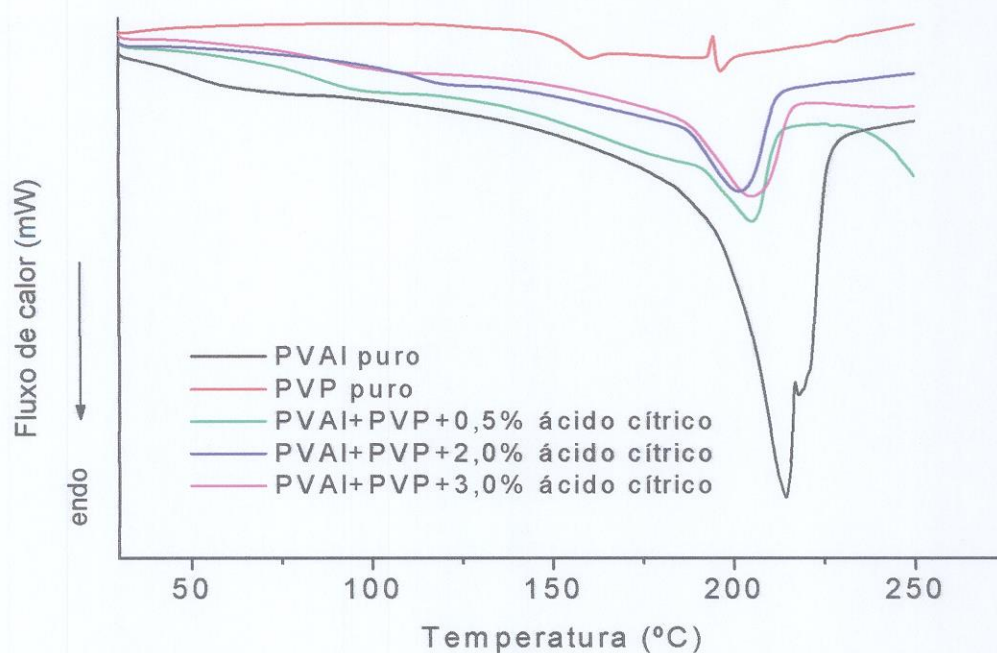


FIGURA 43 – Curvas de DSC primeira fusão PVP + PVAI variando-se a porcentagem de ácido cítrico.

Na tabela 14 estão apresentados os valores da temperatura das matrizes de hidrogéis obtidos por reticulação química. A temperatura de 219 °C foi atribuída a parte cristalina do PVAI, como o PVP é amorfo não contribuiu com esse evento. A baixa intensidade do pico em cerca de 210 °C, está relacionado com a diminuição de cristalinidade do PVAI em razão da reticulação

TABELA 14 - Valores de T_f das matrizes de hidrogéis PVP+PVAI + ácido cítrico.

Amostras	T (°C)
PVAI puro	219
PVP puro*	-
PVAI + PVP + 0,5% Ácido cítrico	210
PVAI + PVP + 2,0% Ácido cítrico	210
PVAI + PVP + 3,0% Ácido cítrico	215

* Polímero amorfo não apresenta T_f .

O mecanismo que ocorre de reticulação do PVAI envolve o ataque nucleofílico catalisado por ácido. O carbono carbocátio do ácido cítrico é protonado. O átomo de hidrogênio do PVAI age como nucleófilo sobre o C carboxílico formando o estado intermediário. A deslocalização eletrônica no átomo de oxigênio é estabilizada como consequência da eliminação da molécula de água.

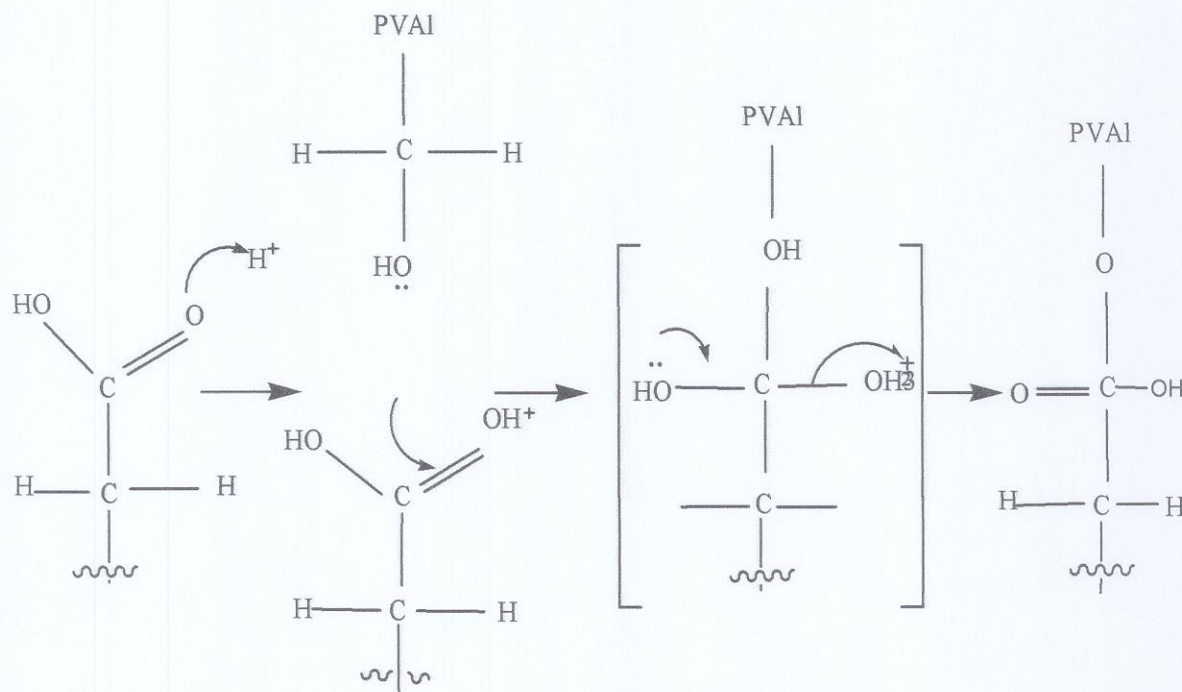


FIGURA 44 - Mecanismo que ocorre na reticulação do PVAI envolvendo o ácido cítrico.

5.4.5 Análise de infravermelho (IR)

Na tabela 15 estão apresentadas atribuições às bandas dos espectros de infravermelho obtidos para as matrizes de hidrogéis por reticulação química variando-se a concentração de ácido cítrico. Como pode ser observado na figura 45, a menor intensidade relativa e o estreitamento da banda correspondente às ligações O-H (3000 a 3500 cm^{-1}) indica que houve condensação. Aumentando-se a concentração de ácido cítrico para 2,0% observa-se maior estreitamento do pico. Nota-se também o deslocamento do sinal atribuído à carbonila do PVP de $1660 - 1640\text{ cm}^{-1}$ quando o PVAI é adicionado. O deslocamento dessas bandas para menores valores de frequência indica a formação de ligações de hidrogênio entre os grupos carbonila e hidroxila como resultado das interações de PVAI com o PVP [77]. O aparecimento de sinal relativo à carbonila do PVAI reticulado é observado no espectro do 2,0% de ácido cítrico a 1736 cm^{-1} , enquanto que o estiramento do grupo C-O-C do éster é observado a $1100-1050\text{ cm}^{-1}$.

TABELA 15 – São apresentadas as principais bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de hidrogéis PVA+PVP, variando-se a concentração de ácido cítrico.

Banda (cm^{-1})	Estiramento relativo
3000-3500	O-H PVAI
1142	C-O PVAI
1666	C=O PVP
1290	C-N PVP
600-550	N-C-O PVP
1100-1050	C-O-C Éster
1736	C=O Reticulado

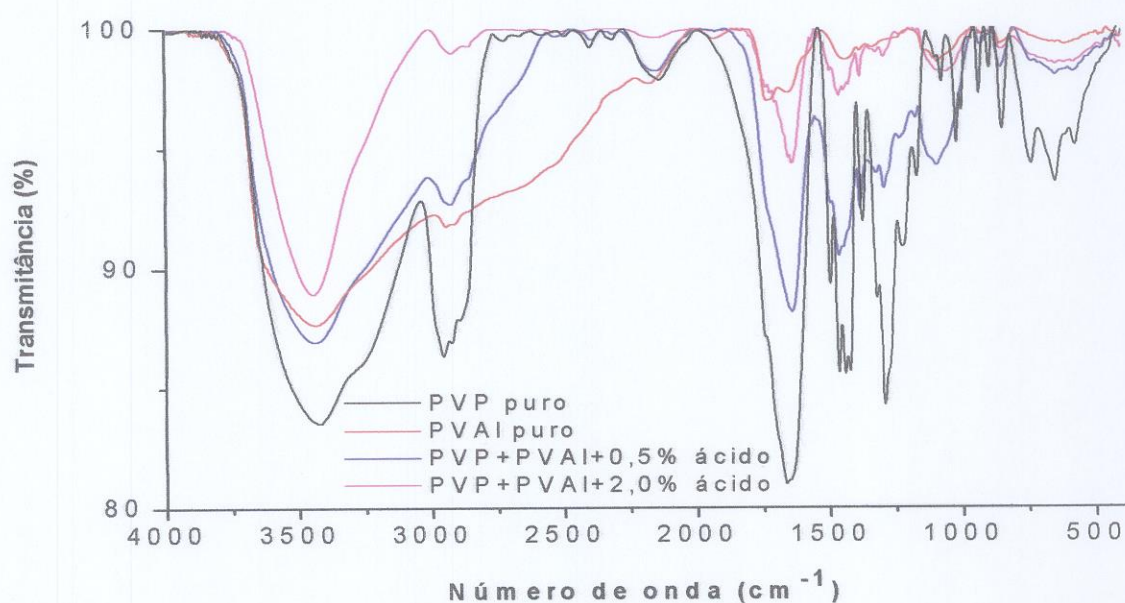


FIGURA 45 – Espectros de absorção na região do infravermelho das membranas dos hidrogéis obtidos por reticulação química.

5.4.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Como podem ser observadas na figura 46 as micrografias das membranas de hidrogéis estudadas mostram material homogêneo. Observa-se que a matriz de hidrogel com 0,5% de ácido cítrico apresenta uma rugosidade elevada na superfície de fratura que diminui com o aumento da concentração de ácido cítrico para 2%.

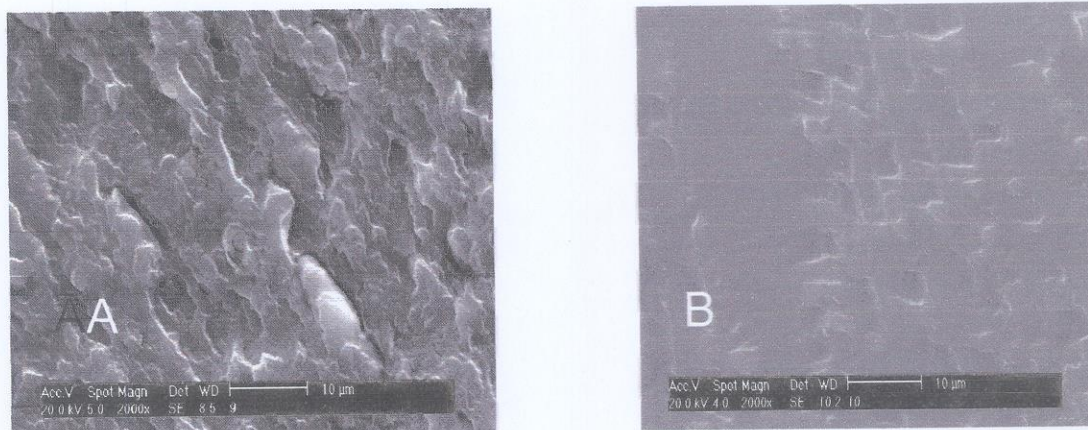


FIGURA 46 - Micrografias de MEV da superfície de fratura para as matrizes de hidrogéis PVAI+PVP variando-se a concentração de ácido cítrico (A) 0,5% (B) 2,0%

5.4.7 Matrizes de hidrogéis PVP+PVAI+Ácido cítrico

As matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação química apresentam características físicas diferentes das reticulações obtidas por irradiação gama e reticulação física, como são ilustradas na figura 47a e 47b. Quando submetida ao intumescimento apresenta-se em forma de hidrogel mantendo-se maleável.

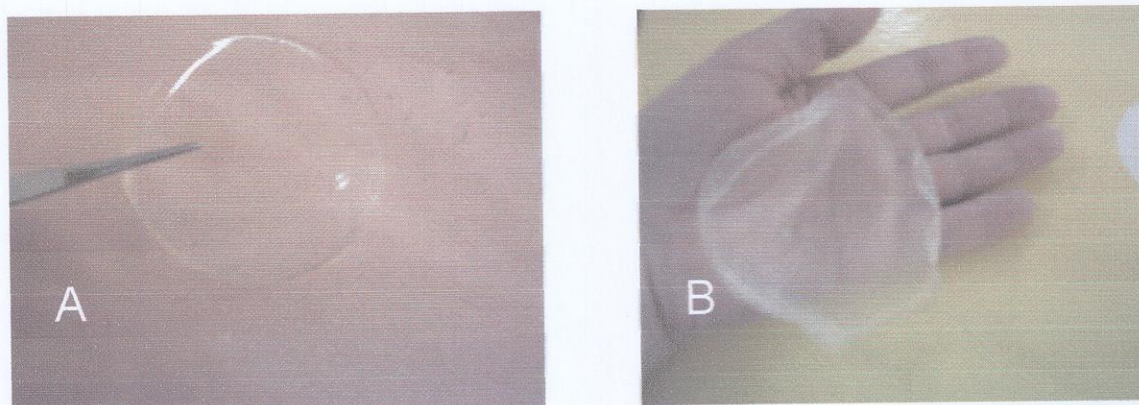


FIGURA 47 – Fotos das matrizes de hidrogéis PVP+PVAI+Ácido cítrico, obtidos por reticulação química. (A) Antes do intumescimento (B) Após intumescimento.

5.4.8 – Citotoxicidade

Como no resultado do teste não foi observado halo de toxicidade ao redor ou sobre as amostras das células, e estas que se mostraram íntegras sem nenhuma alteração morfológica, apresentando comportamento idêntico a curva do controle negativo, figura 48, então é possível afirmar que os hidrogéis sintetizados por reticulação química desenvolvidos nesse trabalho não causam morte ou prejuízo à população celular sendo, portanto, caracterizados como não-citotóxicos.

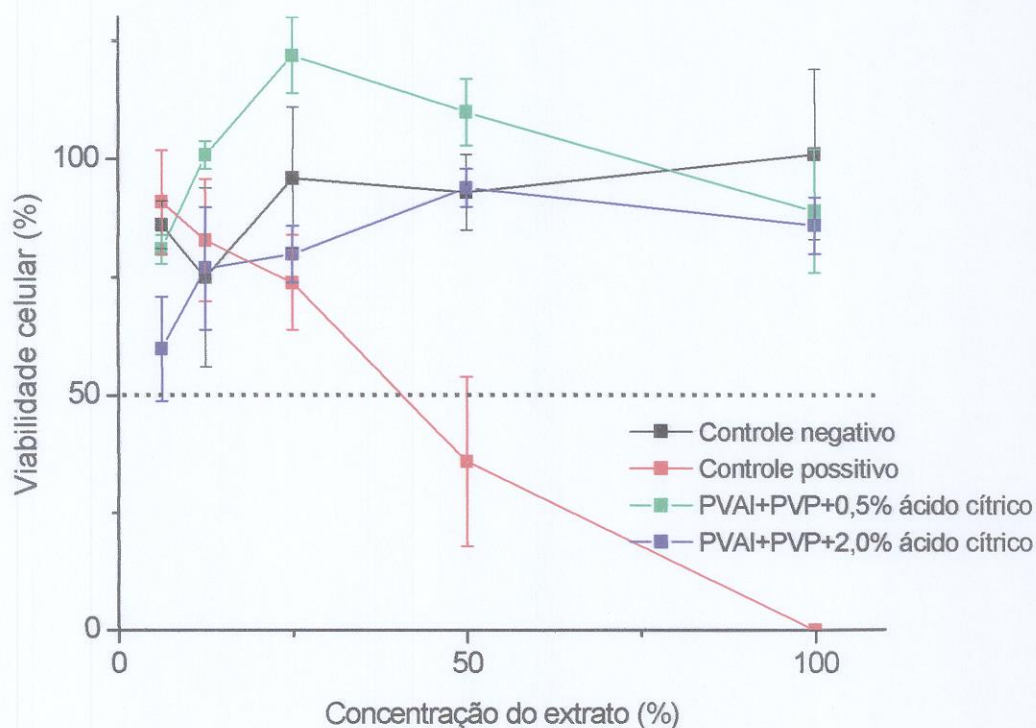


FIGURA 48 - Curvas de viabilidade celular das matrizes de hidrogéis pela incorporação do vermelho neutro.

5.5 RETICULAÇÃO QUÍMICA PVAI+PEG+ÁCIDO CÍTRICO

5.5.1 Intumescimento

A absorção de água ocorreu mais rápida nas primeiras 6 horas, devido à superfície hidrofílica e capilaridade. No estágio que se estende até às 16h a absorção ocorre com menor velocidade mantendo um equilíbrio, provavelmente, a uma relaxação lenta da rede polimérica. A figura 49 permite observar que quanto maior a concentração do ácido cítrico menor é a quantidade de água absorvida, devido a maior reticulação entre as cadeias poliméricas.

Os valores apresentados do intumescimento pelo processo de reticulação química das membranas de hidrogéis de PVAI + 1,5% de PEG com 0,5, 2,0 e 4,0% de ácido cítrico são respectivamente 28,3, 22,0 e 20,5%.

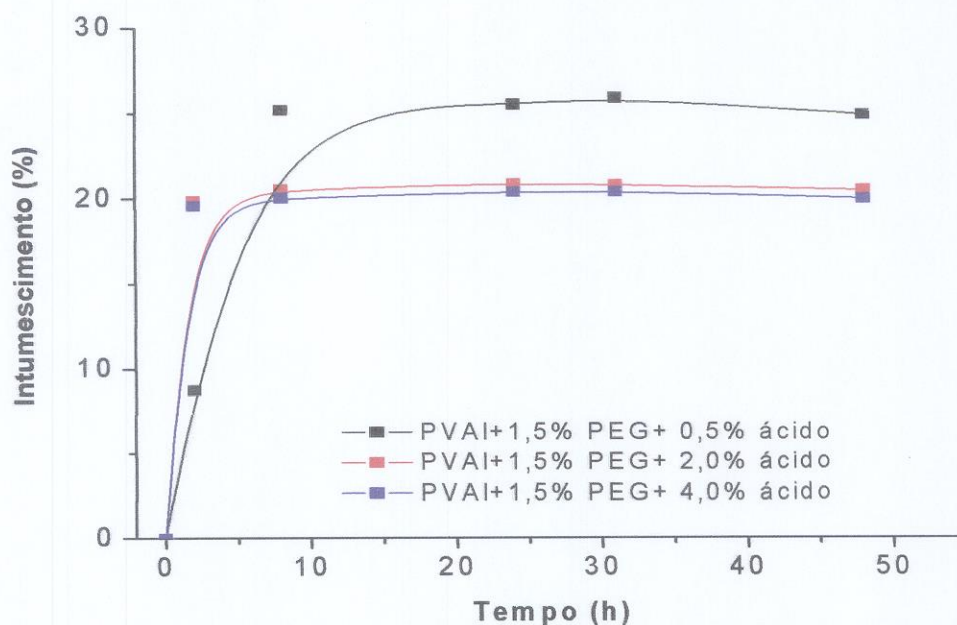


FIGURA 49 – Curva de intumescimento das matrizes de hidrogéis de PVAI + PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.

5.5.2 Fração gel

Observa-se que com o aumento da concentração do ácido cítrico nas matrizes de hidrogéis ocorre uma variação na formação de ligações cruzadas, aumentando a porcentagem (%) da fração gel. Com isso ocorre um decréscimo nos valores que exprimem o grau de equilíbrio de intumescimento das matrizes, tabela 16.

TABELA 16 – Apresenta a fração gel em porcentagem (%) das matrizes de hidrogéis PVAI + 1,5% de PEG obtidas por reticulação química, variando a concentração de ácido cítrico.

Membranas	Fração gel (%)
PVAI + PEG + 0,5 % Ácido	62,3
PVAI + PEG + 2,0 % Ácido	76,8
PVAI + PEG + 4,0 % Ácido	82,2

5.5.3 Análise termogravimétrica (TGA / DTGA)

Como pode ser observado nas figuras 50 e 51 há um aumento na estabilidade térmica das matrizes de hidrogéis quando submetidos à variação da concentração do ácido

cítrico. A formação de rede polimérica estabiliza termicamente a membrana e o início de decomposição ocorre a temperatura superior quando comparado com o PVAI puro.

Nos termogramas dos hidrogéis da fig. 51, no intervalo de 100-200 °C observa-se um evento relacionado as três matrizes de hidrogéis, esse evento representado na curva de derivada indica duas perdas, a eliminação de água e em seguida a perda de massa atribuída ao PEG.

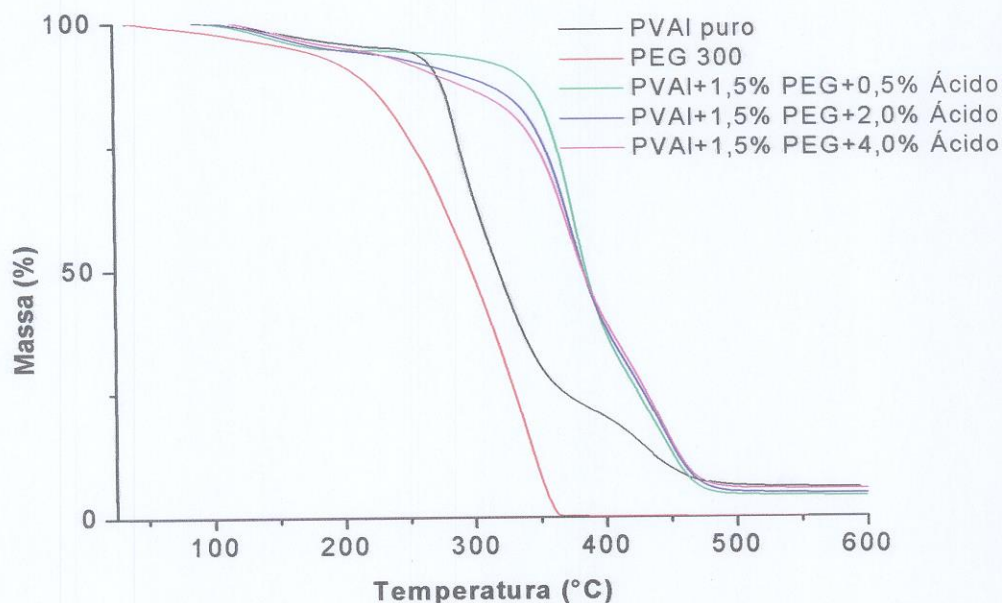


FIGURA 50 – Curvas de TGA das matrizes de hidrogéis PVAI+ 1,5% de PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.

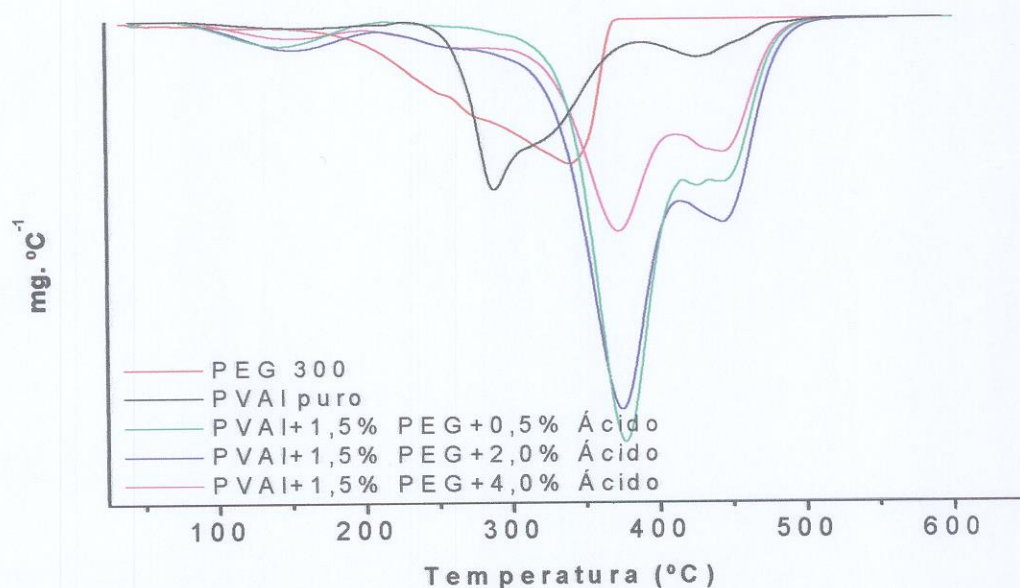


FIGURA 51 – DTGA das matrizes de hidrogéis PVAI+ 1,5% de PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.

Observa-se um aumento da temperatura no início de decomposição nas membranas reticuladas com ácido cítrico de cerca de 75 °C de diferença, relacionando-se aos valores de temperatura dos polímeros puros, de acordo com o segundo e terceiro eventos de decomposição (2ª T e 3ª T) da tabela 17.

TABELA 17 – T_{onset} e perda de massa das membranas de hidrogéis.

Amostra	1ª T (°C) (água)	2ª T (°C)	3ªT (°C)	Perda de massa (%)
PVAI puro	-	272,3	408,3	94,1
PEG 300	-	257,4		
PVAI + 1,5% PEG + 0,5% ácido cítrico	110	351	443,0	95,8
PVAI + 1,5% PEG + 2,0% ácido cítrico	110	346,5	443,0	95,2
PVAI + 1,5% PEG + 4,0% ácido cítrico	110	345,6	447,9	94,4

T= Temperatura inicial de decomposição

Com referência ao terceiro evento de decomposição observa-se um deslocamento de temperatura de decomposição de cerca de 30 °C. Esse deslocamento está associado à reticulação e é mais acentuado que no caso anterior da reticulação em presença do PVP. Estima-se que a presença de ligações de hidrogênio entre PVP e PVAI do caso anterior tenha restringido a uma reticulação mais extensa das cadeias de PVAI. Isto é corroborado pelos valores de intumescimento onde se observa que as membranas PVAI+PVP+ácido cítrico intumescem mais que as de PVAI + ácido cítrico.

5.5.4 Análise de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

À medida que ocorre a reticulação o evento de desidroxilação do PVAI desloca-se bem como a temperatura de fusão que diminui. Para a membrana 4,0% ácido cítrico observa-se na figura 52 uma fusão alargada entre 160-200 °C. A tabela 18 indica a temperatura de fusão (T_f) é uma função da densidade de reticulação, e segundo Mandelkern, a área obtida na curva para o calor de fusão é maior quanto mais alto o grau de cristalinidade [78]. Para o nosso sistema pode ser observada uma tendência em diminuir

o ponto de fusão e a cristalinidade para todas as matrizes de hidrogéis, com o aumento da concentração de agente reticulante e, portanto, da extensão da reticulação.

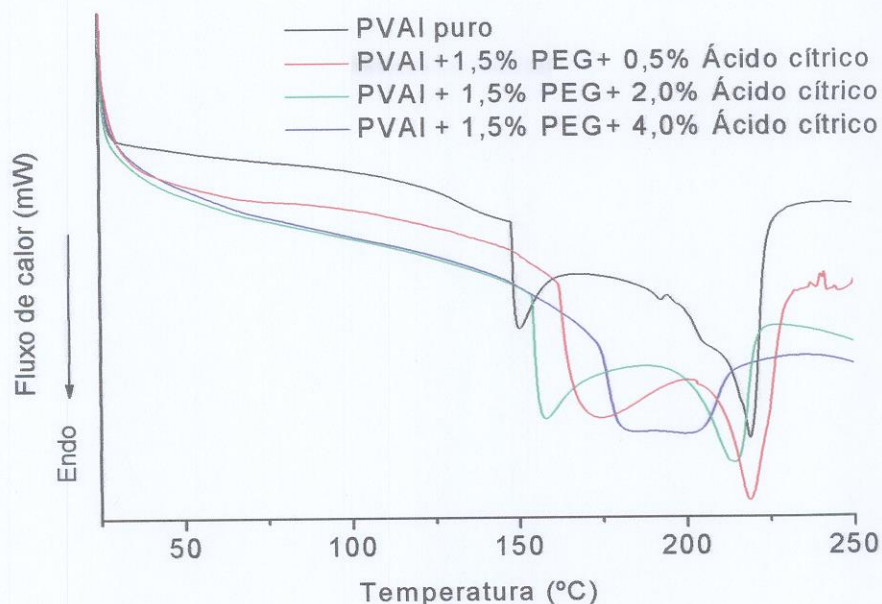


FIGURA 52 - Curvas de DSC das matrizes de hidrogéis PVAI + 1,5% de PEG, variando-se a concentração de ácido cítrico.

TABELA 18 – Valores dos picos de fusão (T_f) para as membranas de hidrogéis reticulação química PVAI+1,5% PEG variando-se a concentração de ácido cítrico.

Amostras	T (°C)
PVAI puro	219
PVAI + 1,5% PEG + 0,5% Ácido cítrico	218
PVAI + 1,5% PEG + 2,0% Ácido cítrico	214
PVAI + 1,5% PEG + 4,0% Ácido cítrico	182-210

Comparando-se a estabilidade térmica em termos de temperatura de início de decomposição (tab. 4, tab. 13 e tab. 17) verifica-se:

- 1) Que os eventos de perda de massa são moderadamente deslocadas para temperatura superior no caso da reticulação gama.
- 2) Que o primeiro evento de decomposição do PVAI é fortemente deslocado para temperatura superior (indicando uma estabilidade) na reticulação química das membranas de PVAI / PVP, fato justificado pela presença de ligações de hidrogênio.

- 3) Que para as membranas de PVAI na reticulação química outros eventos de decomposição do PVAI são fortemente deslocados para temperatura superior.

5.5.5 Análise de infravermelho (IR)

Os valores dos picos principais da figura 53 estão descritos atribuídos na tabela 19. Observa-se a presença do PEG no PVAI. O aparecimento do pico a 1709 cm^{-1} refere-se ao estiramento do pico C=O de ésteres formado pelo PVAI e ácido cítrico. O estiramento de C-O-C do éster formado é observado a 1096 cm^{-1} com deslocamento da absorção de C-O-C do PEG para 1143 cm^{-1} demonstrando a interação deste com o PVAI.

TABELA 19 – Atribuições das principais bandas de infravermelho encontradas nas matrizes de hidrogéis PVA+1,5% PEG, variando-se a concentração de ácido cítrico.

Bandas (cm^{-1})	Estiramento relativo
3000-3500	O-H PVAI
1088	C-O PVAI
1130-1100	C-O-C PEG
1096	C-O-C éster
1709	C=O reticulado

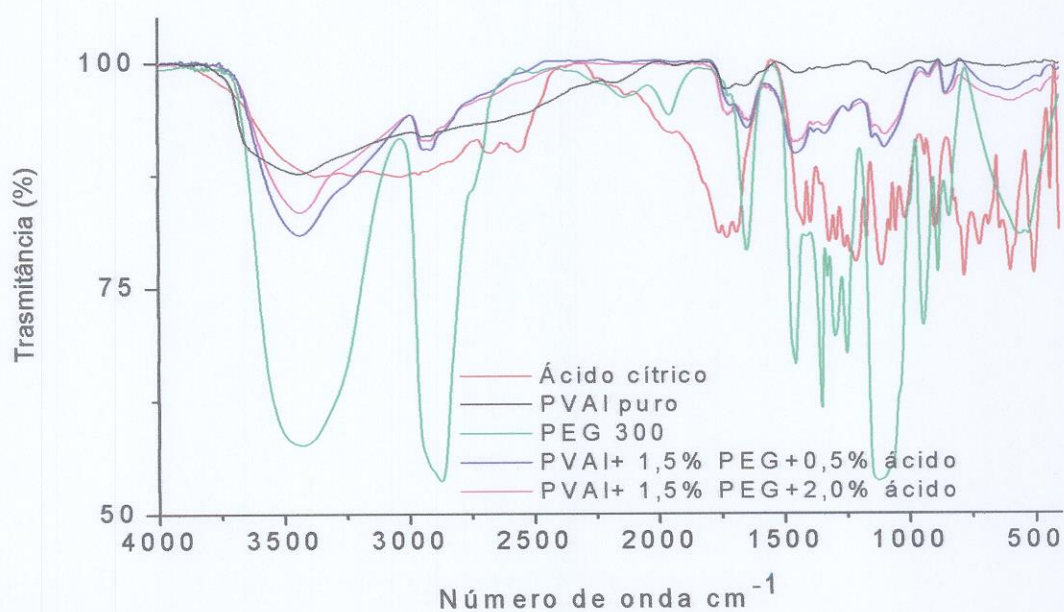


FIGURA 53 - Espectro de absorção na região do infravermelho das membranas de hidrogéis, obtidas por reticulação química, variando a concentração de ácido cítrico.

5.5.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As micrografias das membranas de hidrogéis estudadas são ilustradas na figura 54. A micrografia na superfície de fratura apresenta homogeneidade das matrizes de hidrogéis. Não foi observado mudança na morfologia variando-se a concentração do ácido cítrico. Nas condições submetidas de análise não foi possível observar a presença de poros. Apenas foi possível observar o empacotamento apresentado em forma de lâminas.

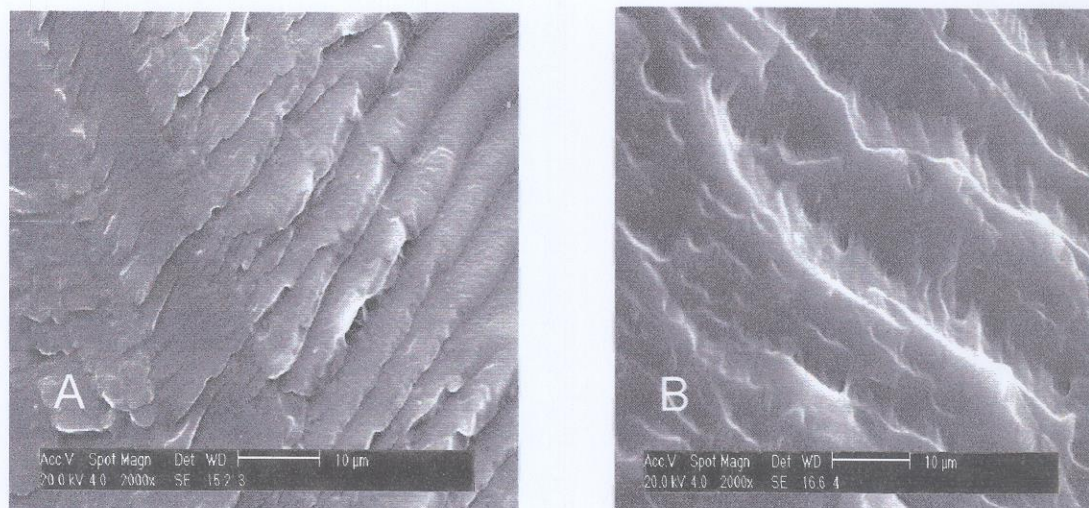


FIGURA 54 – Micrografias de MEV da superfície de fratura das matrizes de hidrogéis PVA1 + 1,5% de PEG, variando-se a concentração de ácido cítrico (A) 0,5% (B) 2,0%

5.5.7 Matrizes de hidrogel químico

A figura 55 ilustra as membranas de hidrogéis PVA1+1,5% de PEG obtidas pelo processo químico, variando-se a concentração de ácido cítrico.

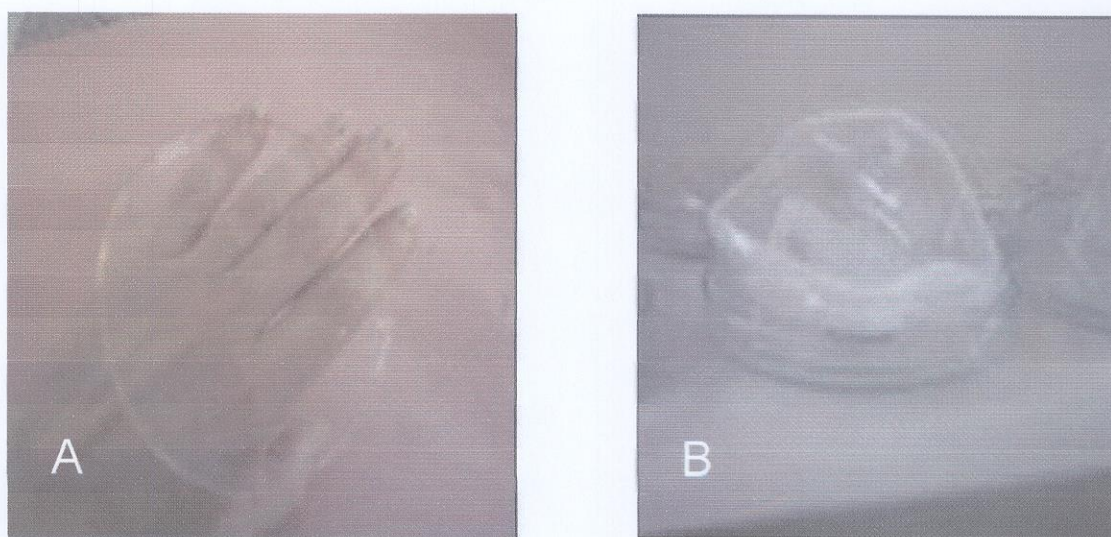


FIGURA 55 - Hidrogel PVA1 + PVP + 1,5% PEG + ácido cítrico (A) 2,0% (B) 4,0 %

5.5.8 - CITOTOXICIDADE

O teste de citotoxicidade mostrou comportamentos semelhantes ao controle negativo, ou seja, nenhuma das diferentes composições reticuladas apresentou toxicidade. Desta forma, é possível afirmar que os hidrogéis sintetizados por reticulação química desenvolvidos nesse trabalho não causam morte ou prejuízo à população celular sendo, portanto, caracterizados como não-citotóxicos, como pode ser observado na figura 56. O teste de citotoxicidade também garante que não houve contaminação em quantidade significativa durante o processamento, não comprometendo o experimento.

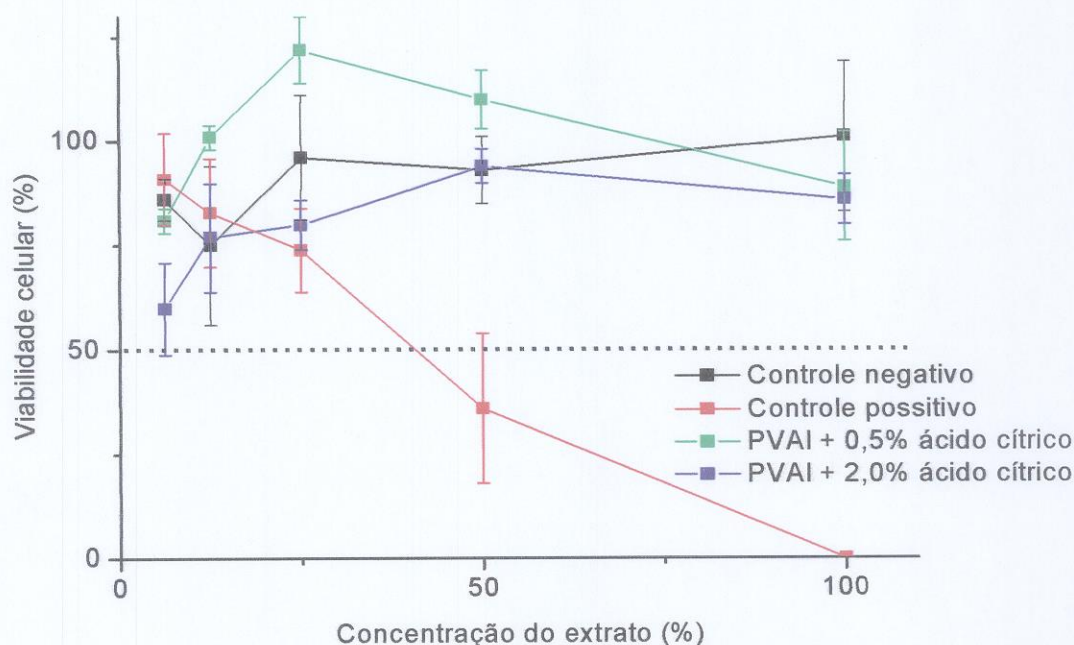


FIGURA 56 - Curvas de viabilidade celular pela incorporação do vermelho neutro das matrizes de hidrogéis PVAI+1,5% PEG obtidas por reticulação química, variando-se a concentração de ácido cítrico.

5.5.9 LIBERAÇÃO DO GLUCANTIME

A liberação do fármaco foi estudada a partir da incorporação do glucantime em matrizes obtidas por processos diferentes de reticulação: gama PVAI+PVP +0,5% de PEG, térmico PVAI+PVP+2,0% de PEG, PVAI+2,0% de PEG e químico PVAI+PVP+2,0% ácido cítrico.

Foram selecionadas as matrizes que apresentassem maior reticulação e, portanto, pudessem liberar o fármaco de forma lenta e contínua. Segundo Y. Ikeda et al [79] a área

disponível para a difusão do soluto é o espaço livre que existe entre as cadeias macromoleculares de hidrogéis e quanto mais reticulado for o hidrogel, menores serão os espaços entre elas. Quando os espaços entre as cadeias forem preenchidos por água ou fluidos biológicos, alcançando equilíbrio de intumescimento, essas cadeias se alongarão e as partículas menores se difundirão para fora da matriz de hidrogel.

As amostras dos hidrogéis com a concentração do fármaco foram colocadas em frascos com 10 mL de água e colocadas em uma centrífuga com temperatura controlada a 37,8 °C. Após 1 hora do início do experimento foi colhida uma alíquota de 1 mL a cada hora por um período de 6 horas e outra alíquota de 1 mL após 24 horas de ensaio. Supõe-se que este tempo foi suficiente para que o estado estacionário para a liberação do glucantime fosse estabelecido. Isto foi baseado no fato de que o mecanismo de difusão deste sistema controlado por intumescimento da matriz polimérica reticulada a difusão deve aumentar à medida que a água penetre no polímero.

A análise da cinética deste processo evidenciou um valor próximo de concentração da liberação do fármaco entre as matrizes obtidas pelo processo químico e pelos outros processos, por irradiação gama e térmico. O tempo de coleta das alíquotas foi feito por um período de 24 horas tempo suficiente para determinar diferenças entre as matrizes dos vários processos de reticulação para a liberação do glucantime. As matrizes apresentam a ordem relativa de liberação: PVA/PVP 2% por ciclo térmico > PVA/PVP 2% ácido cítrico > PVA/PVP 0,5% por irradiação gama. E são conforme anteriormente determinado distintos em conteúdo de gel de 40, 60 e 78% respectivamente.

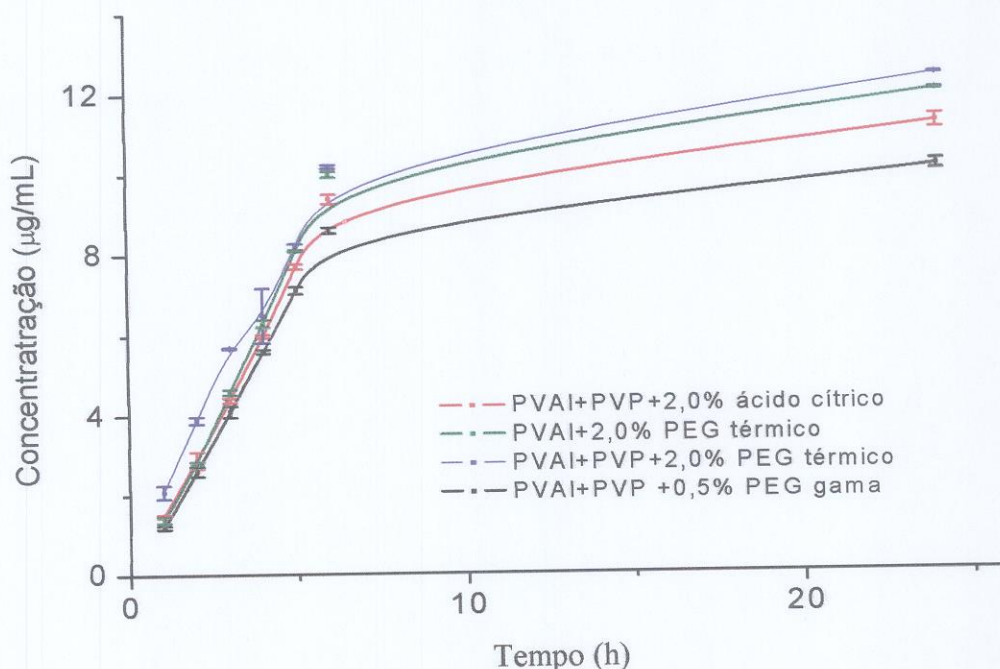


FIGURA 57 – Cinética da liberação do glucantime das matrizes de hidrogéis obtidas pelo reticulação com agente químico, por radiação gama e por ciclos térmicos.

5.5.9.1 Absorbância, desvio padrão e concentração das membranas de hidrogéis

Nas tabelas 20 a 23 foram observados que os valores das concentrações do fármaco liberado pelas matrizes de hidrogéis se mantêm próximos uns dos outros. Mesmo sendo um pouco menor a concentração liberada pela matriz de hidrogel obtida por reticulação gama, não é suficiente para afirmar que ela apresenta liberação mais lenta em relação às outras, obtidas por reticulação química e pelo processo térmico.

TABELA 20 – Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por reticulação química PVAI+PVP+ 2,0% de ácido cítrico, comprimento de onda 500 nm.

Tempo (h)	Aliquota de solução (µL)	Absorvância média*	Concentração µ.L ⁻¹
1	1000	1,260 ± 0,036	1,531
2	1000	1,132 ± 0,211	1,380
3	1000	1,246 ± 0,057	1,517
4	1000	1,323 ± 0,038	1,611
5	1000	1,431 ± 0,064	1,742
6	1000	1,376 ± 0,115	1,670
24	1000	1,600 ± 0,170	1,830

(* - Referente a três leituras)

TABELA 21 – Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por reticulação gama PVAI+PVP+Ágar+ 0,5% PEG, comprimento de onda 500 nm.

Tempo (h)	Aliquota de solução (µL)	Absorvância média*	Concentração . µL ⁻¹
1	1000	1,026 ± 0,045	1,249
2	1000	1,171 ± 0,119	1,426
3	1000	1,209 ± 0,141	1,472
4	1000	1,248 ± 0,047	1,520
5	1000	1,196 ± 0,091	1,456
6	1000	1,234 ± 0,079	1,503
24	1000	1,516 ± 0,121	1,846

(* - Referente a três leituras)

TABELA 22 – Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por processo térmico PVAI+PVP+2,0% PEG comprimento de onda 500 nm.

Tempo (h)	Alíquota de solução (μL)	Absorvância média*	Concentração μ.L ⁻¹
1	1000	1,174 ± 0,163	2,119
2	1000	1,152 ± 0,086	1,855
3	1000	1,424 ± 0,013	1,734
4	1000	1,672 ± 0,672	1,818
5	1000	1,417 ± 0,079	1,725
6	1000	1,615 ± 0,044	1,967
24	1000	1,814 ± 0,016	2,209

(* - Referente a três leituras)

TABELA 23 – Valores de absorvância média, desvios padrão e concentração respectiva para a membrana de hidrogel obtida por processo térmico PVAI+ 2,0% PEG, comprimento de onda 500 nm.

Tempo (h)	Alíquota de solução (μL)	Absorvância média*	Concentração μ.L ⁻¹
1	1000	1,228 ± 0,081	1,495
2	1000	1,113 ± 0,041	1,355
3	1000	1,476 ± 0,064	1,797
4	1000	1,404 ± 0,084	1,710
5	1000	1,444 ± 0,024	1,758
6	1000	1,578 ± 0,074	1,922
24	1000	1,671 ± 0,023	2,035

(* - Referente a três leituras)

6 – CONCLUSÕES

Os três processos de reticulação, por irradiação gama, físico por ciclos térmicos de congelamento e descongelamento e por agente químico demonstraram que hidrogéis de PVAI / PVP são obtidos com características diferentes e que a presença de PEG influencia consideravelmente nas propriedades das membranas, proporcionando uma maior flexibilidade e extensibilidade, facilitando o seu manuseio. O uso de PEG em quantidade crescente, no processo e radiação, possibilita a obtenção de diversos níveis de intumescimento. No processo por ciclos térmicos o intumescimento limita-se a um nível de 2 - 4% de PEG o que ainda mantém as membranas íntegras. As membranas obtidas por reticulação com agente químico não incorporam o PEG e suas propriedades são melhores na ausência deste, nesse caso o intumescimento diminui em função do aumento da concentração de ácido cítrico.

As matrizes de hidrogéis reticuladas por irradiação gama apresentaram valores decrescentes de fração de gel com o aumento da concentração de PEG.

A presença do PEG em matrizes de hidrogéis de PVAI forma hidrogéis menos densos a partir dos ciclos térmicos.

As membranas obtidas termicamente apresentaram valores de gel entre 10 - 33% enquanto que as obtidas por agente químico ensaiadas entre 40 - 68% e as irradiação gama na faixa superior de 50 a 78%.

O intumescimento nos hidrogéis esterilizados é mais elevado do que nos hidrogéis não esterilizados devido à ocorrência de cisão de cadeias na estrutura polimérica decorrente do processo de irradiação. O aumento de fração gel nas membranas esterilizadas indica que paralelamente à quebra de ligações também ocorre reticulação.

Observa-se que nas matrizes de hidrogéis obtidas por reticulação química a quantidade de gel é maior, quando comparadas com as reticulações por radiação gama e por processo físico.

Comparando-se a estabilidade térmica em termos de temperatura de início de decomposição, verifica-se: que os eventos de perda de massa são moderadamente deslocados para temperatura superior no caso da reticulação gama. Na reticulação pelo processo térmico das membranas de PVAI / PVP não há evidência de reticulação dos polímeros havendo apenas formação de retículo físico. Para as membranas de PVAI na reticulação química eventos de decomposição são fortemente deslocados para temperaturas superiores.

Com base no tempo em que foi analisada a liberação do fármaco glucantime, o resultado da cinética de liberação evidenciou um valor próximo da concentração liberada do fármaco para os exemplos de matrizes obtidas por reticulação por agente químico, por ciclos térmicos e por irradiação gama. A liberação do fármaco glucantime foi positiva. As matrizes apresentam a ordem relativa de liberação: PVA/PVP 2% por ciclo térmico > PVA/PVP 2% ácido cítrico > PVA/PVP 0,5% por irradiação gama. E são conforme anteriormente determinado distintos em conteúdo de gel de 40, 60 e 78% respectivamente.

As características de integridade, citotoxicidade, homogeneidade e intumescimento, observadas nas membranas sintetizadas são evidências que sínteses diferentes podem ser utilizadas para aplicações como liberação de fármaco. De acordo com o grau de reticulação podem ser usadas para liberação rápida ou liberação lenta.

7 - PERSPECTATIVAS FUTURAS

Estudo de secagem utilizando-se a técnica de liofilização, na qual a estrutura pode ser preservada para auxiliar o aparecimento de poros.

Estudar a difusão de biomoléculas de acordo com o tamanho de poros.

Estudar a liberação do fármaco pela cinética de reação e a citotoxicidade do fármaco incorporado na matriz de hidrogel.

Realizar os testes em vivo com membranas contendo o fármaco imobilizado.

8 – BIBLIOGRAFIA

1. ROSIAK, J. M.; ULANSKI, P. Synthesis of Hydrogels by Irradiation of Polymers in Aqueous Solution, **Radiation Physics and Chemistry**, v. 55, p. 139-151, 1998.
2. AJJI, Z.; OTHMAN, I. ROSIAK, J. M. Production of Hydrogel Wound Dressings Using Gamma Radiation, **NIM B**, v. 229, p. 375-380, 2005.
3. LAKOURAJ, M. M.; TAJBAKHSI, M.; MOKHTARY, M. Synthesis and Swelling Characterization of Cross-linked PVP/PVA Hydrogels, **Iranian Polymer Journal**, v.14 (12) p.1022-1030. 2005.
4. YANG, X.; LIU, Q.; CHEN, X.; ZHU, Z. Investigation on the Formation Mechanisms of Hydrogels Made by Combination of γ -Ray Irradiation and Freeze-Thawing, **Journal Polymer Science**, v. 108, p. 1365-1372, 2008.
5. PEPPAS N.A.; STAUFFER S. R., Reinforced uncrosslinked poly(vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing–thawing process: a short review, **Journal Controlled Release**, v. 16, p.35, 1991.
6. LOZINSKY V. I., Study of Cryostructuration of Polymer Systems. XVI. Freeze-thaw-induced Effects in the low Concentration Systems Amylopectin-water, **Russian Chem. Reviews.**, v. 67, p.573, 1998.
7. LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering, **Chemical Reviews**, v. 101, nº 7, 2001.
8. TOMME, S. R. V.; Storm, G.; HENNINK, E. W., *In Situ* Gelling Hydrogels for Pharmaceutical and Biomedical Applications, **International Journal of Pharmaceutics** p. 1–18, 2008.
9. RUIZ, J.; MANTECÓN, A. CADIZ, V., Synthesis and Swelling Characterization of Acid-containing Poly(vinyl alcohol) Hydrogels, **Journal Appl. Polym. Sci.**, v. 81, p. 1444-1450, 2001.
10. WANG, T.; TURHAN, M. GUNASEKARAN, S. Selected properties of pH-sensitive, Biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) Hydrogel, **Polymer Int.**, v.53, p. 911-918, 2004.
11. ATTA, A. M.; ELSAYED, A. M.; SHAFY, H. I. Uses of Electron-beam Irradiation to Prepare pH- and Temperature-Sensitive Hydrogels from Reactive Poly(vinyl alcohol) Grafts, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 108, p. 1706-1715, 2008.
12. ROSIAK, J. M.; ULANSKI, P. Synthesis of Hydrogels by Irradiation of Polymers in Aqueous Solution, **Institute of Applied Radiation Chemistry**, Lodz, Poland, 1998.
13. CHMIELEWSKI, A. G.; CHMIELEWSKA, D. K.; MICHALIK, J. SAMPA, M. H. Prospects and Challenges in Application of Gamma, Electron and ion Beams in Processing of Nanomaterials, **NIM B**, v.265 p. 339-346, 2007.

14. BARROS, J.A.G.; FECHINE, G.J.M.; ALCANTRA, M. R.; CATALANI, L.H. Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) Hydrogels Produced by Fenton Reaction, **Polymer** v.7, p. 8414-8419, 2006.
15. LOPÉRGOLO, L.C.; LUGÃO, A. B.; CATALANI, L. H. Direct UV Photocrosslinking of Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to Produce Hydrogels, **Polymer**, v.44, p. 6217-6222, 2003.
16. BAVARESCO, V. P.; MACHADO, L. D. B.; ZAVAGLIA, C. A. C.; REIS, M. C. Caracterização Mecânica de Hidrogéis de PVAI para serem utilizados como cartilagem artificial reticulados por irradiação. **Rev. Brás. Pesq. Des.**, v. 4 (3) parte 2, p. 1679-1681, 2002.
17. BENAMER, S.; MAHLOUS, M.; BOUKRIF, A. MANSOUURI, B.; YOUCEF, S. L. Synthesis and Characterizations of Hydrogels Based on Poly(vinyl pyrrolidone), **NIMB**, v.248, p. 284-290, 2006.
18. LEE, K. Y. et al. Hydrogels as Extracellular Matrices for Skeletal Tissue Engineering, **Macromolecules**, v.33, p.4291, 2000.
19. PEPPAS, N. A. "Hydrogels in Medicine and Pharmacy", v. III, **CRC PRESS Boca Raton**, 1987.
20. **BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE**, Ministério da Saúde, Disponível em 07 de julho de 2008, <<http://bvsm.saude.gov.br/html/pt/dicas/126leishmania>>.
21. SANGSTER, D. F. et. al. Early Events in High-energy Irradiation of Polymer. In **Technology Polymers**. Washington: **American Chemical Society Symposium Series**, v.381, p. 14-26, 1989.
22. HAJI-SAEID M.; SAMPA, M. H.; RAMAMOORTHY, N.; GÜVEN, O.; CHMIELEWSKI, A. G. The role of IAEA in coordinating research and transferring technology in radiation chemistry and processing of polymers, **NIM B**, v. 265 p. 51-57, 2007.
23. MARCELO, H. et al. Fotoiniciação de Polimerização de Vinílica Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, **Química Nova**, v.21(6) (1998).
24. SPINKS, J. W. T.; WOODS, R. J. **An Introduction to Radiation Chemistry**. New York: John Wiley e Sons Inc, 1990.
25. SCHNABEL, W. **Polymer Degradation, Principles and Practical Applications**. Munich: **Hanser International**, 1981.
26. ORAL, E.; PEPPAS, N. A. Responsive and Recognitive Hydrogels Using Star Polymers, **J. Biomedical Mater Res A**. 2004.
27. YOSHII, F. et al, Irradiation of Crosslinked, Poly(vinyl alcohol) Blended Hydrogel for Wound Dressing, **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 250, 2001.

28. HASSAN, C. M.; PEPPAS, N. A. Structure and Applications of Poly(vinyl alcohol) Hydrogels Produced by Conventional Crosslinking or by Freezing/Thawing Methods, **Polymer Science**, v. 153, p. 37-65, USA, 2000.
29. CRISPIM, E. G. Síntese e Caracterização de Hidrogéis de Poli(álcool vinílico) Modificado com Metacrilato de Glicidila (PVA-Ma) e de PVA-Ma Associado com Sulfeto de Condroetina, **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Maringá – PR, 2006.
30. GODOVSKY, D. Y. Device Applications of Polymer - Nanocomposites, v. 153, **Advances in polymer Science**, v. 68, p. 439-447, 2000.
31. PEPPAS, N. A.; MERRILL E. W. J. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) Hidrogels for Biomedical Applications, **Appl Polym Sci**, 1976.
32. PEPPAS et. al. Biopolymeres PVA Hydrogels Anionic Polymerizations Nanocomposites, **Advances in Polymer Science**, Springer, 2000.
33. GAF CORPORATION, Pasdone K-90, **Boletim Técnico**.
34. ENCYCLOPEDIA POLYMER, Hydrogels, **Science and Engineering**, 2ª Ed., v. 17, p. 783-806, 1993.
35. MERRILL, E. W., DENNILSON, K. A.; SUNG, C., Partitioning and Diffusion of Solutes in Hydrogels of Poly(ethylene oxide) **Biomaterials**, v. 14, n. 15, p. 1117-1126, 1993.
36. SOLANGER, R., PEPPAS, N. A. Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems, **Biomaterials**, v.2, p. 201-214, 1981.
37. SOLANGER, R. Controlled Release of Macromolecules, **Chemtech**, v. 29, p. 98-105, 1982.
38. PEPPAS, N. A.; MERRILL, E. W. Crosslinked Poly(vinyl alcohol) Hidrogels as Swollen Elastic Networks, **J. Appl. Polym. Sci.**, v.21, p 1763-1770, 1977.
39. PEPPAS, N. A.; MERRILL, E. W. Development of Semicrystalline Poly(vinyl alcohol) Hydrogels for Biomedical Applications, **J. Biomed. Materials**, v.11, p. 423-434, 1977.
40. ROSIAK, J. M.; Olejniczak, J. Medical Applications of Radiation Formed Hydrogels. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 42, p. 903-906, 1993.
41. PEPPAS, N. A.; HARLAND, R.S. **Journal of Controlled Release**, v. 26, p. 157-174, 1993.
42. REINHART, C. T.; KORSMEYER, R. W.; PEPPAS, N. A. Macromolecular network structure and its effects on drug protein diffusion. **J. Pharm Technol Prod.** v. 2, p. 9, 1981.

43. JENKINS, M. J. *Biomedical Polymers*, Boca Raton, Boston, New York, Washington, 2007.
44. COLLINS, E. A. *Experiments in polymer science*, Ed. John Wiley & Sons, New York, 1973.
45. MARK, H. F. *Enciclopedia of Polymer Science and Engineering*, Wiley & Sons, Ed. John New York, 1985
46. VOLLHARDT K. P. C., SCHORE, N. E. **Química Orgânica Estrutura e Função**, 4ª Edição, Editora Bookman, São Paulo, 2004.
47. OSSIPOV, D. A.; HILBORN, J. Poly(vinyl alcohol)-Based Hydrogels Formed by "Click Chemistry", **Macromolecules**, v.39, p.1709-1718, 2006.
48. MONTEIRO, V. A. R.; SOUZA, E. F.; AZEVEDO, M. M. M.; GALEMBECK, F. Aluminum polyphosphate nanoparticles: Preparation, particle size determination, and microchemistry. **J. Colloid Interf. Sci.**, v. 2, n. 217, p. 237-248, 1999.
49. WEI A.; PUSZTAY S. V.; STAVENS K. B.; ANDRES R. P. Nanoparticles engaged in cross-linked resorcinarene shells. **Abstr. Pap. Am. Chem. S.**, v. 220, 100-IEC Part 1, 2000.
50. KAWASHIMA, Y. Preface nanoparticulate systems for improved drug delivery. **Adv. Drug Delivery Rev.**, v.1, n.47, p.1-2, 2001.
51. LIMA, K. M.; SILVA, C. L.; RODRIGUES-JÚNIOR, J. M. Microesferas biodegradáveis. **Biotechnol. Cienc. Desenv. (Brasil)**, v. 2, p. 10-13, 2000.
52. YANO, H.; HIRAYAMA, F.; KAMADA, M.; ARIMA, H; UEKAMA, K. J. Colon-specific delivery of prednisolone-appended alpha-cyclodextrin conjugate: alleviation of systemic side effect after oral administration. **J. Control. Release**, v.1-3, n°. 79, p.103-112, 2002.
53. JAIN, A. K.; THOMAS, N. S.; PANCHAGNULA, R. Transdermal drug delivery hydrochloride. **J. Control. Release**. v.1-3, n°. 79, p. 93-101, 2002.
54. DUMITRIU, S. **Polymeric biomaterials**, Marcel Dekker, New York, 1994.
55. **Vitaline® A – Sistema de Liberação de Fármaco Controlada** <http://www.gerbras.com.br/produto/vitaline>, disponível em 10 de julho de 2008.
56. FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA, J. R, GREMIÃO, A. A.; OLIVEIRA, M. P. D. Microemulsões e fase líquida cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n° 3, p.301-312, 2005.
57. POHLMANN, A. R. Nanopartículas poliméricas como carreadores de fármacos, Simpósio Nacional de Nanotecnologia e Nanomedicina, **I Nano Med 2007**, IQ-UFRGS.

58. AZEVEDO, M, M, M. Nanoesferas e a liberação controlada de fármaco, **Monografia**, Instituto de Química – UNICAMP-2002.
59. PEPPAS, N. A.; HARLAND, R. S. **Journal of Controlled Release**, v. 26, Issue 3, September, p. 157-174, 1993.
60. LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: Polímeros Hidrofílicos, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 2, 2005.
61. LOPES, C. M.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Modified release of drug delivery systems: hydrophilic polymers **Revista Cienc. Farm.**, v. 41 n.2, São Paulo, 2005.
62. NARANJO, G. P. Targeting of Antileishmanial Drugs Produced by Nanotechnologies, **Departament Pharceutics of Technology**, Barcelona, 2007.
63. MARSDEN, P.D.; Antimoniato, **Ver. Soc. Brás. Méd. Trop.**, v. 18, p. 187, 1985.
64. Amato, V. S. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana, SBMT- **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005.
65. CRREIA, D.; et, al. Comparative study of meglumine antimoniate, pentamidine isethionate and aminosidine sulfate in the treatment of primary skin lesions caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 29, n.º 5, p. 447-4453, 1996.
66. RATH, S. et al. Antimonials employed in the treatment leishmaniasis: the state of the art, **Quimica Nova**, v. 26, São Paulo, 2003.
67. JUNIOR, H. F. A.; OSSO, J. A.; NASCIMENTO, N. In Vitro Antileishmanial Properties of Neutron-Irradiated Meglumine Antimoniate, **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 63-67, 2005.
68. AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM D 570: Test method of test for water absorption of plastics, 1998.
69. ASTM D 2765, Standard Test Methods for Determination of Gel Content and Swell Ratio of Crosslinked Ethylene Plastics, 2001.
70. ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias, **Mater. Res.** v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.
71. CANEVAROLO, S. V. **Técnica de Caracterização de Polímero**, Artliber, 2004.
72. ABBASPOUR, A.; NAJAFI, M.; KAMYABI, M. A. Quantitative kinetic determination of Sb(V) and Sb(III) by spectrophotometric H-point standard addition method, **Analytica Chimica Acta** v. 505, p. 301-305 2004.
73. RODRIGUES, F. Princípios de Sistemas de Polímeros, **EL Manual Moderno**, S. A. De, México, 1984.

74. TADMOR, Z.; GOGOS, C. G. **Principles of Processing**, John Wiley & Sons New York, p. 43, 1979.
75. ETXEERRIA, A. et. al.; Miscibility of poly(vinyl methyl ether) with modified Phenoxy resin, **European Polymer Journal**, 37, 1943-1950, 2001.
76. WAN, L.; HUANG, X.; XU, Z. Diffusion and Structure of Water in Polymers Containing N-Vinyl-2-Pyrrolidone, **J. Phys Chem**, v. 111, p. 922-928, 2007.
77. PING, Z. H.; QUANG, T. N.; NEEL, J. Investigations of poly (vinyl alcohol)/poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) blends and compatibility, **J. Makromol, Chem**, v.189, p. 437- 448, 1988.
78. PEPPAS, N. A.; MERRILL, E. W. Differential Scanning Calorimetry of Crystallized PVAI Hydrogels. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 20, p. 1457-1465, 1976.
79. BURCZAK, K.; FUJISATO, T.; HATADA, M.; IKADA, Y. Protein Permeation through Poly(vinyl alcohol)Hydrogel, **Biomaterials**, v.15 (3), p. 231-238, 1994.