

3M.072744

BR0343209



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**MATRIZES POLIMÉRICAS OBTIDAS MEDIANTE RADIAÇÃO
IONIZANTE PARA SUA UTILIZAÇÃO COMO SISTEMAS DE
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS**

FLAVIA MARTELLINI

**Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de Doutor em Ciências
na Área de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

**Orientadora:
Dra. Olga Zazuco Higa**

**São Paulo
1998**

POLYMER MATRICES OBTAINED BY IONIZING RADIATION FOR USING IN CONTROLLED DRUG DELIVERY SYSTEMS

Flavia Martellini

Abstract

Two kinds of controlled drug delivery system were obtained by gamma radiation induced polymerization. One of the system was obtained from an acrylic derivative of acetaminophen (4-hydroxyacetanilide), by copolymerization of 4-(acryloyloxy)acetanilide (AOA) and N,N-dimethylacrylamide (DMAA) in dimethylformamide (DMF) solution with 0,16 kGy/h dose rate and 54 Gy dose. The values of reactivity rate, $r_{DMAA} = 0,31 \pm 0,02$ e $r_{AOA} = -0,07 \pm 0,12$, were determined by Fineman-Ross method. The acetaminophen hydrolysis was carried out in alkaline and enzymatic (trypsin) media. Another kind of drug delivery system studied was solvent controlled type, being the drug immobilized in the hydrogel. The hydrogels prepared by radiation polymerization of acryloyl-L-proline methyl ester (A-ProOMe) with 10 Gy dose, showed thermosensible property, swelling or shrinking in water with decreased or increased temperatures (LCST). The hydrogels were obtained with different crosslinking density, trimethylolpropane trimethacrylate (TMPTMA), and the monomers N,N-dimethyl acrylamide (DMAA) and 2-cyanoethyl acrylate (CEA) to study the influence of the composition in the drug delivery rate. It was verified that the porous size besides being a characteristic of the matrix composition, it was also temperature dependent (thermosensible). The analgesic drug acetaminophen was immobilized by entrapment and by physical adsorption into the hydrogels matrices for "in vitro" study. The insulin was immobilized by adsorption for "in vivo" study.

MATRIZES POLIMÉRICAS OBTIDAS MEDIANTE RADIAÇÃO IONIZANTE PARA SUA UTILIZAÇÃO COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FÁRMACOS

Flavia Martellini

Resumo

Dois tipos de sistemas de liberação controlada de fármacos foram obtidos por polimerização via radiação gama. Um dos sistemas foi do tipo fármaco polimérico preparado a partir de um derivado acrílico do acetaminofeno (4-hidroxiacetanilida), sintetizado por copolimerização dos monômeros acrilato de 4-acetanilida (AOA) e da N,N-dimetilacrilamida (DMAA) em solução de dimetilformamida (DMF) com uma taxa de dose de 0,16 kGy/h e dose 54 Gy. Determinou-se os valores da razão de reatividade dos monômeros, $r_{DMAA} = 0,31 \pm 0,02$ e $r_{AOA} = -0,07 \pm 0,12$, pelo método Fineman-Ross. A hidrólise do acetaminofeno a partir da matriz foi realizada em meio alcalino e em meio enzimático (tripsina). O outro sistema de liberação foi do tipo controlado pelo solvente a partir de um hidrogel com o fármaco imobilizado. Os hidrogéis obtidos a partir da polimerização via radiação gama, dose 10 kGy, do monômero éster metílico de N-acrilóil-L-prolina (A-ProOMe) apresentaram termossensibilidade, expandindo-se em água em temperaturas inferiores àquelas de contração (LCST). Os hidrogéis foram preparados com diferentes quantidades do agente reticulante trimetacrilato de trimetilol propano (TMPTMA) e dos monômeros N,N-dimetilacrilamida (DMAA) e acrilato de 2-ciano etila (CEA) para estudar a influência da composição na velocidade de liberação do fármaco. Constatou-se que o tamanho dos poros nos hidrogéis além de ser função da temperatura é característico da composição da matriz. O acetaminofeno foi imobilizado por aprisionamento físico e por adsorção nas matrizes de poli(A-ProOMe) para o estudo da liberação "in vitro". Imobilizou-se a insulina por adsorção no poli(A-ProOMe) para o estudo da liberação do fármaco "in vivo".

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	01
I.1 A ciência dos biomateriais	01
I.2 Uso da radiação ionizante na obtenção de materiais poliméricos para aplicação na biomedicina	04
I.3 Sistemas de liberação de fármacos	06
I.3.1 <i>Fármacos poliméricos</i>	09
I.3.2 <i>Hidrogéis</i>	12
I.3.2.1 <i>Hidrogéis termossensíveis</i>	15
I.3.2.2 <i>A estrutura da água dentro dos hidrogéis</i>	19
II. OBJETIVOS	21
III. PARTE EXPERIMENTAL	23
III.1 Síntese de copolímeros com o acetaminofeno como substituinte	23
III.1.1 <i>Síntese do monômero acrilato de 4-acetanilida (AOA)</i>	24
III.1.2 <i>Copolimerização</i>	25
III.2 Comportamento hidrolítico do sistema DMAA-AOA	28
III.2.1 <i>Preparação das pastilhas</i>	28
III.2.2 <i>Determinação do acetaminofeno liberado</i>	29
III.2.2.1 <i>Acetaminofeno liberado em meio alcalino</i>	31
III.2.2.2 <i>Acetaminofeno liberado em meio enzimático</i>	34
III.3 Síntese e caracterização do homopolímero e dos hidrogéis termossensíveis derivados do A-ProOMe	36
III.3.1 <i>Polimerização</i>	37
III.3.2 <i>Determinação da temperatura crítica inferior do homopolímero (LCST)</i>	39
III.3.2 <i>Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)</i>	39
III.3.4 <i>Ciclo de reversibilidade dos hidrogéis</i>	40
III.3.5 <i>Determinação do grau de expansão dos hidrogéis</i>	40
III.3.6 <i>Determinação da água ligada nos hidrogéis com a utilização da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	41
III.4 Imobilização e medida da liberação de fármacos dos hidrogéis derivados do A-ProOMe	43
III.4.1 <i>Imobilização do acetaminofeno e da insulina nos hidrogéis</i>	44

III.4.2	Determinação do acetaminofeno liberado.....	46
III.4.3	Utilização dos hidrogéis como sistemas de liberação de insulina para controle de "diabetes mellitus" em ratos.....	46
IV.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
IV.1	Copolimerização e caracterização do sistema DMAA/AOA.....	47
IV.1.1	Caracterização do monômero acrilato de 4-acetanilida AOA.....	47
IV.1.2	Esquema cinético da copolimerização radicalar.....	52
IV.1.3	Determinação da composição dos copolímeros.....	54
IV.1.4	Razões de reatividade r_1 e r_2	57
IV.2	Estudo hidrolítico da matriz DMAA/AOA.....	61
IV.2.1	Estudo da hidrólise da matriz DMAA/AOA em meio alcalino.....	63
IV.2.2	Estudo da hidrólise da matriz DMAA/AOA em meio enzimático.....	66
IV.3	Caracterização do homopolímero dos hidrogéis obtidos a partir do A-ProOMe.....	69
IV.3.1	Sistema de solução de temperatura crítica inferior (LCST)...	69
IV.3.2	Ciclo de reversibilidade de expansão dos hidrogéis.....	75
IV.3.3	Comportamento de fase e determinação do grau de expansão dos hidrogéis.....	77
IV.3.4	Determinação da interação da água com hidrogéis utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	82
IV.4	Utilização dos hidrogéis a base de A-ProOMe como sistemas de liberação de fármacos.....	87
IV.4.1	Liberação do acetaminofeno de hidrogéis a base de A-ProOMe.....	89
IV.4.2	Estudos preliminares da utilização do poli(A- ProOMe-co-TMPTMA) como sistema de liberação da insulina para controle de "diabetes mellitus" em ratos.....	93
V.	CONCLUSÕES.....	96
VI.	ANEXOS.....	98
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

I. INTRODUÇÃO

I.1 A ciência dos biomateriais

A ciência dos biomateriais envolve o estudo do desenvolvimento dos materiais dirigido para sanar problemas na área biológica e médica mobilizando a pesquisa básica, aplicação de tecnologia avançada, considerações éticas e envolvimento da indústria.¹ Os pesquisadores desta área necessitam estar familiarizados com disciplinas como: química, física, biologia, medicina e conceitos de engenharia necessários para desenhar e avaliar materiais que substituirão tecidos ou órgãos ou que exercerão alguma função biológica. Mais do que qualquer outro campo atual de tecnologia, a ciência dos biomateriais carrega juntos pesquisadores com diferentes formações que devem ter um total intercâmbio caracterizando-a como interdisciplinar.

Apesar do estudo dos biomateriais ser considerado um campo novo existem indícios de sua existência na história antiga. Os romanos, chineses e astecas usaram o ouro na odontologia a mais de 2000 anos atrás. Olhos de vidro e dentes de madeira e pedras semi preciosas também foram usados muito tempo atrás. A partir de 1800 iniciou-se a utilização dos metais para substituir os ossos por meio de cirurgias.^{1,2} No curso deste século, em 1930, com o início da indústria do plástico, iniciou-se o uso dos polímeros para inúmeras aplicações. Sua facilidade de fabricação e domínio imediato no mercado levou a implantação de muitos ensaios, a maioria deles, originados da recente descoberta da toxicologia destes materiais utilizados como biomateriais que foram condenados pelas falhas. O poli(metacrilato de metila) (PMMA) foi introduzido na odontologia em 1937. Durante a II Guerra Mundial, fragmentos de PMMA, provenientes das cabines dos aviões, encontrados

nos olhos dos aviadores, sugeriram que alguns materiais podiam provocar somente uma suave reação a corpos estranhos. Logo após o Vinion N, utilizado como roupas de para quedas, foi modificado por enxertia resultando em um material utilizado para prótese vascular em 1958, chamado de Dacron.^{1,2} Em 1960 o PMMA, polietileno de alta densidade (HDPE), e aço foram obtidos para reposição total do osso íliaco.¹

Enquanto as aplicações dos materiais sintéticos expandiram-se muito, o termo biomaterial não encontrou um denominador comum. Em 1975 houve a formação da Sociedade de Biomateriais após o grande sucesso científico constatado no simpósio de biomateriais realizado na Universidade de Clemson em 1960 e 1970.¹

A ciência dos biomateriais é uma área de avançada tecnologia onde um grande número de termos novos são introduzidos ou mesmo inventados. Devido o número crescente e a controvérsia em relação ao uso destes termos, se tornou importante definir os mais importantes e fundamentais.³ Como muitas definições foram sugeridas para biomateriais no decurso de seu desenvolvimento, uma definição foi endossada por pesquisadores durante um simpósio, "Consensus Conference of the European Society for Biomaterials", realizado em Chester na Inglaterra, em 1987. A partir daí definiu-se biomaterial como um material não vivente usado em dispositivos, com a intenção de interagir com o sistema biológico.³

Os biomateriais foram colocados à parte dos materiais explorados na ciência dos materiais. Os materiais que são classificados como biomateriais são: metais, cerâmicas, polímeros, vidros, carbonos e compósitos.¹

Segundo COOKE (1997)⁴ os materiais utilizados para desenvolver a maioria das estruturas são divididos em 3 classes: metais, cerâmicas (incluindo vidro) e polímeros. Estes materiais possuem muitas propriedades: mecânica, química,

térmica, acústica, ótica, elétrica e magnética. Para a maioria das aplicações como biomateriais, duas destas propriedades são de grande importância: a resistência mecânica e a reatividade química. A dependência da propriedade mecânica da microestrutura é muito grande, sendo que um dos objetivos fundamentais da ciência dos materiais é controlar as propriedades mecânicas por meio da modificação da microestrutura, mobilizando estudos ao redor dos ensaios que determinam estas propriedades, bem como a obtenção destes materiais.

Os polímeros são considerados os materiais mais importantes e dominantes na área dos biomateriais, devido a possibilidade de obtenção dos mesmos com uma variada composição e propriedades, desde os resistentes mecanicamente sistemas hidrofóbicos, até os sistemas altamente hidrofílicos, originando biomateriais macios quando em contato com os fluidos fisiológicos. Além disto, suas propriedades podem ser manipuladas por meio de convenientes modificações estruturais e ainda pode ser moldado utilizando-se baixas temperaturas.^{5,6}

Os hidrogéis são considerados de grande interesse na área dos biomateriais. São estruturas poliméricas reticuladas e expansíveis em água produzidos por meio de reações simples de um ou mais monômeros ou por meio da associação de ligações como as ligações de hidrogênio e interações de van der Waals que atuam como reticulantes entre cadeias de homopolímeros ou copolímeros hidrofílicos.⁷ Após o trabalho marcante de WICHTERLE & LIM (1960)⁸ onde descrevem a importância do hidrogel poli(metacrilato de 2-hidroxietila) (HEMA) como um excelente material para aplicação em lentes de contato, os hidrogéis tem recebido uma atenção marcante nos últimos 30 anos, devido a possibilidade de sua aplicação dentro da biomedicina. O livro de ANDRADE (1976)⁹ revisa alguns dos melhores trabalhos disponíveis antes de 1975, que relatam a aplicação dos hidrogéis na área biomédica. O livro mais recente sobre hidrogéis é o de PEPPAS (1987)¹⁰ que relata a preparação, estrutura e caracterização dos hidrogéis além de trabalhos mais recentes sobre algumas de suas aplicações.

I.2 Uso da radiação ionizante na obtenção de materiais poliméricos para aplicação na biomedicina.

Como mencionamos anteriormente, a classe dos polímeros é, de longe, a mais dominante e importante na obtenção dos biomateriais e a radiação ionizante tem uma capacidade única de iniciar as reações de radical livre e iônicas neste materiais orgânicos, sem a necessidade de adicionar catalisadores ou calor. Portanto, novos polímero ou novas formas de polímeros podem ser sintetizados, ou mesmo, polímeros, já existentes, podem ser modificados por meio de um processo relativamente simples, sem a adição de aditivos e à temperatura ambiente, tudo isto com um potencial de esterilização simultânea. Também é citado, por autores como HOFFMAN (1981)^{11,12}, KAETSU (1995)^{13,14} e CARENZA (1992)¹⁵, em seus trabalhos de revisão, que uma das vantagens da utilização desta técnica é a possibilidade de irradiar materiais resfriados encontrando-se no estado vítreo. Isto ajuda a obter novos biomateriais contendo atividades biológicas específicas. Portanto, imobilização de enzimas, anticorpos, fármacos, células, etc., pode ser obtida durante o processamento de materiais por radiação.

Segundo HOFFMAN (1981)^{11,12} os sistemas de obtenção de biomateriais por radiação dividem-se em três grandes grupos:

- i. Enxertia de monômeros e polímeros
 - a) Enxertia na superfície e enxertia na massa;
 - b) Imobilização de espécies biologicamente ativas em copolímeros enxertados.

- ii. Polimerização por radiação
 - a) Monômeros (incluindo reticulantes);
 - b) Monômeros e polímeros;

- c) Monômeros mais espécies biologicamente ativas (imobilização durante a polimerização).

iii. Reticulação por radiação

- a) Monômeros (incluindo reticulantes);
- b) Monômeros e polímeros;
- c) Monômeros mais espécies biologicamente ativas (imobilização durante a polimerização).

Segundo KAETSU (1995)^{13,14} pesquisa neste campo classifica-se em duas áreas de acordo com o objetivo da aplicação biomédica:

- i. Síntese de polímeros biocompatíveis;
- ii. Imobilização de biocatalisadores e células para diferentes tipos de bioreatores e sistemas analíticos.

Anteriormente uma divisão da química das radiações foi sugerida por CARENZA (1992)¹⁵ tanto para imobilização de biocomponentes quanto para a obtenção de materiais biomédicos:

- i. Síntese de géis poliméricos (hidrogéis) usados para imobilização de espécies ativas nos sistemas de liberação controlada de fármacos;
- ii. Modificação de materiais poliméricos.

O processo de radiação na obtenção de biomateriais poliméricos é uma tecnologia já bem desenvolvida e explorada.^{10,16} Devido a grande versatilidade da tecnologia da radiação na obtenção dos materiais poliméricos, pesquisadores de

todas as partes do mundo utilizam a química das radiações na polimerização desviando seus interesses da pesquisa básica para a aplicada nesta área.^{15,16}

I.3 Sistemas de liberação de fármacos

O desenvolvimento de novos sistemas que liberam fármacos de uma maneira controlada, tem desencadeado uma mudança revolucionária na administração das dosagens uma vez que essa tecnologia tem o objetivo de prolongar a ação dos fármacos. O primeiro produto a ser lançado no mercado, com a intenção de prolongar a ação do fármaco minimizando a frequência entre as doses, foi o "Spansules" entre 1940 e 1950.¹⁷ A partir de 1960 houve um grande aumento de pesquisadores trabalhando para desenvolver esses produtos.¹⁷ Desde então um grande número de termos tem sido usado para referir o prolongamento da duração da ação de um fármaco. Alguns dos termos encontrados na literatura são: ação prolongada, ação repetida, liberação cronometrada, liberação programada, longa duração, "depot", ação lenta, liberação lenta, e liberação controlada.¹⁸

Segundo vários autores, os sistemas de liberação de fármacos são divididos em duas grandes categorias: sistemas de liberação controlada de fármacos e sistemas de liberação dirigida de fármacos.^{5,19-22} A diferença entre a definição de liberação controlada e a liberação dirigida de fármacos é baseada na relação entre o sítio da liberação do fármaco e o sítio da ação do fármaco. Sistemas de liberação controlada liberam o fármaco dentro da circulação sistêmica a uma velocidade predeterminada. Enquanto que sistemas de liberação dirigida atuam no sítio de ação ou muito próximo. Portanto, o sítio de liberação do fármaco e o sítio de ação do fármaco não são os mesmos.^{20,23}

Sistemas de liberação dirigida de fármacos atuam como mecanismos de liberação no sítio de ação, apresentando a vantagem de proporcionar uma grande

concentração do fármaco no local desejado evitando uma distribuição por todo o organismo.^{20,23}

O termo liberação controlada refere-se a sistemas de liberação de fármacos que fornecem um prognóstico de liberação modelo (padrão), o qual poderá ser alcançado controlando as variáveis que governam a velocidade de liberação do fármaco de um dado sistema.¹⁷⁻²³

A ciência que envolve os sistemas de liberação de fármacos também é altamente interdisciplinar sendo necessário alcançar uma boa cooperação entre os seguintes profissionais: químicos das macromoléculas, farmacêuticos, farmacologistas, médicos e biólogos.^{5,17,19-23} Este trabalho representa bem esta idéia da interdisciplinaridade da área de desenvolvimento dos materiais.

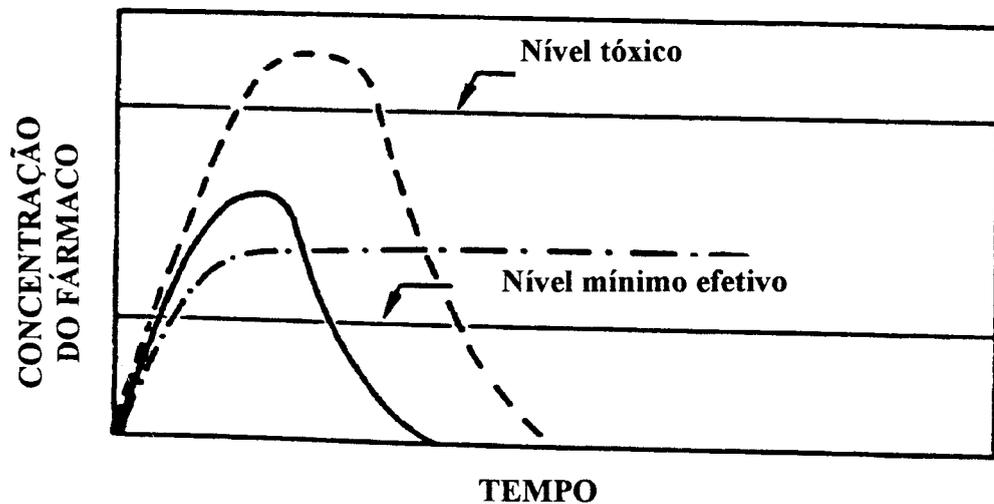


Figura 1. Variação da concentração de fármacos no plasma do sangue em função do tempo indicando o índice terapêutico.²⁴ (—) sistema convencional de administração; (---) sistema convencional de administração; (-·-) sistema de liberação controlada de fármacos.

A grande vantagem dos sistemas de liberação controlada pode ser observada na representação do esquema da figura 1, que representa a diferença entre a

mudança da concentração do fármaco no plasma entre uma administração convencional e uma, por liberação controlada.²⁴

Para toda substância farmacologicamente ativa atuando no organismo existem duas concentrações limites que, normalmente, são bem conhecidas e dependem da natureza do fármaco e da sua interação com o organismo. Nas duas situações limites encontram-se a concentração mínima efetiva, abaixo da qual as doses administradas não tem valor terapêutico, de maneira que o fármaco não expressa sua eficiência, e a concentração máxima efetiva, acima da qual o fármaco causa o aparecimento de efeitos colaterais entrando em uma faixa considerada tóxica. Portanto, a dose de um determinado fármaco deve sempre estar dentro desta faixa de concentração que chamamos de índice terapêutico.^{17-20,24}

Os sistemas poliméricos de liberação controlada de fármacos podem ser classificados conforme o mecanismo de ação, de maneira que se encontram variadas propostas para os diversos dispositivos sugeridas por vários autores^{18,19,24-26}, de forma que reunimos as informações e citamos abaixo algumas delas:

Tabela 1. Classificação dos sistemas de liberação de fármacos.

TIPOS DE SISTEMAS	MECANISMOS DE LIBERAÇÃO
<i>Controlado pela difusão</i>	
• Sistemas tipo reservatórios	difusão por meio de membranas
• Sistemas tipo matrizes	difusão por meio de polímeros em massa
<i>Controlado quimicamente</i>	
• Sistemas biodegradáveis	biodegradação ou biodegradação difusão
• Sistemas de fármacos poliméricos	hidrólise do grupo lateral e difusão
<i>Controlado pelo solvente</i>	
• Sistemas osmóticos	transporte da água por osmose por meio de membrana semi permeável
• Sistemas de expansão	penetração da água em polímeros vítreos
<i>Regulados</i>	
• magnético ou ultra som	aplicações externas de campos magnéticos ou ultra som

1.3.1 Fármacos poliméricos

Os sistemas de liberação controlada quimicamente compreendem os polímeros com atividade farmacológica e também substâncias nas quais fármacos conhecidos estão ligados por meio de ligações covalentes na cadeia polimérica. O termo fármaco polimérico tem sido usado desde o 173^o Encontro Nacional da Sociedade de Química Americana em 1977.⁵

A síntese de fármacos poliméricos que liberam compostos ativos envolve alguns aspectos como^{5,27}:

- o tipo de cadeia principal macromolecular;
- a natureza química da ligação com a substância ativa (fármaco);
- a natureza das unidades não ativas, as quais para terem sua solubilidade aumentada, normalmente adicionam-se outros componentes por copolimerização.

RINGS DORF (1978)²⁰ desenvolveu um trabalho pioneiro preparando um modelo a partir de monômeros acrílicos que gerou vários trabalhos de outros autores. Seu modelo mostra que é possível projetar um fármaco polimérico onde cada área da cadeia polimérica terá uma função específica como mostra a figura 2.

A cadeia principal é a parte do polímero que pode ou não ser degradada no meio biológico. Para uma aplicação parenteral a cadeia polimérica deve ser degradável ao meio, enquanto que quando administrado via oral é uma vantagem ter uma cadeia não degradável ao meio, somente a substância ativa quando liberada é absorvida. Com este propósito constatou-se que o polivinil e o poli(vinilideno) são bastante interessantes pois são quimicamente inertes de maneira que não se espera que reajam com componentes normais do meio fisiológico, portanto, são considerados não degradáveis. Também existem muitas informações sobre a síntese

destes polímeros e de seus copolímeros, mais do que qualquer outro polímero sintético.^{5,19-21,28}

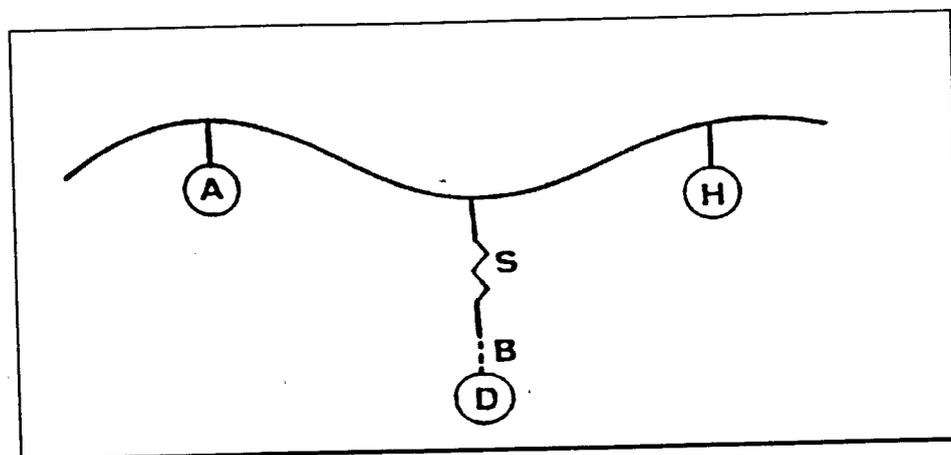


Figura 2. Representação esquemática de um fármaco polimérico. A. Unidade solubilizante. B. Ligação química que pode ser clivada. H. Transportador; S. Grupo espaçador e D. Fármaco.²⁰

As ligações que unem o fármaco a cadeia polimérica não devem ser estáveis ao meio permitindo uma liberação pela hidrólise da substância ativa. As ligações ésteres são as primeiras a serem utilizadas quando a estrutura da droga permite contendo grupos hidroxílicos ou mesmo carbonílicos.^{5,19-21,28,29}

SÀN ROMAN e col. trabalham na preparação de fármacos poliméricos seguindo o modelo sugerido por Ringsdorf. Sintetizam e estudam o comportamento farmacológico de sistemas conjugados poliacrílicos por meio da homo e copolimerização de ésteres metacrílicos e metacrilamidas com fármacos analgésicos e antipiréticos como o acetaminofeno, também denominado paracetamol ou 4-hidroxiacetanilida, ibuprofen e a aspirina.^{5,19,30} O 4-metacrilato de acetanilida (MOA) foi sintetizado pela reação do acetaminofeno com o cloreto de metacrilóila, como podemos ver no esquema da figura 3, segundo a reação de Schotten-Bauman.³¹ Por meio deste passo foram preparados vários monômeros de ésteres metacrílicos contendo fármacos ligados quimicamente. Estes por sua vez foram

polimerizados para a obtenção dos fármacos poliméricos.³¹⁻³⁵ Alguns destes compostos foram testados por meio do comportamento hidrolítico em meio alcalino bem como foram feitos testes preliminares para verificar a atividade da ação antiinflamatória, antipirética e ulcerogênica em ratos, onde constataram grande potencial para aplicações farmacológicas.^{36,37}

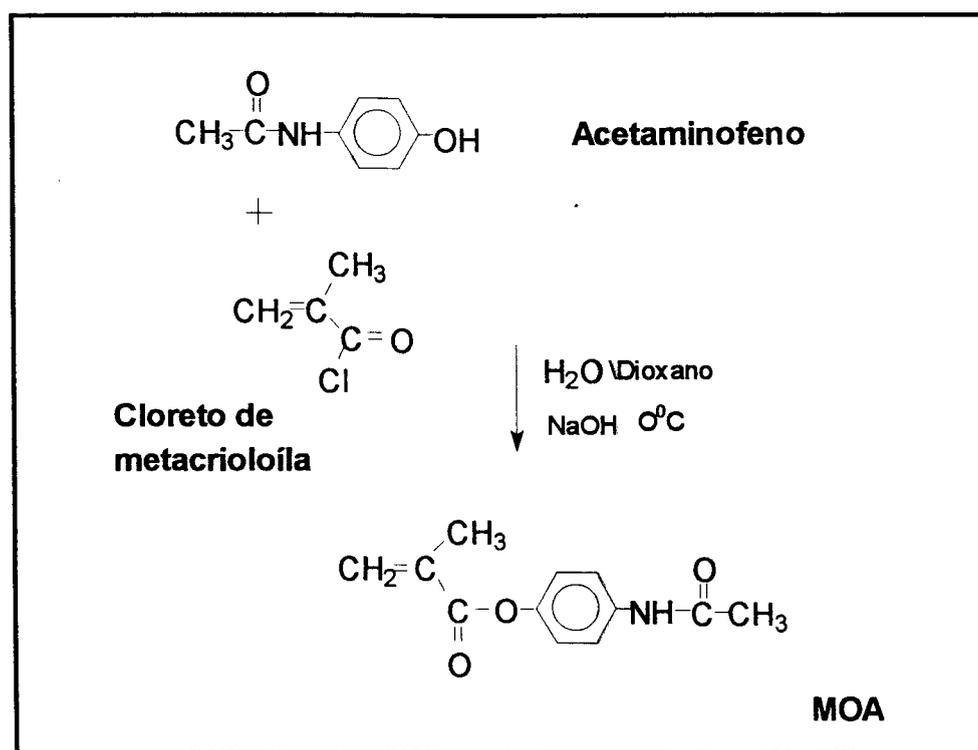


Figura 3. Síntese para a preparação do derivado acrílico do acetaminofeno, 4-metacrilato de acetanilida (MOA).⁵

Com base nesses estudos um dos nossos objetivos foi sintetizar e caracterizar derivados acrílicos do acetaminofeno, um fármaco analgésico e antipirético, e obter copolímeros com a N,N-dimetilacrilamida (DMAA). O acetaminofeno foi usado como grupo lateral tendo uma ligação éster com os copolímeros. A obtenção desses copolímeros seguiu o modelo universal de Ringsdorf, polimerizando via radical livre os correspondentes monômeros por meio de radiação ionizante e que foram caracterizados por espectrometria de RMN de ¹H e ¹³C, como veremos mais adiante.

1.3.2 Hidrogéis

Segundo PEPPAS & KORSMEYER (1987)³⁸ na classificação dos sistemas de liberação controlada, os hidrogéis compreendem-se dentro da categoria de sistemas controlados pelo solvente.

Neste tipo de sistema de liberação o agente é disperso no polímero hidrofílico, que se encontra no estado vítreo quando seco, porém quando em contato com a água, expande-se. Como a difusão das moléculas na matriz é extremamente lenta, quando esta encontra-se no estado vítreo não ocorre liberação. Quando este material é colocado em um meio aquoso, a água penetra na matriz como uma consequência da expansão, e a temperatura de transição vítrea do polímero é diminuída abaixo da temperatura ambiente e o fármaco difunde-se do polímero.¹⁷

O termo gel é usado para descrever um estado da matéria que se encontra entre o líquido e o sólido.³⁹ Até hoje muitas definições são utilizadas pelos autores na tentativa de chegar a uma definição mais precisa para hidrogel. A definição mais usada para um hidrogel na área dos sistemas de liberação é que é um material polimérico reticulado que tem a capacidade de expandir-se na água sem dissolver-se, e reter água dentro de sua estrutura.^{7,40-43}

Nestes sistemas as matrizes são constituídas por polímeros hidrofílicos reticulados com monômeros vinílicos tetrafuncionais ou acrílicos, ou, alternativamente, por copolímeros biocompatíveis compostos por monômeros hidrofílicos e hidrofóbicos.^{19,43,44}

Segundo RATNER & HOFFMAN (1976)⁴⁵ os hidrogéis são os materiais que mais se parecem com os tecidos vivos em suas propriedades físicas, do que qualquer outra classe sintética de biomateriais. Assemelham-se por sua quantidade de água, sua maciez, consistência elástica e sua superfície também similar à suavidade dos tecidos vivos. Baseados nestas propriedades podemos citar duas vantagens destes

materiais para sua utilização como biomateriais: a natureza expandida dos hidrogéis e a permeabilidade a pequenas moléculas, permitindo a total extração de dentro da rede polimérica dos produtos de decomposição de iniciadores de reação, moléculas de solvente da polimerização e outros materiais estranhos, antes que o hidrogel venha a ser colocado em contato com os tecidos vivos. A segunda vantagem é a consistência macia e elástica da maioria dos hidrogéis que contribuem para sua biocompatibilidade, minimizando a irritação mecânica nos tecidos e células vizinhas.⁴¹

À possibilidade das moléculas de diferentes tamanhos difundirem-se para dentro e para fora dos hidrogéis (processo de liberação), adiciona-se uma nova alternativa para o uso destes materiais, secos ou expandidos, como sistemas de liberação não somente por vias de administração oral, mas nasal, bucal, retal, vaginal, ocular e principalmente parenteral.^{40,41}

Existem 3 formas de se preparar hidrogéis para imobilização de fármacos e biomoléculas:¹⁶

- i. polimerização em massa;
- ii. enxertia nas superfícies;
- iii. conversão de polímeros já existentes.

Na polimerização em massa muitos monômeros vinílicos podem ser utilizados para sintetizar hidrogéis como os metacrilatos, derivados de acrilamidas, N-vinil pirrolidonas, e acrílicos.^{16,46} Normalmente, na síntese de obtenção de hidrogéis utiliza-se pequenas quantidades de monômero reticulante e a reação pode ser iniciada por iniciadores químicos, radiação gama, beta ou ultravioleta.⁴⁶

Existem várias técnicas de imobilização de fármacos e biomoléculas dentro de hidrogéis. Estão incluídas o aprisionamento físico, a atração eletrostática, a adsorção física e a ligação química.^{16,46,47}

O método de imobilização por aprisionamento baseia-se na oclusão das moléculas dentro do hidrogel o qual tem uma estrutura suficientemente compacta não deixando as espécies difundirem-se rapidamente para o meio. Este aprisionamento não é permanente de maneira que a liberação das espécies ocorrerá para o meio. A vantagem deste método é que se trata de uma técnica simples podendo-se utilizar vários tipos de moléculas e não causa mudanças na estrutura das espécies imobilizadas. O aprisionamento é obtido durante a reação de polimerização do hidrogel podendo ser iniciada por radiação.^{47,48}

A utilização da radiação como iniciadora da polimerização dos hidrogéis e aprisionamento de espécies tem vantagens como:^{11-14,47,48}

- i. não causa a desativação de biomoléculas;
- ii. pode-se usar soluções super resfriadas durante a polimerização eliminando o problema do aquecimento durante a reação, beneficiando a utilização de espécies mais sensíveis;
- iii. pode-se obter uma grande variação na textura das estruturas e porosidade.

No método de imobilização por adsorção física existem duas ligações possíveis para as espécies dentro do hidrogel, a ligação de hidrogênio e a ligação resultante da interação carga-carga e também as interações hidrofóbicas acontecem. Este método, também relativamente simples, é aplicado depois que o hidrogel foi sintetizado. O hidrogel é colocado em contato com uma solução que contém a espécie a ser imobilizada. É um método bastante utilizado.^{49,50}

Os hidrogéis podem ser divididos em duas categorias os hidrogéis convencionais e os hidrogéis responsivos. Os hidrogéis responsivos tem as mesmas características dos convencionais como também são materiais cujas características, principalmente de expansão e contração, mudam em resposta a estímulos específicos do meio como temperatura, pH, força iônica, luz, campo elétrico e outros.⁵¹⁻⁵⁵

Os hidrogéis responsivos estão classificados dentro da classe de polímeros inteligentes e apresentam uma drástica mudança nas características em função de pequenos estímulos de ordem química ou física. Os polímeros inteligentes também são chamados de ativos, estímulo-responsivos, sensíveis ao meio.^{42,52-54}

1.3.2.1 Hidrogéis termossensíveis

Hidrogéis termossensíveis são aqueles cujas características de expansão e contração são uma função drástica da temperatura.⁵⁶⁻⁵⁸

Quando um hidrogel expandido em água é estimulado a contrair-se ele poderá expelir para fora a água contida nos poros, tornando-se opaco, mais firme e diminuindo seu tamanho. Pode-se desfrutar de uma vantagem desta mudança de fase para inúmeros usos. Um grande número de trabalhos de pesquisas estão direcionados para estes sistemas procurando alcançar novos materiais no desenvolvimento de biomateriais incluindo os sistemas de liberação controlada de fármacos. Fármacos, enzimas e anticorpos podem ser imobilizados em hidrogéis termossensíveis, por imobilização física ou mesmo química.⁵⁹⁻⁷⁰

Os hidrogéis termossensíveis contém na sua rede polimérica grupos de afinidades muito distintas. Quando a temperatura da solução em que se encontram aumenta, as ligações de hidrogênio diminuem e a hidratação da rede também, favorecendo as interações entre os grupos hidrofóbicos, causando uma contração da rede polimérica. A contração descontínua nos hidrogéis termossensíveis, que caracteriza uma mudança de fase, ocorre subitamente em uma dada temperatura.

A termossensibilidade de alguns hidrogéis pode ser negativa, ou seja, a passagem do estado expandido para o estado contraído ocorre mediante aquecimento, passando por uma transição de fase de primeira ordem, resultante de

uma contribuição predominantemente entrópica, que caracteriza o gel como sendo um sistema de solução de temperatura crítica inferior (LCST).^{56,57,67} Estudos revelaram que se pode mudar a LCST de um hidrogel, a velocidade de expansão e contração e a velocidade de permeação dos hidrogéis, variando-se o balanceamento entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na cadeia polimérica.^{61,62,64,65,67,70-75}

Um hidrogel termossensível pode adquirir várias dimensões dependendo da temperatura que se encontra. Observa-se que o mecanismo de funcionamento destes hidrogéis, como sistemas de liberação controlada de fármacos, pode ocorrer de modos diferentes em função da sua LCST representado na figura 4, como veremos a seguir:⁶⁷

- A liberação do agente ativo de um hidrogel expandido à $T < LCST$ quando colocado em um meio aquoso à $T < LCST$.

Este processo está representado na figura 4, a liberação do fármaco ocorre por meio de difusão.

- A liberação do agente ativo de um hidrogel expandido à $T < LCST$ quando colocado em um meio aquoso à $T > LCST$.

Neste processo o fármaco é liberado tanto por difusão quanto pela ação mecânica de contração do hidrogel.

- A liberação do agente ativo de um gel seco quando colocado em um meio aquoso à $T > LCST$.

O hidrogel terá uma fase inicial de hidratação com concomitante difusão do fármaco caracterizada pela velocidade baixa e constante.

- A liberação do agente ativo de um gel seco quando colocado em meio aquoso à $T < LCST$.

O hidrogel terá uma fase inicial de hidratação com concomitante difusão do fármaco.

A figura 4 abaixo mostra os diferentes processos de liberação:

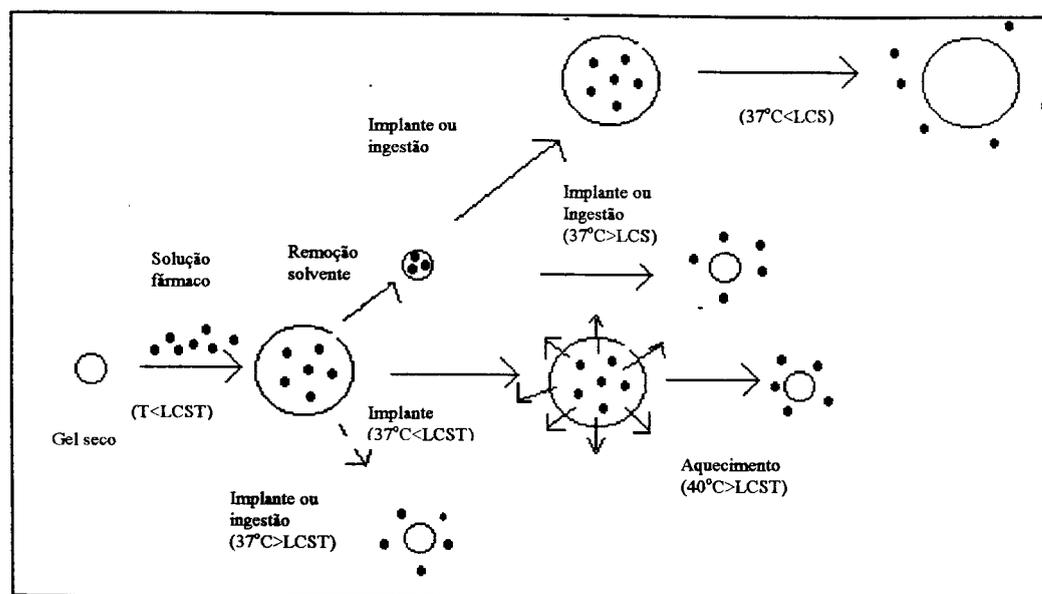


Figura 4. Esquema dos possíveis processos para a liberação de componentes biologicamente ativos de hidrogéis termossensíveis.⁶⁷

Recentemente, foi sintetizado via radiação de alta energia um novo hidrogel termossensível com propriedades altamente biocompatíveis, chamado poli(éster metílico de acrilóil-L-prolina), poli(A-ProOMe).⁷⁶ O hidrogel foi obtido a partir de um monômero derivado da acrilóila com um α -amino ácido (prolina) como grupo lateral (A-ProOMe) (figura 5). Esta síntese foi inspirada a partir da observação e conhecimento de que no organismo vivo existem vários sistemas de sensores a estímulos externos com respostas funcionais, como os amino ácidos, ácidos nucleicos e lipídios, os quais exercem um papel essencial na manifestação de respostas funcionais no metabolismo fisiológico.⁷⁶⁻⁸¹ Anteriormente, YOSHIDA e col. (1991, 1994)^{82,83} sintetizaram derivados do N-acrilóila e do N-metacrilóila

tendo como resultado hidrogéis portadores de L-prolina, alanina e glicina, onde mostraram um comportamento de expansão-contração reversível quando submetidos a mudanças de temperatura.⁸³

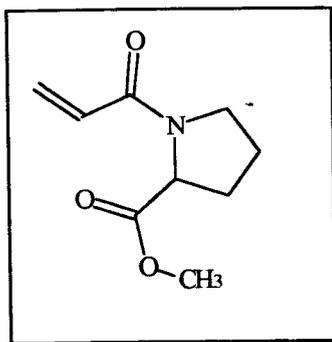


Figura 5. Fórmula estrutural do monômero A-ProOMe.

Com base nos estudos de MARTELLINI e col. (1998)⁸⁴ obteve-se hidrogéis via radiação ionizante a partir do monômero A-ProOMe, onde propõem-se variações na formulação, como agente reticulante e o balanceamento hidrofílico/hidrofóbico. O monômero foi doado pelo Departamento de Desenvolvimento de Materiais do Instituto das Radiações de Takasaki, do JAERI, Japão, sob responsabilidade do Dr. Masaru Yoshida.

Foram imobilizados fármacos como o acetaminofeno e a insulina em alguns dos hidrogéis que foram testados com ensaios de liberação. Os ensaios preliminares de liberação da insulina em ratos foram realizados no Instituto de Ciências Farmacêuticas de Padova, Itália, sob orientação do Dr. Paolo Calicetti. Este ensaio e resultados serão discutidos mais adiante.

1.3.2.2 A estrutura da água dentro dos hidrogéis

Existem vários motivos pelos quais é de grande interesse a natureza das interações da água com os polímeros. No entanto dois são os principais: a interação ser um processo inteiramente biológico e a interação água-polímero ser fundamental na performance de um produto comercial.⁸⁵

A água exhibe propriedades diferentes em situações diferentes. Soluções aquosas diluídas mostram modificações significativas na estrutura e nas propriedades quando comparadas à água normal. Em soluções concentradas como nos hidrogéis ou mesmo fluidos fisiológicos, percebem-se modificações variadas e mais expressivas na estrutura e nas propriedades da água.⁸⁶

A estrutura que a água assume dentro dos hidrogéis usados no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, também é de grande importância, pois a maioria dos fármacos encontra-se dissolvida na água presente em um hidrogel, de maneira que suas propriedades interfaciais influenciam na aplicação dos mesmos.⁴²

JHON & ANDRADE (1973)⁸⁶, lançaram um trabalho pioneiro trazendo um levantamento bibliográfico das teorias sobre o comportamento da água. Os autores associaram o comportamento especial da água nos tecidos biológicos e nos hidrogéis, demonstrando a capacidade da água de se estruturar no seu interior e citando uma nova hipótese de que a água apresenta-se em 3 formas diferentes. Atualmente foi comprovada a estrutura que a água assume dentro dos hidrogéis a partir de dados experimentais obtidos por métodos de ressonância magnética nuclear, medidas dielétricas e pela capacidade calorífica.⁸⁵ Inúmeros trabalhos trazem interpretações termodinâmicas e outros argumentos também baseados em dados experimentais, mostrando a presença de um grau de reorganização da água dentro e nas superfícies destes sistemas poliméricos reticulados.⁸⁷⁻⁹⁴

Quando um hidrogel começa a absorver água, a partir do estado seco, as moléculas de água, inicialmente, hidratam as partes mais polares, os grupos hidrofílicos e os grupos ligados aos hidrogênios. À água que exerce este tipo de interação com o polímero dá-se o nome de “água ligada primária”. Após estes grupos serem hidratados, as cadeias poliméricas começam a se expandir, e como os grupos hidrofóbicos estão expostos às moléculas de água interagem com elas, gerando uma baixa entropia resultante desta interação. O efeito é como se a água “revestisse” os grupos vizinhos aos que está ligada. A água que interage com os grupos hidrofóbicos é freqüentemente chamada de “água ligada secundária”. Estes dois tipos de água estão, freqüentemente, combinados e são simplesmente chamados de água ligada. Quando todas estas interações da água com a cadeia polimérica estão completas, então a rede polimérica começa a embeber mais água causando então a expansão até o equilíbrio. Alguns autores chamam esta água de água livre ou normal, enquanto outros autores subdividem em água intermediária, a qual existe em uma zona entre a água ligada e a água livre. A água livre preenche o centro dos poros, macroporos ou lacunas. A continuação da expansão de um hidrogel se dá devido a força osmótica, que por sua vez, recebe uma força contrária proveniente da retração elástica da rede polimérica até o equilíbrio de expansão ser atingido.^{42,87,91}

A quantidade e a característica da água absorvida por um hidrogel tem importância na permeação do soluto dentro e fora do hidrogel. O tamanho médio, a distribuição dos poros e a interconexão entre eles também são fatores de importância na permeação do soluto através de um hidrogel. Estes últimos fatores são mais influenciados pela composição e densidade de reticulação da rede polimérica do hidrogel.⁴²

Os ensaios por calorimetria exploratória diferencial com o intuito de caracterizar alguns hidrogéis foram feitos no Centro de Estudos da Física das Macromoléculas, Departamento de Química da Universidade de Bolonha, Itália sob a orientação da Dra. Gianna Cojazzi.

II. OBJETIVOS

Um dos objetivos deste trabalho compreende a síntese dos sistemas poliméricos derivados do A-ProOMe que apresentam LCST, variando-se o caráter hidrofílico e hidrofóbico através da polimerização em massa por radiação ionizante seguindo as técnicas sugeridas por XIN e col.(1992)⁴⁹ e CARENZA e col. (1994)⁴⁷. Na obtenção dos géis copoliméricos, constituindo uma das contribuições originais do trabalho (MARTELLINI e col. (1998)⁸⁴) foram utilizados os seguintes monômeros: N,N-dimetilacrilamida (DMAA), acrilato de 2-ciano etila (CEA) e o trimetacrilato de trimetilol propano (TMPTMA) como agente reticulante. Foi feita também a incorporação de compostos ativos em algumas matrizes, como o 4-hidroxiacetanilida (acetaminofeno) e a insulina. O acetaminofeno foi utilizado como um fármaco modelo para testar os hidrogéis como sistemas de liberação controlada e foi incorporado segundo técnicas descritas por DONG e col.(1990)⁹⁵, YOSHIDA e col. (1991)⁷⁶ e GOMBOTZ e col. (1987)¹⁶.

A caracterização dos hidrogéis copoliméricos envolveu a determinação do grau de expansão em várias temperaturas avaliando a capacidade de absorção de água e portanto, da difusão do solvente e soluto. A estrutura das superfícies dos hidrogéis em diferentes temperaturas foi acompanhada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de modo a explicar o comportamento dos materiais, de acordo com técnicas sugeridas pelos autores HOFFMAN (1987)⁶⁷ MIYAJIMA e col. (1993)⁷⁹. A estrutura da água no interior dos hidrogéis e a quantificação dos diferentes tipos foi observada por calorimetria exploratória diferencial (DCS) e relacionada com a estrutura interna dos hidrogéis. Estes dados também contribuíram para a originalidade do presente trabalho, tendo sido submetidos a um periódico internacional⁹⁶.

A liberação do acetaminofeno e da insulina relaciona a velocidade de

liberação em função da composição dos hidrogéis. O método empregado para a dosagem do acetaminofeno por espectrofotometria em ultravioleta (UV) foi descrita por MIYAJIMA e col. (1993)⁷⁹. Estes dados também originais constituíram um outro trabalho que foi enviado para publicação em um periódico internacional⁹⁷.

O outro objetivo consistiu na síntese de derivados acrílicos do acetaminofeno para a preparação de sistemas copoliméricos via radiação ionizante, que contém o fármaco acetaminofeno ligado covalentemente à cadeia principal, e no acompanhamento de sua liberação em meio alcalino e enzimático.

Inicialmente, sintetizou-se o monômero acrilato de 4-acetanilida, o (AOA), que é um derivado do acetaminofeno. Esta síntese baseou-se no estudo desenvolvido por SAN ROMÁN & MADRUGA (1989)³⁰, por meio de uma modificação da reação de Schotten-Bauman⁹⁸. O monômero foi caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C.

Para a caracterização dos copolímeros utilizou-se o método de Fineman e Ross (1949)⁹⁹, para determinar as frações molares dos monômeros nos copolímeros e as razões de reatividade para o sistema DMAA-AOA, conferindo mais uma parte original no trabalho.

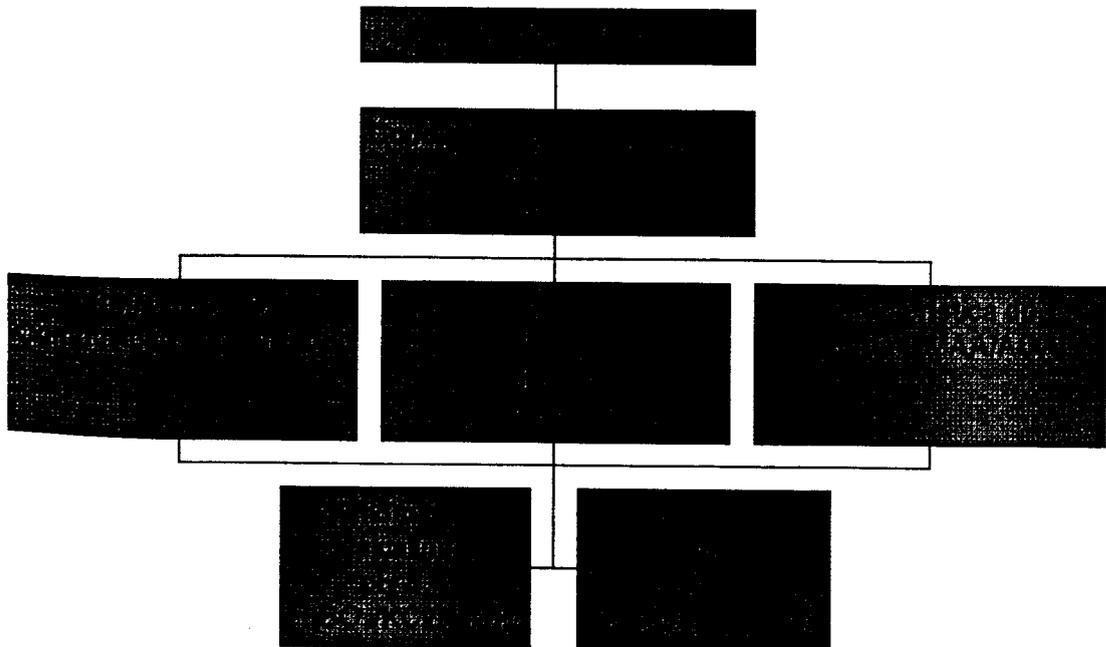
A obtenção destes copolímeros e o estudo da liberação do acetaminofeno almejou verificar o potencial das matrizes como fármaco polimérico.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Síntese de copolímeros com o acetaminofeno como substituinte.

Foram descritas as sínteses do monômero que continha o acetaminofeno ligado quimicamente e posteriormente a copolimerização deste com a N,N-dimetilacrilamida (DMAA). Este sistema foi caracterizado e a liberação do acetaminofeno foi testada.

Obtenção do fármaco polimérico DMAA/AOA



III.1.1 Síntese do monômero acrilato de 4-acetanilida AOA

Reagentes e solventes:

4-hidroxiacetanilida (acetaminofeno), Sigma Chemical Co.;
 cloreto de acrilóila, Aldrich Chemical Co.;
 NaOH, Merck;
 dioxano grau analítico, Nuclear;
 metanol grau analítico, Merck;
 acetona grau analítico, Merck.

Iniciou-se com a síntese de um monômero acrílico derivado do fármaco acetaminofeno, o acrilato de 4-acetanilida (AOA), com o intuito de posteriormente copolimerizá-lo com um monômero hidrofílico, N,N-dimetilacrilamida, (DMAA).

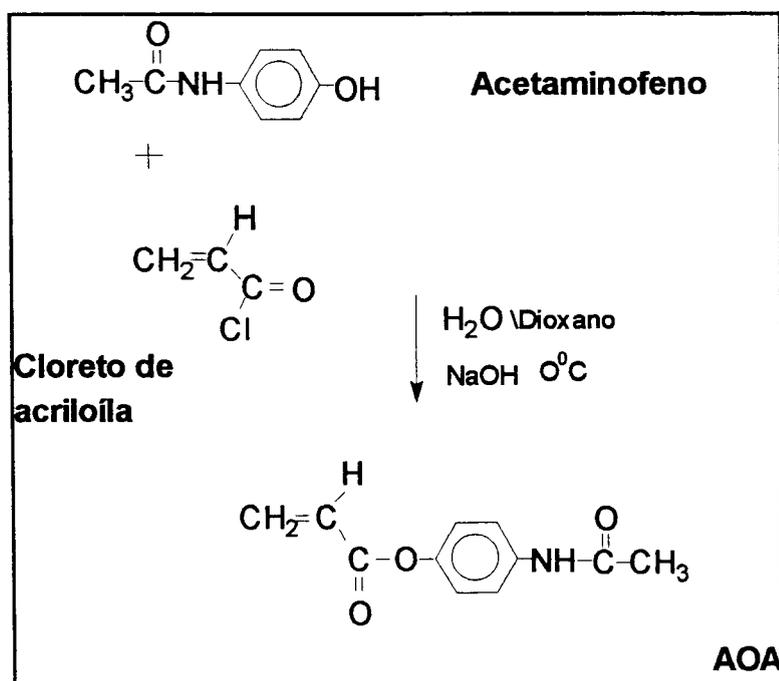


Figura 6. Síntese para a preparação do derivado acrílico do acetaminofeno AOA.

O AOA foi sintetizado dissolvendo-se 0,1 móis de acetaminofeno em 150 mL

de uma solução aquosa de hidróxido de sódio à 5% e misturando-se 20 mL de dioxano. A mistura foi feita em um balão de três bocas onde em uma das entradas colocou-se um funil de separação. O funil de separação de 25 mL continha 0,2 mols de cloreto de acrilóila, que foi adicionado à mistura gota a gota. A mistura foi mantida à 0°C, sob constante agitação, durante a adição do monômero. A mistura permaneceu por mais duas horas com controle constante do pH. A reação é demonstrada a seguir na figura 6:

O AOA foi obtido sob forma de precipitado, portanto, o produto da reação foi separado por filtração. Este foi purificado por cristalização em água duas vezes. O produto sólido filtrado foi seco à pressão reduzida até peso constante. O rendimento foi de 61%. O produto seco puro apresentou um ponto de fusão de 143°C.

O AOA foi caracterizado por espectrometria de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C e infravermelho.

Os espectros de infravermelho foram realizados a temperatura ambiente com a preparação de pastilhas de 200 mg de KBr, perfeitamente seco, e o monômero em uma concentração de 100:1 respectivamente. O espectrofotômetro utilizado foi o Perkin Elmer 1310 à temperatura ambiente.

Os espectros de ^1H e ^{13}C foram obtidos no espectrômetro utilizando-se clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente, e trimetil sulfóxido (TMS) como composto de referência interna, em um espectrômetro Bruker 300 (300MHz).

III.1.2. Copolimerização

Reagentes e solventes:

N,N-dimetilacrilamida, Aldrich Chemical Co.;
 N,N-dimetilformamida grau analítico, Nuclear;
 éter etílico grau analítico, Merck;
 metanol grau analítico, Merck;
 acetona grau analítico, Merck;

A reação de copolimerização entre AOA e DMAA foi realizada em presença de dimetilformamida DMF à temperatura ambiente. A concentração total dos monômeros na mistura da reação foi de 1 mol/L (tabela 2). As misturas foram colocadas dentro de ampolas de vidro seladas sob alto vácuo após a retirada do oxigênio do meio reacional, uma vez que a polimerização foi induzida pela radiação. As ampolas foram degasadas em uma linha de alto vácuo, com vácuo da ordem de 10^{-5} mmHg, gerado por uma bomba mecânica de duplo estágio.

Tabela 2. Frações molares de entrada dos monômeros AOA e DMAA na alimentação da reação de copolimerização via radiação gama (dose 54 Gy).

MISTURAS	F _{DMAA}	F _{AOA}	m _{DMAA} (g)	m _{AOA} (g)	V _{DMF} (mL)	V _{DMAA} (mL)
1	0,85	0,15	3,66	1,34	43,5	3,80
2	0,70	0,30	2,65	2,35	38,5	2,76
3	0,50	0,50	1,63	3,37	32,0	1,69
4	0,30	0,70	0,86	4,14	29,0	0,89
5	0,15	0,85	0,38	4,61	26,4	0,40

A reação via radical livre foi induzida por radiação gama, proveniente de uma fonte de ^{60}Co da Yoshizawa Kiko Co., tipo panorâmica, a uma taxa de dose de 0,16 kGy/h.

A reação de copolimerização pode ser representada da seguinte maneira

(figura 7):

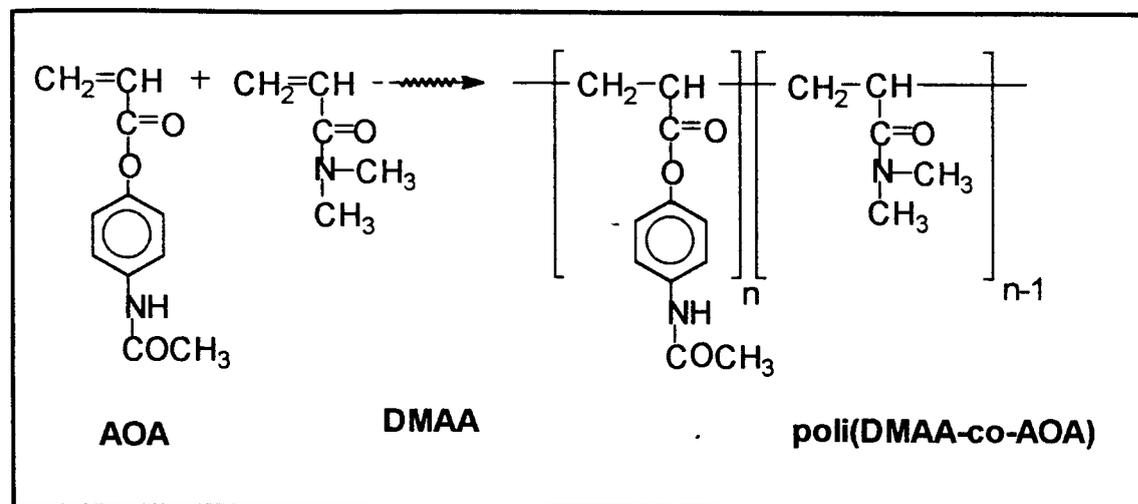


Figura 7. Síntese do poli(DMAA-co-AOA).

Após a irradiação os copolímeros foram precipitados em éter etílico. Os copolímeros foram lavados sucessivas vezes com éter e após solubilizados, para sua transferência de recipiente. Logo após o solvente foi evaporado com um rota evaporador.

O grau de conversão da polimerização foi determinado gravimetricamente, após secagem dos copolímeros em vácuo até peso constante.

A caracterização e a composição dos copolímeros foi feita através de espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H em um equipamento Varian Gemini 200 (200 MHz). Os espectros foram obtidos à temperatura ambiente em solução de dimetilsufóxido DMSO-d_6 à 5% (p/v).

III. 2. Comportamento hidrolítico do sistema DMAA-AOA

Este trabalho teve a finalidade não só de sintetizar um polímero acrílico e estudar suas características, mas também o objetivo de poder preparar sistemas macromoleculares com atividade farmacológica em potencial, pela sua própria funcionalidade e caráter macromolecular, como pela sua capacidade de poder atuar como um sistema de liberação controlada do fármaco propriamente dito (acetaminofeno). Neste sistema de liberação, o fármaco se encontra ligado à macromolécula através de ligações lábeis que podem ser destruídas em condições fisiológicas.

Para possibilitar a união de uma macromolécula a um fármaco utilizou-se grupos funcionais ésteres como pontos de ligação. Por sua natureza, tais funções podem ser hidrolisadas via química ou enzimática através de mecanismos biodegradáveis onde participam enzimas como tripsina, α -quimiotripsina, esterase, lipases, etc.^{5,19-21,24,28,29,100}

O estudo do comportamento hidrolítico dos sistemas preparados, foram realizados em condições padrões, utilizando-se soluções tampões de pH 8,4 ($H_3BO_3/KCl/NaOH$), tampão de Clark e Lubs¹⁰¹, caracterizando um meio alcalino e temperatura fisiológica ($37^{\circ}C$). Também analisou-se a hidrólise em meio enzimático utilizando tampão de Sorensen fosfato¹⁰¹, pH 7,0 mais solução de NaCl a 0,85%, simulando o meio fisiológico e EDTA à 0,02%.

III.2.1. Preparação das pastilhas

Para os experimentos da determinação do acetaminofeno liberado das matrizes poli(DMAA-co-AOA) utilizamos amostras com 30 e 50% em peso do

monômero AOA na sua composição. A partir dos copolímeros sintetizados, como mencionado anteriormente (Capítulo III.1.2), preparamos pastilhas que foram colocadas em diferentes soluções tampão para liberarem o fármaco.

As pastilhas foram preparadas, com aproximadamente 100 mg do copolímero seco utilizando-se uma prensa hidráulica (CARVER- modelo C 12 Ton) durante 30 min. Foi utilizada uma forma que gerou pequenos discos com 10 mm de diâmetro por 1 mm de espessura.

III.2.2. Determinação do acetaminofeno liberado

Com o objetivo de analisar-se quantitativamente e de forma reprodutiva o processo hidrolítico do sistema DMAA-AOA, tanto em meio alcalino como enzimático, as determinações da concentração do acetaminofeno livre foram feitas por espectrometria no UV.

Determinamos o coeficiente de extinção molar do acetaminofeno, o fármaco imobilizado nas matrizes poliméricas, no comprimento de onda de máxima absorção de 246 nm. Para tal, obtivemos uma curva de calibração com a densidade ótica em função das várias concentrações conhecidas de soluções do fármaco em pH 7,3.

Equipamentos e vidraria:

espectrofotômetro UV/visível Pharmacia LKB, Ultrospec III

balança analítica, Mettler H10T;

pipeta automática 200/1000 μ L, Finnpiette Digital ACL Sigma

pipeta automática 1000/5000 μ L, Finnpiette Digital ACL Sigma

pipeta automática 10/1000 μ L, Finnpiette Stepette Sigma

pipeta automática 2/10 μ L -P-10, Gilson

pipeta automática 50/200 μ L, Excel Mydegi 8000.

pipeta automática 250/1000 μ L, Excel Mydegi 8000.

cubeta quartzo de 500 μ L.

banho termostatzado, Neslab

pHmetro digital, Ionalyzer - Orion Reserch, Modelo 801.

Reagentes:

cloreto de potássio (KCl) grau analítico, Merck;

hidróxido de sódio (NaOH) grau analítico, Merck;

ácido bórico grau analítico, Sigma Chemical Co.

Solução tampão borato pH 7,3 (H₃BO₃/KCL/NaOH), Clark e Lubs¹⁰¹

A solução tampão pH 7,3 borato foi preparada através da mistura de 50 mL de uma solução A com x mL de uma solução B e diluídos a 100mL com água destilada. A solução A foi preparada com 6,2 g H₃BO₃ e 7,46 g de KCl por litro e a solução B é uma solução de NaOH 0,1N. Misturou-se 50 mL da solução A com 2,6 mL de solução B e após, diluiu-se até 100 mL com água destilada. O pH da solução final foi acompanhado com um pHmetro.

A curva padrão foi obtida preparando-se uma solução a partir de 2,5 mg de acetaminofeno dissolvidos na solução tampão borato de pH 7,3, num balão de 25,0 mL. Foi obtida uma solução com concentração de 0,1 g/L de onde foram retiradas alíquotas e feitas diluições em 50,0 mL do tampão (tabela 3).

De acordo com a Lei de Lambert-Beer, para um determinado intervalo de concentração de uma solução, a absorvância desta solução de um composto com grupos cromóforos é função da concentração segundo a equação (1):

$$A = \xi \times C \times l \quad (1)$$

sendo,

A - absorvância a um determinado comprimento de onda;

ξ - coeficiente de extinção molar (L/mol.cm);

C - concentração da solução da amostra (mol/L);

l - largura da célula - distância percorrida pelo raio ótico (cm).

Tabela 3. Preparação das soluções de acetaminofeno a partir de uma solução de C = 0,1 g/L e concentração final (Molar).

Aliquota (mL)	C (g/L)	Molar (mol/L)
7,5	0,015	10^{-4}
3,5	0,007	$0,5 \times 10^{-4}$
0,75	0,0015	10^{-5}
0,35	0,0007	$0,5 \times 10^{-5}$
0,075	0,00015	10^{-6}

Para obter-se o coeficiente de extinção molar do acetaminofeno preparou-se uma curva de calibração com soluções de acetaminofeno em concentrações compreendidas entre 10^{-4} e 10^{-6} Molar (tabela 3). Uma vez medidas as absorvâncias correspondentes de cada concentração, obteve-se a relação linear entre as grandezas cuja declividade é o coeficiente de extinção molar.

III.2.2.1 Acetaminofeno liberado em meio alcalino

Para a terminação da variação do acetaminofeno hidrolisado das pastilhas das matrizes poliméricas, estas foram colocadas em 25 mL de solução tampão com pH 8,4 ($H_3BO_3/KCl/NaOH$), que é o tampão borato de Clark e Lubs⁹⁹ na temperatura

de 37°C. As pastilhas foram partidas ao meio, para trabalharmos com uma massa ao redor de 50 mg, e analisadas espectroscopicamente.

Equipamentos e vidraria:

espectrofotômetro UV/visível Pharmacia LKB, Ultrospec III

balança analítica, Mettler H10T;

pipeta automática 200/1000µL, Finnpipette Digital ACL Sigma

pipeta automática 1000/5000µL, Finnpipette Digital ACL Sigma

pipeta automática 10/1000µL, Finnpipette Stepette Sigma

pipeta automática 2/10µL -P-10, Gilson

pipeta automática 50/200µL, Excel Mydegi 8000.

pipeta automática 250/1000µL, Excel Mydegi 8000.

cubeta quartzo de 500 µL.

banho termostatizado, Neslab

pHmetro digital, Ionalyzer - Orion Reserch, modelo 801.

Solução tampão borato pH 8,4 (H₃BO₃/KCl/NaOH), Clark e Lubs¹⁰¹

A solução tampão pH 8,4 borato foi preparada através da mistura de 50 mL de uma solução A com x mL de uma solução B e diluídos a 100mL com água destilada. A solução A foi preparada com 6,2 g H₃BO₃ e 7,46 g de KCl por litro e a solução B é uma solução de NaOH 0,1N. Misturou-se 50 mL da solução A com 8,5 mL de solução B e após, diluiu-se até 100 mL com água destilada. O pH da solução final foi acompanhado com um pHmetro.

O procedimento utilizado compreende a medida da liberação acumulada do acetaminofeno da matriz polimérica em função do tempo. Periodicamente, foram retiradas alíquotas diretamente dos frascos para se realizar a leitura da absorbância, que inicialmente foram no intervalo de 30 min e após às primeiras 10 horas, passaram a ser retiradas em intervalos de tempo maiores.

Para uma melhor interpretação da liberação do acetaminofeno expressou-se os resultados em massa de acetaminofeno liberado (miligramas) por grama de material polimérico. As medidas foram feitas de duas maneiras: por leitura direta ou por diluição das alíquotas. Por leitura direta, considerou-se a medida da transmitância obtida diretamente da alíquota. Enquanto que, por diluição, a medida da transmitância foi obtida com diluição da alíquota. Utilizou-se as seguintes fórmulas:

I. Para leituras diretas (sem diluição):

$$P = \frac{C \times V \times M}{m} \quad (2)$$

onde,

P - massa de acetaminofeno (mg/g de polímero);

C - concentração (mol/L);

V - volume total da solução no frasco contendo a amostra (mL);

m - massa inicial do hidrogel (g);

M - mol de acetaminofeno (151 g).

II. Para leituras com diluição:

$$P = \frac{C \times V_1 \times M \times V_3}{m \times V_2} \quad (3)$$

onde,

P - massa de acetaminofeno (mg/g de polímero);

C - concentração (mol/L);

V₁ - volume total da diluição (mL);

V₂ - volume da alíquota retirada da solução (mL);

V₃ - volume total da solução no frasco contendo a amostra (mL);

M - mol de acetaminofeno (151 g).

Desta forma, obtive-se os dados para a discussão apresentada mais adiante.

III.2.2.2 Acetaminofeno liberado em meio enzimático

Este experimento tem o objetivo de verificar a potencialidade da matriz sintetizada poli(DMAA-co-AOA) como um fármaco polimérico. Desta forma, a utilização do meio enzimático simula parte do meio fisiológico, onde possivelmente ocorrerá a hidrólise.

Equipamentos e vidraria:

espectrofotômetro, Pharmacia Biotech Optical Unit UV-1
unidade controladora de UV, Pharmacia Biotech Control Unit UV-1
registrador, Pharmacia LKB-Rec101
balança analítica Mettler H10T;
pipeta automática 200/1000 μ L, Finnpipette Digital ACL Sigma
pipeta automática 1000/5000 μ L, Finnpipette Digital ACL Sigma
pipeta automática 10/1000 μ L, Finnpipette Stepette Sigma
pipeta automática 2/10 μ L -P-10, Gilson
pipeta automática 50/200 μ L, Excel Mydegi 8000.
pipeta automática 250/1000 μ L, Excel Mydegi 8000.
cubeta quartzo de 500 μ L.
banho termostatizado, Neslab
pHmetro digital, Ionalyzer - Orion Reserch, Modelo 801.
bomba peristáltica, Incibrás BP 100

Reagentes:

fosfato monobásico potássico (KH_2PO_4) grau analítico;
fosfato dibásico sódico (Na_2HPO_4) grau analítico;
cloreto de sódio (NaCl) grau analítico;
solução de tripsina suína (25g/L) em solução salina, NaCl 0,9%,
Sigma Chemical Company.

Solução tampão fosfato pH 7,4 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), Sorensen¹⁰¹

A solução tampão pH 7,4 ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), foi preparada através da mistura de x mL de uma solução A com $100-x$ mL de uma solução B. A solução A foi preparada com 1/15 moles de KH_2PO_4 (9,08g/L) e a solução B é uma solução de 1/15 moles de Na_2HPO_4 (11,88 g/L). Utilizou-se 39,2 mL de solução A e 60,8 mL da solução B. O pH da solução final foi acompanhado com um pHmetro.

Solução enzimática de tripsina suína à 0,25%

Preparou-se uma solução com a tripsina à 0,25% a partir de uma solução mãe de 2,5% (diluição 1:10 em tampão fosfato) e acrescentou-se NaCl à 0,85% simulando um meio fisiológico. Acrescentou-se algumas gotas de EDTA, 0,018g em 80 mL de (solução de 0,02%), para evitar a complexação da tripsina, no caso de presença de cátions cálcio. O pH final da solução foi de 7,0.

O experimento para a medida do acetaminofeno liberado da matriz através da hidrólise enzimática, também, compreendeu uma medida da liberação acumulada do acetaminofeno em função do tempo. Para tal, foi utilizado um sistema contínuo de leitura (figura 8). A amostra foi colocada em um recipiente fechado que continha uma quantidade conhecida da solução enzimática, que por sua vez encontra-se em um banho termostatizado à 37°C. A solução circulou por meio de uma bomba peristáltica através das unidade óptica de UV retornando ao recipiente de origem. O sinal da leitura era enviado a um registrador. Desta forma, obtivemos leituras contínuas das absorbâncias da solução em função do tempo.

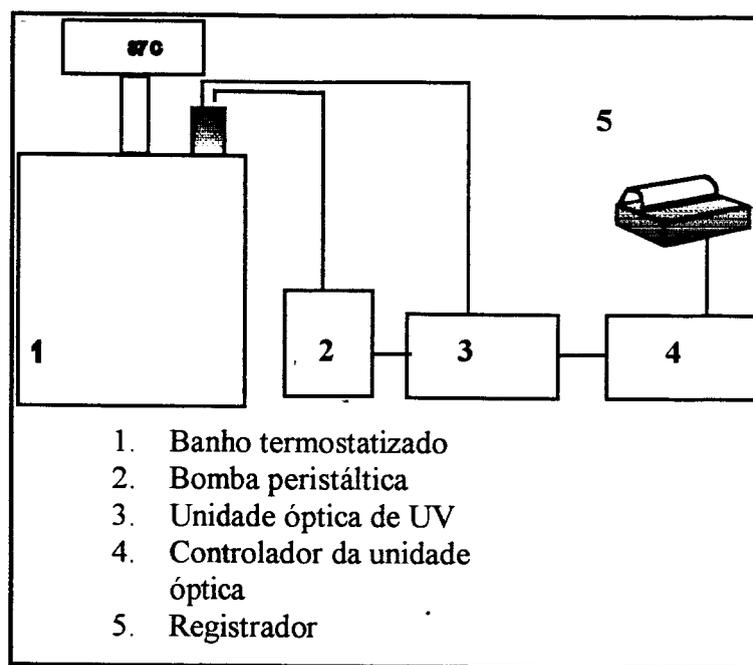


Figura 8. Esquema do sistema contínuo de leitura da concentração do acetaminofeno por espectrometria de UV.

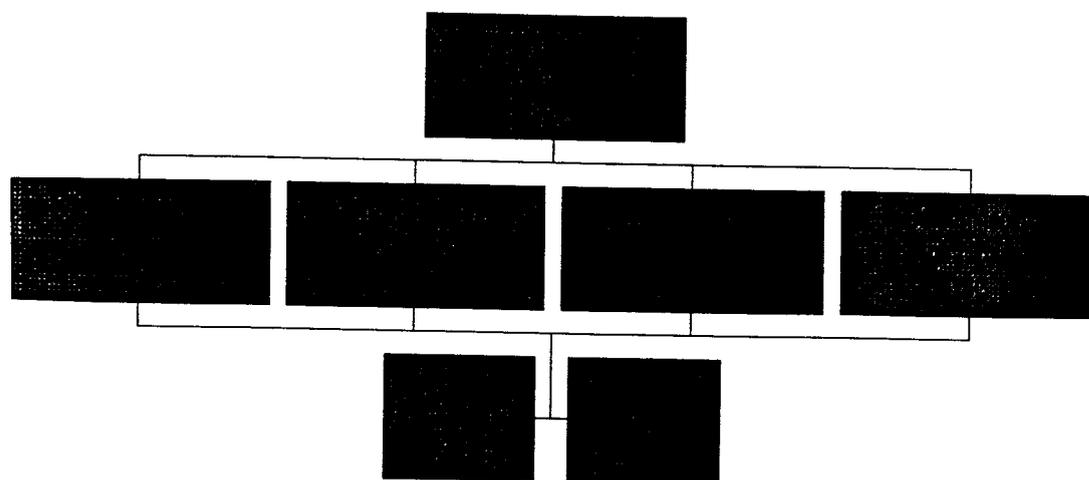
III.3 Síntese e caracterização do homopolímero e dos hidrogéis termossensíveis derivados do A-ProOMe

Recentemente, foi sintetizado um hidrogel sensível a estímulos externos com propriedades biocompatíveis por YOSHIDA e col. (1991)⁷⁶, usando grupos laterais amino ácidos derivados da acrilóila com o éster metílico de N-acrilóil L-prolina. O monômero éster metílico de N-acrilóil-L-prolina (A-ProOMe) foi obtido pela reação do ácido clorídrico da L-prolina metil éster (HCl.A-ProOMe) em solução de clorofórmio com trietilamina onde foi adicionado uma solução de ácido acrílico em tetrahydrofurano (THF). A reação foi mantida por algumas horas à -10°C e mais algum tempo em temperatura ambiente. O produto foi purificado por cromatografia em coluna de sílica gel com solventes orgânicos como eluentes.⁷⁶

O monômero foi doado pelo Departamento de Desenvolvimento de Materiais do Instituto de Pesquisas da Química das Radiações de Takasaki, do Instituto de Pesquisas de Energia Atômica do Japão (JAERI).

Sintetizou-se hidrogéis a partir do A-ProOMe com diferentes frações de monômeros hidrofílicos, hidrofóbicos e reticulantes.⁸⁴

Obtenção dos hidrogéis termossensíveis



III.3.1 Polimerização

Materiais:

O A-ProOMe foi sintetizado de acordo com YOSHIDA e col. (1991)⁷⁶. O DMAA, acrilato de 2-ciano etila (CEA), trimetacrilato de trimetilol propano (TMPTMA) e o acetaminofeno foram obtidos da Aldrich Chemical Company Ltda. (USA) e utilizados como fornecidos. A água utilizada foi sempre recém destilada e os outros reagentes químicos usados eram de grau analítico.

O homopolímero e os hidrogéis foram obtidos por irradiação dos monômeros em temperatura ambiente na ausência de O₂, com raios gama, (γ), provenientes de uma fonte de ⁶⁰Co da Yoshizawa Kiko Co., tipo panorâmica, com taxa de dose de 0,365 Gy/s e dose de 10 kGy.

Tabela 4. Composição dos monômeros, acetaminofeno e agente reticulante (m/m), utilizada na obtenção dos hidrogéis copolimerizados via radiação gama.

A-ProOMe (%)	DMAA (%)	CEA (%)	Acetaminofeno (%)	TMPTMA (%)
95	5	-	10	1
99	-	-	10	1
97	-	-	10	3
99	-	-	-	1
95	5	-	-	1
95	-	5	-	1
99,5	0,5	-	-	1
98	2	-	-	1
95	5	-	-	1
-	100	-	-	3
95	5	-	-	3
90	10	-	-	3
80	20	-	-	3
70	30	-	-	3
98	-	2	-	1
95	-	5	-	1
85	-	15	-	1
97	-	-	-	3
94	-	-	-	6
90	-	-	-	10
87	-	-	-	13
85	-	-	-	15
81	-	-	-	19

Os monômeros foram colocados em cilindros de polipropileno de 3 cm de comprimento e 0,7 cm de diâmetro. Antes de serem irradiados foram degasados com o borbulhamento de N₂ durante 3 min. cada amostra e fechados imediatamente.

A composição dos vários hidrogéis foi obtida a partir da mistura do A-ProOMe com CEA, DMAA, TMPTMA e AOA nas desejadas proporções (tabela 4).

Após a irradiação as amostras tinham uma aparência sólida e transparente com a forma cilíndrica do recipiente. Estes cilindros foram cortados em pequenos discos com 1,5 mm de espessura. Após, as amostras foram lavadas em água à 5°C durante 3 dias.

III.3.2 Determinação da temperatura crítica inferior do homopolímero (LCST)

A temperatura crítica inferior da solução do homopolímero A-ProOMe foi determinada em uma solução aquosa. Solubilizou-se 82,2 mg e 48,8 mg do homopolímero em dois tubos de ensaio diferentes com 10 mL de água em cada à 6°C, onde permaneceram por 2 horas para estabilização da solução em um banho termostaticado. Após, a temperatura das soluções foi elevada de 1°C por hora de maneira que se pudesse observar a mudança do aspecto da solução de transparente para o aparecimento de uma turvação. Neste momento, leu-se a temperatura crítica inferior (LCST).

III.3.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As amostras foram analisadas depois de lavadas sucessivas vezes para retirada do monômero. Após, foram submetidas a temperaturas diferentes durante 48 h em água e em seguida os hidrogéis poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) na proporção 99,5/0,5 foram cuidadosamente liofilizados. As amostras foram analisadas nas temperaturas de 10°C, 20°C, 30°C e 50°C. As micrografias foram obtidas com um aumento de 2.000 vezes com um microscópio eletrônico de varredura (MEV) de marca Cambridge Stereoscan 250.

III.3.4 Ciclo de reversibilidade dos hidrogéis

Este experimento consistiu em determinar a reversibilidade da propriedade de expansão dos hidrogéis. As amostra foram inicialmente expandidas em água à 6°C até atingirem um grau máximo de expansão (24 h). Após, a temperatura foi elevada, de uma só vez para 35°C, onde, mediu-se o grau de expansão de hora em hora até o equilíbrio nesta temperatura.

O caminho inverso foi feito com as mesmas amostras, ou seja, após as amostras estarem em equilíbrio à 35°C, diminuiu-se a temperatura à 6°C onde mediu-se os graus de expansão de hora em hora até o equilíbrio.

III.3.5 Determinação do grau de expansão dos hidrogéis

Este experimento consistiu em obter a expansão em massa dos hidrogéis denominada grau de expansão e o comportamento de fase dos hidrogéis.

O grau de expansão (%E) (5) de um hidrogel termossensível é determinado pela quantidade de água absorvida ou expelida durante uma variação de

temperatura, ou seja, a diferença da massa do polímero expandido numa dada temperatura, pela massa liofilizada do mesmo hidrogel dividida pela massa do hidrogel expandido (equação 4). Sendo assim, a equação correspondente é:

$$\%E = \frac{M - M_0}{M} \times 100 \quad (4)$$

M - massa do hidrogel expandido (mg);

M₀ - massa do hidrogel liofilizado (mg);

%E - grau de expansão.

Para a medida do grau de expansão sucederam-se várias etapas. Inicialmente, as amostras foram lavadas em água à 5°C para retirada do monômero excedente durante 3 dias. Após, foram colocadas em tubos de ensaio com 5 mL de água e estes por sua vez colocados em um banho termostatizado em temperaturas previamente estabelecidas (6°; 12°; 18°; 20°; 23°; 30°; 40°; 50° e 60°C, nesta ordem). Assim que as amostras atingiram seu equilíbrio de expansão em uma dada temperatura, foram pesadas em balança analítica. O equilíbrio do grau de expansão na água foi atingido após 24 horas.

O diagrama de fase de cada hidrogel foi representado pelas curvas do grau de expansão em função da temperatura.

III.3.6 Determinação da água ligada nos hidrogéis com a utilização da técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de calorimetria diferencial de varredura (DSC) foram obtidas em um DSC-7 da Perkin Elmer equipado com um acessório de resfriamento podendo trabalhar com temperaturas abaixo de -60°C. A temperatura de calibração foi

atingida com a utilização do n-decano e benzeno, e o Índio foi utilizado para a calibração da variação da entalpia (ΔH). A taxa de aquecimento foi de $5^\circ\text{C}/\text{min}$ com o aparelho operando na faixa de temperatura de -55° à 37°C .

Hidrogéis com diferentes graus de reticulante (1, 5, 10 e 15%) foram expandidos em água até atingirem o equilíbrio em diferentes temperaturas, 4° , 22° e 37°C . As amostras foram, uma a uma, cuidadosamente secas com papel de filtro para retirar a água em excesso da superfície, colocadas e seladas em porta amostras próprio de alumínio, previamente pesados. A massa das amostras expandidas foi determinada gravimetricamente com o valor de 2 a 6 mg.

Os porta amostras para serem ambientados também foram mantidos nas respectivas temperatura. Antes dos experimentos todos os porta amostras já com as amostras ainda foram mantidos dentro do aparelho de DSC nas respectivas temperaturas por 10 min. Após as medidas com DSC os porta amostras foram pesados novamente para certificar-se que não houve perda de água durante o experimento.

Sabe-se que as amostras são constituídas por dois componentes polímero mais a água. A quantidade de água absorvida (massa) foi determinada pela evaporação utilizando-se o DSC a uma temperatura de trabalho de 150°C , menor do que a temperatura do início da degradação das amostras poliméricas ($\approx 300^\circ\text{C}$) depois das medidas de DSC. A massa (g) de água absorvida é expressa por grama de polímero seco e é chamada de A_c .

$$A_c = A_L + A_N \quad (5)$$

A_c é a soma dos dois tipos de água, a água normal, A_N , que congela, e a água ligada, A_L , que não congela, que será calculada por diferença: $A_L = A_c - A_N$.

Todas as três grandezas são expressas em massa de H₂O (g) por massa do polímero seco (g), m_p .

$$A_c = \frac{m \text{ H}_2\text{O absorvida}}{m_p} \quad (6)$$

$$A_N = \frac{m \text{ H}_2\text{O normal}}{m_p} \quad (7)$$

$$A_L = \frac{m \text{ H}_2\text{O ligada}}{m_p} \quad (8)$$

Esta técnica permite obter o ΔH (calor de fusão) da transição de fase da água normal contida na amostra.

$$\Delta H = K \frac{A}{m} \quad (9)$$

onde K é a constante de proporcionalidade do equipamento, m a massa da amostra A a área do componente que originou a transição. Desta forma obtém-se a quantidade da água normal na amostra uma vez que sabe-se que o valor do calor de fusão da água é 334 J/g H₂O.

III.4 Imobilização e liberação controlada de fármacos dos hidrogéis derivados do A-ProOMe

Alguns hidrogéis obtidos neste trabalho foram escolhidos, em função das suas características, para serem estudados como sistemas de liberação de fármacos.

Um dos objetivos deste trabalho é obter dados para que se possa futuramente alcançar sucesso na utilização destes materiais como sistemas de liberação de fármacos.

O acetaminofeno foi escolhido devido sua facilidade de manipulação, aquisição e detecção em solução aquosa, facilitando o estudo e observação dos mecanismos de liberação nos hidrogéis obtidos. A imobilização do fármaco foi feita por aprisionamento e adsorção física. As medidas da liberação foram feitas por espectrometria no UV em meio aquoso.

Para observação do comportamento dos hidrogéis como sistemas de liberação de fármacos imobilizou-se a insulina em dois hidrogéis diferentes. Testou-se os hidrogéis com o hormônio para controle de diabetes de ratos por meio de testes preliminares. A imobilização da insulina foi por adsorção física.

III.4.1 Imobilização do acetaminofeno e da insulina nos hidrogéis

O acetaminofeno foi imobilizado nos hidrogéis de maneiras diferentes:

i. Por aprisionamento

A partir de uma mistura do monômero A-ProOMe com acetaminofeno nas proporções indicadas na tabela 4 o agente reticulante foi adicionado ao final da mistura. A mistura foi colocada em tubos de polipropileno onde borbulhou-se nitrogênio com o intuito de retirar o oxigênio do meio. As condições da reação de polimerização e a preparação dos discos foi idêntica a descrita anteriormente (Capítulo III.3.1);

ii. Por adsorção física

O hidrogel foi imerso em uma solução saturada do fármaco. Os discos dos hidrogéis já lavados e liofilizados foram introduzidos em uma solução saturada de acetaminofeno à 6°C, de maneira que nesta temperatura adquiriram uma expansão máxima com a adsorção do fármaco. Foram mantidos na solução por 24 h e após cuidadosamente liofilizados. A massa do acetaminofeno foi determinada gravimetricamente após os discos estarem secos.

Foram utilizados hidrogéis com dois diferentes graus de reticulação para os testes de liberação da insulina, o poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) com 99/1 e 95/5 % em peso de reticulante. Para a imobilização da insulina nos hidrogéis os discos foram lavados, liofilizados e pesados, conforme descrito neste Capítulo, item III.3.4. Os hidrogéis secos foram introduzidos em uma solução de insulina onde permaneceram por dois dias à 4°C. Após este período, os hidrogéis foram secos por liofilização.

A solução de insulina foi preparada pela diluição de 300 µL de uma solução aquosa de insulina (17 mg/mL), em 10 mL de ácido acético. A insulina imobilizada nos discos dos hidrogéis foi determinada por diferença de concentração na solução que os discos foram imersos. A medida da concentração das soluções foi determinada por espectrometria no UV no comprimento de onda de 278 nm.

Reagentes:

4-hidroxiacetanilida (acetaminofeno), Sigma Chemical Co.;
insulina, (cod. I 5500), Sigma Chemical Co.;
ácido acético, grau analítico, Merck
Kit Sigma tipo Trinder número do catálogo 315

III.4.2 Determinação do acetaminofeno liberado dos hidrogéis

A determinação do acetaminofeno liberado dos hidrogéis em água à 37°C foi feita por método espectrofotométrico no UV. Os discos de hidrogéis com o acetaminofeno imobilizado foram introduzidos em tubos de ensaio contendo água com volume conhecido e estes imersos em banho termostaticado. As alíquotas foram retiradas dos tubos de ensaio para leitura seguindo a mesma metodologia citada anteriormente (Capítulo III.2.2.1).

III.4.3 Utilização dos hidrogéis como sistemas de liberação de insulina para controle de "diabetes mellitus" em ratos

Foram utilizados para este experimento ratos da raça Sprague Dowlery com 300 g de peso. A diabete foi induzida nos animais através da introdução de estreptazotocina intraperitoneal numa concentração de 65 mg/kg. Os níveis de glicose no soro dos animais foram medidos com a utilização do kit Sigma, com a utilização de espectrometria no UV no comprimento de onda de 505 nm.

Duas matrizes foram testadas por implante subcutâneo nos ratos e os níveis de glicose no soro dos animais foram medidos de tempos em tempos.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 Copolimerização e caracterização do sistema DMAA-AOA

IV.1.1 Caracterização do monômero acrilato de 4-acetanilida AOA

O monômero acrilato de 4-acetanilida, AOA (figura 9), foi obtido conforme reação descrita anteriormente, Cap. III.1.1. O rendimento da reação foi de 61%. O produto seco e puro apresentou um ponto de fusão de 143°C.

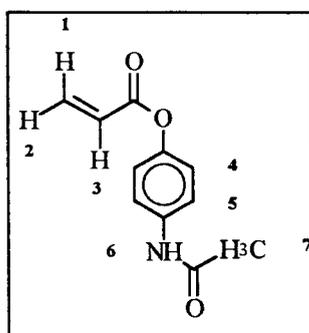


Figura 9. Fórmula estrutural do AOA

No espectro de infravermelho os sinais mais importantes foram a deformação axial N-H de amida à 3300-3260 cm^{-1} , a vibração da deformação axial do C=O de éster à 1745 cm^{-1} , a vibração da deformação axial do C=O da amida à 1645 cm^{-1} , a vibração da deformação axial da ligação dupla vinílica C=C à 1620 cm^{-1} , e a deformação axial da ligação C-C do anel aromático à 1545 e 1500 cm^{-1} (tabela 5).^{30,102}

Tabela 5. Dados característicos espectrométricos de infravermelho e RMN de ^1H do AOA (300 MHz).

Grupo funcional	^1H RMN* (δ , ppm)	IV (cm^{-1})
-CONH-	7,96	3260-3300
$\text{CH}_3\text{CO-}$	2,11	-
-COO-	-	1745, 1200
-CONH-	-	1645
$\text{CH}_2=\text{C}$	6,02, 6,60	1620
$\text{R}=\text{CH-COO-}$	6,31	-
Ar	7,03, 7,46	1545, 1500

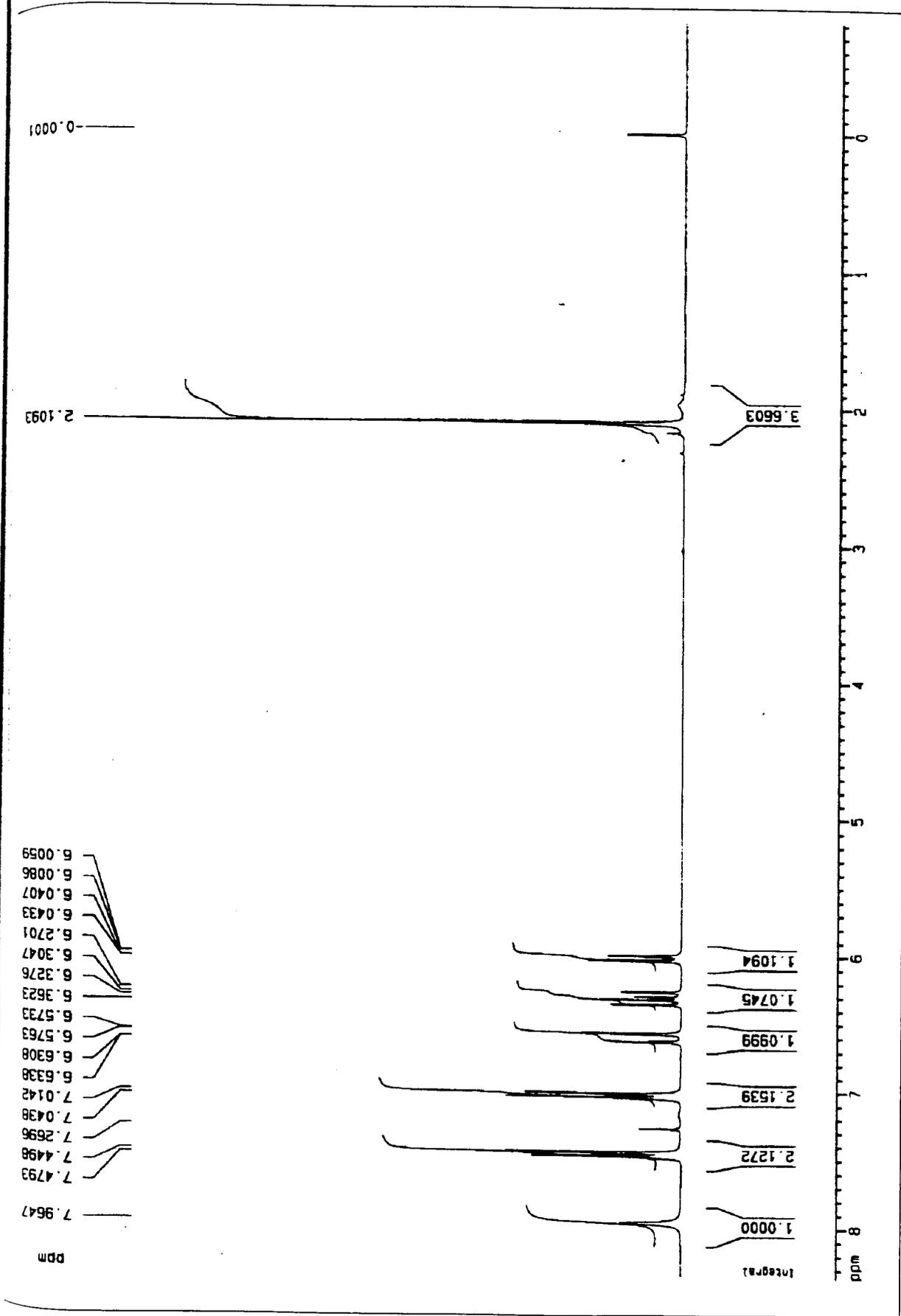
* TMS de referência.

Os picos característicos do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) (figura 10) do AOA estão na tabela 6, com os deslocamentos químicos (δ , ppm) e as respectivas constantes de acoplamento (J_{ab} , Hz). Pode-se observar que o espectro não mostrou o sinal da hidroxila fenólica $-\text{OH}$ pertencente ao acetaminofeno. Os prótons acrílicos encontram-se na região entre 6 e 6,60 ppm.^{24,102} O deslocamento químico do grupo CH_3 está por volta de δ 2 em forma de singlete, pois não está acoplado com hidrogênios adjacentes.^{24,102}

Tabela 6. Deslocamentos químico (δ , ppm) e respectivas constantes de acoplamento (J_{ab} , Hz) dos picos característicos do AOA (RMN de ^1H).

(δ , ppm)	J_{ab} (Hz)
2,11	(singlete; H_7);
6,02	(dubleto; 10,2 Hz; H_2);
6,31	(duplo dubleto; 10,2 Hz; 15 Hz; H_3);
6,60	(dubleto; 15 Hz; H_1);
7,03	(dubleto; 9 Hz; H_5);
7,46	(dubleto; 9 Hz; H_4);
7,96	(singlete largo; NH; H_6)

Figura 10. Espectro de RMN de ¹H do AOA.



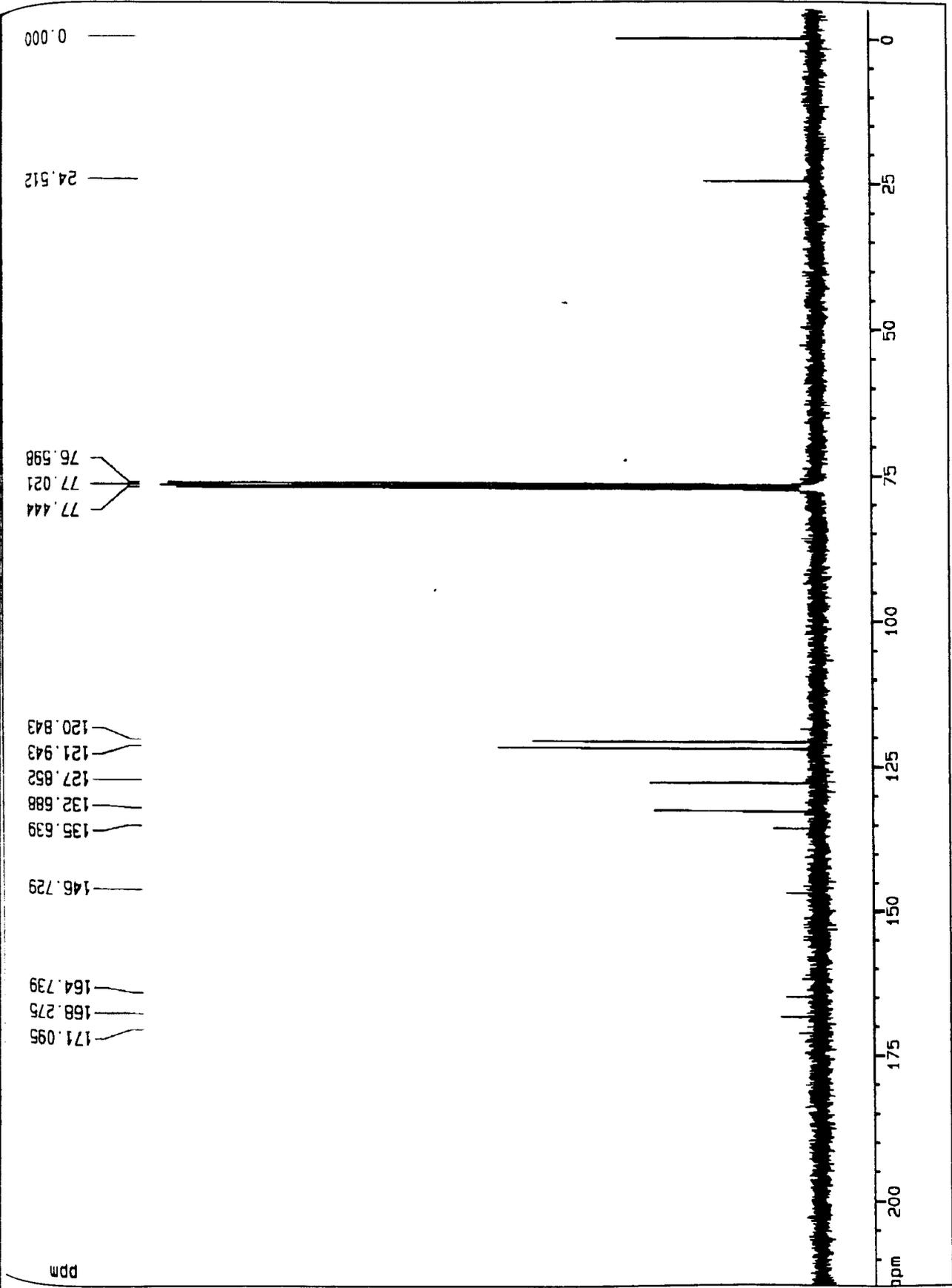


Figura 11. Espectro de RMN ¹³C do AOA.

A figura 11 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do AOA (70MHz) tirado com CDCl_3 , onde pode-se observar o sinal do grupo $\text{C}=\text{O}$ da função éster à 164 ppm aproximadamente. O sinal do grupo CH_3 aparece por volta de 24 ppm e os dois carbonos aromáticos nas posições “para” estão deslocados para campos mais altos devido a deslocalização eletrônica (146 e 135 ppm).¹⁰² Os grupos carbonila estão localizados em 164 e 168 ppm (tabela 7).

Tabela 7. Deslocamentos químicos dos carbonos do AOA, calculados a partir do espectro de RMN ^{13}C .

Nº Carbono	(δ , ppm)
C ₁	146,73 aromático
C ₂	121,94 aromático
C ₃	120,84 aromático
C ₄	135,64 aromático
C ₅	164,74
C ₆	127,85
C ₇	132,69
C ₈	168,27
C ₉	24,51

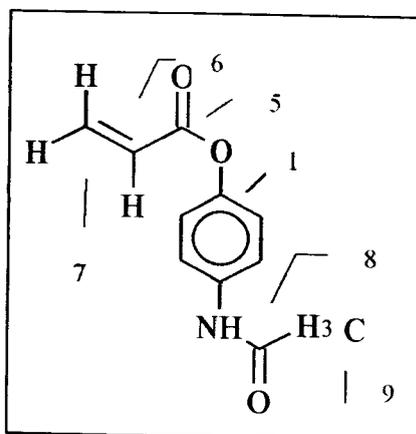


Figura 12. Fórmula estrutural do AOA

A caracterização espectrométrica do AOA no infravermelho e de RMN de ^1H e ^{13}C confirma sua estrutura.

IV.1.2 Esquema cinético da copolimerização radicalar

Na interação da radiação de alta energia ou ionizante com a matéria ocorre perda de energia. A interação ocorre com o orbital eletrônico da molécula que está ao longo do seu caminho. Tem-se como resultado, elétrons levados a níveis energéticos mais elevados (excitados) ou o seu deslocamento do orbital da molécula (ionização). Desta forma, sabe-se que radicais livres e os íons são gerados neste processo, e portanto, polymerizações via radical livre e iônicas são esperadas ocorrer com a irradiação de monômeros.^{103,104}

Sob condições de irradiação usuais a maioria dos monômeros vinílicos polimerizam através do mecanismo convencional de radical livre. As reações de copolimerização radicalar ocorrem através das seguinte fases fundamentais: iniciação, propagação e terminação.¹⁰³

Na fase de iniciação ocorre a geração de radicais livres geralmente como consequência da decomposição térmica do iniciador ou, pela própria interação da radiação de alta energia com o monômero. Os radicais primários reagem com os monômeros formando radicais livres monoméricos capazes de continuar o crescimento das cadeias pela adição de novas unidades monoméricas na fase da propagação.

Em um caso simples de copolimerização onde dois monômeros diferentes copolimerizam, ambas espécies ativas reagem, irreversivelmente, com ambos monômeros, de forma que ocorrem quatro fases diferentes de propagação, onde o esquema cinético pode ser representado segundo as equações abaixo:¹⁰⁵



onde $M_1 \cdot$ e $M_2 \cdot$ representam os macro radicais em crescimento e k_{11} , k_{12} , k_{21} , e k_{22} são as constantes de velocidade de propagação onde o primeiro sub índice indica a natureza do radical em crescimento e o segundo indica o tipo de monômero que se adiciona a cadeia. Este modelo cinético da copolimerização foi proposto por MAYO & LEWIS (1944)¹⁰⁵ onde consideram as constantes de velocidades de adição de cada monômero dependentes da identidade da unidade terminal na cadeia de crescimento. As velocidades de extinção dos monômeros são dadas pelas equações:

$$-\frac{d|M_1|}{dt} = k_{11}|M_1| \cdot |M_1| + k_{21}|M_2| \cdot |M_1| \tag{11}$$

$$-\frac{d|M_2|}{dt} = k_{22}|M_2| \cdot |M_2| + k_{12}|M_1| \cdot |M_2| \tag{12}$$

Dividindo estas duas equações entre si se obtém-se a seguinte expressão:

$$\frac{d|M_1|}{d|M_2|} = \frac{k_{11}|M_1| \cdot |M_1| + k_{21}|M_2| \cdot |M_1|}{k_{22}|M_2| \cdot |M_2| + k_{12}|M_1| \cdot |M_2|} \tag{13}$$

Para chegarem a uma equação teórica da composição do copolímero, MAYO & LEWIS (1944)¹⁰⁵ consideraram o estado estacionário para as concentrações de cada tipo de radicais dos monômeros. Ou seja, na fase da propagação, se alcança rapidamente um estado no qual a concentração total de radicais se mantém constante pois as velocidades de interconverções são iguais. Desta forma, eliminam-se as concentrações dos radicais $|M_1 \cdot|$ e $|M_2 \cdot|$ na equação:

$$k_{12}|M_1| \cdot |M_2| = k_{21}|M_2| \cdot |M_1| \tag{14}$$

Substituindo-se esta relação na equação (13) obtém-se a equação de Mayo-Lewis:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{(k_{11}/k_{12})[M_1] + [M_2]}{(k_{22}/k_{21})[M_2] + [M_1]} \quad (15)$$

A equação (15) é também conhecida como equação da composição do copolímero, tendo sido confirmada experimentalmente, estabelecendo os valores das razões de reatividade para um grande número de pares monoméricos.^{24,105,106}

A razão entre as constantes de velocidade dos processos cinéticos de homopropagação e propagação cruzada são denominadas de razão de reatividade dos correspondentes monômeros, representadas por:²⁴

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}} \quad r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}} \quad (16)$$

Este parâmetro da copolimerização mede a probabilidade de adição de uma espécie ativa. Como ambas espécies ativas competem por um monômero num dado tempo, o produto dos parâmetros da copolimerização, $r_1 r_2$, pode ser considerado na classificação da mesma.¹⁰⁶

IV.1.3 Determinação da composição dos copolímeros

Os copolímeros foram preparados a partir da mistura dos monômeros em solução de dimetilformamida numa concentração de 1 mol/L e irradiação nas condições descritas anteriormente (Capítulo III.1.2). As conversões dos diferentes copolímeros estão apresentadas na tabela 8.

As condições de polimerização foram:

- taxa de dose: 0,162 kGy/h
- dose: 54 Gy (20 min).

Tabela 8. Resultados da conversão percentual da reação de copolimerização do AOA e o DMAA em 54 Gy de dose.

Nº copolímero	% C
1	8,5
2	8,8
3	13,2
4	8,2
5	5

A composição dos copolímeros de DMAA/AOA foi determinada a partir dos correspondentes espectros de RMN de ^1H . Os espectros dos copolímeros (figura 13) preparados com várias composições de AOA na alimentação, mostraram os picos nos diferentes deslocamentos químicos característicos com diferentes intensidades possibilitando conhecer as quantidades de cada tipo de unidade monomérica incorporada à cadeia dos copolímeros (tabela 9).

Tabela 9. Valores das frações molares (F) dos monômeros no início da reação e (f) dos monômeros no copolímero calculados a partir das relações de integração dos picos dos espectros de RMN ^1H .

Nº amostra	F _{DMAA}	f _{DMAA}	F _{AOA}	f _{AOA}
1	0,85	0,73	0,15	0,27
2	0,70	0,66	0,30	0,34
3	0,50	0,53	0,50	0,47
4	0,30	0,42	0,70	0,58
5	0,15	0,43	0,85	0,57

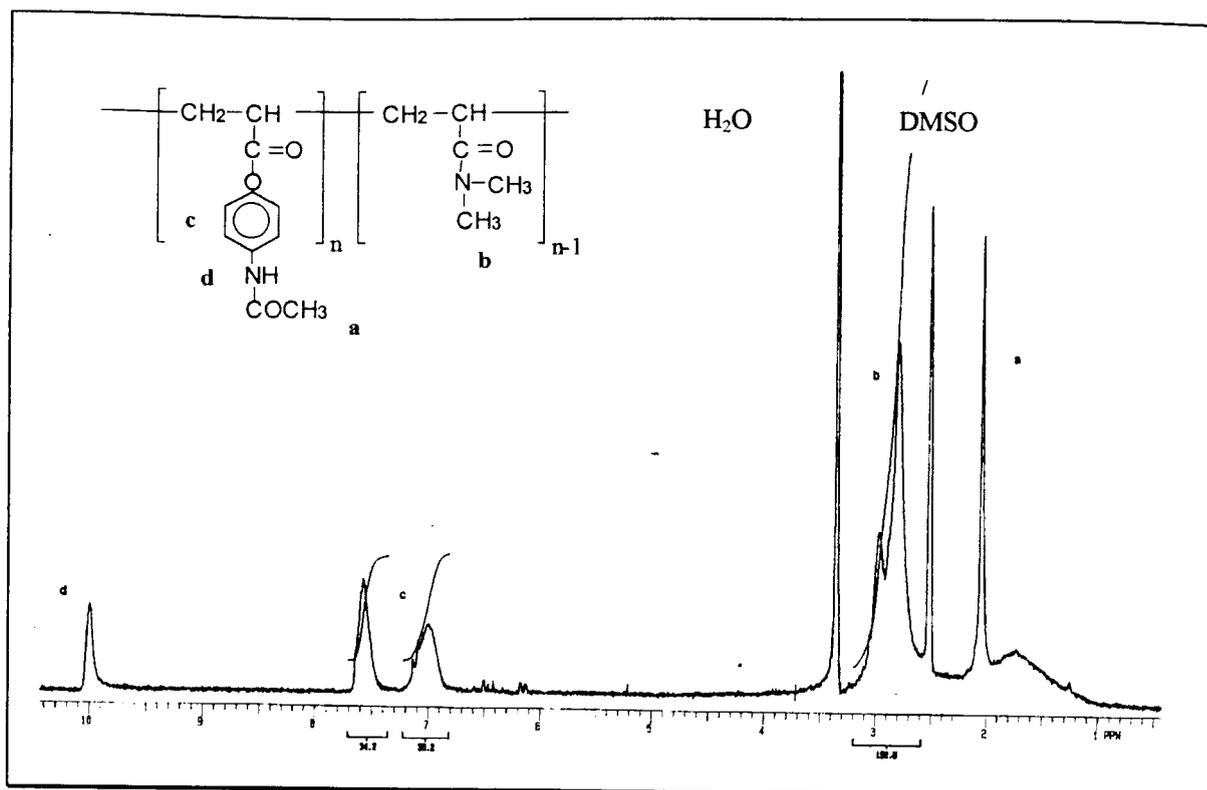


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H do copoli(DMAA-co-AOA) em DMSO-D_6 .

Considerou-se a razão entre as intensidades das integrais dos picos dos prótons aromáticos pertencentes ao AOA a um deslocamento químico de 7,1 e 7,6 ppm e dos picos dos prótons metílicos $-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ pertencentes à DMAA a um deslocamento químico de 2,9 ppm. Os resultados desta análise possibilitaram determinar as frações molares dos monômeros nos copolímeros. O pico localizado no deslocamento de 2,1 ppm refere-se aos prótons metílicos do grupo acetamida da unidade AOA.

A partir destes dados de RMN de ^1H do sistema DMAA-AOA foi possível deduzir que os copolímeros obtidos apresentam uma quantidade de AOA maior do que a correspondente à alimentação do monômero até uma mistura de monômeros de 1:1. Quantidades maiores que 50% de monômero (AOA) na alimentação, demonstram uma diminuição da proporção do AOA no copolímero, para valores menores que os correspondentes a própria alimentação.

IV.1.4 Razões de reatividade r_1 e r_2

Pode-se tomar inúmeros caminhos na avaliação gráfica da linearização da equação da composição do copolímero (equação 15) para a determinação das razões de reatividade. Fineman e Ross (1949)⁹⁹ propuseram um dos mais simples métodos para a linearização desta equação envolvendo obter a copolimerização em baixas conversões. Os valores de r_1 e r_2 podem ser obtidos graficamente por meio da declividade da reta onde a composição dos copolímeros é plotada versus a composição dos monômeros.

Partindo-se da equação da composição do copolímero (equação 15), pode-se substituir as concentrações dos monômeros $[M_1]$ e $[M_2]$ por suas respectivas frações molares, obtendo-se a seguinte equação:

$$\frac{f_1}{f_2} = \frac{F_1}{F_2} \frac{r_1 F_1 + F_2}{F_1 + r_2 F_2} \quad (17)$$

onde, F_1 e F_2 são as frações molares dos monômeros DMAA e AOA, respectivamente, na alimentação e f_1 e f_2 são as frações molares do DMAA e AOA, respectivamente no copolímero.

Os autores designaram por F a relação $F_{\text{DMAA}}/F_{\text{AOA}}$ e por f a relação $f_{\text{DMAA}}/f_{\text{AOA}}$, de modo que a equação acima toma uma nova representação:

$$f = F \frac{r_1 F_1 + F_2}{F_1 + r_2 F_2} \quad (18)$$

Simplificando-se divide-se os termos por F_2 :

$$f = F \frac{r_1 \left(\frac{F_1}{F_2} \right) + \frac{F_2}{F_2}}{\frac{F_1}{F_2} + \frac{r_2 F_2}{F_2}} \quad (19)$$

e

$$f = F \frac{r_1 F_1 + 1}{F + r_2} \quad (20)$$

Rearranjando os termos tem-se:

$$\frac{F}{f}(f-1) = r_1 \frac{F^2}{f} - r_2 \quad (21)$$

Na representação gráfica sugerida pelos autores (tabela 10) tem-se $F/f(f-1)$, na ordenada, versus F^2/f , na abscissa, dando uma reta onde a inclinação é o r_{DMAA} e o número da interseção com o eixo y é o $-r_{\text{AOA}}$.

Tabela 10. Valores das frações molares dos monômeros na composição do copolímero e sua relação pela linearização segundo a Fineman e Ross.

Nº copolímero	F_{DMAA}	F_{AOA}	f_{DMAA}	F_{AOA}	F	f	$F^2/f(x)$	$F/f(f-1)(y)$
1	0,85	0,15	0,73	0,27	5,67	2,70	11,91	3,57
2	0,70	0,30	0,66	0,34	2,33	1,94	2,80	1,13
3	0,50	0,50	0,53	0,47	1	1,13	0,89	0,12
4	0,30	0,70	0,42	0,58	0,43	0,72	0,26	-0,17
5	0,15	0,85	0,43	0,57	0,18	0,75	0,04	-0,06

Utilizando-se os dados experimentais da composição dos copolímeros nas equações propostas por Fineman-Ross para este sistema obtém-se o diagrama representado na figura 14.

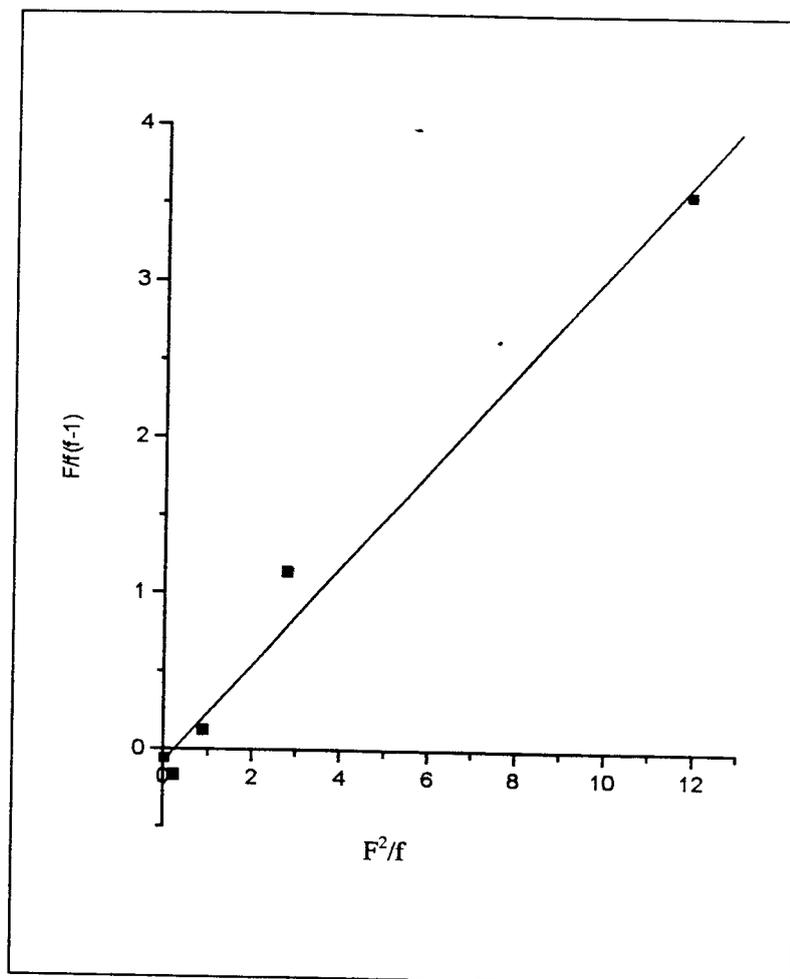


Figura 14. Diagrama Fineman-Ross da copolimerização radicalar entre o DMAA e o AOA.

Dados da regressão linear da curva de linearização da equação da copolimerização proposta por Fineman-Ross (figura 14):

$$Y = a + bX \quad (22)$$

$$a (r_{AOA}) = -0,07259 \pm 0,1238$$

$$b (r_{DMAA}) = 0,31151 \pm 0,02256$$

$$R = 0,99222$$

$$DP = 0,2256 \text{ (desvio padrão)}$$

$$N = 5 \text{ (número de pontos utilizados no experimento)}$$

Os valores das razões de reatividade, r_{DMAA} e r_{AOA} , obtidos, a partir da equação acima, são $0,31 \pm 0,02$ e $-0,07 \pm 0,12$ respectivamente. A obtenção dos valores de r_{DMAA} e r_{AOA} possibilita calcular as frações molares teóricas (tabela 11) no produto para quaisquer mistura de monômeros na alimentação.

Tabela 11. Valores das frações molares dos monômeros e as frações molares teóricas da composição dos copolímeros calculadas utilizando as razões de reatividade.

Nº copolímero	F_{DMAA}	F_{AOA}	f_{DMAA}	f_{AOA}
1	0,85	0,15	0,79	0,21
2	0,70	0,30	0,66	0,34
3	0,50	0,50	0,55	0,45
4	0,30	0,70	0,45	0,55
5	0,15	0,85	0,34	0,66

Utilizou-se o diagrama de Wall para verificar-se a dependência da composição dos produtos em função da concentração dos monômeros na alimentação (figura 15). Através da equação 18 calculou-se as frações molares teóricas dos copolímeros.

$$\frac{f_1}{f_2} = \frac{F_1 r_1 F_1 + F_2}{F_2 F_1 + r_2 F_2} \quad (24)$$

O diagrama da composição é:

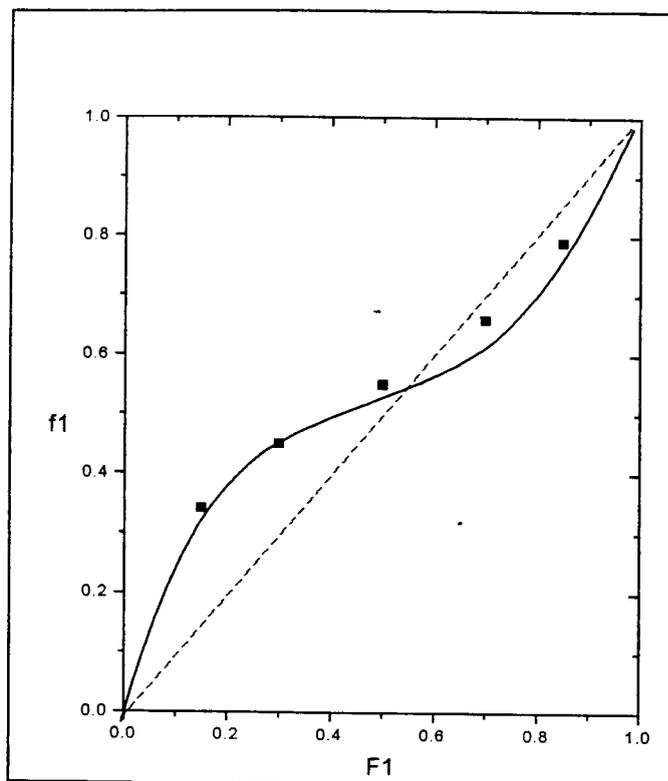


Figura 15 Diagrama da composição do sistema de copolímeros DMAA-AOA. A linha contínua corresponde ao diagrama teórico obtido da relação de reatividade da tabela 11

A composição do copolímero para $r_{\text{DMAA}} < 1$; $r_{\text{AOA}} < 1$ ($k_{12} > k_{11}$, $k_{21} > k_{22}$), denuncia uma preferência das cadeias terminais por uma propagação reticulada à homopolimerizada. Portanto, existe uma tendência à configuração alternada como podemos verificar pelo produto de $r_{\text{DMAA}} r_{\text{AOA}}$ próximo de zero.^{106,107} Também observou-se um ponto no diagrama de Wall no qual a composição do monômero e do polímero são iguais, a isso dá-se o nome de mistura azeotrópica.¹⁰⁸

IV.2 Estudo hidrolítico da matriz DMAA-AOA

Uma das modalidades de grande interesse dentro do universo dos sistemas de

liberação controlada de fármacos são os chamados fármacos poliméricos que são compostos com atividade farmacológica ligados covalentemente em um suporte macromolecular.

Os grupos funcionais pela sua estrutura química ou os grupos laterais ao longo da cadeia principal de uma macromolécula podem ser hidrolisados, com o auxílio de compostos ativos, gerando compostos hidrossolúveis. Portanto, por exemplo, a presença de ligações ésteres em um sistema macromolecular pode gerar uma maneira de promover um mecanismo de biodegradação, solubilidade ou liberação de um fármaco imobilizado através desta ligação.

Para estudar-se experimentalmente o comportamento cinético de grupos funcionais ligados a suportes poliméricos insolúveis, é necessário que exista a possibilidade das espécies ativas, que serão responsáveis pela hidrólise, difundirem-se até estes grupos funcionais da mesma maneira que estes, uma vez independentes da cadeia principal, possam migrar para o meio. A seguir, utiliza-se uma técnica analítica (química ou espectrométrica) que permita conhecer com exatidão a variação da concentração dos grupos ligados à matriz polimérica ou determinar a concentração das espécies liberadas no meio.²⁴

O mecanismo de hidrólise de derivados dos ácidos carboxílicos (ésteres, anidridos, amidas, etc.) é de grande importância devido sua grande semelhança com o processo biológico envolvendo a clivagem enzimática dos derivados dos ácidos carboxílicos em meio aquoso.^{24,100} Podem-se considerar como compostos ativos que catalisam uma hidrólise, as serinas-proteases, onde estão incluídas a quimiotripsina, a tripsina, elastase e várias enzimas de coagulação sanguínea, que compartilham muitas propriedades estruturais e funcionais.¹⁰⁰

Nas matrizes obtidas neste trabalho o acetaminofeno está ligado à cadeia macromolecular por meio de uma ligação éster, desta forma, induzimos a hidrólise alcalina e por catálise enzimática.

IV. 2.1 Estudo da hidrólise da matriz DMAA/AOA em meio alcalino

Como no meio fisiológico humano é encontrado uma atividade enzimática intensa juntamente com um meio alcalino, inicialmente conduziu-se o estudo do processo hidrolítico do sistema DMAA/AOA em pH alcalino. Utilizou-se o pH 8,4, maior que aquele encontrado no intestino, porém, os resultados obtidos devem ser considerados sob o ponto de vista de um modelo de mecanismo para o processo de liberação.

Para obter-se o coeficiente de extinção molar do acetaminofeno preparamos uma curva de calibração (figura 16) onde foram preparadas várias soluções com concentrações compreendidas entre 10^{-4} e 10^{-6} mol/L (tabela 12). Uma vez medidas as absorvâncias correspondentes obteve-se a relação linear entre as grandezas cuja tangente do ângulo da curva é o coeficiente de extinção molar.

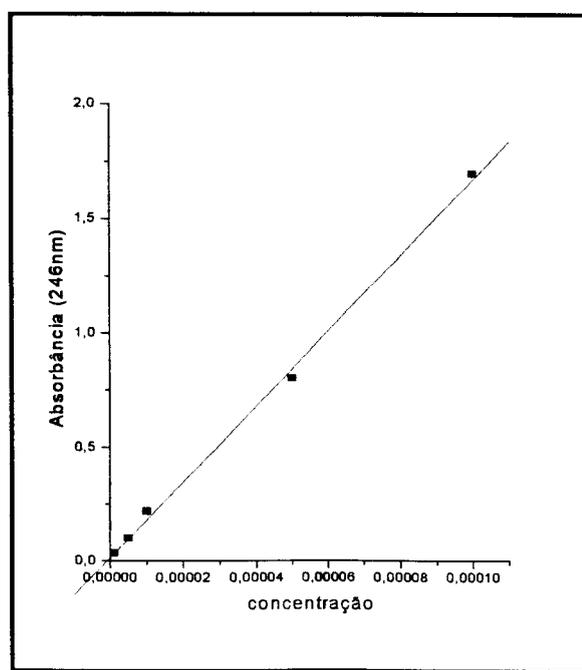


Figura 16. Curva padrão de absorvância versus concentração de acetaminofeno.

Tabela 12. Absorbâncias das soluções de acetaminofeno obtidas por espectrometria no UV ($\lambda=246\text{nm}$).

C (mol/L)	Absorbância
1×10^{-4}	1,697
$0,5 \times 10^{-4}$	0,802
1×10^{-5}	0,219
$0,5 \times 10^{-5}$	0,103
1×10^{-6}	0,035

A curva de calibração (figura 16) obtida com as absorbâncias das soluções nas diferentes concentrações de acetaminofeno (tabela 12) determinou o valor do coeficiente de extinção molar, calculado em 16.545 L/mol.cm.

Dados da regressão linear da curva de calibração do acetaminofeno:

$$Y = a + bX \quad (25)$$

$$a = 0,02188 \pm 0,02082$$

$$b = 16.545 \text{ (coeficiente de extinção molar)}$$

$$R = 0,99906$$

$$DP = 0,03495 \text{ (desvio padrão)}$$

$$N = 5 \text{ (número de pontos utilizados no experimento)}$$

As figuras 17 e 18 representam a variação da concentração do acetaminofeno liberado em meio alcalino em função do tempo das matrizes poliméricas copoli(DMAA-co-AOA) preparadas com diferentes proporções dos monômeros.

A figura 17 demonstra a liberação da matriz número 4, copoli(DMAA-co-AOA) nas proporções em massa de 0,42/0,58%. Observa-se uma maior velocidade de liberação nos primeiros 4 dias, após caindo até tendendo atingir um patamar a partir do 6º dia. Esta matriz apresentou uma liberação máxima para estas condições de 20 mg por grama de copolímero.

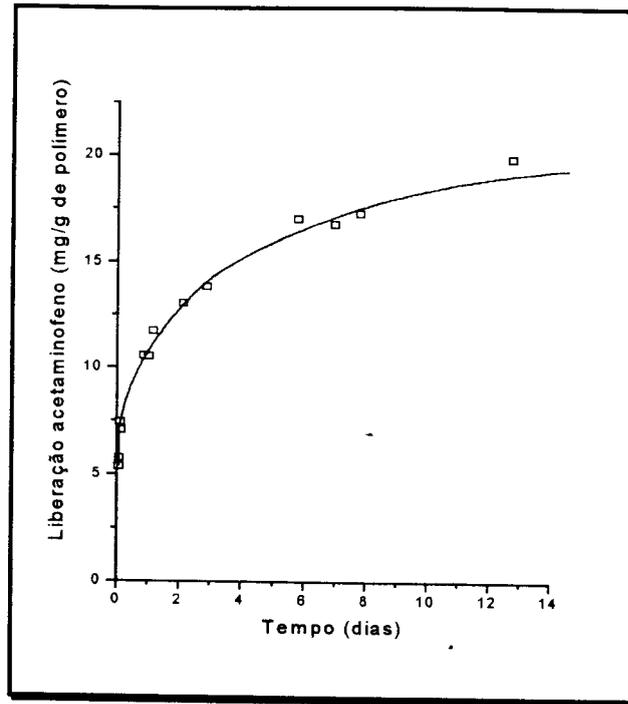


Figura 17. Liberação do acetaminofeno da matriz copoli(DMAA-co-AOA) com 42/58% em massa em tampão borato (H₃BO₃/KCl/NaOH) pH8,4.

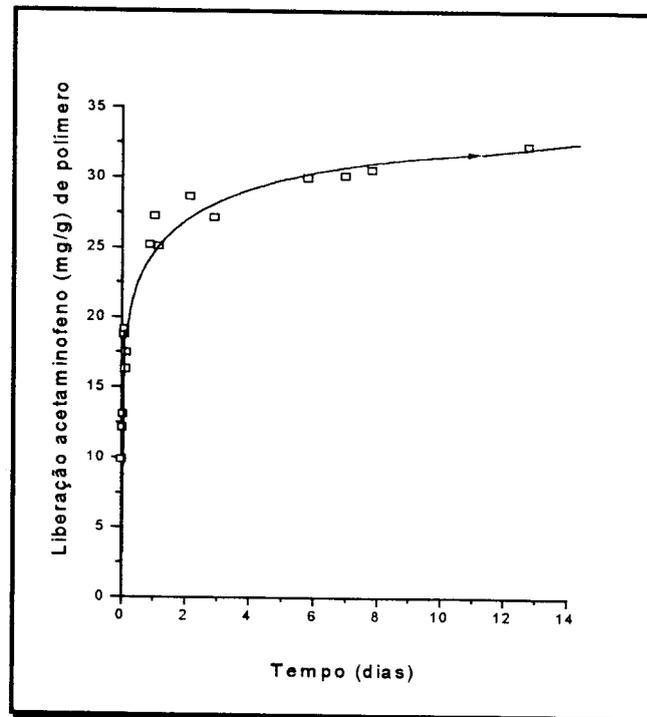


Figura 18. Liberação de acetaminofeno da matriz copoli(DMAA-co-AOA) com 53/47% em massa em tampão borato (H₃BO₃/KCl/NaOH) pH8,4.

A figura 18 representa a liberação do acetaminofeno na matriz copoli(DMAA-co-AOA), com 53/47% em massa. Observou-se uma velocidade de liberação acentuada no 1º dia, onde cerca de 50% do conteúdo liberado deu-se neste período. A quantidade máxima liberada do acetaminofeno nestas condições foi de 32 mg por grama de polímero.

O comportamento cinético dos grupos funcionais ligados a suportes poliméricos insolúveis depende da facilidade com que o sistema “matriz-grupo funcional ativo” expande-se no meio reacional, de maneira que se obtenha um estado gelificado, permitindo a difusão das espécies reativas até onde se encontram os grupos funcionais, bem como a parte clivada deve poder difundir-se no meio com relativa facilidade. Portanto, pode-se atribuir ao diferente comportamento cinético da liberação do fármaco das duas matrizes à composição das mesmas. O componente DMAA tem por característica uma forte interação com a água. De modo que foi introduzido com a função de permitir uma expansão da matriz na água para possibilitar a difusão dos grupos ativos até a ligação éster e a difusão do fármaco hidrolisado. A matriz que contém maior quantidade do componente hidrofílico, a DMAA, facilitou a difusão das espécies para a efetivação da hidrólise.

IV. 2.2 Estudo da hidrólise da matriz DMAA-AOA em meio enzimático

Neste estudo mostrou-se a possibilidade de hidrolisar o acetaminofeno da matriz DMAA/AOA por catálise enzimática, uma vez que a obtenção destas matrizes visa uma futura aplicação como sistemas de liberação controlada de fármacos.

Como mencionamos anteriormente, o acetaminofeno está ligado à cadeia principal por meio de uma ligação éster. Portanto, considerou-se o mecanismo da reação hidrolítica do grupamento éster, catalisado por enzimas proteolíticas, a

tripsina no caso, o mesmo mecanismo geral de ação das serinas-proteases (figura 19) como acontece no organismo humano. Sabe-se que o grupo ativo desta enzima é a hidroxila da serina responsável pelo ataque ao grupo éster.¹⁰⁰

Todas as serina-proteases atuam essencialmente pelo mesmo mecanismo geral de catálise, onde a hidrólise segue uma série de passos os quais em sua maioria são uma adição do reagente nucleofílico (água, ou OH⁻) com formação transitória de um intermediário, que através de sua clivagem, formará o ácido carboxílico ou o ânion, dependendo do caráter ácido ou básico do meio reacional.^{12,31,34,100}

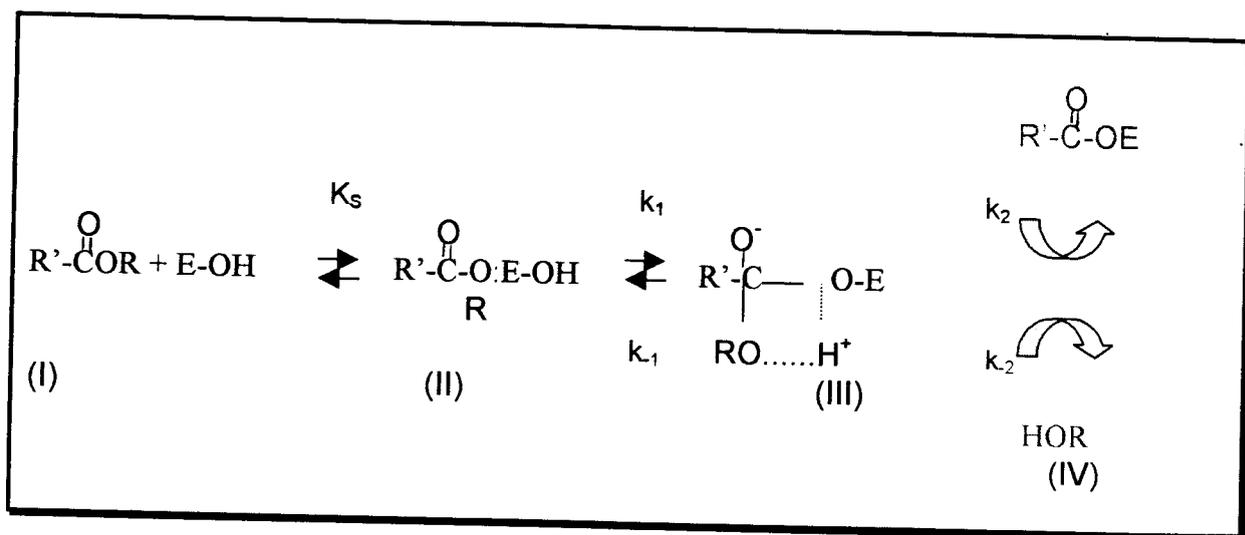


Figura 19. Mecanismo geral da ação das serina-proteases. E-OH é o grupo hidroxila da serina acilado durante a catálise, conforme indicado pela estrutura IV. K_s é a constante de Michaelis para reações, e k₁ e k₂ etc. as constantes de velocidade para as reações indicadas.¹⁰⁰

Como a tripsina pode hidrolisar ésteres, ROH (IV) nesse caso representa o acetaminofeno.

A figura 20 mostra a liberação do acetaminofeno da matriz DMAA/AOA, 53/47% em massa com um aumento crescente da velocidade nas primeiras 15 h até atingir um patamar. A quantidade máxima liberada foi 9,5 mg/g de polímero.

FU & MORAWETZ (1976)¹⁰⁹, em um de seus trabalhos sobre o ataque enzimático (quimiotripsina) a uma ligação sensível localizada na cadeia lateral de um polímero sintético, descrevem que um substrato polimérico em solução pode encontrar-se em uma forma aleatória espiralada de maneira que consideram possível que somente os grupos do lado de fora da espiral molecular são realmente acessíveis às enzimas, enquanto àqueles localizados no interior da espiral estão protegidos.

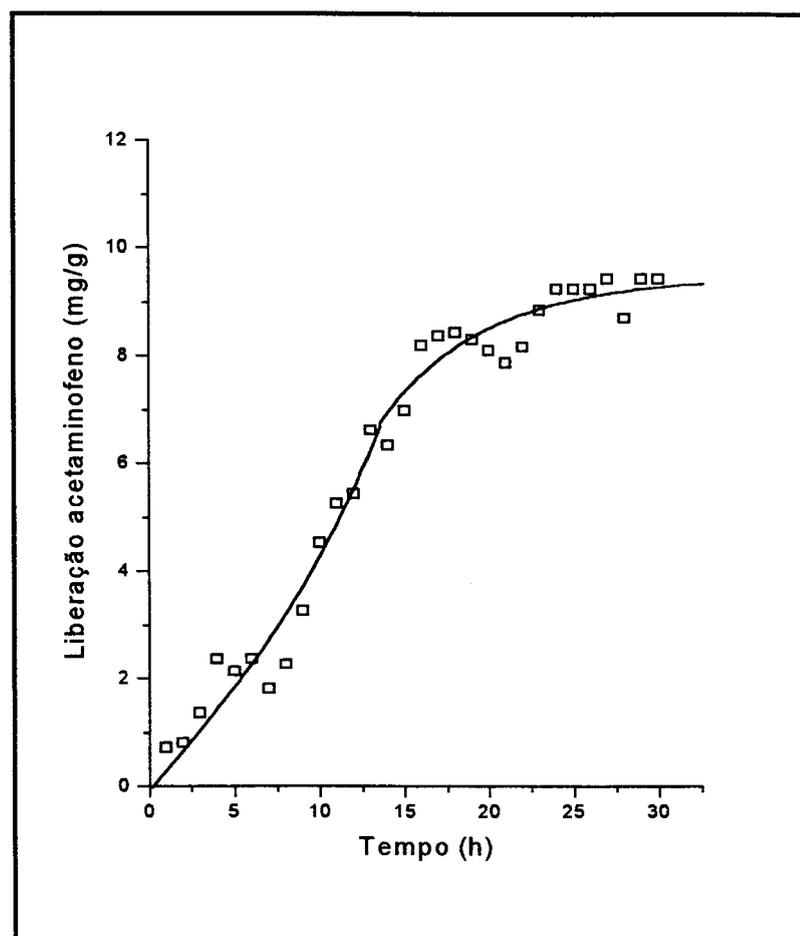


Figura 20. Hidrólise do acetaminofeno do copoli(DMAA-co-AOA) com 53/47% em massa, catalisada pela tripsina em tampão fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$), pH 7,0.

As quantidades de acetaminofeno liberado inferiores às esperadas, pode-se atribuir à pouca expansão da matriz no meio, dificultando a difusão das enzimas no interior da matriz. Pode-se considerar possível que o ataque enzimático tenha sido efetivo nos grupos funcionais mais periféricos ou ainda aqueles acessíveis fisicamente às enzimas considerando-se também sua alta massa molecular (23.200 Dalton)¹¹⁰.

IV.3 Caracterização do homopolímero e dos hidrogéis obtidos a partir do A-ProOMe

A partir da solução do homopolímero, poli(A-ProOMe), determinou-se a temperatura de separação de fase do sistema constatando-se, desta maneira, tratar-se de um sistema de solução de temperatura crítica inferior (LCST).

Os hidrogéis que foram obtidos, neste trabalho, com diferentes componentes hidrofílicos e hidrofóbicos e com diferentes graus de reticulação, como citado no capítulo anterior (III.3.1) e tiveram seu grau de expansão determinados. Estudou-se a dependência do grau de expansão e do comportamento de fase em relação à composição dos hidrogéis verificando a influência no processo de difusão tanto do solvente quanto do soluto através da matriz polimérica. Desta forma, escolheu-se quais as composições mais adequadas para estudar estes copolímeros como sistemas de liberação controlada de fármacos. Verificou-se, também, a reversibilidade da propriedade de expansão de hidrogéis com diferentes composições.

IV.3.1 Sistema de solução de temperatura crítica inferior (LCST)

A solubilidade de um polímero em um solvente é determinada pelo equilíbrio

da interação polímero-polímero e polímero-solvente. Um copolímero que contenha grupos de afinidade diferentes pode ser completamente solúvel em água, desde que a mesma seja um bom solvente para as partes hidrofílicas da unidade do mero, hidratando também grupos vizinhos hidrofóbicos. Quando a temperatura da solução aumenta, as ligações de hidrogênio se enfraquecem resultando numa diminuição da hidratação e, conseqüentemente, há um aumento da interação entre os grupos hidrofóbicos. Os grupos hidrofóbicos solvatados perdem sua fraca ligação com a água até tornarem-se insolúveis, separam-se as fases e o polímero precipita. Esta temperatura é chamada de temperatura crítica inferior da solução (LCST).⁵⁶

Portanto, a temperatura crítica inferior da solução (LCST) é a temperatura abaixo da qual o sistema encontra-se em uma única fase estável, de modo que a separação de fases ocorrerá com aquecimento.

A partir dos trabalhos de PRIGOGINE & DEFAY (1954)¹¹¹, diz-se que em um sistema binário o ponto crítico é aquele onde as duas fases tornam-se idênticas (frações molares). Pode-se representar uma curva de coexistência AC e BC que se encontram de maneira contínua no ponto C (figura 21). As duas fases podem coexistir dentro de uma faixa determinada pela composição dos componentes.

Quando um sistema binário apresenta a temperatura crítica com o menor valor de temperatura em que as duas fases coexistem, este é chamado de um sistema de temperatura crítica inferior (figura 21).

Em um sistema de temperatura crítica inferior a separação de fase ocorre com aquecimento o que quer dizer que para uma mistura binária ser estável e não se separar em duas fases, é necessário que a seguinte condição termodinâmica seja satisfeita.⁵⁶

$$\left(\frac{\partial^2 h}{\partial x_2} \right)_c > 0 \quad (26)$$

onde h é a entalpia média molar e x_2 é a fração molar.

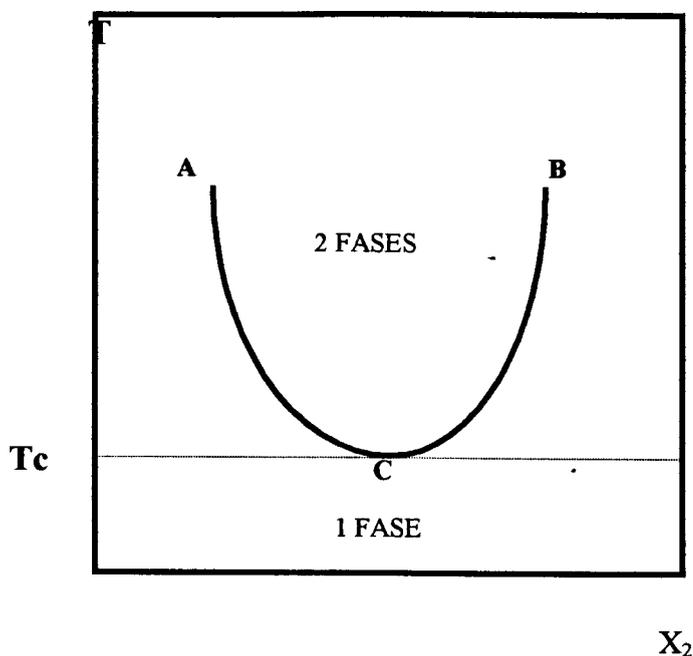


Figura 21. Diagrama de fase de um sistema que apresenta temperatura crítica inferior.

Estas condições designam a curvatura convexa da linha da entalpia molar em função da composição $h(x_2)$ no ponto crítico C como mostra a figura 22. Neste caso, a mistura ocorre com a diminuição da entalpia e, portanto, com desprendimento de calor (mistura exotérmica), caracterizando uma função entrópica.

Considerando-se as condições termodinâmicas sabe-se que a quantidade de calor da mistura de uma solução é menor do que a quantidade de calor da solução das substâncias puras separadas h_1° e h_2° , como podemos constatar pela linha reta da curva da figura 22. A mistura é formada a partir dos componentes puros com liberação de calor (mistura exotérmica), portanto, somente as misturas exotérmicas apresentam uma temperatura crítica inferior.⁵⁶

A energia livre molar de um sistema binário é representada pela seguinte expressão:^{72,111}

$$g = (x_1\mu_1^0 + RTx_1 \ln x_1 + x_2\mu_2^0 + RTx_2 \ln x_2) + g^E \quad (27)$$

onde os termos que estão entre parênteses representam a energia livre ideal de uma mistura binária com os componentes 1 e 2 nas frações molares x_1 e x_2 com os valores dos potenciais químicos padrões de μ_1^0 e μ_2^0 . R é a constante dos gases e T temperatura absoluta. g^E é a energia livre excedente da mistura.^{72,111}

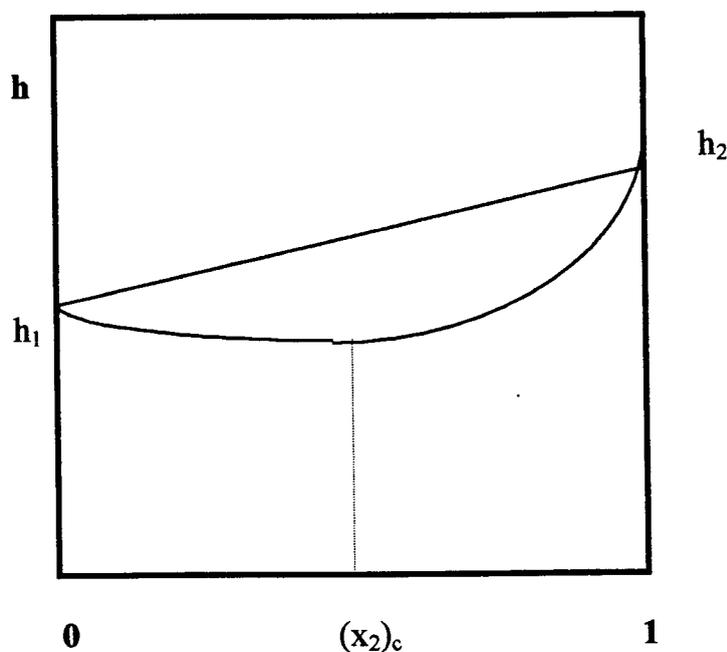


Figura 22. Entalpia molar média $h(x_2)$ em função da composição à temperatura e pressão constantes.

A diferença entre a função termodinâmica de uma mistura e o valor correspondente ao de uma solução perfeita a uma mesma T , p e composição, é chamada de função termodinâmica excedente (misturas não ideais).¹¹²

Com a queda da energia livre excedente e introduzindo a entalpia e entropia molar excedentes (h^E), (s^E) na equação (27) teremos as funções termodinâmicas excedentes representadas na equação abaixo em uma temperatura crítica.^{72,56}

$$T \left(\frac{\partial^2 s^E}{\partial x_2^2} \right)_{T,p} - \left(\frac{\partial^2 h^E}{\partial x_2^2} \right)_{T,p} = \frac{RT}{x_1 x_2} > 0 \quad (28)$$

Para que a equação (28) seja válida o termo da entropia deve ser positivo e maior que a entalpia,

$$T \left(\frac{\partial^2 s^E}{\partial x_2^2} \right)_{T,p} > 0 \quad (29)$$

Portanto, temperatura de solução crítica inferior corresponde a uma separação de fase resultante do efeito entrópico.^{111,112}

Segundo a teoria da expansão em equilíbrio uma rede polimérica expandida em equilíbrio, sob determinadas condições, pode ter duas fases quando em solução. Estas fases diferem na conformação das cadeias e na concentração dos segmentos. Uma pequena mudança na interação polímero-solvente, dada por exemplo, por mudança na temperatura pode levar a uma pronunciada mudança na conformação do polímero e consequentemente na solubilidade.¹¹³

Nos experimentos para determinar a LCST do poli(A-ProOMe), este foi, inicialmente, deixado em água a 6°C onde demonstrou completamente solúvel. A temperatura do sistema foi aumentada de 1°C/h até que houve uma mudança no aspecto da solução, ou seja de transparente tornou-se turva. O experimento foi repetido e confirmou-se que à 17°C o sistema demonstrou uma mudança de fase, temperatura um pouco superior àquele determinada, anteriormente, por MIYAJIMA e col.⁷⁹

Os hidrogéis a base de A-ProOMe colapsam com o aumento da temperatura, isto significa que eles se comportam como sistemas de temperatura crítica inferior de solução.

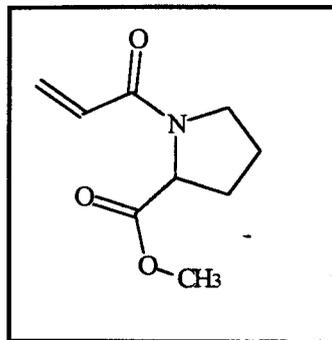


Figura 23. Fórmula estrutural do A-ProOMe.

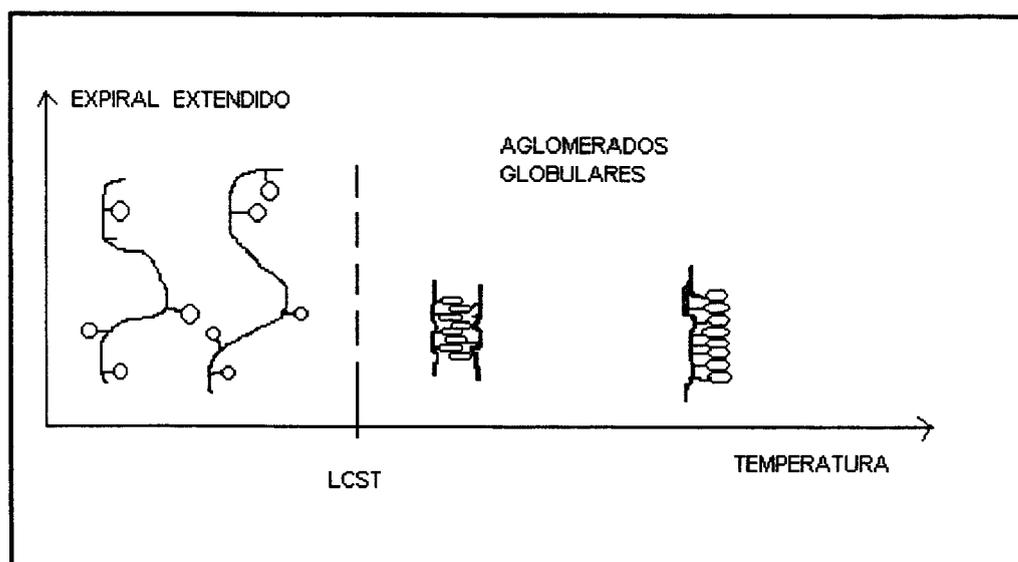


Figura 24. Modelo proposto para a transição de fase do poli(A-ProOMe). Em temperaturas abaixo da LCST os polímeros apresentam uma estrutura espiralada estendida com fortes interações entre os grupos da prolina e a água. Em temperaturas mais altas estas interações enfraquecem e a probabilidade de uma ligação inter e intramolecular entre os grupos vizinhos da prolina aumentam.⁷⁸

A figura 23 mostra a estrutura química do monômero A-ProOMe. Neste sistema o grupo CH_3 na cadeia lateral da prolina constitui o componente hidrofóbico, enquanto o $\text{C}=\text{O}$ e o N , os componentes hidrofílicos. Abaixo da LCST

o poli(A-ProOMe) apresenta-se com uma a estrutura espiralada estendida com uma forte interação entre os grupos hidrofílicos do A-ProOMe e a água formando uma camada de água altamente organizada (água ligada) ao redor do polímero.⁷⁸ A formação desta estrutura contribui favoravelmente à entalpia da mistura assumindo um valor maior que o da energia livre, que por sua vez, é desfavorável a solubilidade por estar relacionada à exposição dos grupos hidrofóbicos à água dificultando uma boa solubilidade do polímero. Segundo SAFRANAJ e col. (1993)⁷⁸ com o aumento da temperatura as ligações de hidrogênio enfraquecem, a estrutura da água é liberada e as interações hidrofóbicas entre os grupos da prolina tornam-se dominantes. Nas temperaturas acima da LCST ocorre uma interação inter e intramolecular formando compactos aglomerados de conformação globular (figura 24) levando a um colapso dirigido pela entropia e portanto a uma separação de fase (precipitação).

IV.3.2 Ciclo de reversibilidade de expansão dos hidrogéis

O conhecido processo de reversibilidade dos hidrogéis pôde ser bem observado quando estes apresentaram um estado expandido nas temperaturas mais baixas e um estado contraído nas temperaturas mais elevadas (figura 25) e ainda constatando-se que este fenômeno pode ser repetido indefinidas vezes.

A figura 25 mostra o comportamento de expansão e contração dos hidrogéis copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) enquanto a temperatura foi aumentada e diminuída várias vezes entre 6° e 35°C durante 24 h.

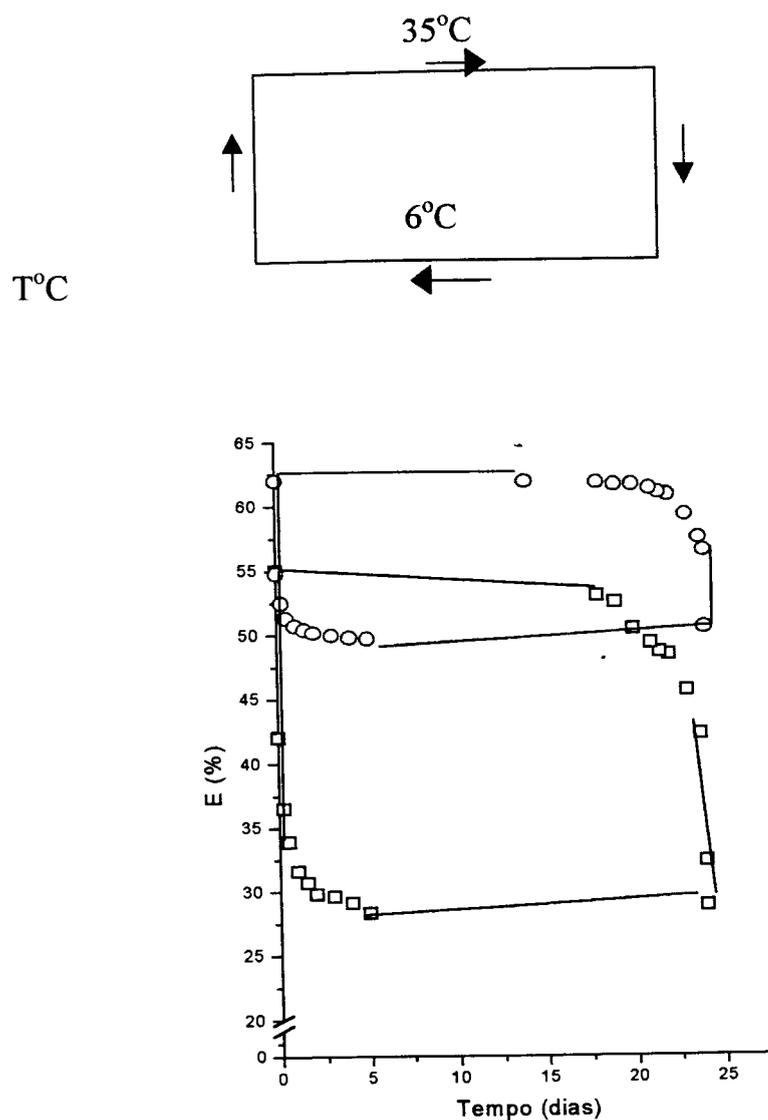


Figura 25. Ciclo de reversibilidade dos hidrogéis copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) nas proporções em massa de 70/30/3 (□) e 90/10/3 (○) em resposta a temperaturas de 6°C e 35°C.

Os hidrogéis copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA), usados neste experimento, continham as proporções em massa de 70/30/3 e 90/10/3. Estes foram submetidos a expansão em água à 6°C, durante 24h, apresentando um grau de expansão de 62 e 55% respectivamente. Após, a temperatura foi elevada subitamente para 35°C, onde as medidas do grau de expansão foram feitas de hora em hora. Verificou-se uma rápida perda de massa devido à contração dos hidrogéis

e o equilíbrio começou a ser novamente atingido após 5 a 6 h sendo que os valores do grau de expansão, após 24 h, foram de 50 e 30% para os hidrogéis com as proporções de 70/30/3 e 90/10/3. Após 24h a temperatura foi novamente abaixada subitamente para 6°C e os hidrogéis começaram novamente a expandirem-se até os mesmos valores máximos de grau de expansão atingidos anteriormente. A repetição do experimento nos confirmou a reversibilidade da característica dos hidrogéis de expandirem-se e contraírem-se.

Como esperado a amostra com maior quantidade de DMAA apresentou um maior grau de expansão tanto à 6°C quanto à 36°C. Como a DMAA é muito hidrofílica confere uma maior capacidade de expansão aos hidrogéis. Ao mesmo tempo a diminuição da fração do A-ProOMe no hidrogel diminui a variação de volume de água absorvida em função da temperatura, já que este monômero é o responsável pela termossensibilidade do hidrogel.

IV.3.3 Comportamento de fase e determinação do grau de expansão dos hidrogéis

Soluções de temperatura crítica inferior, geralmente, são aquelas que possuem ambos componentes (polímero, solvente) altamente polares e estão relacionadas à diminuição de entropia associada à formação de ligações de hidrogênio em baixas temperaturas. A diminuição da solubilidade com o aquecimento pela quebra da ligação dos hidrogênios se dá por meio da rotação das moléculas.⁵⁶

O hidrogel estudado aqui, a base de A-ProOMe, comporta-se de uma forma semelhante ao homopolímero, onde a contração do hidrogel é equivalente à separação de fase do polímero não reticulado. Portanto, o hidrogel expande-se em baixas temperaturas e colapsa com o aumento da temperatura. A velocidade de

expansão em função da temperatura é diferente para diferentes hidrogéis, como veremos a seguir. Bem como, as temperaturas de transição de fase, caracterizadas pelo ponto de inflexão nas curvas de expansão, variam de um polímero para outro.

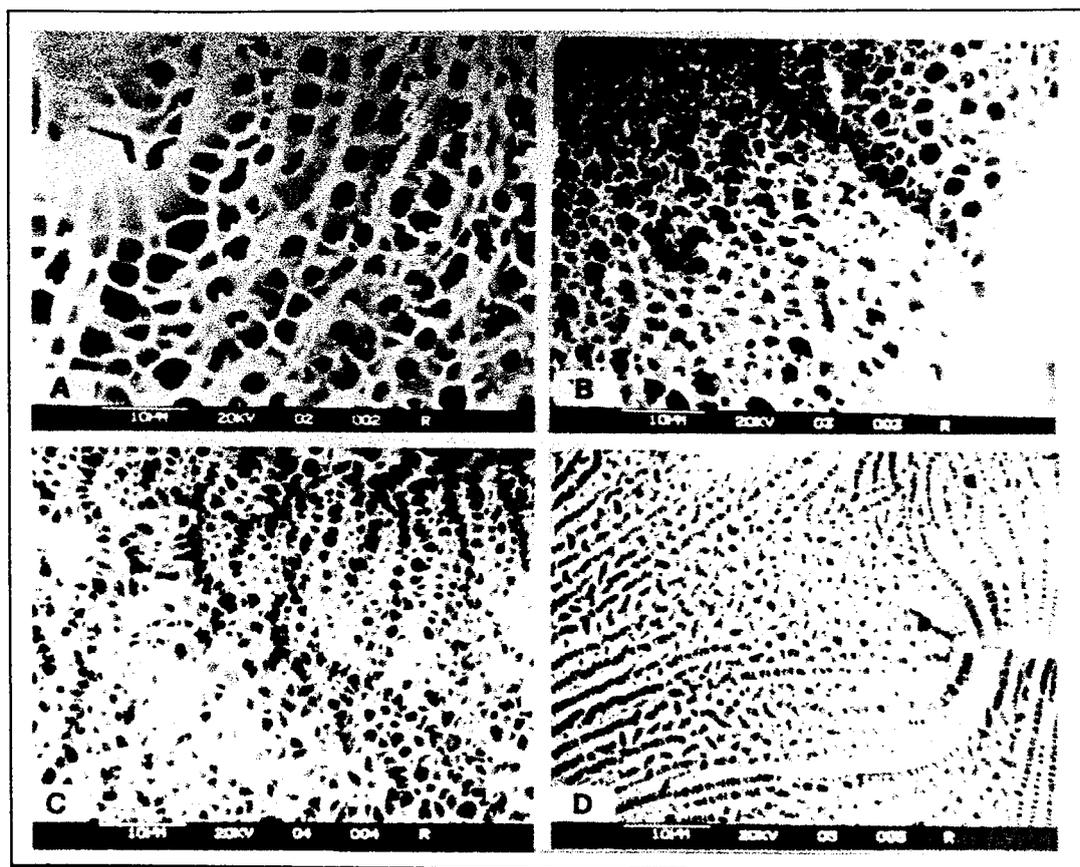


Figura 26. Micrografias dos hidrogéis poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) na proporção 99,5/0,5 expandidas em água até o equilíbrio nas temperaturas de 10°C (A), 20°C (B), 30°C (C) e 50°C (D). Aumento 2.000 X.

As micrografias do hidrogel poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) na proporção 99,5/0,5 foram tiradas da seção transversal do mesmo em diferentes temperaturas (10°C, 20°C, 30°C e 50°C). É bem evidente o aumento das dimensões dos poros nas temperaturas inferiores e uma diminuição das mesmas nas temperaturas mais elevadas (figura 26).

Para conhecer-se os hidrogéis, estudou-se as curvas de expansão dos mesmos obtidos com diferentes graus de reticulação. O grau de expansão (%E) foi determinado pela variação da massa dos hidrogéis em diversas temperaturas em água, em relação a sua massa seca (liofilizada), como descrito anteriormente. A composição das amostras também foi descrita anteriormente (Capítulo III.3.4).

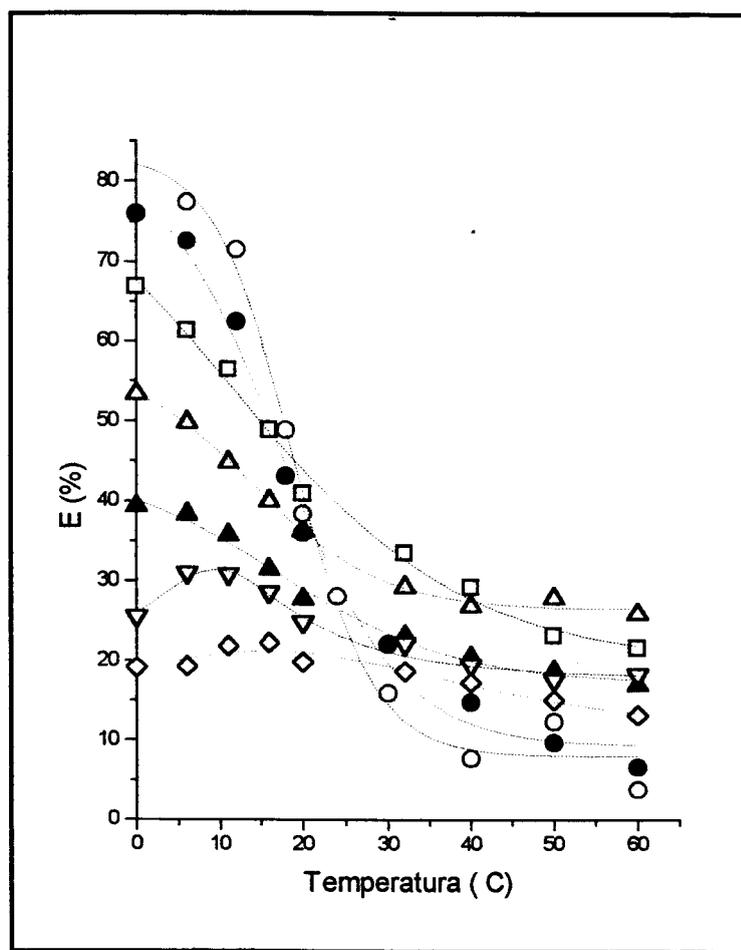


Figura 27. Grau de expansão em água do copoli(A-ProOMe-co-TMPTMA) em função da temperatura com as seguintes composições (relação em massa): (○)99,5/0,5; (●)99/1; (□)97/3; (△)94/6; (▲)90/10; (▽)87/13; (◇)81/19.

A figura 27 mostra a dependência do grau de expansão da temperatura nos hidrogéis preparados com diferentes quantidades do agente reticulante. Pode-se

notar com clareza que com o aumento da densidade de reticulação há uma diminuição da variação do grau de expansão. Os hidrogéis que contêm mais de 3% do agente reticulante em sua composição mostram uma contínua diminuição da expansão com o aumento da temperatura enquanto que os que contêm 3% ou menos apresentam uma temperatura de transição bem definida. A temperatura de transição de fase da amostra que contém a proporção de 99,5/0,5 de agente reticulante é 18°C e observa-se a tendência desta temperatura diminuir nas amostras com o aumento do componente hidrofóbico.

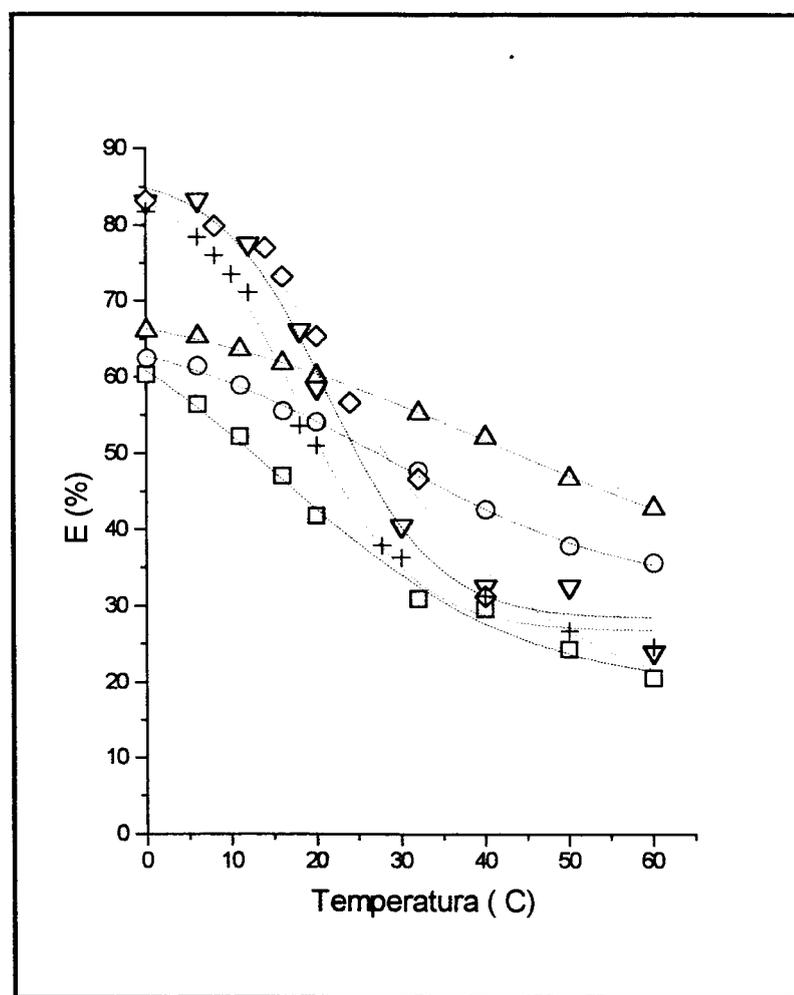


Figura 28. Grau de expansão em água do copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) em função da temperatura com as seguintes composições (relação em massa): (+)99,5/0,5/1; (◇)98/2/1; (▽)95/5/1; (□)95/5/3; (○)80/20/3; (Δ)70/30/3.

A dependência do grau de expansão da temperatura dos hidrogéis copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) em água pode ser observada na figura 28 como função da diferente quantidade de monômero hidrofílico na composição. Os hidrogéis que apresentam em sua composição até 5% de DMAA e 1% de agente reticulante apresentam uma marcada transição de fase, o processo cinético de expansão-contração ocorre descontinuamente ao redor da temperatura da LCST levando a um sistema característico termossensível onde a expansão ocorre em temperaturas inferiores àquelas de contração. Porém, esta resposta é muito influenciada pela introdução de uma maior quantidade do monômero DMAA, devido sua grande hidrofilicidade confere ao hidrogel grande capacidade de absorver água, porém os hidrogéis que contém mais de 5% em sua composição exibem uma contínua contração a partir de 0°C até a temperatura de 60°C diminuindo também a variação da quantidade de água retida em função da temperatura. Em outras palavras diminuem a característica termossensível.

Na figura 29 tem-se as curvas relativas aos hidrogéis compostos com diferentes quantidades do monômero hidrofóbico CEA. Observa-se que o copoli(A-ProOMe-co-CEA-co-TMPTMA) 98/2/1 e o 95/5/1 (relação em massa) apresentam uma transição de fase, sendo que a LCST é deslocada para aproximadamente 18 e 15°C respectivamente. A introdução de grupos hidrofóbicos na cadeia polimérica diminui a temperatura de LCST. Com um aumento da concentração de grupos hidrofóbicos na cadeia polimérica as forças das ligações de hidrogênio com os grupos hidrofílicos se enfraquecem. Uma vez que as ligações de hidrogênio mantêm os grupos hidrofóbicos solvatados, quando enfraquecidas favorecem que estes se aproximem um dos outros, colapsando a cadeia e expulsando a água interagida nas cadeias poliméricas. Desta forma, a LCST poderia ocorrer a uma temperatura inferior, uma vez que a energia necessária para a quebra das forças de solvatação é menor. Pode-se observar que os hidrogéis obtidos com as misturas A-ProOMe/CEA/TMPTMA e A-ProOMe/DMAA/TMPTMA nas mesmas proporções de 95/5/1, apresentaram uma LCST de 15 e 20°C, respectivamente.

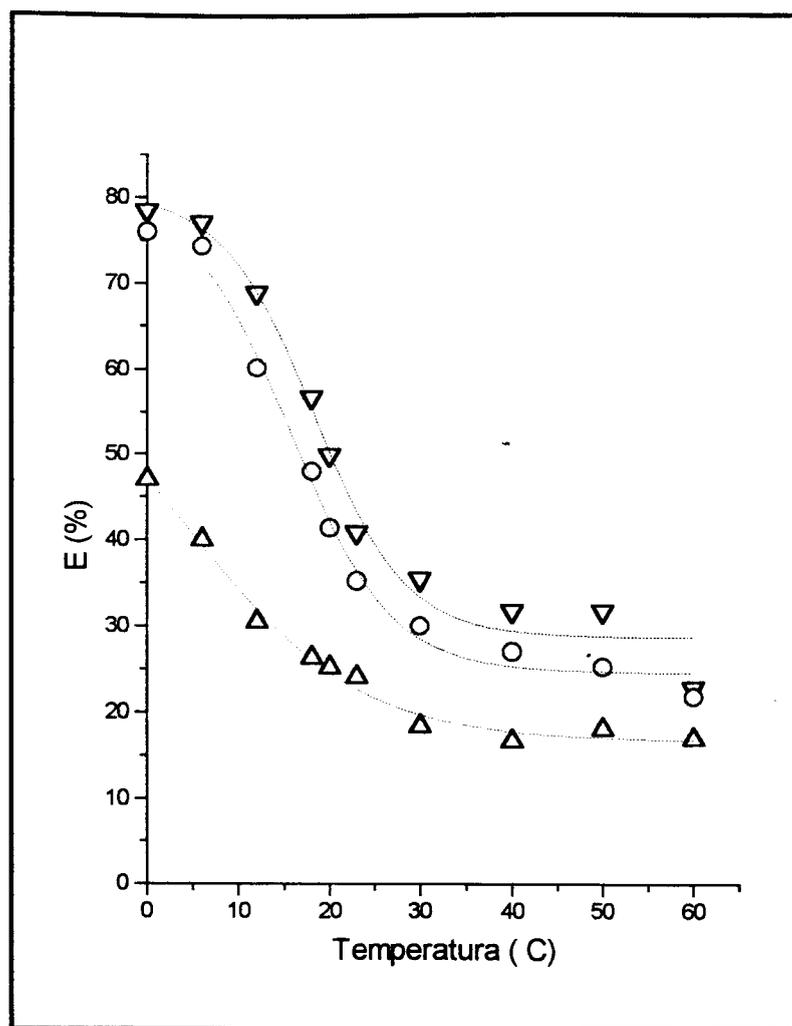


Figura 29. Grau de expansão em água do copoli(A-ProOMe-co-CEA-co-TMPTMA) em função da temperatura com as seguintes composições (relação em massa): (▽)98/2/1; (○)95/5/1; (△)85/15/1.

IV.3.4 Determinação da interação da água com hidrogéis utilizando a técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Como os hidrogéis foram sintetizados visando seu uso em contato com os fluidos do corpo, logo, a absorção de uma quantidade considerável de água ocorrerá dentro da rede polimérica, bem como a adsorção dos fármacos será sempre via solução aquosa. Desta maneira o estudo do comportamento da água dentro da

estrutura dos hidrogéis virá a contribuir para elucidação dos resultados obtidos na imobilização dos fármacos e sua liberação no meio.

A ação recíproca entre a água e os polímeros que contenham grupos hidrofílicos resulta em diferentes interações onde a água assume diferentes estruturas, denominadas “estados”. A água pode ser encontrada dentro dos hidrogéis nos estados de água ligada, intermediária e normal ou livre. A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC) que possibilita calcular a quantidade de água ligada por método indireto.⁸⁵

Para a determinação do estado da água as amostras são resfriadas à temperaturas bem abaixo de 0°C, a água livre congela enquanto a água ligada permanece no estado não congelado. Quando a água congelada é aquecida no calorímetro, o calor necessário para fundir a água pode ser medido como calor de fusão (ΔH). A água não congelada, a qual é definida como água ligada, é a diferença entre a água total e a água livre medida.

Como observou-se anteriormente, a quantidade de água que pode chegar a um equilíbrio no interior dos hidrogéis diminui tanto com o aumento da concentração do agente reticulante na composição quanto com a temperatura a que é submetido durante a expansão. De maneira que investigou-se o estado da água dentro dos hidrogéis em função dos dois parâmetros.

Na figura 30 estão representadas as curvas da fusão da água (endotérmicas) dos poli(A-ProOMe) obtidos com diferentes graus de reticulação (1, 5, 10 e 15% de TMPTMA) previamente mantidos em água em equilíbrio à 4°C. Todas as curvas foram normalizadas em relação ao peso das amostras. Os termogramas mostram as diferentes áreas das curvas dos respectivos hidrogéis, representando portanto, as diferentes quantidades de água livre em cada amostra. Observa-se nestas curvas a

diminuição progressiva da quantidade de água livre com o aumento do agente reticulante na composição do hidrogel.

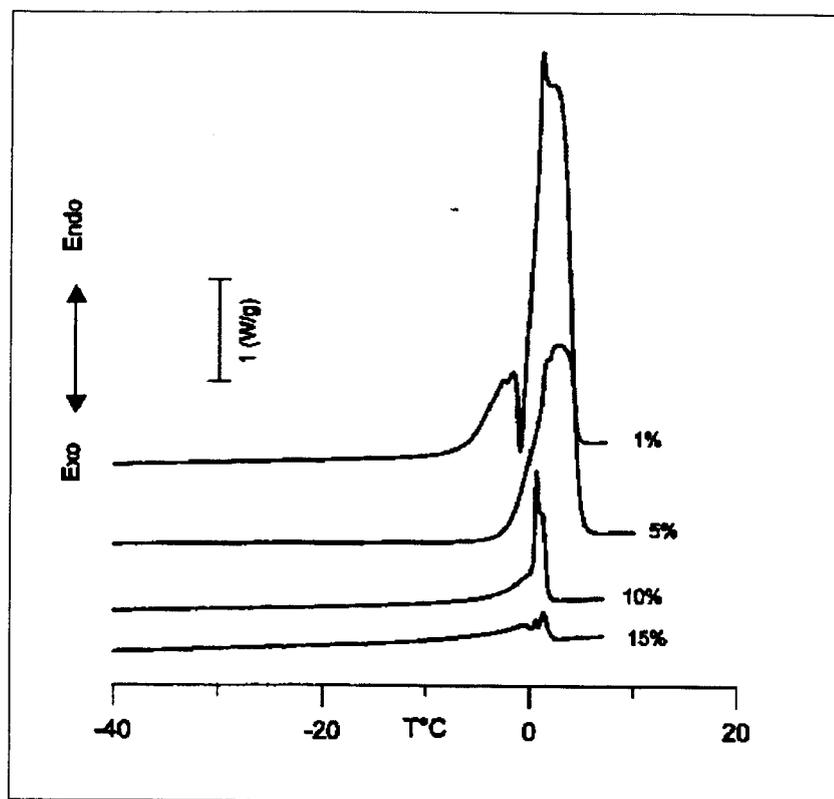


Figura 30. Curvas de fusão da água dos hidrogéis poli(A-ProOMe) com TMPTMA como reticulante nas seguintes proporções 1%; 5%; 10% e 15%.

A figura 31 mostra 4 gráficos representando as curvas de fusão da água, cada gráfico contém os termogramas de 4 hidrogéis com o mesmo grau de reticulante, sendo que cada amostra foi mantida em equilíbrio em água em uma determinada temperatura (4°, 22° e 37°C). Verificou-se que a área do pico da água livre diminui não somente com o aumento do grau de reticulação, como demonstrado anteriormente, mas também com o aumento da temperatura em que as amostras foram submetidas durante a expansão. Este resultado era esperado, uma vez que o poli(A-ProOMe) é um hidrogel termossensível e estando acima de sua

LCST apresenta-se no estado colapsado de modo que o tamanho dos poros estão diminuídos, como constatou-se através das micrografias tiradas por SEM.

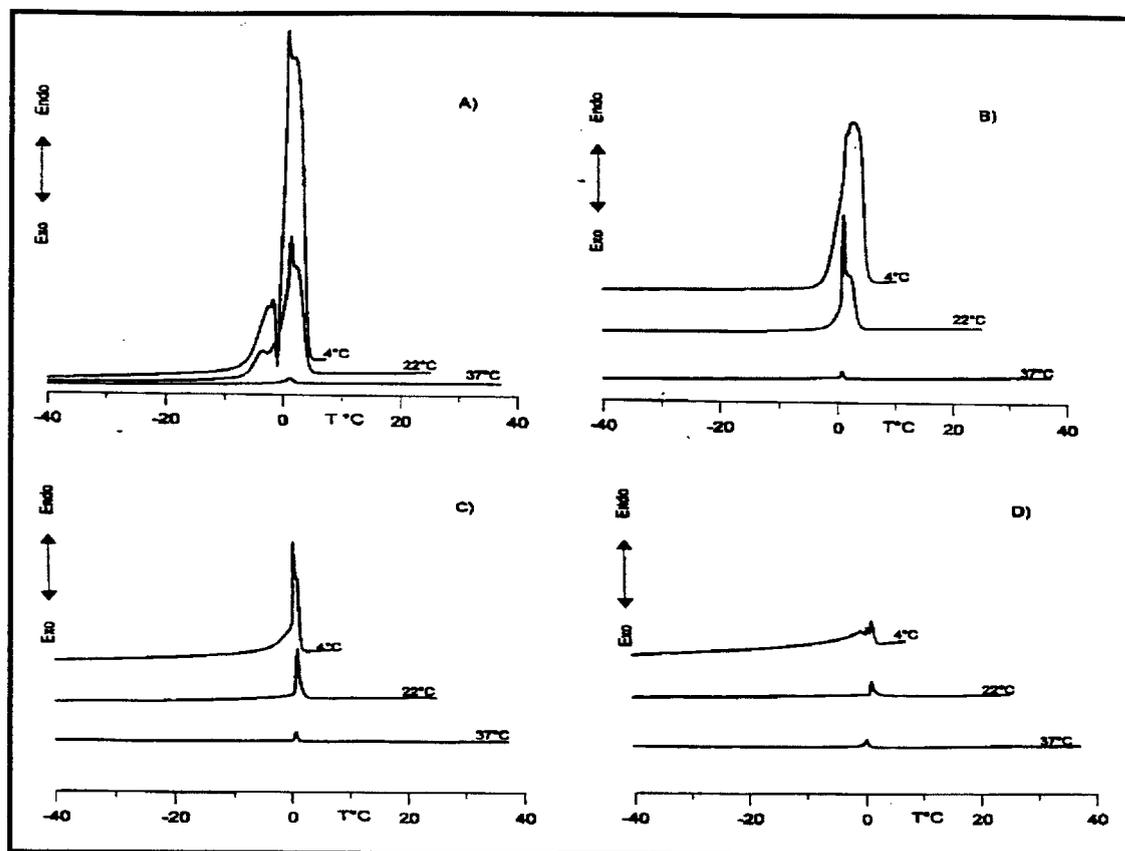


Figura 31. Curvas de fusão da água dos hidrogéis poli(A-ProOMe) expandidos em água até o equilíbrio nas temperaturas de 4°, 22° e 37°C. A porcentagem de TMPTMA foi de 1% (A), 5% (B), 10% (C) e 15% (D).

Relacionou-se a quantidade de água ligada, A_L , à temperatura de hidratação das amostras (figura 32). As curvas resultantes seguiram o mesmo padrão daquelas observadas com a água livre. Dependendo da quantidade de agente reticulante, a diminuição da quantidade de água ligada com o aumento da temperatura tem uma maior ou menor variação. O hidrogel com a menor quantidade de agente reticulante (1%) apresenta a maior quantidade de água ligada, a qual diminui acentuadamente com o aumento da temperatura de expansão. Enquanto que

as amostras com maior quantidade de reticulante apresentam menor quantidade de água ligada que também diminui com o aumento da temperatura.

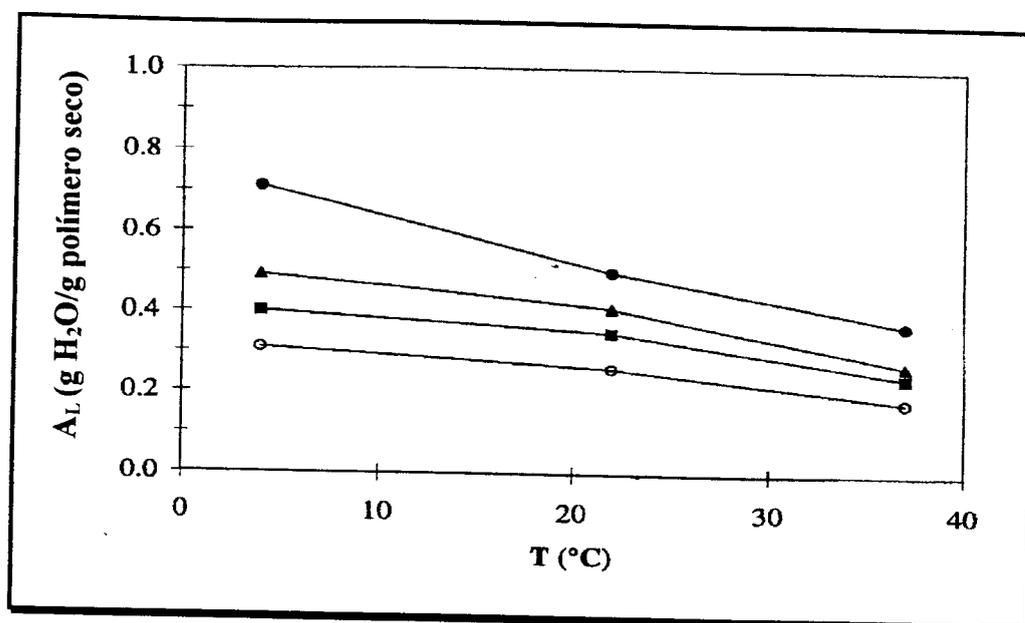


Figura 32. Quantidade de água ligada, A_L , em função da temperatura de expansão dos hidrogéis poli(A-ProOMe) reticulados com TMPTMA nas concentrações 1% (●), 5% (▲), 10% (■) e 15% (○).

Na figura 33 relacionou-se A_N/A_c em função do grau de reticulação. Observou-se que com a menor concentração de reticulante a $A_L \ll A_N$ em uma temperatura de expansão de 4°C , $A_L \approx A_N$ à 22°C enquanto que à 37°C $A_L \approx A_c$. Além disto, a medida que a quantidade de agente reticulante aumenta, a quantidade de água livre diminui progressivamente, até atingir valores muito próximos de zero. Tal comportamento indica que em uma $T \geq 37^\circ\text{C}$ toda a água absorvida por uma rede polimérica pode estar no estado de água ligada independente do grau de reticulação.

Ainda na figura 33, vê-se que o polímero com 15% de reticulante tem $A_L \approx A_c$ em todas as temperaturas de expansão. Portanto, pode-se inferir que com altas concentrações de reticulante o efeito da temperatura na expansão da rede é diminuído. Enquanto que os hidrogéis com quantidade de reticulante inferior à 1%,

o efeito da temperatura parece ser predominante em relação ao do agente reticulante.

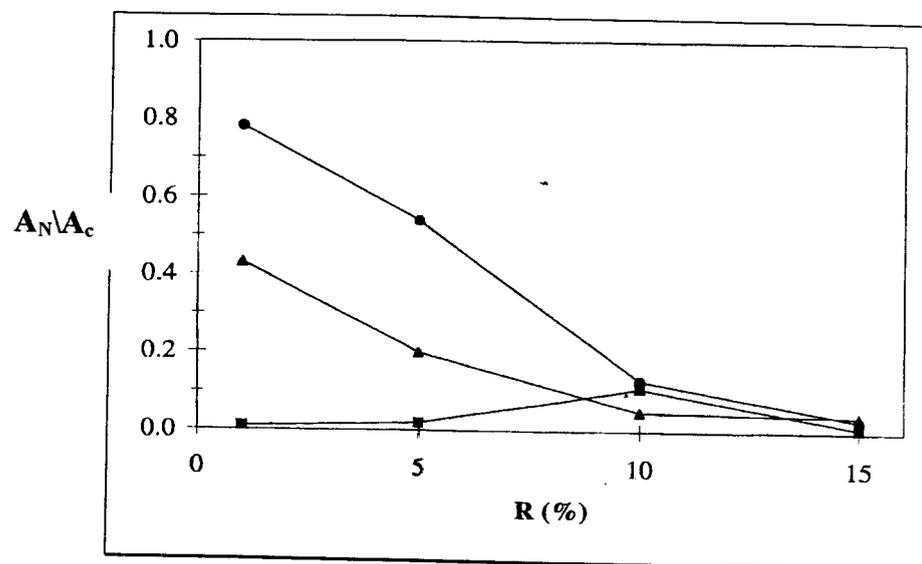


Figura 33. Razão A_N/A_c em função do agente reticulante (TMPTMA) nos hidrogéis poli(A-ProOMe) hidratados até equilíbrio na temperaturas de 4° (●), 22° (▲) e 37°C (■).

Pode-se concluir que para porcentagens de agente reticulante inferiores à 15%, o efeito da temperatura na expansão da rede polimérica é semelhante ao do agente reticulante, com a diferença que com a temperatura este fenômeno é reversível enquanto que com o agente reticulante, não.

IV.4 Utilização dos hidrogéis a base de A-ProOMe como sistemas de liberação de fármacos

Os hidrogéis possuem 4 propriedades principais: grau de expansão, biocompatibilidade, permeabilidade e cinética de expansão.⁴⁰ A possibilidade de conter elevadas quantidades de água pode levar a uma boa biocompatibilidade

facilitando a retirada de impurezas. Sua estrutura macia e natureza elástica reduzem as irritações mecânicas em contato com os tecidos e seu caráter hidrofílico diminui as tensões superficiais. Pode-se obter hidrogéis com diferentes permeabilidades, uma vez que a cinética de expansão é reprodutiva e passiva de ser modificada, dá a possibilidade de variar a permeabilidade em função do tempo ou mesmo em função das modificações do meio. Todas estas características tornam os hidrogéis, materiais com grande potencial no emprego como sistemas de liberação controlada de fármacos. Desta maneira, estudou-se estes materiais para conhecer suas características visando uma futura utilização como sistemas de liberação de fármacos.

Como foi visto anteriormente, a introdução de componentes em um gel termossensível traz mudanças no comportamento de expansão e transição de fase. Desta forma, foram escolhidos diferentes copolímeros que apresentam uma contração característica de sistemas com transição de fase, de forma a não descaracterizar o A-ProOMe como o monômero precursor dos mesmos para trabalhar-se na liberação de fármacos como o acetaminofeno e a insulina.

O trabalho foi iniciado com a imobilização do acetaminofeno em diferentes hidrogéis por aprisionamento via radiação e via adsorção para estudar-se os comportamentos da liberação em água à 37°C. Foram escolhidos copolímeros com componentes hidrofílicos e hidrofóbicos, sendo possível comparar o comportamento da liberação do fármaco nestes diferentes hidrogéis.

Devido aos resultados positivos dos experimentos da liberação do acetaminofeno dos hidrogéis em água, realizou-se um experimento preliminar com a utilização de um dos hidrogéis para liberação da insulina em ratos com diabetes induzida, para observar a possibilidade do uso destes em futuros experimentos *in vivo* com animais geneticamente diabéticos. Os resultados serão apresentados neste capítulo.

IV.4.1 Liberação do acetaminofeno de hidrogéis a base de A-ProOMe

O fenômeno característico dos hidrogéis termossensíveis, que é sua contração com o aumento da temperatura, tem grande influência no mecanismo de liberação de um fármaco. Considerando-se que a variação desta propriedade é consequência da mudança no tamanho dos poros da matriz em função da temperatura, como podemos observar nas micrografias tiradas com o MEV no item anterior, esperam-se também alterações na difusão.

A figura 34 mostra a liberação do acetaminofeno, à 37°C, dos hidrogéis copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA), com 95/5/1%; copoli(A-ProOMe-co-TMPTMA), com 99/1% e com 97/3 % em massa na composição, todos contendo 10% em massa de acetaminofeno imobilizados por aprisionamento durante a polimerização via radiação.

Foi possível observar uma variação das velocidades de liberação entre os diferentes hidrogéis. Percebeu-se que o hidrogel que contém a maior fração hidrofílica, a DMAA, tem uma maior velocidade de liberação do acetaminofeno. Estes resultados permitiram relacionar a velocidade de liberação ao grau de expansão, portanto, quanto maior o grau de expansão maior é a velocidade de liberação. Uma quantidade maior do componente hidrofílico na rede do hidrogel permite uma maior interação com a água através das ligações de hidrogênio e um maior grau de expansão conseqüentemente maior quantidade de água livre facilitando a difusão do fármaco.

A figura 35 mostra os resultados da liberação do acetaminofeno de diferentes hidrogéis: copoli(A-ProOMe-co-TMPTMA), com 99/1% em massa em sua composição; copoli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) com 95/5/1% em massa e copoli(A-ProOMe-co-CEA-co-TMPTMA) com 95/5/1% em massa. Todos os hidrogéis tiveram por volta de 5% em massa de acetaminofeno imobilizado por adsorção após a síntese.

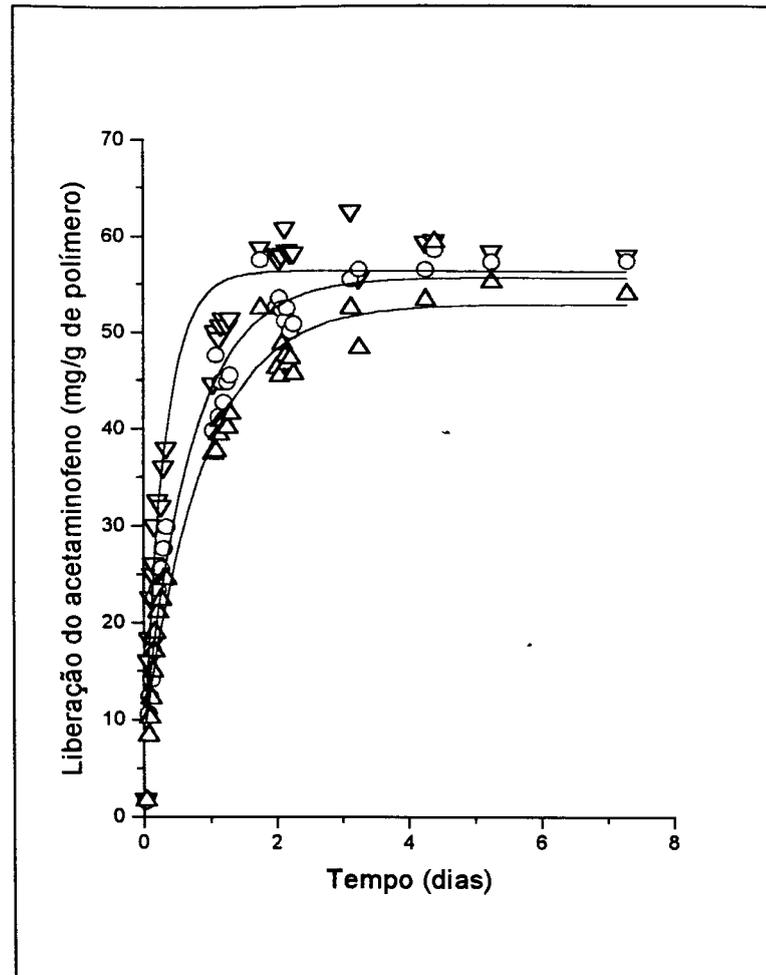


Figura 34. Curva da liberação do acetaminofeno à 37°C das matrizes obtidas a partir da relação m/m das misturas: A-ProOMe/DMAA/TMPTMA, 95/5/1 (∇); A-ProOMe/TMPTMA, 99/1 (○); A-ProOMe/TMPTMA, 97/3 (Δ). Acetaminofeno imobilizado por aprisionamento.

O efeito da hidrofiliicidade está evidente nas curvas de liberação da figura 35, onde o hidrogel que contém o componente hidrofílico, DMAA, apresenta uma maior velocidade de liberação do fármaco. Da mesma maneira, neste experimento foi possível observar que o hidrogel com maior grau de expansão, tem a maior velocidade de liberação, enquanto que os dois hidrogéis com velocidades próximas, tem um grau de expansão máximo iguais (%E, 76%). A imobilização do acetaminofeno nestas amostras foi feita por adsorção do fármaco em uma solução saturada à 6°C, onde as amostras permaneceram por dois dias e após, foram cuidadosamente liofilizadas. Desta maneira estavam no estado de expansão máximo e portanto com o maior tamanho de poro. Os hidrogéis quando recolocadas na água

para liberação esta porosidade pode ter auxiliado a liberação na fase inicial apesar da temperatura do meio ser de 37°C.

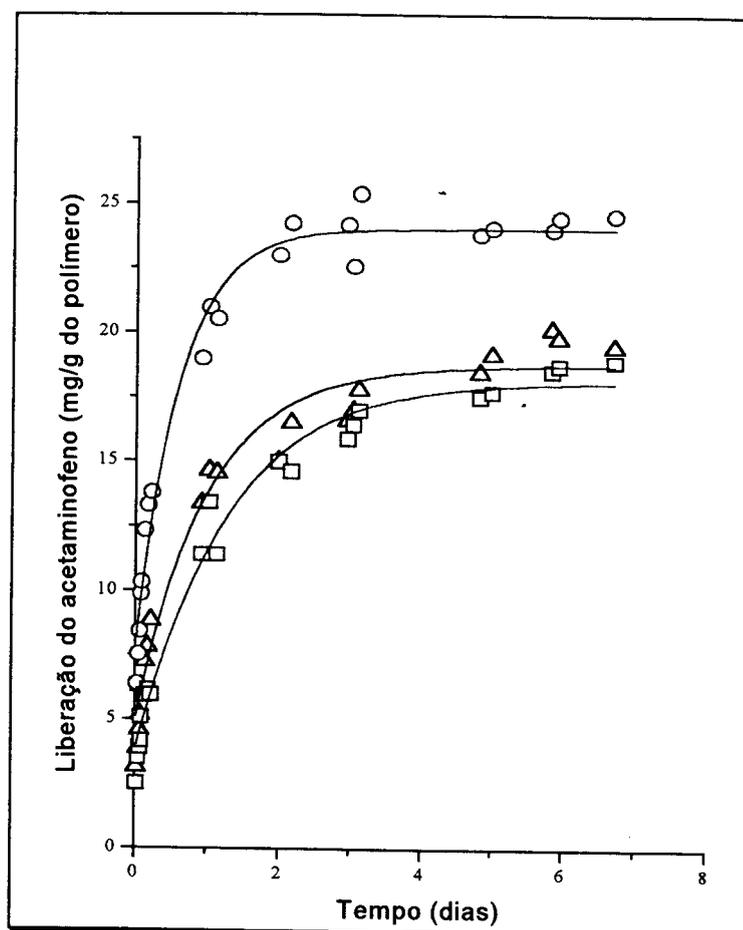


Figura 35 Curva de liberação do acetaminofeno à 37°C, das matrizes obtidas por polimerização das misturas nas relações m/m: A-ProOMe/TMPTMA, 99/1 (Δ); A-ProOMe/DMAA/TMPTMA, 95/5/1 (○); A-ProOMe/CEA/TMPTMA, 95/5/1 (□). Acetaminofeno imobilizado por adsorção física.

A maior quantidade de água livre, que está presente nos hidrogéis mais expandidos, com os maiores poros, proporcionará uma velocidade maior de liberação. Percebeu-se também que a característica dos componentes do hidrogel é bastante importante na velocidade da liberação do fármaco. Portanto, tem-se a possibilidade de manipulação da velocidade de liberação de um fármaco mudando-

se a composição do hidrogel.

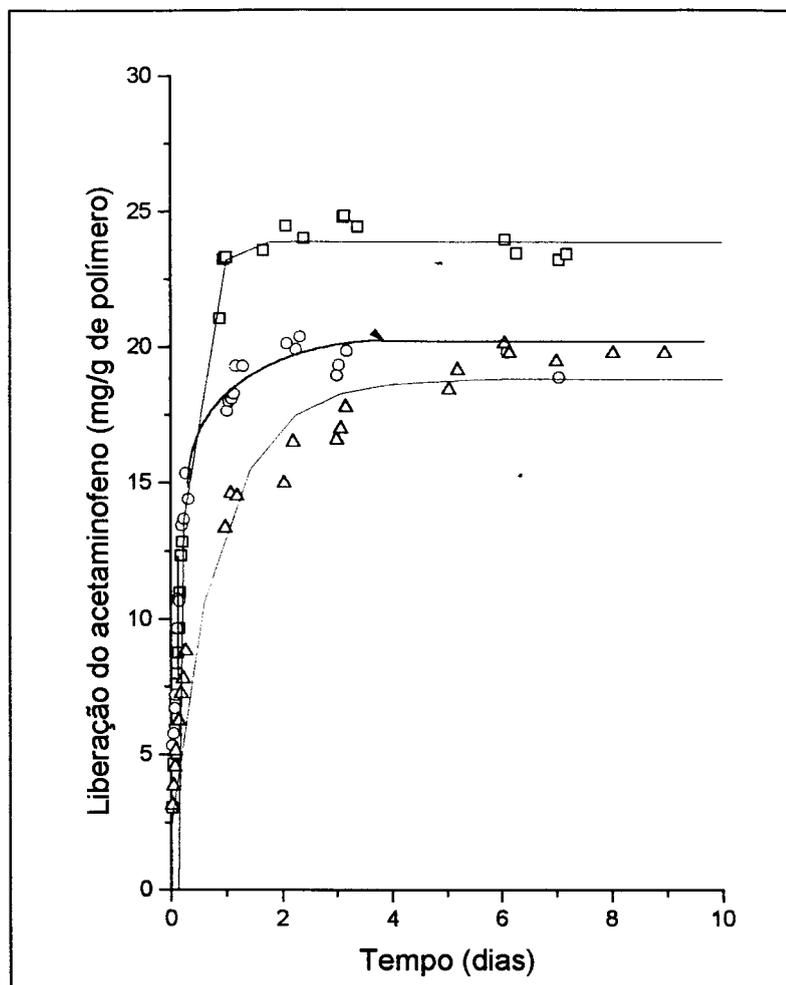


Figura 36. Curva da liberação do acetaminofeno do hidrogel copoli(A-ProOMe-co-TMPTMA) nas proporções de 99/1 em massa em água nas temperaturas de 10°C (□), 30°C (○) e 37°C (△).

A figura 36 representa a liberação do acetaminofeno em diferentes temperaturas a partir do mesmo hidrogel, copoli(A-ProOMe-co-TMPTMA) nas proporções de 99/1 em massa. Desta maneira pode-se constatar que na temperatura mais baixa ocorre a maior velocidade de liberação.

Como constatado anteriormente a temperatura influencia na dimensão dos poros do hidrogel e isto significa uma variação na quantidade de água livre no

interior da rede polimérica. Um hidrogel com poros maiores terá maior quantidade de água livre que influencia diretamente na difusão do fármaco através da rede.

Desta forma constata-se que o tamanho do poro de um hidrogel pode ser modificado neste caso com a temperatura, com o grau de reticulação ou mesmo com o balanceamento hidrofílico/hidrofóbico do hidrogel.

IV.4.2 Estudos preliminares da utilização do poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) como sistema de liberação da insulina para controle de "diabetes mellitus" em ratos

Os experimentos iniciaram-se com a imobilização da insulina em 4 discos de 2 matrizes de hidrogéis através de adsorção imergindo-as em uma solução com concentração de 17 mg/mL (tabela 13,14).

Cada hidrogel (I e II) foi testado em dois animais, por meio de implante subcutâneo.

Tabela 13. Quantidades da insulina imobilizada nos discos de poli(A-ProOMe-co-TMPTMA), com 99/1% dos componentes em massa, através de medidas espectrométricas no UV, $\lambda=278\text{nm}$.

Hidrogel I (mg)	v_0 sol. insulina (μL)	v_f sol. Insulina (μL)	C insulina (mg/mL)	Insulina imob. (mg/disco)
48,7	300	150	22,7	2,8
61	300	110	20,7	3,9
80,8	300	80	26,5	4,1
73,5	300	65	22,4	4,7

Tabela 14. Quantidades da insulina imobilizada nos discos de poli(A-ProOMe-co-TMPTMA), com 95/5% dos componentes em massa, através de medidas espectrométricas no UV, $\lambda=278\text{nm}$.

Hidrogel II (mg)	v_0 sol. insulina (μL)	v_f sol. Insulina (μL)	C insulina (mg/mL)	Insulina imob. (mg/disco)
122,1	300	210	28,2	0,3
70,7	300	215	20,5	1,8
32,5	300	245	18,6	1,6
76,4	300	210	-	-

A figura 37 mostra a variação percentual do nível de glicose no plasma dos animais ocasionada pela liberação da insulina através do implante subcutâneo do hidrogel poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) nas proporções de 99/1 e 95/5 em massa. Para o primeiro caso, já nas primeiras 3 horas o percentual de glicose foi reduzido para 90%, mantendo uma média de redução para 70% durante os 3 primeiros dias e para 64% durante aproximadamente 50 dias.

A liberação da insulina através do implante subcutâneo do hidrogel poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) nas proporções de 95/5 em massa mostra uma diferença, observa-se que o valor do percentual de glicose no plasma dos animais reduziu-se de 18 % nas primeiras 3 horas de experimento, mantendo uma média de redução de 33 % nos primeiros 20 dias e de 44% nos próximos 25 dias.

Percebeu-se que o tempo de liberação para a insulina dos hidrogéis nestes experimentos chegou até 60 dias após o implante. Um dos aspectos a ser considerado é o tipo de substância ativa a ser imobilizada, pois pelas próprias dimensões dos hidrogéis a serem implantados não é possível utilizar-se grandes quantidades. De modo que se deve dar preferência a utilização de compostos a serem imobilizados que apresentam uma atividade com baixas dosagens, como é o caso dos hormônios que em geral atuam a uma dosagem baixíssima da ordem de nanogramas.

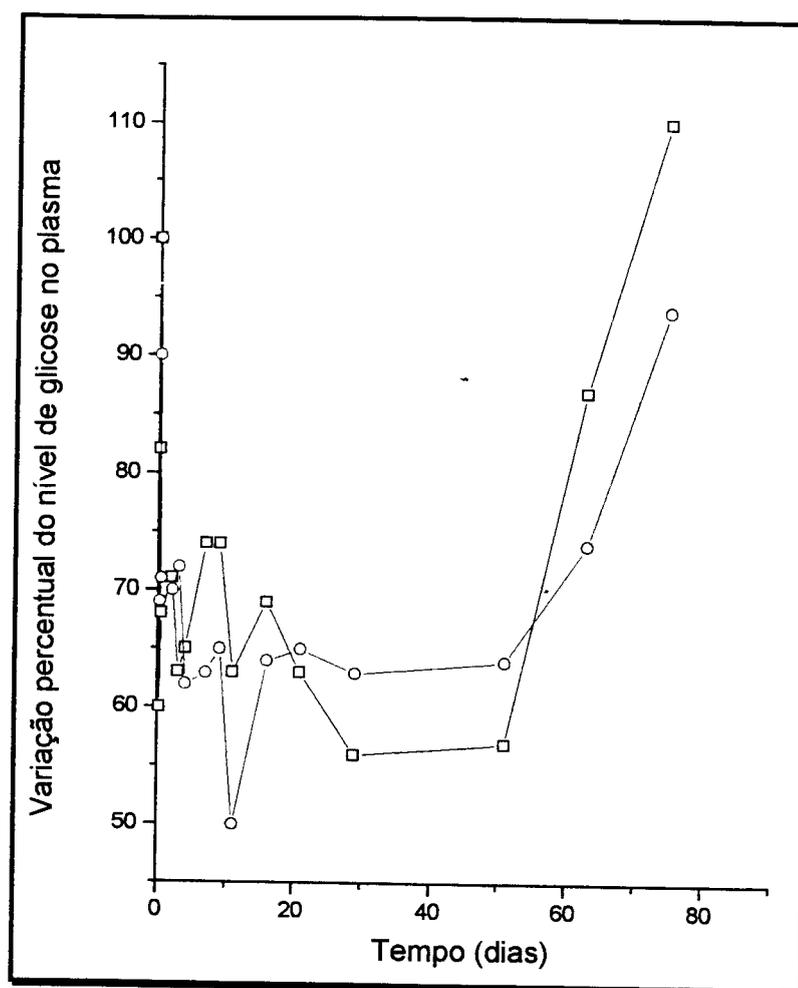


Figura 37. Curva representativa da redução da concentração da glicose medida no plasma de ratos com diabetes induzida implantados com o hidrogel poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) nas proporções de 99/1 (○) e 95/5 (□) (m/m) contendo insulina.

Confirmou-se que hidrogéis com poros maiores ou com menor grau de reticulação, podem expandirem-se mais e portanto adsorver maior quantidade de fármaco e maior quantidade de água livre favorecendo a difusão. Pode-se portanto manipular a estrutura dos hidrogéis em função dos resultados desejados.

A partir destes experimentos serão feitos testes *in vivo* em ratos geneticamente diabéticos.

V - CONCLUSÕES

Foi obtido um sistema de liberação de fármacos de natureza macromolecular portador de um composto com atividade farmacológica via radiação ionizante. O composto com atividade farmacológica é o acetaminofeno, analgésico e antipirético, que foi ligado à cadeia polimérica, de natureza acrílica, através de uma ligação éster.

Foram determinados os valores das razões de reatividade para o sistema DMAA-AOA envolvidos na copolimerização que são $r_{\text{DMAA}} = 0,31 \pm 0,02$ e $r_{\text{AOA}} = 0,07 \pm 0,12$. O poli(DMAA-co-AOA) apresentou uma configuração alternada.

O estudo hidrolítico das matrizes poli(DMAA-co-AOA) realizados em meio alcalino e enzimático, conforme condições descritas anteriormente, indicou a hidrólise do acetaminofeno da cadeia polimérica detectado por espectrometria em UV.

Foi possível obter-se hidrogéis a partir do A-ProOMe copolimerizados por radiação ionizante juntamente com os monômeros DMAA e CEA, hidrofílico e hidrofóbico, respectivamente.

Através da caracterização dos hidrogéis pelo grau de expansão concluiu-se que um hidrogel obtido por copolimerização com o monômero A-ProOMe que apresenta LCST mantém as características de termossensibilidade negativa. Para que um hidrogel termossensível, obtido por copolimerização, mantenha um comportamento de transição de fase deve apresentar em sua composição no mínimo 97% do monômero com LCST.

Por DSC determinou-se que a quantidade de água livre no interior dos hidrogéis diminui com o aumento do agente reticulante na composição dos hidrogéis e com o aumento da temperatura em que estão submetidos. A uma temperatura maior ou igual à 37°C toda a água absorvida pelos hidrogéis pode estar sob forma de água ligada independentemente do grau de reticulação.

A análise do grau de expansão, da quantidade de água ligada e da estrutura dos poros por MEV nos hidrogéis em várias temperaturas, permitiu concluir que o tamanho do poro depende não só da temperatura do meio como da composição do gel.

Verificou-se que a velocidade de difusão do fármaco do hidrogel depende do tamanho do poro de modo que pode ser função da temperatura ou composição da rede polimérica dos copolímeros obtidos a partir do A-ProOMe.

O hidrogel a base do A-ProOMe mostrou-se capaz de constituir um sistema de liberação de fármaco.

VI. ANEXOS

A. DADOS EXPERIMENTAIS DA LIBERAÇÃO DO ACETAMINOFENO DAS MATRIZES POLIMÉRICAS poli(DMAA-co-AOA)

Tabela 1. Dados das medidas do acetaminofeno liberado da matriz poli(DMAA-co-AOA) com 42/58% em massa dos componentes respectivamente em pH 8,4 por espectrometria no UV, $\lambda = 246$ nm.

TEMPO (dias)	ABSORBÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mg x 10 ⁵)	ACET./POLÍMERO (mg/g)
0,08	0,19	1,148	5,35
0,104	0,203	1,227	5,72
0,125	0,263	1,590	7,4
0,146	0,250	1,511	7,04
0,88	0,374	2,260	10,54
1,03	0,373	2,255	10,5
1,17	0,415	2,508	11,69
2,15	0,461	2,786	12,99
2,9	0,489	2,956	13,77
5,8	0,602	3,639	16,95
6,98	0,594	3,590	16,73
7,82	0,612	3,699	17,24
12,78	0,704	4,255	19,83

Tabela 2. Dados das medidas do acetaminofeno liberado da matriz poli(DMAA-co-AOA) com 47/53% em massa dos componentes respectivamente em pH 8,4 por espectrometria no UV, $\lambda = 246$ nm.

TEMPO (dias)	ABSORBÂNCIA	CONCENTRAÇÃO (mg x 10 ⁵)	ACET./POLÍMERO (mg/g)
0,02	0,402	2,430	9,84
0,04	0,495	2,992	12,11
0,06	0,535	3,234	13,09
0,08	0,766	4,630	18,74
0,104	0,720	4,720	19,11
0,125	0,664	4,013	16,25
0,146	0,712	4,303	17,42
0,88	1,027	6,207	25,13
1,03	1,111	6,715	27,18
1,17	1,024	6,189	25,06
2,15	1,169	7,066	28,6
2,9	1,108	6,700	27,11
5,8	1,224	7,398	29,95
6,98	1,231	7,440	30,12
7,82	1,247	7,537	30,51
12,78	1,054	6,370	32,24

Tabela 3. Dados das medidas do acetaminofeno liberado da matriz poli(DMAA-co-AOA) com 47/53% em massa dos componentes, respectivamente, em meio enzimático (tripsina), por espectrometria no UV, $\lambda = 246$ nm.

TEMPO (h)	ABSOR.	ACET./POLÍMERO (mg/g)
1	0,04	0,73
2	0,05	0,81
3	0,075	1,36
4	0,11	2,36
5	0,118	2,14
6	0,11	2,36
7	0,1	1,81
8	0,125	2,27
9	0,18	3,26
10	0,25	4,54
11	0,29	5,26
12	0,3	5,44
13	0,365	6,62
14	0,35	6,35
15	0,385	6,99
16	0,452	8,2
17	0,462	8,38
18	0,465	8,44
19	0,458	8,31
20	0,445	8,1
21	0,434	7,88
22	0,45	8,17
23	0,488	8,86
24	0,51	9,25
25	0,51	9,25
26	0,51	9,25
27	0,52	9,44
28	0,48	8,71
29	0,52	9,44
30	0,52	9,44

B. DADOS EXPERIMENTAIS DO GRAU DE EXPANSÃO DOS HIDROGÉIS

Tabela 1. Dados do grau de expansão do poli(A-ProOMe-co-CEA-co-TMPTMA) em água em diversas concentrações (relações em massa) e temperaturas.

Composição Temperatura °C	E(%)		
	98/2/1	95/5/1	85/15/1
0	78,4	76	47
6	77	74,3	40
12	68,7	60	30,5
18	56,5	47,9	26,3
20	49,8	41,4	25,2
23	40,8	35,2	24,1
30	35,4	30	18,4
40	31,8	27,1	16,7
50	31,8	25,3	18,1
60	22,9	21,9	17

Tabela 2. Dados do grau de expansão do poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) em água em diversas concentrações (relações em massa) e temperaturas.

Composição Temperatura °C	E(%)						
	99,5/0,5	99/1	97/3	94/6	90/10	87/13	81/19
0	-	76	66,9	53,3	39,3	25,5	19,2
6	77,4	72,6	61,3	49,8	38,3	31	19,3
8	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	56,4	44,8	35,7	30,8	21,8
12	71,5	62,5	-	-	-	-	-
16	-	-	48,9	40	31,4	28,6	22,2
18	48,9	43,1	-	-	-	-	-
20	38,4	36	40,9	36,3	27,7	24,8	19,8
24	28,1	-	-	-	-	-	-
30	15,9	22	-	-	-	-	-
32	-	-	33,5	29,3	23,1	22,1	18,7
40	7,68	14,8	29,2	26,8	20,4	19,5	17,3
50	12,36	9,7	23,1	27,9	18,7	17,6	15,1
60	3,78	6,6	21,6	25,9	17	18,3	13,2

Tabela 3. Dados do grau de expansão do poli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) em água em diversas concentrações (relações em massa) e temperaturas.

Composição Temperatura °C	E(%)					
	95/5/3	80/20/3	70/30/3	99,5/0,5/1	98/2/1	95/5/1
0	60,3	62,5	66,2	81,8	83,1	83,3
6	56,4	61,5	65,4	78,5	83,29	-
8	-	-	-	76,1	-	80
10	-	-	-	73,6	-	-
11	52,2	59	63,7	-	-	-
12	-	-	-	71,2	77,6	-
14	-	-	-	-	-	77,1
16	47,1	55,6	61,9	-	-	73,3
18	-	-	-	53,7	66,2	-
20	41,8	54,2	60,2	51,1	58,62	65,5
24	-	-	-	-	-	56,8
27,7	-	-	-	38	-	-
30	-	-	-	36,4	40,6	-
32	31	47,8	55,4	-	--	46,8
40	29,6	42,7	52,2	31,3	32,6	31,3
50	24,3	37,9	46,8	26,8	32,6	-
60	20,5	35,6	42,9	24,6	24	-

C. DADOS DO GRAU DE EXPANSÃO PARA OBTENÇÃO DO CICLO DE REVERSIBILIDADE

Tabela 1. Dados do grau de expansão do poli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) estabilizado em água na temperatura de 6°C em elevação para 35°C.

TEMPO (h)	E(%)	
	90/10/3	70/30/3
0	55	62
0	42	54,8
0,25	36,5	52,5
0,5	33,9	51,3
1	31,6	50,7
1,5	30,7	50,4
2	29,8	50,2
3	29,6	50
4	29,1	49,8
5	28,3	49,7
24	29,3	50,5

* no tempo 0 está implícito que as amostras permaneceram 24 h na temperatura de 6°C, é o tempo inicial das medidas.

Tabela 2. Dados do poli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA) estabilizado em água na temperatura de 35°C abaixando para 6°C.

TEMPO (h)	E (%)	
	70/30/3	90/10/3
Composiçã 0		
0	32,3	56,5
0,25	42,2	57,5
1	45,6	59,3
2	48,4	60,8
2,5	48,6	61
3	49,3	61,3
4	50,4	61,6
5	52,5	61,6
6	53	61,8
10	-	61,9
24	55	62

* no tempo 0 está implícito que as amostras permaneceram 24 h na temperatura de 35°C, é o tempo inicial das medidas.

D. DADOS EXPERIMENTAIS DA LIBERAÇÃO DO ACETAMINOFENO DOS HIDROGÉIS A BASE DE A-ProOMe.

Medidas da liberação de acetaminofeno, em água à 37°C, das amostras que contém 10% de acetaminofeno imobilizado por aprisionamento, poli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA), com 95/5/1%, poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) com 99/1 e 97/3% em massa respectivamente por espectrometria no UV, $\lambda = 246$ nm em meio aquoso.

Tabela 1. Concentração do acetaminofeno liberado do poli(A-ProOMe-co-DMAA-co-TMPTMA), 95/5/1% e com 10% de acetaminofeno em massa. Massa da mostra 93,0 mg.

Tempo (dias)	Absorbância	Alíquotas (μ L)*	Acetaminofeno/polímero (mg/g)
0,02	0,188	200	1,8
0,0625	1,593	200	16,0
0,08	1,796	200	18,3
0,104	1,117	100	22,6
0,125	0,624	50	25,0
0,146	0,652	50	26,0
0,166	0,740	50	30,0
0,208	0,809	50	32,6
0,25	0,768	50	32,0
0,29	0,900	50	36,0
0,33	0,937	50	38,0
1,04	1,113	50	44,6
1,08	1,246	50	50,0
1,125	1,220	50	49,3
1,16	1,251	50	50,6
1,208	1,271	50	51,3
1,25	1,257	50	50,6
1,29	1,278	50	51,3
2,00	1,438	50	58,0
2,04	1,423	50	57,3
2,08	1,453	50	57,9
2,125	1,506	50	60,7
2,16	1,450	50	58,4
2,2	1,442	50	58,1
2,25	1,441	50	58,1
3,00	1,456	50	58,7
3,125	1,548	50	62,4

*Continuação tabela anterior.

Tempo (dias)	Absorbância	Alíquotas (μL)*	Acetaminofeno/polímero (mg/g)
3,25	1,378	50	55,5
4,25	1,468	50	59,2
5,25	1,446	50	58,3
6,27	1,475	50	59,4
7,29	1,438	50	57,9

*As alíquotas foram diluídas até um volume final de 400 μL .

Tabela 2. Concentração de acetaminofeno liberado do poli(A-ProOMe-co-TMPTMA), 99/1% e com 10% de acetaminofeno em massa. Massa da mostra 87,2 mg.

Tempo (dias)	Absorbância	Alíquotas (μL) *	Acetaminofeno/polímero (mg/g)
0,02	0,313	direta	1,69
0,0625	1,993	direta	10,6
0,08	2,260	direta	12,4
0,104	1,327	200	14,2
0,125	0,399	50	17,1
0,146	0,425	50	18,5
0,166	0,522	50	22,7
0,208	0,542	50	23,5
0,25	0,602	50	25,6
0,29	0,639	50	27,7
0,33	0,688	50	29,9
1,04	0,968	50	39,8
1,08	1,116	50	47,6
1,125	0,953	50	41,2
1,16	1,035	50	44,8
1,208	0,994	50	42,7
1,25	1,046	50	44,8
1,29	1,062	50	45,5
2,00	1,220	50	52,6
2,04	1,246	50	53,5
2,08	1,217	50	52,3
2,125	1,189	50	51,1
2,16	1,220	50	52,4
2,2	1,164	50	50,0
2,25	1,185	50	50,8
3,00	1,336	50	57,4
3,125	1,289	50	55,4
3,25	1,313	50	56,4
4,25	1,308	50	56,4
5,25	1,332	50	57,2
6,27	1,361	50	58,5
7,29	1,333	50	57,3

*As alíquotas foram diluídas até um volume final de 400 μL .

Tabela 3. Concentração do acetaminofeno liberado do poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) com 97/3% e 10% de acetaminofeno em massa. Massa da amostra 91,2 mg.

Tempo (dias)	Absorbância	Alíquotas (μL) *	Acetaminofeno/polímero (mg/g)
0,02	0,332	direta	1,7
0,0625	1,636	direta	8,4
0,08	1,970	direta	10,2
0,104	1,194	200	12,2
0,125	0,367	50	15,0
0,146	0,411	50	17,0
0,166	0,470	50	19,0
0,208	0,517	50	21,1
0,25	0,546	50	22,4
0,29	0,597	50	24,5
0,33	0,592	50	24,5
1,04	0,918	50	37,4
1,08	0,933	50	37,7
1,125	0,957	50	39,4
1,16	0,985	50	40,8
1,208	1,000	50	40,8
1,25	0,978	50	40,1
1,29	1,016	50	41,5
2,00	1,131	50	46,2
2,04	1,105	50	45,4
2,08	1,186	50	48,7
2,125	1,157	50	47,5
2,16	1,134	50	46,6
2,2	1,148	50	47,2
2,25	1,109	50	45,6
3,00	1,275	50	52,4
3,125	1,275	50	52,4
3,25	1,176	50	48,3
4,25	1,298	50	53,3
5,25	1,340	50	55,1
6,27	1,443	50	59,3
7,29	1,316	50	54,0

*As alíquotas foram diluídas até um volume final de 400 μL .

E. MEDIDAS DA LIBERAÇÃO DO ACETAMINOFENO NOS HIDROGÉIS
TERMOSENSÍVEIS EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA.

Tabela 1. Concentração do acetaminofeno liberado em água do poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) nas proporções em massa de 99/1 e 5% em massa de acetaminofeno imobilizado por adsorção física em diferentes temperaturas.

Temperatura Tempo (dias)	<i>Acetaminofeno/polímero</i> (mg/g)		
	10°C	30°C	37°C
0,02	3,03	5,32	3,14
0,04	4,63	5,79	3,84
0,0625	5,88	6,7	4,55
0,08	7,03	7,2	5,14
0,104	7,96	9,65	-
0,125	8,75	10,75	-
0,135	-	-	6,26
0,146	9,64	10,67	-
0,166	10,98	-	-
0,177	-	-	7,25
0,188	12,33	13,44	-
0,208	12,82	-	-
0,219	-	-	7,8
0,875	21,04	-	-
0,944	23,23	-	-
0,98	23,31	-	-
1	23,31	-	-
1,66	23,56	-	-
2,08	24,46	-	-
2,4	24	-	-
3,12	24,79	-	-
0,23	-	13,67	-
0,26	-	-	8,83
0,27	-	15,35	-
0,313	-	14,41	-
0,97	-	-	13,35
1	-	17,66	-
1,04	-	18,02	-
1,07	-	-	14,62
1,08	-	18,1	-
1,125	-	18,29	-
1,16	-	19,32	-
1,18	-	-	14,53
1,29	-	19,32	-
2,03	-	-	15
2,08	-	20,15	-
2,25	-	19,93	-

*Continuação tabela anterior.

Temperatura Tempo (dias)	<i>Acetaminofeno/polímero</i> (mg/g)		
	10°C	30°C	37°C
2,32	-	20,4	-
2,99	-	18,97	-
2,2	-	-	16,5
2,99	-	-	16,6
3,03	-	19,35	-
3,07	-	-	17
3,15	24,83	-	-
3,16	-	-	17,8
3,17	-	19,87	-
3,38	24,43	-	-
5,03	-	-	18,465
5,19	-	-	19,17
6,06	23,95	-	-
6,05	-	-	20,16
6,09	-	19,84	-
6,14	-	-	19,8
6,275	23,46	-	-
7	-	-	19,5
7,04	-	18,92	-
7,056	23,23	-	-
7,2	23,44	-	-
8,02	-	-	19,8
8,95	-	-	19,8
11,95	-	-	-

F. VALORES DE A_c E A_L NOS HIDROGÉIS DETERMINADOS POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DIFERENCIAL (DSC).

Tabela 1. Valores de A_c e A_L (g H_2O/g de polímero seco) para hidrogéis obtidos com diferentes graus de reticulante e expandidos à temperaturas de 4°, 22° e 37°C.

Reticulante (%)		-			
		1	5	10	15
T(°C)					
4	A_c	3,26	1,07	0,46	0,32
	A_L	2,55	0,58	0,06	0,01
22	A_c	0,88	0,51	0,37	0,27
	A_L	0,38	0,10	0,02	0,01
37	A_c	0,37	0,28	0,27	0,18
	A_L	0,004	0,005	0,03	0,002

G. MEDIDAS DA LIBERAÇÃO DA INSULINA DOS HIDROGÉIS EM ANIMAIS DIABÉTICOS.

Medidas da redução da "diabetes mellitus" induzida em ratos através da liberação da insulina administrada por meio implantes do hidrogel poli(A-ProOMe-co-TMPTMA) com duas concentrações de reticulante: 1% (polímero I) e 5% (polímero II) em massa. Dados obtidos por espectrometria no UV, $\lambda=505$ nm para a glicose.

TEMPO (dias)	Absorbância		Concentração da glicose no plasma (%)	
	Polímero I	Polímero II	Polímero I	Polímero II
0	457	481	100	100
0,125	411	394	90	82
0,25	315	288	69	60
0,42	324	327	71	68
2	320	341	70	71
3	329	303	72	63
4	283	312	62	65
7	288	355	63	74
9	297	355	65	74
11	228	303	50	63
16	293	331	64	69
21	297	304	65	63
29	288	269	63	56
51	338	389	74	57
63	430	529	74	87
75			94	110

VII - BIBLIOGRAFIA

1. RATNER, B.D.; *Biomaterial science. An introduction to materials in medicine.* New York: Academic, 1997.
2. LYMANN, D.J.; Polymers in medicine - An overview. In: CHIELLINI, E.; GUISTI, P. (Eds.). *Polymers in medicine.* New York: Plenum, 1983. p. 215-218.
3. WILLIAMS, D.; F.; Definitions in biomaterials. In: CONSENSUS CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS, March 3-5, 1996, Chester, England. *Proceedings...* England: Elsevier, 1987. V. 4: Definitions in Biomaterials. p.9-71.
4. COOKE, F.W.; Bulk properties of materials In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. (Eds.) *Biomaterial science. An introduction to materials in medicine.* New York: Academic, 1997. p.11-35.
5. SAN ROMÁN, J.; GALLARDO, A. New polymers for biomedical applications: synthesis and characterization of acrylic systems with pharmacological activity. *Macromol. Symp.*, v. 84, p. 145-158, 1994.
6. TSURUTA, T. Contemporary topics in polymeric materials for biomedical applications. In: REISFELD, R. *Advances in polymer science.* Berlin: Springer Verlag, 1996. V. 126. p.1-51,

7. PEPPAS, N.A.; MIKOS, A.G. Preparation methods and structure of hydrogels. In: PEPPAS, N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1987. V. I: Fundamentals. p. 1-56.
8. WICHTERLE, O.; LÍM, D. Hydrophilic gels for biological use. *Nature*, v. 185, p. 117-118, 1960.
9. ANDRADE, J.D. *Hydrogels for medical and related applications*. Washington, DC.: ACS Symposium Series, American Chemical Society, 1976.
10. PEPPAS, N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton: Fla.: CRC, 1987.
11. HOFFMAN, A.S. A review of the use of radiation plus chemical and biochemical processing treatments to prepare novel biomaterials. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 18, n. 1-2, p. 323-342, 1981.
12. HOFFMAN, A.S. Use of radiation technology in preparing materials for bioengineering and medical science. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON INDUSTRIAL APPLICATION OF RADIOISOTOPES AND RADIATION TECHNOLOGY. September, 28- October, 2, 1981, Grenoble. *Proceedings...* Vienna IAEA, 1982. P.279-309.
13. KAETSU, I. Radiation synthesis of polymeric materials or biomedical and biochemical applications. *Advan. in Polym. Sci.*, v. 105, p. 81-97, 1993.
14. KAETSU, I. Immobilization of drugs and proteins by radiation polymerization and biomedical uses of this technique. In: RESEARCH COORDINATION MEETING APPLICATION OF RADIATION TECHNOLOGY IN

IMMOBILIZATION OF BIACTIVE MATERIALS, June, 15-18, 1987, Beijing. *Proceedings...*p.113,127.

15. CARENZA, M. Recent achievements in the use of radiation polymerization and grafting for biomedical applications. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 39, n. 6, p. 485-493, 1992.
16. GOMBOTZ, W.R.; HOFFMAN, A.S. Immobilization of biomolecules and cells on and within synthetic polymeric hydrogels. In: PEPPAS, N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1986. V. I: Fundamentals. p. 95-125.
17. HELLER, J.; Drug delivery systems. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. (Eds.) *Biomaterial science. An introduction to materials in medicine*. New York, NY.: Academic, 1997. p.346-356.
18. OLSEN, J.L.; SADEK, M. Pharmaceutical considerations in the development of controlled release drug delivery systems. In WISE, D.L. *Biocopolymeric controlled release systems*. New York, NY: CRC, 1987. V. I. p.193-216.
19. SAN ROMÁN, J.; GALLARDO, A.; LEVENFELD, B. Polymeric drug delivery systems *Adv. Mater.*, v. 7, n. 2, p. 203-208, 1995.
20. RINGSDORF, H. Synthetic Polymeric Drugs. In KOSTELNIK, R.J. *Polymeric delivery systems*. New York, NY.: Gordon and Breach Science, 1978. p. 197-223.
21. RINGSDORF, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J. Polym. Sci. Symp.*, v. 51, p. 135-153, 1975.

22. ILLUM, L.; DAVIS, S.S. *Polymers in controlled drug delivery*. Bristol: Wright, 1987. p. 49-59.
23. FERRUTI, P.; SCAPINI, G.C.; RUSCONI, L.; TANZI, M.C. New polymeric and oligomeric matrices as drug carriers. In: CHIellini, E.; GIUSTI, P. *Polymers in medicine*. New York, NY.: Plenum, 1983.
24. LEVENFELD, B.L. *Polimeros biocompatibles con actividad farmacologica: preparacion de derivados acrilicos de paracetamol*. Madrid: 1989. Tese (Doutoramento) - Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Quimicas Departamento de Quimica Organica.
25. KOST, J.; LANGER, R. Equilibrium swollen hydrogels in controlled release applications. In: PEPPAS, N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1987. V. III: Properties and applications. p. 95-108.
26. SILVER, F.; DOILLON, C. *Biocompatibility. Interactions of biological and implantable materials*. New York, NY.: VHC, 1989. V. I: Polymers. p. 261-297.
27. VERT, M. Design and synthesis of bioresorbable polymers for the controlled release of drugs. In: ILLUM, L.; DAVIS, S.S. (Eds.) *Polymers in controlled drug delivery*. London: The Bath, 1987. p. 117-130.
28. FERRUTI, P. Macromolecular drugs. *Il Farmaco, Ed. Sc.*, v. 32, n. 3, p. 220-236, 1977.

29. BATZ, H.G.; RINGSDORF, H.; RITTER, H. Cyclophosphamide-and steroidhormone containing polymers as potential anticancer compounds. *Die Makromol. Chem.*, v. 175, p. 2229-2239, 1974.
30. SAN ROMÁN, J.; MADRUGA, E.L. Polymers with pharmacological activity: synthesis and free-radical polymerization of p-methacryloylacetanilide. *Polymer*, v. 30, p.949-954, 1989.
31. GALLARDO, A.; SAN ROMÁN, J. Synthesis and characterization of a new poly(methacrylamide) bearing side groups of biomedical interest. *Polymer*, v. 34, n. 2, p. 394-400, 1993.
32. SAN ROMÁN, J.; LEVENFELD, B. Polymers with pharmacological activity. 3. Stereochemical configuration of acrylic polymers bearing paracetamol and phenacetin side groups. *Macromolecules*, v. 23, p.423-427, 1990.
33. LEVENFELD, B.; SAN ROMÁN, J. Polymers with pharmacological activity: 4. synthesis and free-radical polymerization of an acrylic derivate of "paracetamol". *Polymer*, v. 32, n. 17, p. 3250-3255, 1991.
34. SAN ROMÁN, J.; LEVENFELD, B.; MADRUGA, E.L.; VAIRON, J.P. Biocompatible polymeric systems: copolymerization of 4-methacryloyloxy-acetanilide with 2-hydroxyethyl-methacrylate. *J. Polym. Sci., Part A-1 Polym. Chem.*, v. 29, p. 1023-1030, 1991.
35. GALLARDO, A.; SAN ROMÁN, J. Kinetic behavior of methacrylic monomers with large polar side groups substituents in free radical polymerization. *Macromolecules*, v. 25, p. 5836-5840, 1992.

36. SAN RÓMAN, J.; DARIAS, V.; BRAVO, L.; CANDELÁRIA, C.S.M.; TELLO, M.L.; ABDALLAH, S.S.; VIVAS, S.M. Preliminary pharmacological study of polymeric acrylic derivatives of salicylic acid and paracetamol. *Die Pharmazie*, v. 47, p. 1-3, 1992.
37. LEVENFELD, B.; SAN ROMÁN, J. Polymers with pharmacological activity, 5^a) hydrolytical behaviour of polymethacrylic hydrogels bearing "paracetamol" side groups. *Makromol. Chem.*, v.192, p.793-803, 1991.
38. PEPPAS, N.A.; KORSMEYER, R.W. Dynamically swelling hydrogels in controlled release applications. In: PEPPAS, N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1987. V. III: Properties and applications. p. 109-137.
39. TANAKA, T. Gels. In: NICOLINI, C. *Structure and dynamics of biopolymers*. Boston: Martinus Nijhoff, 1987. p. 237-257. (NATO ASI Ser., Ser. E n. 133).
40. GEHRKE, S.H. Hydrogels for drug delivery systems. In: TYLE, P. *Specialized drug delivery systems*. New York and Basel: Marcel Dekker, 1990. p. 333-392.
41. BOUWSTRA, J.A.; JUNGINGER, H.E. Hydrogels. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J.C. (Eds.) *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York, NY.: Marcel Dekker, 1993. V. 7: Genetic engineering to hydrogels. p.441-465.
42. ROSIAK, J.M. Hydrogel biomaterials obtained by means of radiation technique. 4TH MEETING ON NUCLEAR APPLICATIONS, 18-22 agosto, 1997, Poços de Caldas. *Proceedings...*

43. RATNER, B.D. Biomedical applications of hydrogels: review and critical appraisal. In: WILLIAMS, D. F. *Biocompatibility of clinical implant materials*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1981. p.145-175.
44. TIGHE, B.; CORKHILL, P. Hydrogels in biomaterials design: is there life after polyHEMA? *Macromol. Reports*, A31, sup. 6 e 7, p.707-713, 1994.
45. RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.D. In: ANDRADE, J.D. *Hydrogels for medical and related applications*. Washington, DC.: ACS Symposium Series, American Chemical Society, 1976. p.1-36.
46. GRAHAM, N.B. Hydrogels in controlled drug delivery. In: PISKIN, E.; HOFFMAN, A.S. (Eds.) *Polymeric biomaterials*. Boston: Martinus Nijhoff, 1986. p. 170-194. (NATO ASI Ser. Ser. E n. 106).
47. CARENZA, M.; VERONESE, M.F. Entrapment of biomolecules into hydrogels obtained by radiation-induced polymerization. *J. Controlled Release*, v. 29, p. 187-193, 1994.
48. VERONESE, F.M.; CALICETI, P.; RAZETI, M.; LORA, S.; CARENZA, M. Methacrylic polymers obtained by radiation induced polymerization for slow release of peptide and protein drug. In: OTTENBRITE, R.M.; CHIellini, E. (Eds.) *Polymer in medicine IV. Biomedical and pharmaceutical applications*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p. 16-23.
49. XIN, L.Z.; CARENZA, M.; KAETSU, I.; KUMAKURA, M.; YOSHIDA, M.; FUJIMURA, T. Immobilization of yeast cells on hydrogels carriers obtained by radiation-induced polymerization. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 40, n. 6, p. 579-584, 1992.

50. CARENZA, M.; YOSHIDA, M.; KUMAKURA, M.; FUJIMURA, T. Hydrogels obtained by radiation-induced polymerization for yeast cells immobilization. *Eur. Polym. J.*, v. 29, n. 7, p. 1013-1018, 1993.
51. PEPPAS, N.A. Physiologically responsive hydrogels. *J. Bioact. Compa. Polym.*, v. 6-July, p. 241-247, 1991.
52. OKANO, T.; YOSHIDA, R. Polymers for pharmaceutical and biomolecular engineering. In TSURUTA, T. *et al. Biomedical applications of polymeric materials*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1993. p. 407-428.
53. HOFFMAN, A.S. "Intelligent" polymers in medicine and biotechnology. *Macromol. Symp.*, v. 98, p. 645-664, 1995.
54. GALAEV, I.Y. "Smart" polymers in biotechnology and medicine. *Russ. Chem. Rev.*, v. 64, n. 5, p. 471-489, 1995.
55. GEHRKE, S.H. Synthesis, equilibrium swelling, kinetics, permeability and applications of environmentally responsive hydrogels. *Adv. Polym. Sci.*, v. 110, n. 81, p. 81-144, 1993.
56. FREITAS, R.F.S., *Extractions with and phase behaviour of temperature-sensitive gels*. Minneapolis: 1986. Dissertation (Ph.D.) - University of Minnesota.
57. SOUZA, R.G.; FREITAS, R.F.S. Determinação do diagrama de fases do hidrogel termossensível copoli(N-isopropilacrilamida). *Polímeros: ciência e tecnologia*, v. 3, p. 32-37, 1995.

- 58.HIRASA, O.; ITO, S.; YAMAUCHI, A.; FUJISHIGE, S.; ICHIJO, H. Thermoresponsive polymer hydrogel. In: DeROSSI, D. et al. *Polymer gels*. New York, NY.: Plenum, 1991. p. 247-256.
- 59.DONG, L.C.; HOFFMAN, A.S.; SADURNI, P. pH sensitive hydrogels based on thermally reversible gels for enteric drug delivery. *Proc. Int. Symp. Controlled Release Bioact. Mater.*, v. 16, n. 35, p. 95-96, 1989.
- 60.SIEGEL, R.A.; FIRESTONE, B.A. Mechanochemical approaches to self-regulating insulin pump design. In: ANDERSON, J.M.; KIM, S.W.; KNUSTSON, K. (Eds.) *Advances in drug delivery systems*. New York, NY.: Elsevier, 1990. p. 181-192.
- 61.OKANO, T.; BAE, Y.H.; JACOBS, H.; KIM, S.W. Thermally on-off switching polymers for drug permeation and release. In ANDERSON, JM.; KIM,S.W.; KNUSTSON, K. (Eds.) *Advances in drug delivery systems*. New York, NY.: Elsevier Science, 1990. p. 255-265.
- 62.DONG, L.C.; HOFFMAN, A.S. Synthesis and application of thermally reversible heterohydrogels for drugs delivery. *J. Controlled Release*, v. 13, p. 21-31, 1990.
- 63.PALASIS, M.; GEHRKE, H. Permeability of responsive poly(N-isopropylacrylamide) gel to solutes. *J. Controlled Release*, v. 18, p. 1-11, 1992.
- 64.BAE, Y.H.; OKANO, T.; HSU, R.; KIM, S.W. Thermo-sensitive polymers as on-off switches for drug release. *Makromol. Chem., Rapid Commun.*, v. 8, p. 481-485, 1987.

65. HOFFMAN, A.S.; AFRASSIABI, .A.; DONG, L.C. Thermally reversible hydrogels: II. Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions. *J. Controlled Release*, v. 4, p. 213-222, 1986.
66. DONG, L.C.; HOFFMAN, A.S. Thermally reversible hydrogels: immobilization of enzymes for feedback reaction control. *J. Controlled Release*, v. 4, p. 223-227, 1986.
67. HOFFMAN, A.S. Applications of thermally reversible polymers and hydrohydrogels in therapeutics and diagnostics. *J. Controlled Release*, v. 6, p. 297-305, 1987.
68. DINARVAND, R.; D'EMANUELE, A.D. The use of thermoresponsive hydrohydrogels for on-off release of molecules. *J. Controlled Release*, v. 36, p. 221-227, 1995.
69. SENEL, S.; ISIK-YURUKSOY, B.; CICEK, H.; TUNCEL, A. Thermoresponsive isopropylacrylamide-vinylpyrrolidone copolymer by radiation polymerization. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 64, p. 1775-1784, 1997.
70. DING, Z.L.; YOSHIDA, M.; ASANO, MA, Z.; OMICHI, H.; KATAKAI, H. Thermo-responsive behaviour of a methacryloyl-DL-alanine methyl ester polymer gel prepared by radiation-induced polymerization. *Radiat. Phys. Chem.* v. 44, n. 3, p. 262-272, 1994.
71. BAE, Y.H.; OKANO, T.; KIM, S.W. Temperature dependence of swelling of crosslinked poly(N,N'-alkyl substituted acrylamides) in water. *J. Poly. Sci., Part B Polym. Phys.*, v. 28, p. 923-936, 1990.

72. TAYLOR, L.D.; CERANKOWSKI, L.D. Preparation of films exhibiting a balanced temperature dependence to permeation by aqueous solutions - A study of lower consolute behavior. *J. Polym. Sci. Chem. Ed.*, v. 13, p. 2551-2563, 1975.
73. MUELLER, K.F. Thermotropic aqueous gels and solutions of N,N-dimethylacrylamide-acrylate copolymers. *Polymer*, v. 33, n. 16, p. 3470-3476, 1992.
74. CHEN, G.; HOFFMAN, A.S. Temperature-induced phase transition behaviors of random vs. graft copolymers of N-isopropylacrylamide and acrylic acid. *Macromol. Rapid Commun.*, v.16, p. 174-182, 1995.
75. INOMATA, H.; WADA, N.; YAGI, Y.; GOTO, S.; SAITO, S. Swelling behaviours of N-alkylacrylamide gels in water: effects of copolymerization and crosslinking density. *Polymer*, v.36, n. 4, p. 875-877, 1995.
76. YOSHIDA, M.; ASANO, M.; KUMAKURA, M.; KATAKI, R.; MASHIMO, T.; YUASA, H.; YAMANAKA, H. Thermo-responsive hydrogels based on acryloyl-L-proline methyl ester and their use as long-acting testosterone delivery systems. *Drug Des. Delivery*, v. 7, p. 159-174, 1991.
77. YOSHIDA, M.; OMICHI, H.; KATAKAI, R. Light-scattering study of temperature-responsive poly(acryloyl-L-proline methyl ester). *Eur. Polym. J.*, v. 28, n. 9, p. 1141-1145, 1992.
78. SAFRANJ, A.; YOSHIDA, M.; OMICHI, H.; KATAKAI, R. Surfactant effect on the inverse volume phase transition of a polymer with amino acid side chains. *Langmuir*, v. 9, n. 12, p.3338-3340, 1993.

79. MIYAJIMA, M.; YOSHIDA, M.; SATO, H.; OMICHI, H.; KATAKAI, R.; HIGUCHI, W.I. Controlled release of 9- β -D-arabinofuranosyladenine from thermo-responsive devices based on acryloyl-L-proline methyl ester. *Int. J. Pharm.*, v. 95, p. 153-160, 1993.
80. YOSHIDA, M.; OMICHI, H.; KUBOTA, H.; KATAKAI, R.; Studies of coil-globule transition and cross-linking of poly(acryloyl-L-proline methyl ester) prepared by radiation-induced polymerization. *J. Intell. Mater. Syst. Struct.*, v. 4, p. 223-228, 1993.
81. MIYAJIMA, M.; YOSHIDA, M.; SATO, H.; OMICHI, H.; KATAKAI, R.; HIGUCHI, W.I. In vitro release of 9- β -D-arabinofuranosyladenine from thermo-responsive copoly(acryloyl-L-proline methyl ester/styrene) hydrogels. *Eur. Polym. J.*, v. 30, n. 7, p. 827-831, 1994.
82. YOSHIDA, M.; SAFRANJ, A.; OMICHI, H. Polymerization, Self-Bridging, and Degradation of Acryloyl- and Methacryloyl-L-proline Methyl Esters Induced by Radiation and Characteristics of Gel Swelling. *Macromolecules*, v. 29, p. 2321-2323, 1996.
83. YOSHIDA, M.; TAMADA, M.; KUMAKURA, M.; KATAKI, R. Synthesis of methacryloyl-L-derivatives having various carboxyl-protecting groups and thermo-response of its polymers hydrogels. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 38, n. 1, p. 7-10, 1991.
84. MARTELLINI, F.; HIGA, O.Z.; TAKACS, E.; SAFRANAJ, A.; YOSHIDA, M.; KATAKAI, R.; CARENZA, M. Thermally reversible gels based on acryloyl-L-proline methyl ester as drug delivery systems. *Radiat. Phys. Chem.*, 1998, no prelo.

85. ROWLAND, S.P.; STANLEY, P. *Water in polymers*. Washington DC: ACS Symposium Series, 1980. p. 1-8.
86. JHON, M.S.; ANDRADE, J.D. Water and hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.*, v.7, p.509-522, 1973.
87. RATNER, B.D. Hydrogels surfaces. In: PEPPAS, N.A. *Hydrogels in medicine and pharmacy*. Boca Raton, Fla.: CRC, 1987. V. I: Fundamentals. p. 85-93.
88. HATAKEYEMA, T.; YAMAUCHI, A. Studies on bound water in poly(vinyl alcohol). Hydrogel by DSC and FT-NMR. *Eur. Polym. J.*, v. 20, n.1, p. 61-64, 1984.
89. TANIGAMI, T. ONO, T.; SUDA, N.; SAKAMAKI, Y.; YAMAURA, Z.; MATSUZAWA, S. *Macromolecules*, v. 22, p. 1397-1401, 1989.
90. SUNG, Y.K.; GREGONIS, D.E.; JOHN, M.S.; ANDRADE, J.D. Thermal and pulse NMR analysis of water in poly(2-hydroxyethyl methacrylate). *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 26, p. 3719-3728, 1981.
91. QUINN, F.X.; KAMPFF, E.; SMYTH, G.; McBRIERTY, V.J. Water in hydrogels. 1. A study of water in ploy(N-vinyl-2-pyrrolidone/methyl methacrylate) copolymer. *Macromolecules*, v. 21, p. 3191-3198, 1988.
92. SMYTH, G.; QUINN, F.X.; McBRIERTY, V.J. . Water in hydrogels. 2. A study of water in poly(hydroxyethyl methacrylate). *Macromolecules*, v. 21, p. 3198-3204, 1988.
93. CHAN, K.; HIROTSU, T.; HATAKEYAMA, T. DSC Studies on bound water in polypropylene films plasma-grafted with 2-hydroxyethyl acrylate and

- acrylic acid or methacrylic acid. *Eur. Polym. J.*, v. 28, n. 9, p. 1021-1025, 1992.
- 94.ALLEN, P.E.M.; BENNETT, D.J.; WILLIAMS, D.R.G. Water in methacrylates-IV. Structures and organization in poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-glycol dimethacrylate) networks. *Eur. Polym. J.*, v. 29, n. 2/3, p. 231-236, 1993.
- 95.DONG, L.C.; HOFFMAN, A.S. Synthesis and application of thermally reversible heterogels for drugs delivery. *J. Controlled Release*, v.13, p.21-31, 1990.
- 96.CARENZA. M.; COJAZZI, G.; BRACCI, B.; LENDINARA, L.; VITALI, L.; ZINCANI; M.; YOSHIDA, M.; KATAKAI, R.; TAKACS, E.; HIGA O.Z.; MARTELLINI, F. The state of water in thermoresponsive poly(acryloyl-L-proline methyl ester) hydrogels observed by DSC and relaxometry $^1\text{H-NMR}$. *Radiat. Phys. Chem.*, no prelo.
- 97.MARTELLINI, F., HIGA O.Z.; TAKACS, E.; SAFRANAJ, A.; YOSHIDA, M.; KATAKAI, R.; CARENZA. M. Intelligent drug delivery systems obtained by radiation. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 52, n. 1-6, p. 295-299, 1998..
- 98.MURTO, J. Hydroxide-alkoxide ion equilibria and their influence on chemical reactions. In: PATAI, S. *The chemistry of the hydroxyl group*. New York, NY.: Interscience, 1980. p. 1087-1115.
- 99.FINEMAN, M.; ROSS, S.D. Linear method for determining reactivity ratios in copolymerization.. *J. Polym. Sci. Lett. Ed.*, v. 2, p. 259-265, 1949.

100. SMITH, E.L.; HILL, R.L.; LEHMAN, I.R.; LEFKOWITZ, R.J.; HANDLER, P.; White, A. *Bioquímica. Aspectos gerais*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p. 199-213.
101. DIEM, K. Documenta Geigy, Tablas Científicas. Basilea (Suiza), J. R. Geigy S.A.: 1965. p. 320-321.
102. SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
103. CHAPIRO, A. Radiation induced polymerization. *Radiat. Phys. Chem.*, v. 14, p. 101-116, 1979.
104. CHAPIRO, A. Radiation chemistry of polymeric systems. New York, NY.: Interscience, 1962.
105. MAYO, F.; LEWIS, F.M. Copolymerization. I. A basis for comparing the behavior of monomers in copolymerization; a copolymerization of styrene and methyl methacrylate. *J. American Sci. Part A*, v. 66, p.1594-1601, 1944.
106. ELIAS, H.G. *Macromolecules 1. Structure and properties*. New York, NY.: Plenum, 1964. p. 755-799.
107. MARK, H.F.; BIKALES, N.M.; OVERBERGER, C.G.; MENGES, G. *Encyclopedia of polymer science and engineering*. New York, NY.: Wiley-Interscience, 1985. V. 4: Composites, fabrication to die design. p. 192-231.

108. WALL, F.T. The structure of copolymers. II *J. Am. Chem. Soc.*, v.66, p.2050-2057, 1944.
109. FU, T.; MORAWETZ, H. Enzymatic attack on side chains of synthetic polymers. *J. Biol. Chem.*, v. 23, n.7, 2083-2086, 1876.
110. LEHNINGER, A.L. *Princípios da bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1988.
111. PRIGOGINE, I.; DEFAY, R. *Thermodynamique chimique*. Paris: Desoer, 1950. p. 244-310.
112. PRIGOGINE, I. *The molecular theory of solutions*. Amsterdam: North-Holland, 1957. p. 1-21.
113. DUSEK, K. Transition in swollen polymer networks induced by intramolecular condensation. *J. Polym. Sci., Part A-2 Polym Phys.*, v.6, p. 1209-1216, 1968.