

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Ciência e Tecnologia de Materiais

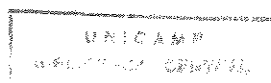
**SÍNTESE DE PÉROLAS DO HIDROGEL DE POLI-2-
HEMA E ESTUDO DE SUA UTILIZAÇÃO EM
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS.**

AUTORA: Denise Pacífico

ORIENTADORA: Profa. Dra. Lúcia H. I. Mei

Dissertação de Mestrado submetida à Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Química de Campinas - UNICAMP como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Campinas - SP - Brasil
Dezembro - 1995



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	7/UNICAMP
	P119
V. E.	
TOMBO	28267
PREÇO	667/96
C ☐ D ☒	
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	15/08/96
N.º CPD	

CM-00090906-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

P119s Pacífico, Denise
Síntese de pérolas do hidrogel de poli-2-HEMA e estudo de sua utilização em liberação controlada de drogas / Denise Pacífico.--Campinas, SP: [s.n.], 1996.

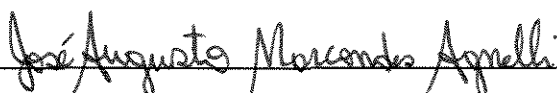
Orientadora: Lúcia H. I. Mei.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Drogas. 2. Polímeros. 3. Tecnologia de liberação controlada. I. Mei, Lúcia H. I.. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Tese defendida e aprovada em 07 de dezembro de 1995 pela banca
examinadora constituída pelos professores:



Profª Drª Lucia Helena Innocentini Mei



Prof Dr. José Augusto Marcondes Agnelli



Prof. Dr. Roger Josef Zemp

Esta versão corresponde à redação final da dissertação de mestrado em Engenharia Química defendida pela aluna Denise Pacífico e aprovada pela comissão julgadora em 07/12/1995.



Prof. Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei

**Aos meus pais,
por todo amor e estímulo
em todos os momentos.**

AGRADECIMENTOS

À Profa.Dra. Lúcia Helena Innocentini Mei pela orientação dedicada a este trabalho.

Ao Instituto de Química da Unicamp, pela utilização do Espectrofotômetro, em especial:

Prof.Dr.Edward Bruns, Dr. Patrício Peralta e Cláudia Martelli.

À Faculdade de Engenharia Mecânica, pela utilização do Microscópio Eletrônico de Varredura, em especial:

Rita H. B. Jacon.

Às técnicas do laboratório: Carla, Veruska e Daniela pelo auxílio nos trabalhos de laboratório.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Engenharia Química.

Ao CNPq pela bolsa de estudos.

À todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ser realizado.

RESUMO

Este trabalho teve como meta principal a síntese de pérolas de tamanho uniforme do hidrogel de poli-2-hidroxietilmetacrilato (poli-2-HEMA) e o estudo de sua utilização em sistemas de liberação controlada de drogas.

A síntese foi feita utilizando-se alginato de cálcio como molde de polimerização e obteve-se, como resultado final, pérolas uniformes (2-3 mm de diâmetro) do hidrogel poli-2-HEMA.

As pérolas do hidrogel foram utilizadas em estudos de absorção e liberação de substâncias (ácido fólico e o corante alaranjado de metila), através de um método de otimização estatístico denominado Planejamento Fatorial, onde estudou-se a influência de três importantes variáveis (pH, tempo e Temperatura) e suas interações na resposta, que no caso deste trabalho foi a Absorbância de uma solução.

Os melhores resultados foram obtidos com o corante alaranjado de metila cujas equações para os processos de absorção e liberação, são, respectivamente:

$$A = 0.5193 + 0.1050 \text{ pH} - 0.0343 t$$

$$A = 0.0289 - 0.0119 \text{ pH} + 0.0143 t - 0.0034 \text{ pH} \times t$$

Em ambos os casos, absorção e liberação, observou-se que baixo pH e longo tempo favoreceram os processos; alto pH degradou o polímero e Temperatura não teve influência significativa na resposta.

Através da Microscopia Eletrônica de Varredura obteve-se fotomicrografias que permitiram observar a porosidade das pérolas do hidrogel.

ABSTRACT

The aim of this work was the synthesis of poly-2-hydroxyethylmethacrylate (poly-2-HEMA) hydrogel and its utilization as drug delivery system.

The synthesis was carried out using calcium alginate as moulder for the polymerization reaction and the result obtained was the hydrogel beads of poly-2-HEMA with uniform size of 2-3mm in diameter.

These beads were furthermore utilized to the study of absorption and release of folic acid and methyl orange applying a Statistical Technique following the influence of three important variables as pH, time and temperature as well as their interactions with the data measured, that is, absorbance of the solution.

The best results were obtained with the methyl orange whose equations for the absorption and delivery process are respectively:

$$A = 0.5193 + 0.1050 \text{ pH} - 0.0343 t$$

$$A = 0.0289 - 0.0119 \text{ pH} + 0.0143 t - 0.0034 \text{ pH} \times t$$

In both cases it was observed that low pH and long time affect the process; high values of pH degrade the polymer and polymer and temperature did not influence significantly the results.

Through MEV it was obtained the micrography that allowed us to observe the porosity of the hydrogel beads.

OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo a otimização das condições de síntese do hidrogel de poli-2-HEMA para liberação controlada de drogas tendo em vista que:

a) no Brasil, o desenvolvimento e uso de hidrogéis, principalmente na área médica, ainda se constitui numa tecnologia pouco explorada;

b) o uso de Planejamento Estatístico para selecionar as condições ótimas de trabalho tem sido cada vez mais frequente em trabalhos desta natureza;

c) nenhum tratamento estatístico sobre este sistema foi encontrado na literatura.

ÍNDICE

1. Introdução	01
1.1. Hidrogéis	01
1.2. Alginatos	02
1.3. Tecnologia da Liberação Controlada	06
2. Revisão	20
2.1. Importância do Sistema de Liberação Controlada de Drogas	20
2.2. Importância dos hidrogéis em Sistemas de Liberação Controlada de Drogas	27
2.3. Quimiometria	36
3. Materiais e Métodos	38
3.1. Síntese de pérolas de tamanho uniforme do hidrogél de poli-2-HEMA	38
3.2. Estudo da absorção e liberação de drogas pelas pérolas do hidrogél de poli-2-HEMA	39
3.3. Estudo da absorção de substâncias com variação de Peso Molecular pelas pérolas do hidrogél de poli-2-HEMA	41
3.4. Verificação da porosidade das pérolas do hidrogél de poli-2-HEMA por microscopia eletrônica de varredura	42
4. Resultados	43
4.1. Ensaios realizados com o Ácido Fólico	43
4.2. Ensaios realizados com o Alaranjado de Metila	48
5. Discussão dos Resultados	65
5.1. Quanto à síntese do hidrogél.	65
5.1.1. Função dos Reagentes	65
5.1.2. Processo de Síntese	67
5.2. Quanto a absorção e liberação de substâncias pelas pérolas do hidrogél	68
5.3. Curvas de Liberação Controlada	75
5.4. Estudo da absorção de substâncias com variação de Peso Molecular	76
5.5. Microscopia Eletrônica de Varredura	77
6. Conclusões	78
7. Sugestões para Próximos Trabalhos	80
8. Apêndice	81

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

FIGURAS

Figura 1.	Estrutura Proposta para o gel de Alginato de Cálcio	03
Figura 2.	Estrutura Conformacional do Ácido Manurônico	04
Figura 3.	Estrutura Conformacional do Ácido Gulurônico	05
Figura 4.	Estrutura dos segmentos do polímero contidos no alginato	05
Fig. 5a e 5b.	Sistema de doses repetidas x sistema de liberação controlada	08
Figura 6.	Sistema biodegradável	14
Figura 7a.	Sistema de reservatório de liberação de droga por difusão	16
Figura 7b.	Sistema Monolítico de liberação de droga por difusão	17
Figura 8.	Efeito do carregamento na difusão de uma matriz polimérica	18
Figura 9.	Difusão através de uma membrana permeável	19
Figura 10.	Esboço do hidrogel convencional e hidrogel LCST macroporoso	34
Figura 11.	Curva de calibração do ácido fólico	44
Figura 12.	Absorbância x λ (nm) do ácido fólico	45
Figura 13.	Absorbância x λ (nm) em função do pH para alaranjado de metila	52
Figura 14.	Curva de liberação do alaranjado de metila c/ troca de solução	54
Figura 15.	Curva de liberação do alaranjado de metila s/ troca de solução	54
Figura 16.	Absorbância x λ (nm) para o alaranjado de metila	56
Figura 17.	Absorbância x λ (nm) para o nitroblue tetrazolium	57
Figura 18.	Absorbância x λ (nm) para a vitamina B12	58
Figura 19.	Curva de absorção com variação de PM	60
Figura 20.	Fotografia da Pérola do hidrogel de poli-2-HEMA	61
Figura 21.	Fotografia da uniformidade das pérolas do hidrogel de poli-2-HEMA	62
Figura 22.	Interior poroso da pérola do hidrogel de poli-2-HEMA	63
Figura 23.	Poros das pérolas do hidrogel de poli-2-HEMA	64
Figura 24.	Fórmula estrutural do Ácido Fólico	68
Figura 25.	Fórmula estrutural do Alaranjado de Metila	70
Figs 26a,26b,26c.	Gráficos do programa fatorial para absorção (alaranjado de metila)	73
Figs 27a,27b,27c.	Gráficos do programa fatorial para liberação (alaranjado de metila)	74
Figs 28	Curvas Comparativas da Liberação Controlada do Alaranjado de Metila	75
Figs 29	Curvas Comparativas de Absorção de Substâncias	76

TABELAS

Tabela 1.	Aplicações médicas das drogas poliméricas	09
Tabela 2.	Algumas aplicações médicas de sistemas de liberação controlada	26
Tabela 3.	Curva de calibração do ácido fólico	43
Tabela 4.	Variação de absorbância em função do pH para soluções de ácido fólico	43
Tab. 5a e 5b.	Planejamento fatorial para absorção do ácido fólico	46
Tabela 6.	Resultados dos efeitos no processo de absorção do ácido fólico	47
Tabela 7.	Planejamento fatorial para liberação do ácido fólico	47
Tabela 8.	Resultados dos efeitos no processo de liberação do ácido fólico	47
Tabela 9.	Absorbância x pH x λ (nm) para o alaranjado de metila	48
Tab. 10a e 10b.	Planejamento fatorial para absorção do alaranjado de metila	48
Tabela 11.	Resultados dos efeitos no processo de absorção do alaranjado de metila	49
Tab. 12a e 12b.	Planejamento fatorial para liberação do alaranjado de metila	50
Tabela 13.	Resultados dos efeitos no processo de liberação do alaranjado de metila	51
Tabela 14a.	Curva de liberação do alaranjado de metila c/ troca de solução	53
Tabela 14b.	Curva de liberação do alaranjado de metila s/ troca de solução	53
Tab. 15a,15b,15c.	Variação de absorbância em função do pH para as substâncias: alaranjado de metila, nitroblue tetrazolium e vitamina B12	55
Tab. 16a,16b,16c.	Absorção do alaranjado de metila, nitroblue tetrazolium e vitamina B12	59

INTRODUÇÃO

1.1) HIDROGÉIS^(12,36,48)

Hidrogéis, ou géis contendo água, são polímeros caracterizados por sua hidrofilicidade e insolubilidade em água.

Em meio aquoso, estes polímeros entumescem (ou incham) até um volume de equilíbrio, mas preservam seu formato. A hidrofilicidade é devida à presença de grupos solúveis em água tais como: -OH, -COOH, -CONH₂, -CONH, -SO₃ H, etc.; presentes na cadeia polimérica.

A insolubilidade e a estabilidade do formato destes géis são devidas à presença de uma rede tridimensional. O estado entumescido resulta de um balanço entre as forças de dispersão atuando nas cadeias hidratadas e forças coesivas devidas às ligações covalentes cruzadas.

Outras interações características também estão presentes, isto é, eletrostáticas e dipolo-dipolo.

O grau e a natureza das ligações cruzadas são responsáveis por suas características no estado entumescido.

A habilidade de absorver água e/ou íons sem a perda de seu formato ou de suas propriedades mecânicas é muito importante em muitos hidrogéis naturais tais como aqueles encontrados em músculos, tendões, cartilagens, intestinos e sangue.

Hidrogéis naturais são encontrados por exemplo em polpa de frutas, na produção de papel, na seda artificial, nas membranas celulósicas, tendo ampla aplicação na área biomédica.

Hidrogéis sintéticos são usados em próteses, lentes de contato e membranas para liberação controlada de drogas, devido à sua compatibilidade com os tecidos vivos.

Membranas de separação e de troca de íons são hidrogéis, embora o termo hidrogel seja usualmente restrito a um polímero sintético, macio, com consistência de borracha e que entumesce em água.

A característica deste tipo de material polimérico é determinada através dos monômeros hidrofílicos e da densidade de rede do polímero (ou densidade de ligações cruzadas, as quais são responsáveis pela formação de uma estrutura em rede dentro do polímero).

Géis com carga ou ionogênicos formam um grupo especial, com entumescimento e propriedades mecânicas dependentes do pH do meio. Hidrogéis tem sido classificados de várias maneiras. Um limitado número de monômeros, copolimerizados de várias formas, tem

contribuído com um aumento à imensa variedade de hidrogéis já existentes.

O entumescimento e a permeação dos hidrogéis refletem as propriedades internas dos mesmos.

Convém lembrar que a permeação e a difusão não são exclusivas para hidrogéis, os quais obedecem às mesmas leis que outros materiais.

A permeação em hidrogéis tem uma importância singular em duas aplicações: a permeação de oxigênio através das lentes de contato e a permeação de drogas em hidrogéis através de um sistema controlado. A permeabilidade ao oxigênio é de fundamental importância para as lentes de contato de uso contínuo.

Dentre outras aplicações os hidrogéis são empregados principalmente na medicina como biomateriais usados em diagnósticos, em recursos terapêuticos e em implantes. Recursos diagnósticos incluem sondas (cateteres), carregadores de enzimas em testes imunológicos, substrato para cultura de células e géis para eletroforese.

Aplicações terapêuticas incluem revestimentos adsorventes para desintoxicação do sangue, sistemas de liberação controlada de drogas e lentes de contato enquanto em implantes incluem lentes intra-oculares, córneas artificiais e substitutos de tecidos delicados.

Hidrogéis são também usados para fixação de herbicidas, em cromatografia, como carregadores de enzimas, em processamento de alimentos e também como membranas de separação.

1.2) ALGINATOS^(11,16,25,53):

Desde 600 a.C., algas marinhas eram usadas como alimento para o homem, mas as alginas, um componente das algas marinhas, foi primeiramente descoberto pelo químico inglês E.C.C. Stanford em 1880.

Em 1896, A. Krefting preparou o ácido algínico puro. Em 1929, a Kelco Company começou a produção comercial de alginatos e introduziu a algina solúvel em leite como um estabilizante de sorvetes em 1934. Em 1944, o propileno glicol alginato foi desenvolvido.

Algina é um polissacarídeo encontrado em todas as algas marinhas marrons, as quais crescem em terras rochosas ou em áreas oceânicas limpas e de fundo rochoso.

Somente poucas espécies de algas marrons são usadas para produção comercial de algina.

A principal fonte de fornecimento mundial de algina é a espécie *Macrocystis pyrifera*, encontrada ao longo da costa da América do Norte e do Sul, Nova Zelândia, Austrália e África.

Outras espécies de algas usadas para a fabricação de alginas são: *Ascophyllum nodosum* e espécies de *Laminaria* e *Ecklonia*.

A algina existe na parede da célula como uma mistura de sais insolúveis (cálcio, magnésio, sódio, potássio do ácido alginico). O ácido alginico é um composto linear de alto peso molecular formado exclusivamente de ácido D-manurônico e L-gulurônico.

A algina é usada em alimentos e aplicações industriais gerais devido ao seu comportamento coloidal único e sua capacidade para espessar, estabilizar, emulsificar, suspender, formar filmes e produzir géis.

Alginatos puros são dissolvidos em água destilada formando soluções homogêneas com características bem fluidas. As variáveis físicas que afetam a propriedade de fluidez das soluções de alginato são: temperatura, tamanho do polímero, concentração e a presença de solventes miscíveis em água destilada.

As variáveis químicas que afetam as soluções de algina são: pH e a presença de sequestrantes, sais monovalentes, cátions polivalentes e compostos quaternários de amônio.

Devido ao seu alto peso molecular e rigidez molecular, o alginato de sódio forma soluções de alta viscosidade aparente, até mesmo em baixas concentrações.

Polímeros de algina reagem com muitos cátions polivalentes (exceto magnésio) para formar ligações cruzadas. Quando a quantidade do íon polivalente aumenta, a solução de algina fica mais viscosa, então gelifica e finalmente precipita.

Uma estrutura proposta do gel alginato no qual íons de cálcio estão ligados entre os segmentos associados da cadeia do polímero é mostrado a seguir.

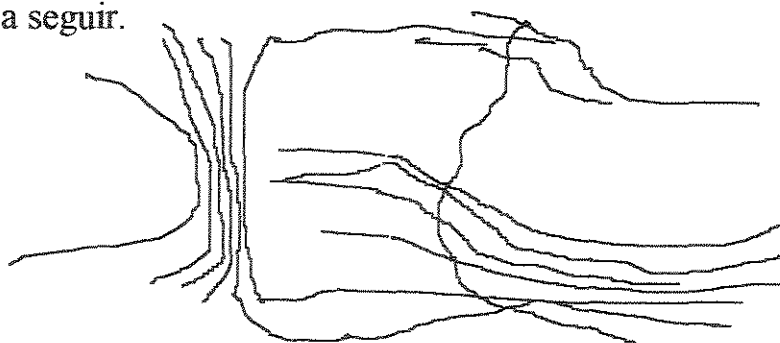


Figura 1: Estrutura proposta para o gel de alginato de cálcio ⁽⁵³⁾

Devido a sua alta afinidade por água, sua total ausência de toxicidade e sua habilidade de formar soluções viscosas e géis, alginatos tem sido amplamente utilizados.

Mais recentemente, sua habilidade de formar géis muito rapidamente na presença de íons cálcio sob condições extremamente brandas tem sido explorada para imobilização de partículas de enzimas.

As figuras 2, 3 e 4, a seguir, mostram as estruturas conformacionais dos ácidos manurônico e gulurônico que formam as cadeias lineares do polímero de alginato, assim com o seu arranjo mais comum é o de copolímero em bloco onde longas sequências homopoliméricas de resíduos do ácido manurônico (blocos M-M) e sequências similares de resíduos do ácido gulurônico (blocos G-G) estão espaçadas por sequências de composição mista (blocos M-G):

MMMMMM-MGMGMG-GGGGGG

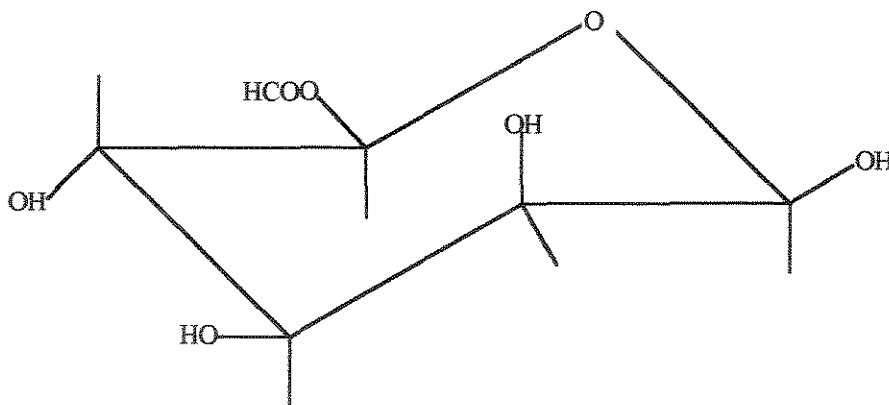


Figura 2 : Estrutura Conformacional do Ácido Manurônico ⁽⁵³⁾

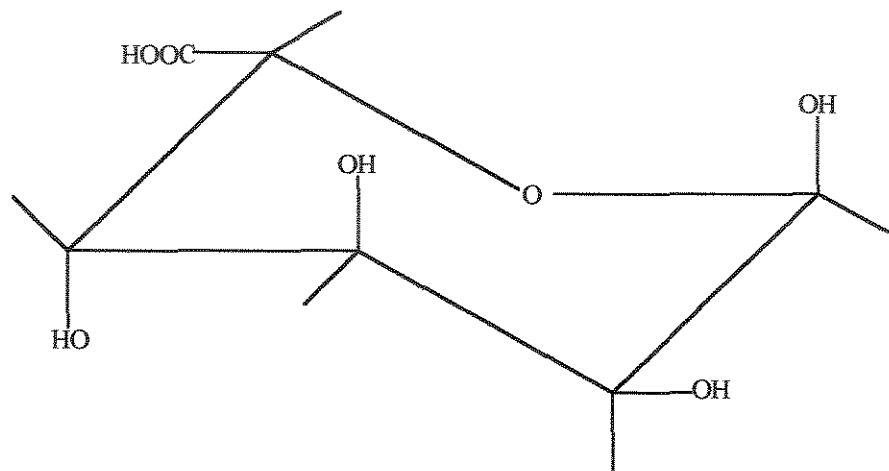


Figura 3: Estrutura Conformacional do Ácido Gulurônico ⁽⁵³⁾

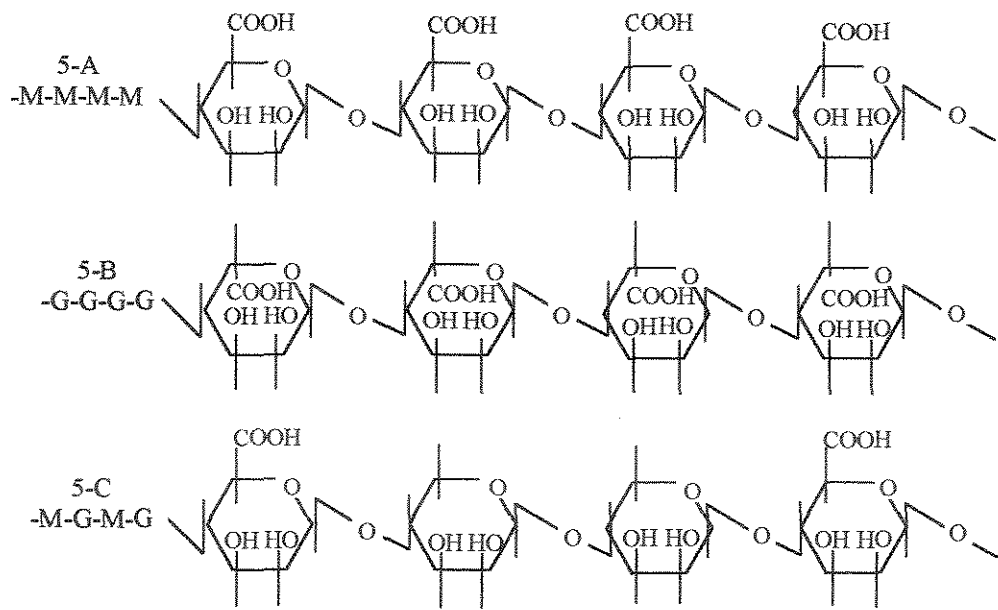


Figura 4: Estrutura dos Segmentos do Polímero Contidos no Alginato ⁽⁵³⁾

1.3) TECNOLOGIA DA LIBERAÇÃO CONTROLADA^(10,13,23,44,45,46)

A tecnologia de liberação controlada se tornou mais conhecida durante a década de 80 como uma metodologia comercialmente sólida.

A realização de uma liberação reprodutível de um agente, dentro de um meio específico e sobre um extenso período de tempo, tem muitos méritos significativos. O mais significativo é a criação de um meio desejado com resposta ótima, efeitos colaterais mínimos e eficácia prolongada.

Considera-se portanto que esta é uma tecnologia relativamente nova, a qual requer uma abordagem científica interdisciplinar.

Sistemas poliméricos de liberação controlada têm sido usados para uma grande série de substâncias em um grande número de meios, sendo que sua aplicação mais popular tem por objetivo principal a administração terapêutica efetiva de drogas por um extenso período de tempo.

Estas técnicas são úteis também em agricultura para criar um meio contínuo de liberação de nutrientes do solo, de inseticidas, de herbicidas e outros.

Por muitos séculos, farmacologistas tem tido interesse na liberação de agentes bioativos, mas, até recentemente, o sucesso era limitado às pomadas e cataplasmas (papas medicamentosas que eram aplicadas entre dois panos a uma parte do corpo para resolver problemas de inflamações).

Durante a década de 60 uma abordagem sistemática maior para o modelo e a preparação de novos sistemas de liberação começou a ser feita e durante a década de 70 se tornou evidente que um esforço interdisciplinar envolvendo química, ciência dos polímeros, engenharia e ciências básicas de saúde era necessário.

Assim, o desenvolvimento desta nova tecnologia começou envolvendo companhias pequenas. Entretanto, durante a década de 80, houve um maior interesse das companhias químicas e farmacêuticas de maior porte que adquiriram uma tecnologia significativa através de licenças e compras das pequenas companhias de risco.

Abordagens mais novas e sofisticadas para a liberação controlada estão sendo continuamente desenvolvidas, podendo se encontrar muitos artigos na literatura sobre o tema.

Um sistema de liberação farmacêuticamente ideal libera a droga somente quando e onde ela é necessária e na concentração apropriada para o efeito terapêutico desejável.

Neste sentido, sistemas poliméricos para a liberação controlada em geral têm sido bastante explorados.

Fármacos em potencial, sem uso porque são instáveis, podem vir a ser drogas viáveis se liberadas por um sistema de liberação controlada adequado.

Muitas vezes, é desejável controlar a liberação do agente farmacologicamente ativo para manter a concentração terapêutica do sangue sem alcançar níveis tóxicos. Isto é geralmente descrito como liberação de ordem-zero, como é esquematicamente ilustrado na figura 5b abaixo em comparação com a figura 5a, que representa o sistema de doses repetidas.

Nestes casos, a liberação pode ser realizada por bombas osmóticas, por bombas mecânicas, por difusão através de uma matriz polimérica, por difusão através de uma membrana ou através de sistemas biodegradáveis. É conveniente lembrarmos que certas matrizes poliméricas contêm ligações enzimáticas lábeis ou hidrolíticas que ao serem rompidas dão origem à corrosão da matriz induzindo à liberação do agente ativo.

Sistemas poliméricos de liberação controlada podem ser classificados como^(4,13,23,46):

- a) sistemas de drogas poliméricas
- b) sistemas controlados quimicamente
- c) sistemas de difusão controlada.

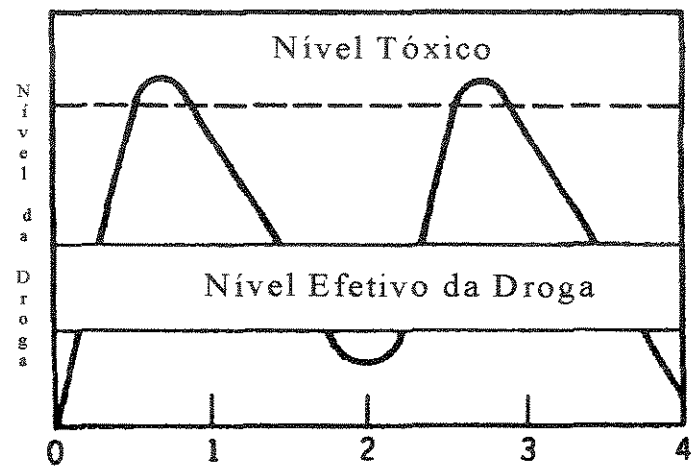


Figura 5a: Sistema de Doses Repetidas

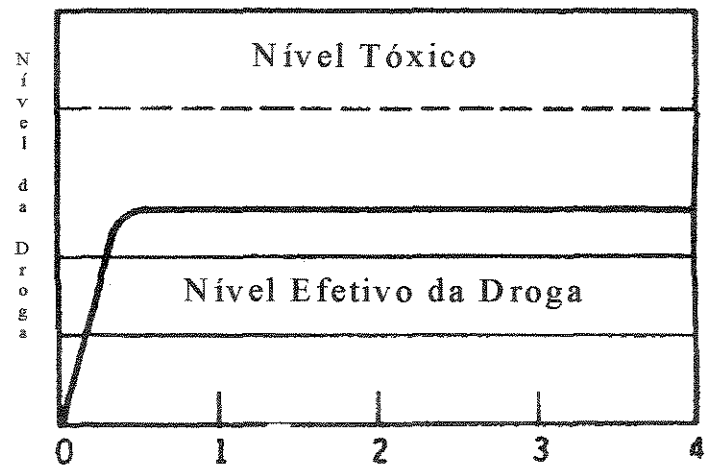


Figura 5b: Sistema de Liberação Controlada Ideal

a) Sistemas de Drogas Poliméricas: Sistemas de drogas poliméricas incluem macromoléculas que contêm uma atividade biológica própria e macromoléculas que servem como carregadores para as drogas.

Drogas Poliméricas: O desenvolvimento das áreas de bioquímica e biologia molecular tem resultado na elucidação da estrutura e função de muitas moléculas poliméricas úteis no tratamento de organismos vivos. Consequentemente, tem sido realizadas significativas pesquisas, considerando a síntese e as propriedades de polímeros fisiologicamente ativos.

É possível preparar macromoléculas com estrutura pré-determinada, peso molecular desejado e grupos funcionais específicos. As vantagens das drogas poliméricas são que os polímeros exibem ação demorada, atividade prolongada, decréscimo da taxa do metabolismo da droga e excreção da droga.

A atividade biológica demonstrada por compostos poliméricos pode ser resultado do próprio polímero, como é o caso dos poliânions, feitos de monômeros inativos, ou pode ser resultado da polimerização ou copolimerização de uma conhecida droga monomérica ativa.

Por exemplo, um copolímero uréia-formaldeído, conhecido pelo nome comercial de Anaflex, tem sido usado como agente antibacterial e antifungos.

Outras drogas poliméricas em uso são mostradas na tabela descrita a seguir:

Tabela 1) Aplicações Médicas das Drogas Poliméricas⁽¹³⁾

APLICAÇÕES	SISTEMA POLIMÉRICO
agente antibacterial	polímeros quaternários de amônio polímeros polianiônicos polipeptídeos
agente antifungos agente antiviral	polímeros polianiônicos polímeros uréia-formaldeído
agente antitumor	polímeros polianiônicos polímeros quaternários de amônio

anticoagulante	polímeros polianiônicos heparina
tratamento antisilicose	poli-(N-óxido)

Muitas drogas monoméricas ativas perdem sua atividade na forma polimérica, mas outras exibem elevada atividade. Por exemplo, a maioria dos aminoácidos não exibem atividade antibacterial na forma de monômero, mas se tornam muito ativos quando polimerizados e administrados como sais catiônicos.

O exemplo mais notável é a L-lisina, a qual não tem atividade antibacterial aparente como monômero mas é muito ativa contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* como poliamida. Um grande número de polímeros e copolímeros tem sido preparados de diferentes drogas ativas como monômeros. Este estudo concluiu que polimerização ou copolimerização de drogas podem aumentar, diminuir, ou não ter efeito na atividade biológica do material resultante. A polimerização de drogas monoméricas ativas tem em muitos casos toxicidade diminuída, mas pode também ter efeito oposto.

Em sistemas de drogas poliméricas, as variáveis mais importantes que aparentemente regulam a atividade biológica são: estrutura molecular e estereoquímica. Estes dois fatores estão evidentes na maior parte dos sistemas poliméricos devido ao Peso Molecular, propriedades copoliméricas, enrolamento e dobramento de cadeias, ligações cruzadas, taticidade e características eletrolíticas.

Certas propriedades características dos sistemas poliméricos podem estar correlacionadas com a atividade biológica. Consequentemente, mais detalhes de estudos estrutura-reatividade de drogas poliméricas são necessários para servir como base para um futuro modelo de droga.

Drogas poliméricas tem sido extensivamente aplicadas em tratamentos de câncer. Poliânions sintéticos tem mostrado excelente potencial em muitos estudos. Muitos polímeros de ácidos carboxílicos possuem atividade antitumor, mas são tóxicos.

Carregadores de Drogas Poliméricas ou Drogas Poliméricas Conjugadas:

A maior parte dos medicamentos são micromoleculares em tamanho quando comparados aos polímeros e, portanto, são relativamente livres para difundirem-se através dos sistemas biológicos. Consequentemente, tem sido difícil a administração de drogas de forma localizada, ficando

concentrada dentro de um tecido ou órgão desejado. Uma das saídas viáveis para isto tem sido a interação de polímeros, que possuem difusão lenta, com agentes farmacológicos na tentativa de se obter um biopolímero com atividades farmacológicas distintas. Estes carregadores poliméricos de drogas têm exibido propriedades desejáveis tais como: liberação lenta de drogas e atividade prolongada.

É conveniente lembrar que o agente farmacológico é aquele responsável pela resposta fisiológica e ele pode estar ligado permanentemente à matriz polimérica por uma ligação estável, do tipo covalente, entre a droga e o polímero ou pode estar ligado temporariamente, via forças secundárias, e ser removido por hidrólise ou por um processo enzimático. O sistema de transporte para estes carregadores poliméricos de drogas solúveis pode ser feito de modo específico para determinadas células de um tecido pela presença de grupos sensíveis ao pH ou componentes receptores ativos, isto é, antígeno-anticorpo.

Grupos solubilizantes tais como carboxilatos, aminas quaternárias e sulfonatos são adicionados para aumentar a hidrofiliabilidade e solubilidade de todo o sistema macromolecular em meio aquoso, enquanto que grupos alquil ajustam a hidrofobicidade e solubilidade em regiões lipídicas.

A especificidade de polímeros farmacocinéticos é devido ao seu alto Peso Molecular, o que impede o transporte através de certas barreiras.

Portanto, pelo controle do Peso Molecular do carregador polimérico de drogas é possível regular a passagem da droga pelo cérebro, sua excreção pelo rim ou seu acúmulo no baço, fígado ou outros órgãos.

A aplicação de fundamentos da teoria de transporte macromolecular para biopolímeros e tecidos biológicos tem sido feita com sucesso, em planejamento, fabricação e predição da performance *"in vivo"* de sistemas de liberação controlada. Consequentemente, usando-se somente a variação de Peso Molecular, carregadores poliméricos de drogas tem sido desenvolvidos com um desempenho específico maior do que a droga sozinha. Por outro lado, muitas outras variáveis tais como a composição da cadeia polimérica, estrutura, característica eletrolítica e solubilidade que podem ter efeito no comportamento do polímero precisam ser levadas em conta e usadas como condições favoráveis ao desenvolvimento de um novo carregador polimérico de drogas.

Quando se trabalha com sistemas deste tipo é preciso ter em mente que as condições das reações químicas usadas para ligar a droga ao polímero não devem afetar a atividade biológica da droga.

Ligações temporárias do fármaco ao polímero, isto é, as que envolvem ligações hidrolisáveis tais como anidrido, éster ou acetal são necessárias

se a droga é ativa somente na forma livre. Uma droga ativada somente depois de ser desligada da cadeia polimérica é chamada pró-droga, como é o caso de agentes com função intracelular.

Por sua vez, ligações permanentes com as drogas são geralmente usadas quando a droga exibe atividade na forma ligada.

Um espectro enorme de aplicações para sistemas de carregadores de drogas específicos tem sido sistematicamente ampliado. A utilização do conceito total, o qual inclui a biocompatibilidade droga-carregador com células específicas, liberação controlada de drogas e biodegradabilidade são sistemas de administração de drogas de alto potencial, no futuro.

b) Sistemas Controlados Quimicamente: Em sistemas de liberação quimicamente controlada, a liberação do agente farmacológico é feita em meio aquoso.

Sistemas Poliméricos Pró-Drogas: Pró-drogas são compostos que não são fisiologicamente ativos como estão constituídos. Sua atividade é adquirida por uma ligação lábil que é removida "*in situ*" por enzimas hidrolíticas para liberar o agente ativo. Consequentemente, pró-drogas podem ser ligadas ao polímero de modo similar ao método usado para carregadores poliméricos de drogas. A forma inativa é então convertida em um agente ativo. Pró-drogas são usualmente preparadas pela polimerização de uma droga conhecida e que é modificada pelo efeito da ligação lábil ao polímero.

Embora hajam muitas ligações químicas hidrolisáveis, somente algumas são úteis devido às suas taxas de hidrólise. A maior parte das ligações predominantes são: anidridos, alguns ésteres e uma pequena sequência de aminoácidos.

Sistemas Biodegradáveis: A liberação de uma substância por meio da biodegradação polimérica é uma tecnologia que tem sido utilizada habilidosamente. Usualmente a matriz polimérica contém ligações lábeis enzimáticas ou hidrolíticas e como o polímero é destruído devido à quebra destas ligações, o agente encapsulado é liberado.

A maior vantagem destes sistemas é que não requerem cirurgia para remover o polímero após o período de administração da droga pois os produtos de degradação/erosão deverão ser atóxicos e efetivamente eliminados do organismo.

Os materiais biodegradáveis mais comumente usados são: poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) e copolímeros de ácidos láctico e glicólico, todos os quais podem ser hidrolisados à metabólitos naturais. Outros polímeros úteis são: policaprolactona, poli(aminoácidos), poli(ortoésteres) e poli(anidridos).

Três mecanismos principais controlam a erosão do polímero: (1) solubilização de polímeros solúveis em água devido às ligações cruzadas hidroliticamente instáveis, as quais são, então, quebradas "*in situ*"; (2) solubilização de polímeros insolúveis em água por hidrólise "*in situ*", ionização ou mudanças de pH; e (3) solubilização de polímeros hidrofóbicos por quebra "*in situ*" do polímero para produzir moléculas menores solúveis em água.

Embora estes mecanismos sejam independentes, o processo de erosão pode ocorrer através de uma combinação de vários mecanismos. Em adição, erosão pode ocorrer como um processo homogêneo ou como um processo heterogêneo. Erosão homogênea ocorre quando a hidrólise procede a uma taxa uniforme por toda a matriz. Neste caso, a permeabilidade da droga pode aumentar por meio de uma combinação dos mecanismos de difusão e erosão. Entretanto, o processo de erosão heterogêneo mais desejável limita-se à hidrólise na superfície do "*expedient*". Este método de erosão de superfície pode produzir liberação de ordem-zero do "*expedient*" que tem uma área superficial constante.

Este sistema de liberação de drogas foi originalmente planejado para transmitir agentes farmacológicos diretamente na corrente sanguínea, sem administração de doses repetidas ou transfusão sendo particularmente útil na liberação de antibióticos, analgésicos e quimioterápicos.

O propósito do polímero biodegradável é funcionar como uma matriz para a droga e então degradar de modo controlado, liberando a droga, como é ilustrado a seguir (fig.6)⁽¹³⁾:

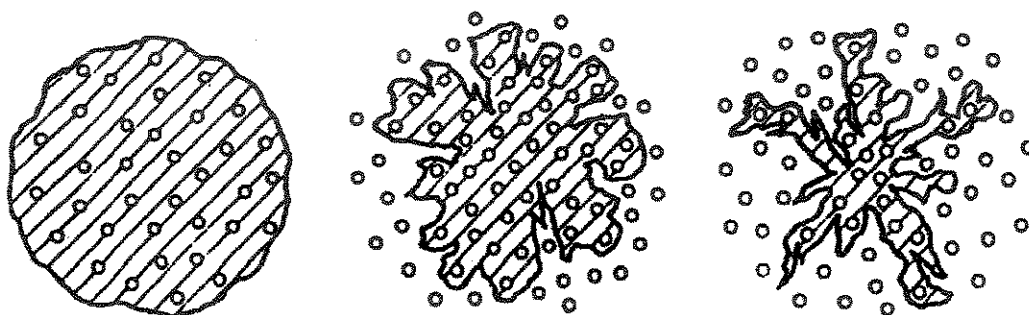


Figura 6: Sistema Biodegradável. (a) Tempo=0; (b) tempo=1; (c) tempo=2.

c) Sistemas de Liberação por Difusão: Os sistemas de liberação de drogas por difusão podem ser divididos em dois tipos: de matriz ou de reservatório.

O sistema de reservatório é composto de uma cavidade interna ou depósito que contém o excipiente, o qual está rodeado por uma membrana semi-permeável que controla o fluxo ou liberação. A membrana, neste caso, é quem controla a difusão (fig.7a).

O sistema matriz é também conhecido como sistema monolítico; o agente biológico está contido na forma de um semi-sólido ou disperso dentro da massa polimérica (fig.7b). Neste sistema, o composto ativo é dissolvido ou misturado intimamente com o polímero, o qual serve como matriz.

Ambos os sistemas tem vantagens e desvantagens. O sistema de matriz é fácil de fazer, pode liberar drogas de alto Peso Molecular, não apresenta perigo de rupturas ou vazamentos e pode ser biodegradável. Entretanto, a liberação da droga pode não ser constante.

O sistema de reservatório dá uma taxa de liberação constante ou de ordem-zero, mas é muito caro de fazer e rupturas ou vazamentos são riscos em potencial.

Membranas poliméricas usadas para a difusão de drogas podem ser macroporosas, microporosas ou não-porosas. O propósito da liberação controlada é prover um fornecimento mais constante e cauteloso da droga. Ambos os sistemas, de reservatório ou de matriz, podem fazer isto.

No planejamento de um sistema de liberação controlada de drogas, fatores como nível terapêutico mínimo da droga requerida; a taxa de remoção da droga do corpo, a cinética e o mecanismo de liberação da

droga e as restrições físicas e químicas no sistema de liberação devem ser considerados.

Os requerimentos básicos para os polímeros não biodegradáveis usados são:

- estabilidade à produtos químicos ou clivagem hidrolítica,
- boas propriedades mecânicas,
- ser atóxico,
- não carcinogênico e
- não ter reações inflamatórias com os tecidos.

Alguns polímeros comumente usados são os seguintes:

- Poliésteres: poli(ácido glicólico), poli(ácido lático), copolímero(ácido glicólico-lático), e policaprolactona,
- Polioortoésteres: polidioxialquiltetrahidrofurano e
- Poliacidos: copolímeros(olefina-anidridomaleico), poli(acrilatos) e poli(metacrilatos).

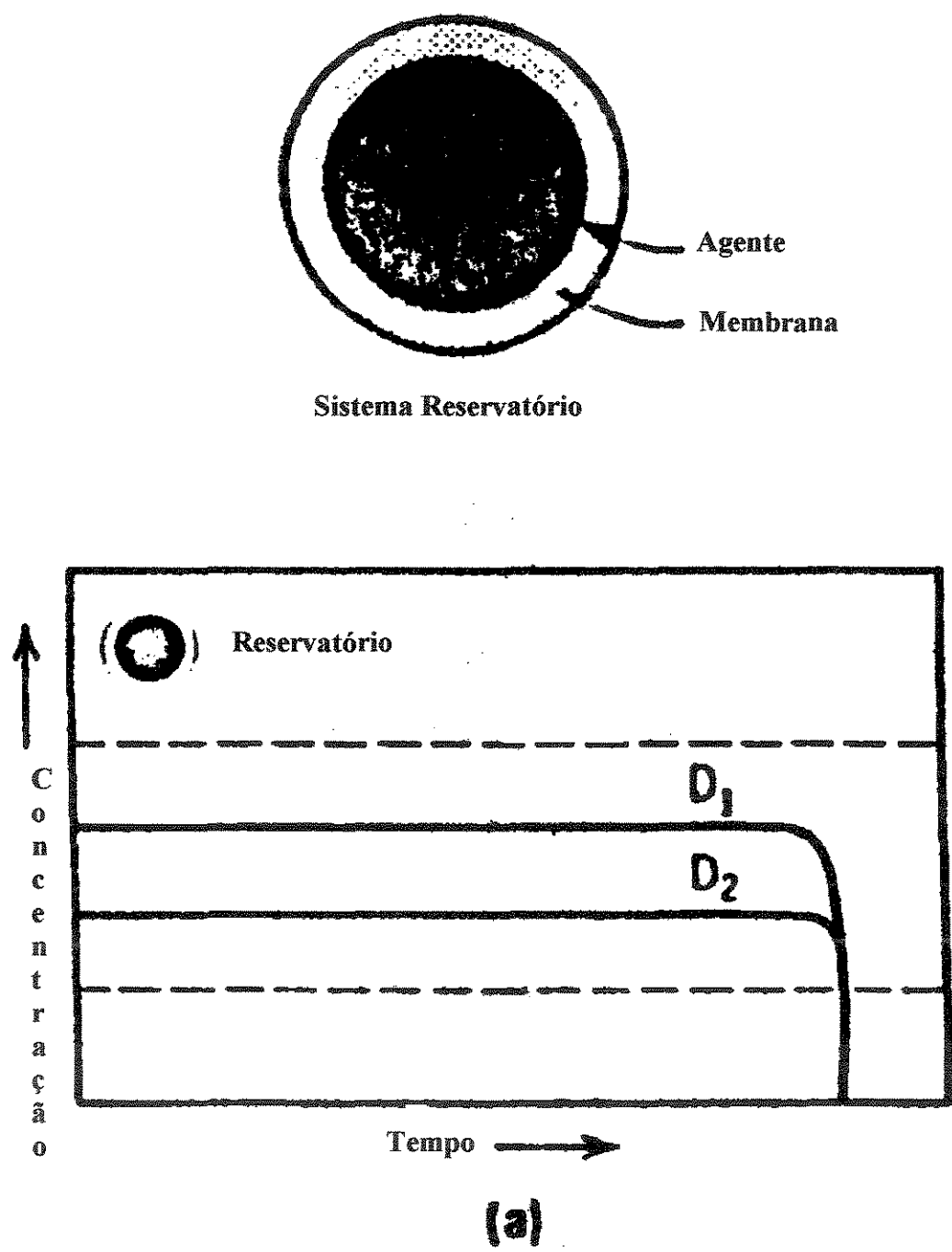
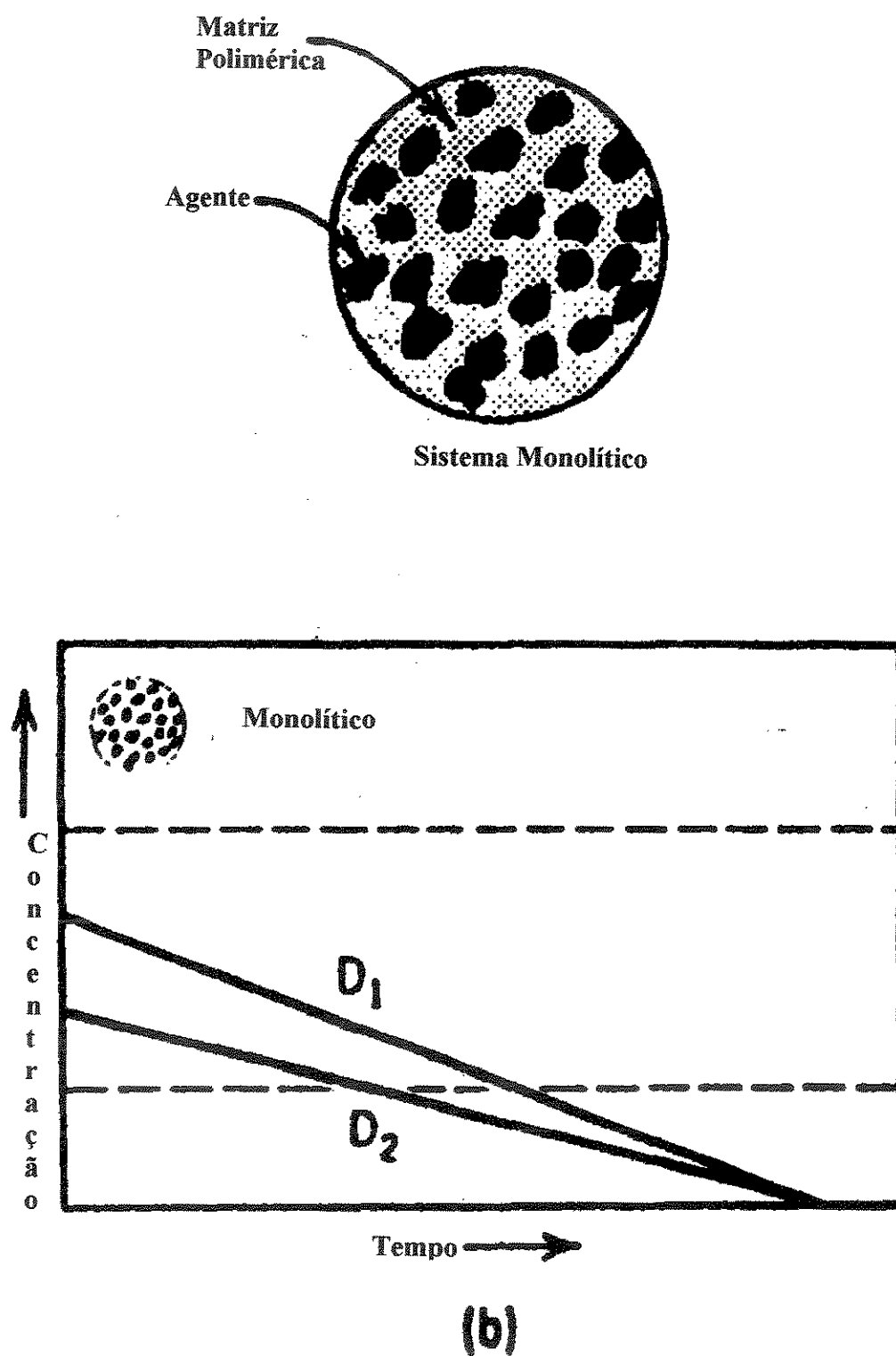


Figura 7a: Sistema de reservatório de liberação de droga por difusão: Representação esquemática e curva de dose de resposta (dose1 > dose2).



**Figura 7b: Sistema monolítico de liberação de droga por difusão:
Representação esquemática e curva de dose de resposta
(dose1 > dose2)**

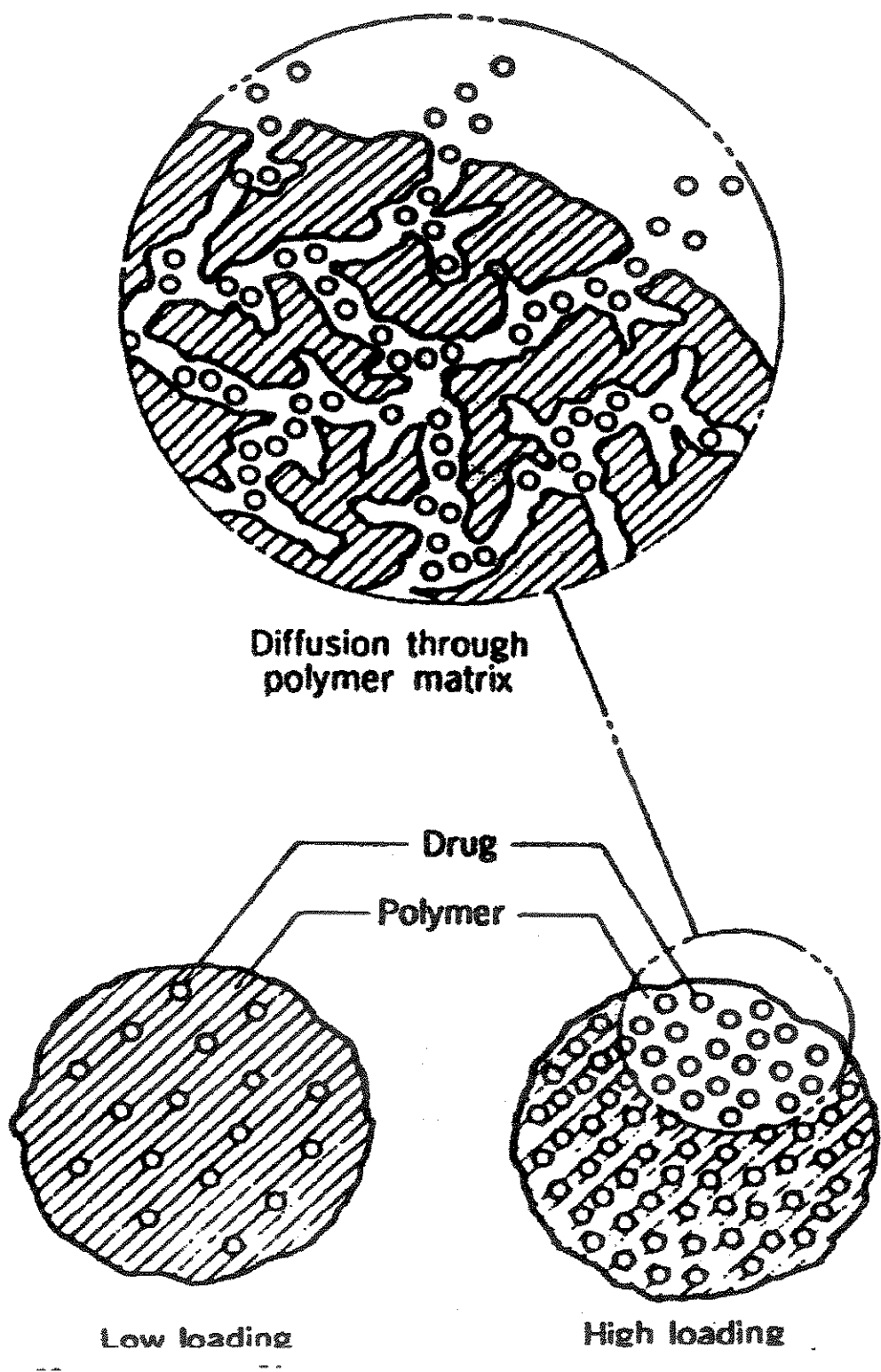


Figura 8: Efeito do Carregamento na Difusão de uma Matriz Polimérica

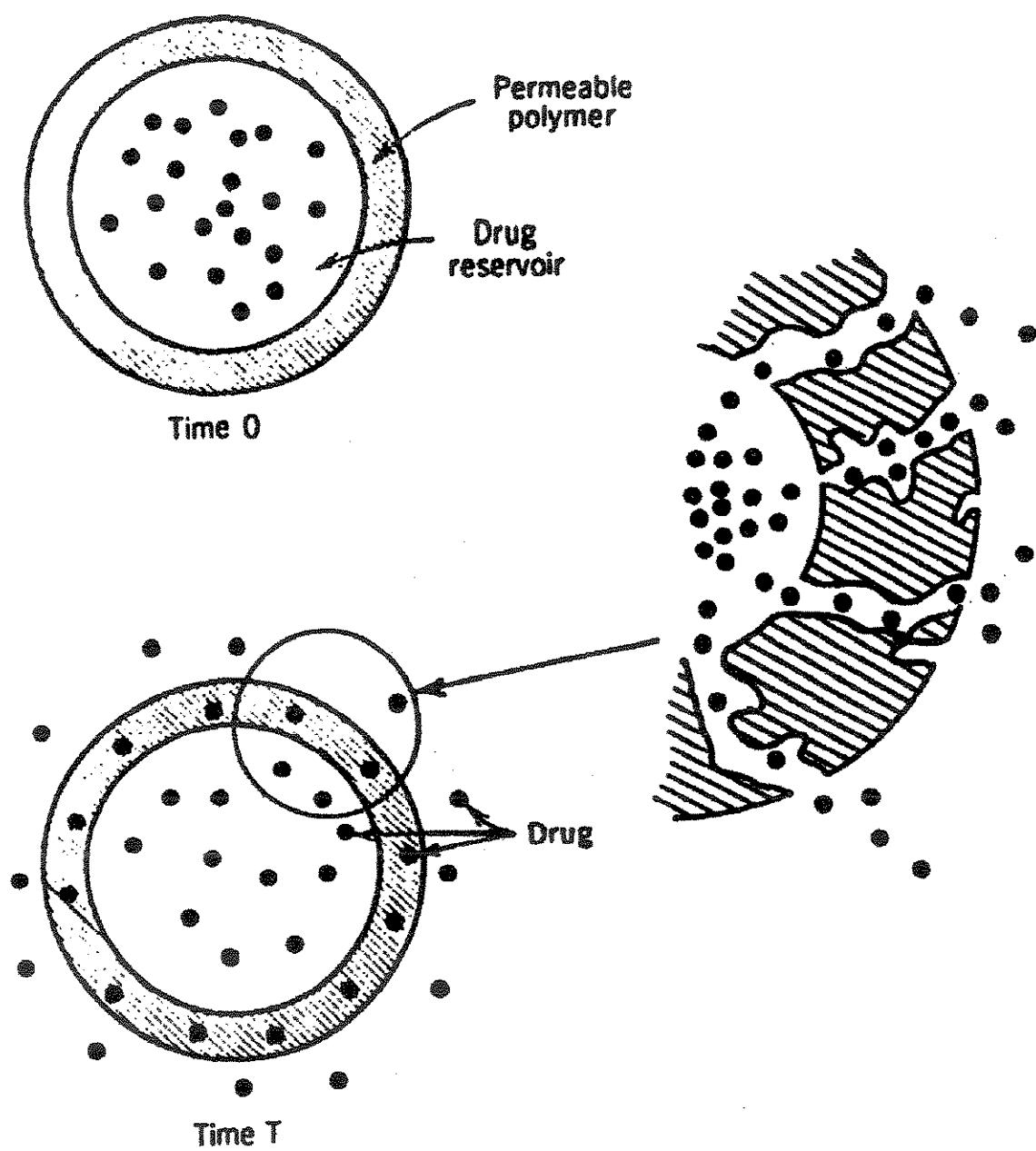


Figura 9: Difusão Através de uma Membrana Permeável

REVISÃO DA LITERATURA

2.1) IMPORTÂNCIA DO SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS

A primeira metodologia de liberação controlada foi desenvolvida em 1962 e foi baseada na difusão de pequenas moléculas (Peso Molecular < 500) através da parede de um tubo de borracha de silicone. O problema da liberação controlada de grandes moléculas tais como as proteínas não foi resolvido até um pouco mais que uma década, quando foi descoberto que microcanais eram formados ao redor de proteínas liofilizadas embebidas em polímeros tais como: copolímero de etileno-acetato de vinila (EVA) e poli(hidroxietilmetacrilato) (p-HEMA). Estes estudos levaram ao desenvolvimento de um implante contraceptivo de cinco anos de duração, o Norplant⁽¹⁹⁾.

O primeiro sistema de liberação controlada foi relatado por Folkman e Long ⁽⁴⁰⁾ em meados de 60. Eles sugeriram que poderiam encapsular lidocaína, uma droga cardio-regulatória, dentro de um tubo de borracha de silicone e implantá-la no miocárdio de um animal em experiência. A liberação da droga seria sob um período prolongado de tempo com alguma medida de controle do ritmo miocardial.

Após observações feitas, eles sugeriram que a lidocaína era liberada por um mecanismo de dissolução na borracha de silicone e subsequente difusão através dela dentro do miocárdio. Em breve, endocrinologistas desenvolveram um sistema de liberação de drogas com um princípio semelhante para uma grande variedade de hormônios esteróides, os quais exibiam alta solubilidade lipídica.

O interesse comercial no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas resultou na formação de companhias de desenvolvimento de produtos e das quais alguns produtos tem emergido.

Houve, então, uma grande expansão de atividades nesta área, em parte devido a grande disponibilidade de produtos farmacêuticos que exibem um resultado terapêutico superior quando administrados continuamente.

Entretanto, as aplicações para estes novos biomateriais e as contribuições que os cientistas de materiais podem oferecer para os complexos problemas provenientes dos sistemas de liberação controlada de drogas ainda não tem sido discutidos extensivamente em encontros sobre biomateriais⁽⁴⁰⁾.

Formas convencionais de administração de drogas são geralmente feitas em pílulas, gotas, unguentos e soluções intra-venosa⁴⁴⁾.

Entretanto, um grande número de novas abordagens sobre liberação de drogas tem sido desenvolvido. Estas abordagens incluem modificação da droga por meios químicos, encapsulamento da droga em pequenas vesículas que são injetadas na corrente sanguínea e encapsulamento das drogas dentro de materiais poliméricos que são colocados no compartimento desejado do corpo como por exemplo no olho ou sob a pele. Estas técnicas tem levado à sistemas de liberação que melhoram a saúde humana e a continuidade destas pesquisas pode ajudar a solucionar a forma de liberação de muitas drogas de grande interesse.

A explosão de pesquisas nesta área pode ser devida a fatores como:

i) drogas mais novas e mais complexas como as proteínas estão se tornando disponíveis através da engenharia genética e a liberação destas drogas é frequentemente mais complicada que as drogas convencionais, necessitando de novos mecanismos de liberação;

ii) muitas drogas, velhos produtos farmacêuticos ou novas entidades moleculares podem ser administradas de modo que não somente melhorem sua segurança e eficácia mas, em muitos casos, sejam permitidas novas terapias;

iii) há um aumento da consciência que modelos de liberação de drogas, contínuo x doses repetidas, afetam significativamente as respostas terapêuticas;

iv) o gasto excessivo para se criar produtos farmacêuticos que sejam uma nova entidade molecular pois o custo é menor para melhorar a liberação de uma droga já existente. Muitas vezes isto é visto como um melhor investimento;

v) avanços na ciência dos materiais e biotecnologia estão permitindo o desenvolvimento de novos métodos físicos e químicos para a liberação de drogas.

O sistema de liberação controlada oferece vantagens sobre as terapias de drogas convencionais^(44,45,46). Por exemplo, depois da ingestão ou injeção de uma dosagem da droga de forma padrão, o nível da mesma no sangue aumenta, atinge um pico máximo e então decai. Uma vez que cada droga tem uma faixa terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, níveis da droga oscilantes podem causar períodos alternados de ineficácia e toxicidade

Em contraste, a liberação controlada mantém a droga no nível terapêutico desejável, por uma única administração. Outras vantagens em potencial da liberação controlada incluem:

- i) liberação localizada da droga num compartimento particular do corpo, de modo a abaixar o nível sistêmico da droga;
- ii) preservação dos medicamentos que são rapidamente absorvidos pelo corpo; isto é particularmente importante para moléculas biologicamente sensíveis tais como as proteínas, e
- iii) aumento do bem-estar.

O uso de polímeros para liberação de esteróides contraceptivos tem sido amplamente estudado^(44,46). Quatro tipos de sistemas tem sido examinados; ou seja:

i) implantes de reservatório subdermal compostos de polímeros não degradáveis que liberam a droga por 5 anos, por exemplo o Norplant. Estes sistemas, baseados em estudos de difusão através da borracha de silicone⁽¹⁹⁾, estão aprovados para uso em 15 países;

ii) implante subdermal ou microesferas injetáveis compostas por materiais degradáveis tais como copolímeros de ácido lático e ácido glicólico ou policaprolactonas;

iii) liberação intrauterina de esteróide, tal como o Progestasert, um copolímero reservatório de etileno-acetato de vinila que contém 38 mg de progesterona, uma quantidade suficiente para uma liberação no local apropriado de 65 Mg por dia por aproximadamente 1 ano;

iv) anéis na vagina que são sistemas reservatórios de silicone usados para um período de 3 à 6 meses.

Por muitos anos, as pesquisas se concentraram sobre a descoberta de compostos potentes com novos tipos de atividade biológica^(23,46). Enquanto isto continua a ser uma importante área de pesquisa, mais e mais atenção é dada à maneira pela qual estas drogas são liberadas.

Uma maneira considerada atualmente como um meio efetivo de liberação de drogas é a incorporação das mesmas em polímeros sólidos tais como borracha de silicone e copolímero etileno-acetato de vinila, dentre outros.

Os sistemas de liberação controlada podem ter aplicações na área médica, na agricultura e nos produtos alimentícios⁽⁴⁶⁾.

As principais vantagens de tais sistemas sob o ponto de vista clínico são as seguintes:

- 1) o nível de droga no plasma é continuamente mantido em um nível terapêutico desejável;
- 2) efeitos colaterais de administração sistêmica podem ser reduzidos ou eliminados por uma administração local de um depósito polímero-droga;
- 3) a administração de drogas pode ser melhorada e facilitada em áreas pouco privilegiadas onde uma boa supervisão médica não está disponível;
- 4) drogas que tem tempo de meia-vida curto *in vivo* podem ser protegidas da degradação;
- 5) pequenas doses contínuas da droga podem ser menos dolorosas do que várias doses grandes da mesma;
- 6) a colaboração do paciente pode ser melhorada e
- 7) a liberação de drogas por este método é economicamente mais vantajosa por se ter um menor desperdício desta.

Exemplos de aplicação na área médica⁽⁴⁶⁾:

- *Aplicação dentária*: há um considerável interesse no desenvolvimento de sistemas para a liberação controlada de flúor para evitar cáries dentárias. Vários sistemas tem sido produzidos que podem ser ligados aos dentes e são capazes de liberar flúor por cerca de 6 meses.

- *Liberação de insulina*: diabéticos normalmente requerem injeções de insulina uma ou duas vezes ao dia. Além desta forma ser inconveniente, este método de administração resulta em picos elevados e vales no nível da glicose no sangue, o que pode ser responsável, em parte, pelas complicações diabéticas. Vários estudos em humanos tem mostrado que um excelente controle da glicose no sangue pode ser obtido usando bombas que liberam insulina a uma taxa constante, mas são capazes de aumentar a taxa antes das refeições. Implantes poliméricos para sistema de liberação de drogas poderiam também ser usados para manter o nível glicêmico nestes pacientes⁽⁴⁶⁾.

- *Sistemas contraceptivos*: dois principais tipos de sistemas de liberação controlada de contraceptivos tem sido desenvolvidos. O primeiro tipo consiste em um sistema polimérico de liberação de estrógeno que pode ser inserido dentro do útero ou da vagina minimizando significativamente a dose sistêmica e o sangramento menstrual, comparado com os métodos intra-uterinos convencionais. O segundo tipo consiste em um implante subdermal, o qual é composto de um polímero biodegradável, tal como poli(ácido láctico),

poli(caprolactona), poli(aminoácidos) ou poliortoésteres. Neste caso, o implante libera a droga anticoncepcional por erosão; o próprio implante é, em alguns casos, totalmente absorvido pelo organismo. Em ambos os tipos de sistema, os implantes são planejados para liberar a droga por cerca de um ano⁽⁴⁶⁾.

- *Imunização*: Métodos convencionais para imunização de animais e humanos geralmente requerem múltiplas injeções e frequentemente causam irritação dos tecidos. Em alguns casos, como no tratamento de alergias, aplicações tem que ser feitas semanalmente por um período de vários anos. Através de estudos realizados por R. Langer e I. Preis⁽⁴⁶⁾, foi considerado que polímeros para liberação controlada poderia ser um meio simples, seguro e efetivo de imunização atuando como uma série de contínuas mini-aplicações. Pequenas pílulas injetáveis (0,3 mm³) de um copolímero etileno-acetato de vinila contendo 100 Mg de um antígeno-teste, albumina bovina, foram colocadas subcutaneamente em ratos. A resposta imune estimulada pela liberação do antígeno foi comparada ao método convencional de imunização de animais, isto é, duas injeções de albumina bovina em uma suspensão de óleo em água contendo bactérias para estimular a resposta imune. A resposta imune induzida pelo antígeno no polímero foi comparável ou superior àquela induzida pela mesma dosagem de antígeno usando a técnica convencional. Além disto, nenhuma irritação dos tecidos foi causada pelo sistema de liberação controlada. Este procedimento de imunização foi efetivo para outros antígenos com uma ampla faixa de peso molecular⁽⁴⁶⁾.

- *Outras aplicações*: anticoagulantes, drogas para uso veterinário, sistema ocular (liberação de pilocarpina para tratamento de glaucoma⁽⁴⁾), etc.

- *Na agricultura*: pesticidas e fertilizantes agrícolas são responsáveis por 60% do total da produção de alimentos nos Estados Unidos. Infelizmente, o uso inadequado destes produtos químicos pode causar sérios problemas de contaminação pois os procedimentos padrões de administração como no caso dos sprays, resultam em terras improdutivas devido ao excesso de agente ativo utilizado. Portanto, algum procedimento que minimize a dose total é desejável como por exemplo a liberação controlada cujos resultados mostram que é possível reduzir a dosagem necessária de agentes químicos⁽⁴⁶⁾.

- *Aplicações em alimentos*: a maior aplicação da tecnologia de liberação controlada por sistemas poliméricos em alimentos tem sido a liberação de ingredientes, incluindo aditivos para alimentos. Exemplos

mais importantes são as seguintes; o encapsulamento e liberação controlada de compostos aromatizantes naturais e/ou sintéticos durante a preparação ou consumo de alimentos; a proteção de componetes sensíveis à água ou ao oxigênio; os quais incluem aromatizantes, vitaminas e outros ingredientes biologicamente ativos e o isolamento de reativos ou ingredientes catalíticos até que sua liberação seja desejada. A tabela 2 a seguir ilustra algumas aplicações médicas do sistema de liberação controlada⁽²³⁾:

Tabela 2) Algumas Aplicações Médicas de Sistemas de Liberação Controlada.

Doença ou tratamento	Droga	Polímero	Taxa de Liberação	Duração	Local do Implante	Condição
Glaucoma	Pilocarpina	Etileno- acetato de vinila	20 micro- gramas/h	1 semana	Conjuntiva (olho)	sendo co- mercia- lizado
Controle da Natalidade	Progeste- rona	Etileno- acetato de vinila (Progestasert)	65 micro- gramas/dia	1 ano	Útero	sendo co- mercia- lizado em 15 países
	outros este- róides	copolímero ácido lático gli- cólico Poli-orto ésteres Poli-amino ácidos Poli-ure- tana	10-100 micro-gra- mas/dia	6 meses/ 1 ano	Sub- cutâneo	animal e testes cli- nicos
Diabete	Insulina	Etileno- vinil- acetato	100 micro- gramas/dia	1 mês	Sub- cutâneo	testes somente em ratos
Imunização	Antígenos	Etileno- vinil- acetato	0,5 micro- gramas/dia	6 meses	Sub- cutâneo	testes somente em ratos
Cárie Dentária	Fluoreto	Poli-2- hidroxietil- metacrilato	_____	6 meses	dentes	testes clínicos
Anti-coa- gulação	Heparina (e em alguns casos pros- taglandina)	Poli-2- hidroxietil metacrilato	Variável	Variável	Geral	<i>In vitro</i>
Câncer (Próstata)	Testostero- na	Silicone	_____	1 ano	Sub-cutâ- neo	Testes clínicos

2.2) IMPORTÂNCIA DOS HIDROGÉIS EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS

O uso de polímeros hidrofílicos tridimensionais com ligações cruzadas para a manufatura de implantes cirúrgicos e lentes de contato foi primeiramente proposto por Wichterle e Lim⁽³⁶⁾. Quando polímeros hidrofílicos tridimensionais estão em equilíbrio com a água ou em uma solução aquosa, obtém-se hidrogéis com propriedades muito atrativas.

Eles podem ser preparados por uma variedade de métodos químicos, utilizando polímeros naturais e sintéticos⁽⁴⁸⁾ e em uma grande variedade de formas físicas tais como filmes, lâminas, pérolas e tubos.

Um exemplo típico de hidrogel convencional é o poli(hidroxietilmetacrilato) ou poli-HEMA preparado com uma concentração de monômero 2-Hidroxietilmetacrilato (HEMA) maior que 50%. Hidrogéis com tamanho de poros significativamente maior que os hidrogéis convencionais são chamados de hidrogéis "macroporosos". Eles são caracterizados por grande tamanho de poros, grande volume de poros e grande área de superfície específica.

Hidrogéis de poli-HEMA preparados com uma concentração de monômero inferior à 40% servem como definição de hidrogéis macroporosos⁽²⁸⁾.

Devido à estrutura aberta dos géis no estado entumescido, pequenas moléculas contaminantes do polímero serão difundidas para fora do implante de hidrogel mais facilmente do que de implantes plásticos não entumescidos ou borrachas.

Os hidrogéis são também materiais ideais para membranas de córnea. Eles podem ser obtidos transparentes e macios, e tem uma permeabilidade maior à água do que outros plásticos sintéticos. A transparência, com certeza, é essencial para implantes na área oftalmológica. Maciez e flexibilidade são também de fundamental importância para tolerância por longo tempo do implante em contato próximo com um tecido macio. Um certo grau de permeabilidade à água e metabólitos é também importante para um bom implante de córnea.

Um hidrogel natural, a gelatina, tem sido usado em formulações farmacêuticas por mais de um século e é bem conhecido no formato "macio" ou em cápsulas de gelatina-dura.

Os modernos hidrogéis de polímeros sintéticos tem uma ampla capacidade para problemas específicos e a habilidade dos cientistas de polímeros de fazer os polímeros e os dispositivos de utilização deles, levarão a uma considerável expansão do uso destes materiais no futuro. Atualmente existe um número considerável de pesquisas que estão sendo realizadas no mundo todo. Exemplos interessantes tem surgido, dentre os quais podemos citar o desenvolvimento de um sistema polimérico composto do copolímero etileno-álcool vinílico (EVAI), capaz de liberar insulina *in vivo* em ratos diabéticos, através de irradiação ultra-som externa, relatado por Miyazaki e outros⁽³⁵⁾. Quando os ratos diabéticos receberam o implante subcutâneo de EVAI contendo insulina e foram expostos à irradiação ultra-som, observou-se uma notável queda do nível de glicose no sangue após a irradiação, indicando uma rápida taxa de liberação de insulina no sítio implantado.

Um trabalho muito interessante feito por Miyakazi e outros⁽³⁴⁾ comparou o potencial de grânulos de quitosana, usados como forma oral de liberação de indometacina com o método convencional na forma de cápsulas. Foi observada, *in vivo*, a liberação da indometacina depois da administração oral em cachorros do produto encapsulado com os grânulos de quitosana. Quando a cápsula comercial foi administrada oralmente, a concentração no plasma atingiu um nível máximo em 30 minutos, enquanto que com os grânulos não foi obtido um pico nítido de concentração no plasma, mas apenas um platô de concentração da droga. Segundo os pesquisadores, isto pode ser devido à lenta taxa de liberação e um tempo de residência maior no estômago. Assim, em termos de redução do pico de concentração no plasma e conservação da concentração da droga no plasma, os grânulos de quitosana foram superiores às cápsulas convencionais.

Chitosana tem sido relatado por ter algumas aplicações úteis no campo farmacêutico e é facilmente preparado por N-diacetilação com álcali da quitina de caranguejos e lagostas, um polímero de ocorrência natural de N-acetil-D-glucosamida.

O quitosana tem atraído atenção como uma matriz para liberação controlada por possuir grupos funcionais reativos, ser facilmente degradado por enzimas e seus produtos de degradação não serem tóxicos⁽²⁹⁾.

A característica de insolubilidade do chitosan em água, bem como em muitos solventes orgânicos, limita seu uso como carregador de drogas.

Microesferas de chitosan tendo boa geometria esférica e superfície uniforme foram utilizadas como matriz de liberação de drogas orais tais como: teofilina, aspirina e griseofulvina. Estas foram incorporadas dentro das microesferas de chitosan em fluidos gástricos e intestinais simulados, *in vitro* à 37°C. Foi observado que a eficiência na incorporação das drogas excedeu 80% e que as taxas de liberação das mesmas foram influenciadas pela densidade de ligações cruzadas, tamanho da partícula e o carregamento inicial das drogas nas microesferas⁽²⁹⁾.

Em outro trabalho verificou-se que a incorporação de uma macromolécula biológica como o colágeno dentro de um hidrogel de poli(hidroxietilmetacrilato) resulta em uma boa tolerância dos tecidos *in vitro* e *in vivo*.

Foi realizado um trabalho por Jeyanthi e Rao⁽²⁶⁾ onde o hidrogel poli(HEMA)-colágeno foi cutaneamente implantado em ratos por cerca de 6 meses e as respostas de curto e longo prazo ao implante foram estudadas. Os dados histopatológicos indicaram que o implante subcutâneo do hidrogel em ratos não causou nenhuma necrose, calcificação, tumor ou infecção no sítio do implante durante este período (6 meses). O hidrogel foi bem tolerado, é atóxico e altamente biocompatível e o implante mostrou uma leve biodegradação, a qual foi atribuída à presença do colágeno. A biodegradabilidade pode, entretanto, ser controlada pela variação da quantidade de colágeno e densidade de ligações cruzadas no hidrogel.

Implantes de colágeno-hidrogel poli(HEMA) contendo uma droga anti-câncer, o 5-fluorouracil (5-FU) para verificar sua liberação e sua eficácia em ratos foram feitos por Nagarajan e Rao⁽³³⁾ subcutaneamente num local próximo ao tumor. O hidrogel mostrou uma atividade anti-tumor melhor que a atividade da droga (5-FU) livre.

Um sistema subcutâneo de liberação de 5-FU foi feito por Denizli e outros⁽²⁴⁾. Este sistema consistia numa matriz polimérica de poli(hidroxietilmetacrilato-bis-glicol-acrilato), na forma de pérolas de 3 mm de diâmetro, as quais foram preparadas por uma polimerização por radiação gama à baixa temperatura.

O aminohexil derivado do copolímero de 2-hidroxietilmetacrilato e etileno dimetacrilato p(HEMA)-Hex na forma de partículas esféricas regulares, foi testado como um carregador polimérico

do agente anti-tumor methotrexate (MTX), segundo mostra o trabalho de Daniel Horák e outros⁽²¹⁾.

O carregador p(HEMA)-Hex-MTX foi colocado no vaso sanguíneo de coelhos e a droga foi liberada por diversos períodos de tempo como mostra o trabalho. O MTX foi capaz de difundir-se por vários dias para o foco da embolia endovascular.

Em relação à administração de drogas a rota mais conveniente e mais comumente empregada é a ingestão oral. Este tipo de administração de drogas está sujeito a frequentes mudanças de meio no trato gastrointestinal. Durante seu caminho, a droga passa da parte gástrica fortemente ácida para uma parte intestinal alcalina dentro do sistema digestivo. Também, como o tempo de esvaziamento do estômago varia de paciente para paciente, há variação na quantidade de droga absorvida.

Devido a estes problemas, atenção especial tem sido dada a prolongação da retenção da dosagem no estômago. Um meio a ser empregado seria um sistema de microesferas menos densas que o fluido gastrointestinal, as quais flutuariam no fluido, prolongando seu tempo de residência no estômago⁽³²⁾.

Um sistema de liberação de droga por via oral usando microesferas de policarbonato capazes de flutuar no fluido gástrico, foi relatado por Thanoo e outros⁽³²⁾. As microesferas de policarbonato carregadas com aspirina, griseofulvina e p-nitroanilina foram preparadas por uma técnica de evaporação do solvente. Por este processo, foi conseguido um carregamento maior que 50% e as microesferas carregadas com a droga foram encontradas flutuando nos fluidos gástrico e intestinal simulados, à 37°C. Foi então concluído que a liberação controlada de drogas poderia ser efetiva usando este tipo de matriz.

A aspirina é a droga mais amplamente usada no tratamento e controle de artrite reumática. Entretanto, efeitos colaterais tal como irritação gastrointestinal, tem sido observados devido à altas doses ou devido à partículas fixadas na mucosa, segundo Hoon⁽³⁴⁾. De acordo com Levy e outros⁽³⁴⁾ baixas dosagens por períodos prolongados podem diminuir a irritação gastrointestinal. Um sistema de liberação controlada onde se pode ter flutuação no fluido gastrointestinal foi relatado em outro trabalho de Thanoo e outros⁽³⁴⁾, com microesferas de policarbonato feitas para aumentar o tempo de residência no estômago, provendo uma dosagem terapêutica por longos períodos.

Outro tipo de microesferas usadas para liberação controlada de drogas orais são as microesferas de poli-vinil-álcool com ligações cruzadas⁽³¹⁾.

As microesferas contendo drogas como aspirina, griseofulvina e ácido nicotínico foram preparadas por uma reação de reticulação na presença de cada droga. A liberação da droga foi estudada pela simulação dos fluidos gástrico e intestinal, sem enzimas, à 37°C, *in vitro*.

Foi observado que aumentando a densidade de ligações cruzadas das microesferas, a taxa de liberação da droga diminui consideravelmente, sugerindo que a liberação poderia ser controlada pela mudança de densidade destas ligações. Também foi observado que uma taxa maior de liberação foi obtida de pérolas menores.

Na área odontológica tem-se deparado com a necessidade de melhorar a liberação de drogas para o tratamento dos dentes e da mucosa oral. Muitos métodos são ineficientes devido às dificuldades em se colocar e manter uma quantidade não tóxica adequada da droga desejada num sítio pretendido por um tempo suficiente. Assim, sistemas de liberação controlada oferecem a oportunidade de superar estes problemas se um dispositivo adequado puder ser construído.

Um número de dispositivos para a liberação de produtos oftálmicos de interesse atual, drogas intra-uterinas e fluoreto tem sido propostos. Uma limitação dos sistemas poliméricos é a pobre difusão de drogas de alto Peso Molecular através da matriz polimérica, com a ocorrência de uma pequena quantidade de liberação pela superfície. Portanto a seleção de uma matriz polimérica apropriada pode ajudar a suavizar este problema.

Polímeros hidratados tem mostrado ser mais permeáveis à produtos solúveis em água, pelo fato de se ter abertura dos poros na estrutura do polímero, pelos quais a difusão pode ocorrer. Um exemplo disto é a liberação de íons fluoreto de uma matriz polimérica consistindo de um copolímero de poli-metil-metacrilato (PMMA) e poli-hidroxietil-metacrilato (PHEMA), onde Brook e van Noort⁽¹⁷⁾ observaram que a taxa de liberação era determinada pelas proporções relativas dos polímeros hidrofóbico e hidrofílico.

Brook e van Noort⁽¹⁷⁾ fizeram um trabalho baseado no desenvolvimento de um núcleo monolítico intra-oral capaz de liberar drogas orais de interesse atual com PM>400. Foi feita a liberação de hidrocortisona succinato de sódio através de resinas acrílicas, copolímero PMMA-PHEMA em água, à 37°C, onde um mecanismo de liberação da

droga pela superfície parece ser o mais viável. A dissolução da droga e sua difusão foi feita, segundo as evidências, via canais e fendas, os quais foram formados pela incorporação da droga, produzindo um polímero modificado com uma difusão insignificante através da matriz polimérica. Foram observados, neste trabalho, alguns fatores, os quais poderiam afetar a liberação de drogas feita por canais e fendas. Foram eles:

- a fragilidade da matriz polimérica,
- a quantidade e distribuição da droga e
- a porosidade do polímero

A liberação via canais e fendas é dependente da porosidade do material uma vez que isto reduz a tortuosidade dos canais dentro da matriz. Houve uma redução na taxa de liberação quando aumentou-se o conteúdo do polímero HEMA e isto foi explicado pelo aumento da flexibilidade do polímero, evitando a formação das fendas.

Um outro sistema que tem merecido atenção é o da Teofilina a qual tem sido amplamente usada como um broncodilatador para o tratamento de asma crônica. O efeito broncodilatador deste medicamento aumenta com a concentração no soro, de uma faixa de 5 a 20 microgramas/ml, mas em um nível de 20 microgramas/ml no plasma há um aumento do perigo de efeitos tóxicos, segundo Ogilvie⁽³⁸⁾. O desejo de manter a Teofilina em níveis no plasma dentro desta estreita faixa tem levado ao desenvolvimento de várias formas de liberação controlada⁽³⁸⁾.

Vários estudos tem sido relatados sobre a dissolução e farmacocinética de liberação controlada de teofilina *in vitro* (Anderson e outros 1983; Simons e outros 1984; El-Yazigi & Sawchuk 1985; Macheras e outros 1987). Entretanto, poucos trabalhos têm mencionado a preparação da forma de dosagem. Microcápsulas de teofilina preparadas de etil-celulose usando copolímero de etileno-acetato de vinila (EVA) tem sido descritas por Lin & Yang (1985). Neste estudo, várias concentrações do copolímero EVA foram usadas e o efeito de sua concentração em certas propriedades como tamanho da partícula, densidade, porosidade, espessura da parede e topografia da superfície das microcápsulas, juntamente com o comportamento de liberação da droga correspondente, foram estudados.

Teofilina tem sido também preparada na forma de um complexo droga-resina e revestido com parafina ou encapsulada com etil-celulose por vários métodos⁽³⁸⁾.

Foi estudado por Yanee Pongpaibul e outros⁽³⁸⁾, a formação e eluição *in vitro* de microesferas de poli(metil-metacrilato) carregadas com Teofilina. As microesferas de PMMA carregadas com Teofilina,

foram preparadas pelo método de evaporação do solvente. Foi verificado que aumentando a proporção entre a droga e o polímero aumentou o tamanho médio das partículas das microesferas e a taxa de liberação. Quando o polietilenoglicol (PEG) foi usado para melhorar a taxa de liberação da Teofilina das microesferas, não foram observados efeitos significativos na distribuição de tamanho das partículas como função da concentração de PEG, mas houve um pronunciado efeito na liberação da droga.

Os diferentes tamanhos de partícula preparadas com a mesma proporção entre a droga e o polímero não mostrou diferença significativa no conteúdo da droga, indicando que a proporção entre Teofilina e PMMA permaneceu praticamente constante independentemente do tamanho das microesferas. Por outro lado, características de liberação das microesferas foram influenciadas pela proporção entre a droga e o polímero, pela quantidade de PEG incorporado e tamanho de partícula das microesferas. A taxa de liberação foi levemente maior em fluidos gástricos simulados do que em fluidos intestinais simulados. O perfil de liberação da droga foi modificado pela mistura de microesferas de diferentes formulações em diferentes proporções.

Um tipo bastante interessante de hidrogel é o poli-(N-isopropilacrilamida) ou poli-(NIPAAm), o qual é termicamente reversível e exibe uma temperatura de solução crítica inferior (LCST=Lower Critical Solution Temperature) por volta de 33°C em solução aquosa; ou seja, o hidrogel entumescce abaixo e encolhe acima de 33°C. Recentemente, os hidrogéis de poli-(NIPAAm) tem sido de grande interesse nos campos de liberação controlada de drogas, imobilização de enzimas e remoção de toxinas.

Ciclos térmicos do poli-(NIPAAm) acima e abaixo de sua LCST podem elevar significativamente sua produtividade. No caso do hidrogel ser usado como carregador de drogas, a liberação destas pode ser controlada pela temperatura. Porém, como o tamanho de poro do polímero convencional é relativamente pequeno, sua resposta ao ciclo térmico é relativamente lenta. Por esta razão, hidrogéis de poli-(NIPAAm) com estrutura macroporosa podem ser mais desejáveis para aplicações nas quais se aproveitem rápida mudança de fase volumétrica em função da LCST.

O método convencional de sintetizar poli-(NIPAAm) é feito à temperatura ambiente. Entretanto, foi proposto um outro método de síntese por Hoffman e outros⁽²⁸⁾. De acordo com este método, a reação de

polimerização foi desenvolvida acima da LCST, com esvaziamento do reator perto do final da polimerização. Também foi adicionado à solução do monômero, outro polímero LCST, isto é, o hidroxipropilcelulose (HPC), o qual agiria como um agente formador de poros, precipitando acima de sua LCST (42°C) durante a polimerização, nucleando regiões do hidrogel e levando a um hidrogel mais poroso em outras regiões (fig.10). Os hidrogéis macroporosos de poli-(NIPAAm) obtidos, tem poros de grande tamanho, rápidas taxas de permeação de macromoléculas, altas taxas de entumescimento e mudanças rápidas de volume em resposta ao aumento ou queda de temperatura através da LCST.

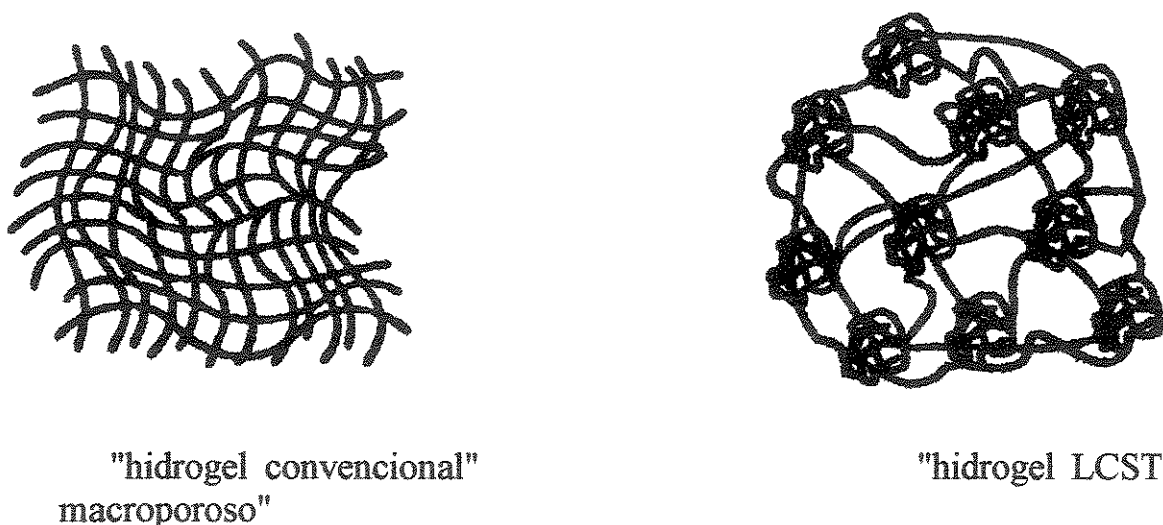


Figura 10: Esboço Hipotético da Estrutura Homogênea do Hidrogel Convencional e Estrutura Heterogênea do Hidrogel Macroporoso LCST.

Foi proposto por Jayakrishnan e Thanoo⁽³⁹⁾ uma nova rota para se obter pérolas esféricas altamente porosas de 2-hidroxietilmetacrilato para aplicações biomédicas através de uma polimerização em suspensão do 2-hidroxietilmetacrilato na presença de diluentes poliméricos.

As pérolas esféricas e altamente porosas de poli(2-HEMA) reticuladas com etileno glicol dimetacrilato (EGDM) foram preparadas por uma polimerização em suspensão do HEMA em solução concentrada de cloreto de sódio na presença de tolueno, poli-metilmetacrilato (PMMA) em tolueno, e poli(tetrametilenoglicol) ou PTMG. Hidróxido de

Na presença de PTMG, pérolas tendo aproximadamente 1,0 mm de diâmetro puderam ser preparadas, enquanto tolueno sozinho como diluente produziu pérolas de tamanho muito menor.

A remoção de PMMA ou PTMG, das pérolas, depois da polimerização usando os solventes adequados, deram microesferas de PHEMA altamente porosas. A polimerização na presença de PTMG produziu microesferas com geometria esférica melhor quando comparada àquelas produzidas na presença de PMMA.

Segundo Hoffinan e outros⁽²⁸⁾, vários fatores podem ter efeito neste tipo de polimerização; tais como: concentração de cloreto de sódio, concentração de hidróxido de magnésio e concentração de PMMA ou PTMG na fase monômero, na estabilidade da suspensão e na distribuição do tamanho das partículas.

Seguindo a linha de pesquisa sobre hidrogéis e liberação controlada, decidimos submeter os dados de nossa pesquisa a um tratamento estatístico para otimizar nossas condições de trabalho. Assim no próximo item, descrevemos sucintamente sobre a *Quimiometria* bem como deixamos claros os objetivos deste trabalho.

2.3) QUIMIOMETRIA^(42,43,49,52)

A quimiometria é a parte da química que utiliza métodos matemáticos e estatísticos para⁽⁵²⁾:

a) definir ou selecionar as condições ótimas de medidas e experiências e

b) permitir a obtenção do máximo de informações a partir da análise dos dados químicos.

Com a sofisticação sempre crescente das técnicas instrumentais, impulsionada pela invasão dos microprocessadores e microcomputadores no laboratório químico, tornam-se necessários tratamentos de dados mais complexos do ponto de vista matemático e estatístico, a fim de relacionar os sinais obtidos (intensidades, por exemplo) com os resultados desejados (concentrações).

Muita ênfase tem sido dada aos sistemas multivariados, nos quais se pode medir muitas variáveis simultaneamente (ou de forma sequencial, com grande eficiência) ao se estudar uma amostra qualquer.

Nesses sistemas, a conversão da resposta instrumental no dado químico de interesse, requer a utilização de técnicas de estatística multivariadas, álgebra matricial e análise numérica. Essas técnicas constituem, no momento, a melhor alternativa para a interpretação dos dados e para a aquisição do máximo de informações sobre o sistema.

De todos os ramos da química clássica, talvez a química analítica tenha sido a mais afetada pelo desenvolvimento recente da instrumentação química, associada a computadores.

De fato, a "Chemometrics Society", organização internacional dedicada ao uso e desenvolvimento de métodos em quimiometria, é composta principalmente por químicos interessados em problemas analíticos.

Atualmente, é muito raro se encontrar qualquer periódico respeitável sobre pesquisa em química analítica, que não traga artigos reportando dados obtidos com o auxílio de microprocessadores, ou tratados por matemática multivariada ou métodos estatísticos, sempre com o objetivo de melhorar a qualidade dos resultados ou facilitar sua interpretação.

Outras áreas em química vem sendo também influenciadas pela quimiometria. Os métodos espectrométricos comumente empregados em química orgânica e inorgânica, tornam-se muito mais poderosos quando acoplados à técnicas de matemática multivariada, o que permite a

análise quantitativa de grande quantidade de dados, os quais até agora, só podiam ser analisados de forma qualitativa.

Sistemas de reações que são por natureza multivariados, dependentes de temperatura, pH, solvente, etc., podem ser otimizados de forma sistemática utilizando métodos quimiométricos.

Muitos campos da físico-química são afetados pela quimiometria. Vários modelos universais rígidos, como a química quântica, podem ser aplicados apenas a sistemas simples. As técnicas de reconhecimento de padrões podem se constituir em métodos complementares ou alternativos, na solução desses problemas e de outros na área de físico-química.

O emprego de computadores na aquisição e interpretação de dados, deverá sofrer um aumento muito significativo. O aprimoramento técnico de microprocessadores e microcomputadores, vem ocorrendo mais rapidamente que o desenvolvimento da instrumentação química.

Ademais, o equipamento utilizado em computação, apesar de se tornar a cada dia mais eficiente e flexível, tem seus custos reduzidos, contrastando com a escalada de preços da instrumentação química convencional.

A quimiometria é um ramo recente da química. Excetuando-se alguns esforços isolados, a década de 70 marca o início da atividade de pesquisa concentrada nesse campo. É difícil prever que tipo de pesquisa em quimiometria obterá maior êxito no futuro.

O método de otimização feito pelo Planejamento fatorial foi escolhido por ser muito útil quando se tem muitas variáveis a serem estudadas ao mesmo tempo; por oferecer uma grande quantidade de informações úteis fazendo-se o mínimo de ensaios e além disso, por permitir determinar quais as variáveis e interações que realmente influenciam a resposta e quais não são significativas, evitando ensaios desnecessários.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1) SÍNTESE DE PÉROLAS DE TAMANHO UNIFORME DO HIDROGEL DE POLI-2-HIDROXIETILMETACRILATO (POLI-2-HEMA)⁽¹⁴⁾

Primeiramente, purificou-se o monômero 2-hidroxietilmetacrilato a ser utilizado na síntese, por destilação a vácuo⁽²⁷⁾.

Dissolvem-se, então, 7,70g do monômero purificado; 0,32g de N,N'-metileno bis-acrilamida; 1,00ml de N,N,N',N'-tetraetilmetilenodiamina (TEMED) e 0,75g de alginato de sódio em 25,00ml de água deionizada.

A solução acima descrita foi gotejada manualmente através de uma bureta, dentro de uma solução à 3% (P/V) de cloreto de cálcio/ 0,5% (P/V) de persulfato de amônio, a qual estava sob agitação e sendo vigorosamente borbulhada com nitrogênio.

Pérolas foram imediatamente formadas e ficaram suspensas por cerca de 5 horas, com contínua agitação e sob atmosfera de nitrogênio.

Após este tempo, fez-se uma filtração e as pérolas foram colocadas em uma solução 0,25M de fosfato de sódio monobásico/ 0,10M de ácido etilenodiaminotetracético(EDTA) onde permaneceram por 2 dias.

As pérolas foram, então, lavadas muitas vezes com água deionizada. Todo o experimento foi feito à temperatura ambiente.

Após a síntese, fez-se a secagem das pérolas do hidrogel com hexileno glicol, 2-metil-2,4-pentanediol, sob agitação constante e temperatura controlada (25°C) por 48 horas.

Para esta síntese, o alginato de sódio e o cloreto de cálcio (CaCl₂) foram utilizados na formação do gel de alginato de cálcio que foi o molde utilizado para a polimerização.

Posteriormente, o alginato foi retirado pelo agente quelante de cálcio (solução de fosfato e EDTA), restando somente o polímero poroso desejado, na forma de pérolas.

3.2) ESTUDO DA ABSORÇÃO E LIBERAÇÃO DE DROGAS PELAS PÉROLAS DO HIDROGEL DE POLI-2-HEMA^(41,43,50,52)

Para este estudo utilizou-se como droga o ácido fólico, simulando o methotrexate, um antimetabólito comumente utilizado para tratamento de câncer e cuja estrutura é muito similar à do ácido fólico⁽⁴¹⁾.

- methotrexate : L-4-amino-N¹⁰- ácido pteroilglutâmico PM=508,50

- ácido fólico : ácido pteroilglutâmico (C₁₉H₁₉N₇O₆) PM=441,44

Preparou-se uma solução estoque de ácido fólico 1x10⁻⁴M e a partir desta, fez-se sucessivas diluições, para a construção de uma curva de calibração. Além disto, com a mesma solução estoque, fez-se uma curva de Absorbância x Comprimento de onda, λ (nm), para a verificação do melhor comprimento de onda (λ = 280nm), o qual foi utilizado em todas as medidas posteriores de absorbância.

Todas as medidas de absorbância foram feitas em um Espectrofotômetro UV/Visível, modelo DMS-100, da Perkin Elmer.

Através da curva de calibração escolheu-se a melhor concentração de ácido fólico, a qual foi utilizada em todos os testes (5x10⁻⁵M; A= 0,836).

Fez-se, também, o estudo das variações de absorbância em função do pH da solução de ácido fólico. Para isto, preparou-se soluções de ácido fólico de mesma concentração(5x10⁻⁵M) e variou-se o pH das mesmas, utilizando soluções diluídas de HCl e NaOH.

Os valores de pH utilizados foram: 1, 4, 5 e 8.

Após estes estudos preliminares, fez-se o Planejamento Fatorial 2³, ou seja, com 2 níveis e 3 variáveis (pH, tempo e temperatura), para o processo de absorção do ácido fólico pelas pérolas do hidrogel.

Para este caso, preparou-se soluções de ácido fólico 5x10⁻⁵M em pHs 1, 4, 5 e 8 e variou-se a temperatura de 25 à 65°C e o tempo de 1 à 4 horas.

Antes que se fizesse o estudo da liberação do ácido fólico pelas pérolas do hidrogel, foi necessário carregá-las com a droga. Isto foi feito colocando-as em uma solução de ácido fólico, no melhor pH e melhor temperatura de absorção (resultados obtidos no Planejamento Fatorial anterior feito para a absorção), sob agitação constante e moderada por 24 horas.

Passado este tempo, filtrou-se a solução, lavou-se as pérolas com água deionizada e fez-se um Planejamento Fatorial 2² para o estudo

de liberação da droga (2 níveis e 2 variáveis: pH e temperatura), deixando o tempo como variável independente.

Neste caso, utilizou-se soluções-tampão de pH 1 e 4 e a temperatura foi variada de 30 à 42°C, sendo o tempo fixo em 4 horas.

Todas as soluções utilizadas em ambos os casos (absorção e liberação) foram mantidas sob agitação suave durante a realização dos experimentos e alíquotas de 5ml foram retiradas para as medidas de absorbância.

Utilizou-se também, em ambos os casos (absorção e liberação), 0,5g de pérolas do hidrogel em 50 ml de solução de ácido fólico, e o pH de todas as alíquotas retiradas foi elevado à aproximadamente 6 para que todas as medidas fossem feitas no mesmo valor.

Como os resultados obtidos com o ácido fólico não foram muito satisfatórios, por não terem tido boa reprodutibilidade, repetiu-se todo o procedimento decrito anteriormente utilizando-se o corante alaranjado de metila, $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$, $PM=327,34$, viragem (pH 3,1 à 4,4), coloração de rosa/vermelho ($\lambda=520,9nm$) para amarelo ($\lambda=434,5nm$)⁽⁴⁷⁾.

Condições utilizadas com o corante:

- leituras feitas em $\lambda=434,5nm$,
- concentração de corante utilizada em todos os testes $5 \times 10^{-5} M$ (escolhida pela curva de calibração),
- o estudo da absorção foi feito através de um Planejamento Fatorial 2^3 : pHs 1,4,5 e 8; temperatura de 25 à 65°C e tempo de 1 à 4 horas,
- carregamento das pérolas foi feito em uma solução de corante $5 \times 10^{-5} M$, pH 1 e $T = 25^\circ C$ por 24 horas,
- o estudo da liberação foi feito através de um Planejamento Fatorial 2^3 : pHs 1,4,5 e 8; temperatura de 30 à 42°C e tempo de 1 à 3 horas,
- para todos os testes: 0,5g de pérolas em 50ml da solução do corante, alíquotas de 5ml retiradas para as medidas de absorbância; o pH de todas as amostras foram elevados até 6.

Fez-se ainda, utilizando o corante, duas curvas de liberação controlada; uma com troca de solução e outra sem troca de solução.

No caso da curva feita sem troca de solução, carregou-se as pérolas com o corante (10g de pérolas em 500ml da solução de corante $5 \times 10^{-5} M$, pH 1, 25°C, sob agitação constante, por cerca de 24 horas) e

após a lavagem das mesmas com água deionizada, as mesmas foram colocadas em 500 ml de uma solução-tampão de pH 1 e alíquotas de 5ml foram retiradas a cada 30 minutos.

As leituras de absorbância, para esta curva, foram feitas em $\lambda = 520,9\text{nm}$.

No caso da curva feita com troca de solução, carregou-se as pérolas com o corante (5g de pérolas em 50ml da solução de corante $5 \times 10^{-5}\text{M}$, pH 1, 25°C , por 24 horas, sob agitação constante e moderada) e após a lavagem das mesmas com água deionizada, estas foram colocadas em 50ml de uma solução-tampão de pH 1.

A cada 30 minutos, retirava-se as pérolas e trocava-se a solução-tampão, fazendo as medidas de absorbância para cada amostra em $\lambda = 520,9\text{nm}$.

3.3) ESTUDO DA ABSORÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM VARIAÇÃO DE PESO MOLECULAR PELAS PÉROLAS DO HIDROGEL DE POLI-2-HEMA

O estudo da absorção com variações de Peso Molecular foi feito utilizando-se soluções de: alaranjado de metila $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ($\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_3\text{NaO}_3\text{S}$; $\text{PM}=327,34$); nitro blue tetrazolium $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ($\text{C}_{40}\text{H}_{30}\text{C}_{12}\text{N}_{10}\text{O}_6$; $\text{PM} = 817,6$) e vitamina B12 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ($\text{C}_{63}\text{H}_{88}\text{CoN}_{14}\text{O}_{14}\text{P}$; $\text{PM} = 1355,38$).

Para todos os casos, fez-se uma curva de Absorbância em função do Comprimento de Onda $\lambda(\text{nm})$ e uma curva de absorbância em função do pH.

Preparou-se soluções das três substâncias, todas em pH 1 e à 25°C e colocou-se 10g de pérolas para 100 ml de cada solução.

Retirou-se alíquotas de 5ml de cada solução após 2, 4 e 6 horas e mediu-se as absorbâncias nos seguintes comprimentos de onda:

- alaranjado de metila : $\lambda = 520,9\text{nm}$
- nitro blue tatrazolium : $\lambda = 265,6\text{nm}$
- vitamina B12 : $\lambda = 365,6\text{nm}$

Construiu-se então, um gráfico de tempo em função da porcentagem (%) de absorção e dos Pesos Moleculares, comparando os três casos e verificando-se a influência do Peso Molecular no processo de absorção de substâncias pelas pérolas do hidrogel.

3.4) VERIFICAÇÃO DA POROSIDADE DAS PÉROLAS DO HIDROGEL DE POLI-2-HEMA POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Estudou-se a superfície das pérolas e verificou-se a presença de porosidade, utilizando-se a microscopia eletrônica de varredura.

Para isto foi necessário fazer a secagem das pérolas pelo processo de liofilização, o qual garantiu a retirada de água do interior das pérolas do hidrogel, sem o rompimento da estrutura do mesmo e mantendo intactas suas características.

Depois de feita a secagem, as pérolas foram fixadas em um suporte, metalizadas com ouro e as fotos foram tiradas em um microscópio eletrônico de varredura da marca Cambridge, modelo Steroscan S4-10.

As condições para as fotos foram as seguintes: 25 KV e 35 graus de inclinação. Tirou-se fotos da superfície assim como do interior poroso das pérolas do hidrogel.

Observações:

1) As soluções-tampão utilizadas no procedimento experimental foram as seguintes:

pH 1 : HCl 0,2M / KCl 0,2M

pH 4 : Tampão acetato (ácido acético 0,2M / acetato de sódio 0,2M)

pH 5 : Tampão acetato (ácido acético 0,2M / acetato de sódio 0,2M)

pH 6 : Tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico 0,2M / fosfato de sódio dibásico 0,2M)

pH 8 : Tampão fosfato (fosfato de sódio monobásico 0,2M / fosfato de sódio dibásico 0,2M)

2) Todos os experimentos realizados para os Planejamentos Fatoriais foram feitos em duplicata (tanto para absorção quanto para a liberação), para que se tivesse a estimativa do erro experimental.

RESULTADOS

Estão descritos à seguir os resultados obtidos neste trabalho na forma de tabelas e gráficos, para melhor visualização dos dados.

4.1) ENSAIOS REALIZADOS COM O ÁCIDO FÓLICO

Tabela 3) Curva de calibração do Ácido Fólico à pH=5, T=25°C e λ=280 nm.

Concentração Molar	Absorbância
1x10 ⁻⁵ M	0.236
2x10 ⁻⁵ M	0.466
3x10 ⁻⁵ M	0.708(desprezado)
4x10 ⁻⁵ M	0.672
5x10 ⁻⁵ M	0.836
6x10 ⁻⁵ M	0.999
7x10 ⁻⁵ M	1.136
8x10 ⁻⁵ M	1.273
9x10 ⁻⁵ M	1.492
1x10 ⁻⁴ M	1.512

Tabela 4) Estudo da variação da absorbância em função do pH para soluções de Ácido Fólico (5x10⁻⁵M); λ=280 nm.

pH	Absorbância	λ (nm)
1.08	0.470	280
4.03	0.510	280
4.93	0.739	280
5.52	0.985	280
8.20	1.309	280

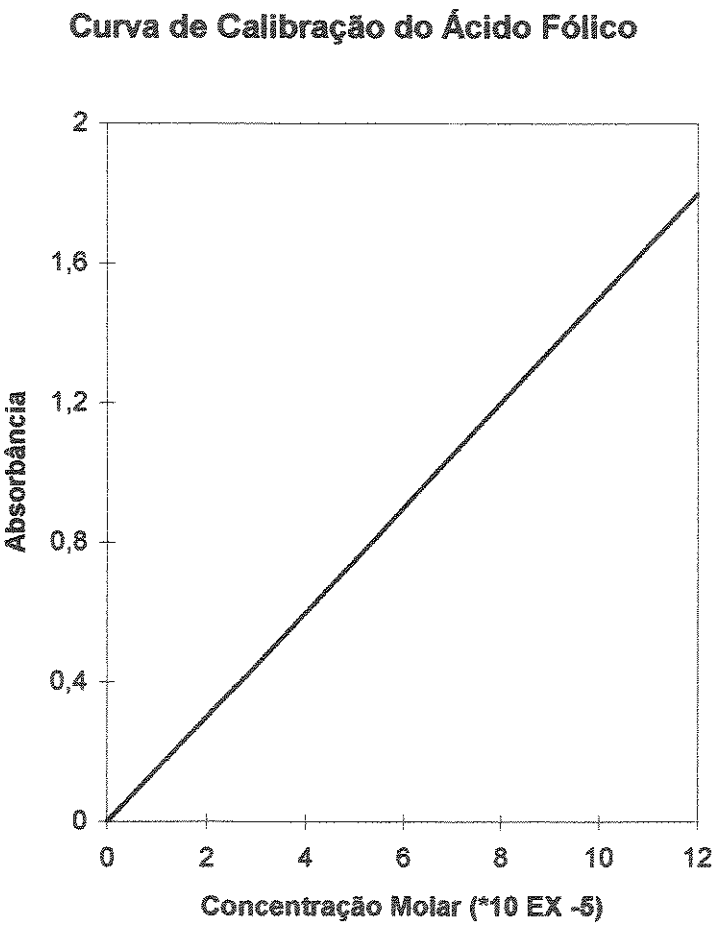


Figura 11: Curva de Calibração do Ácido Fólico por Variação de Absorbância com Concentração; $\lambda=280\text{ nm}$

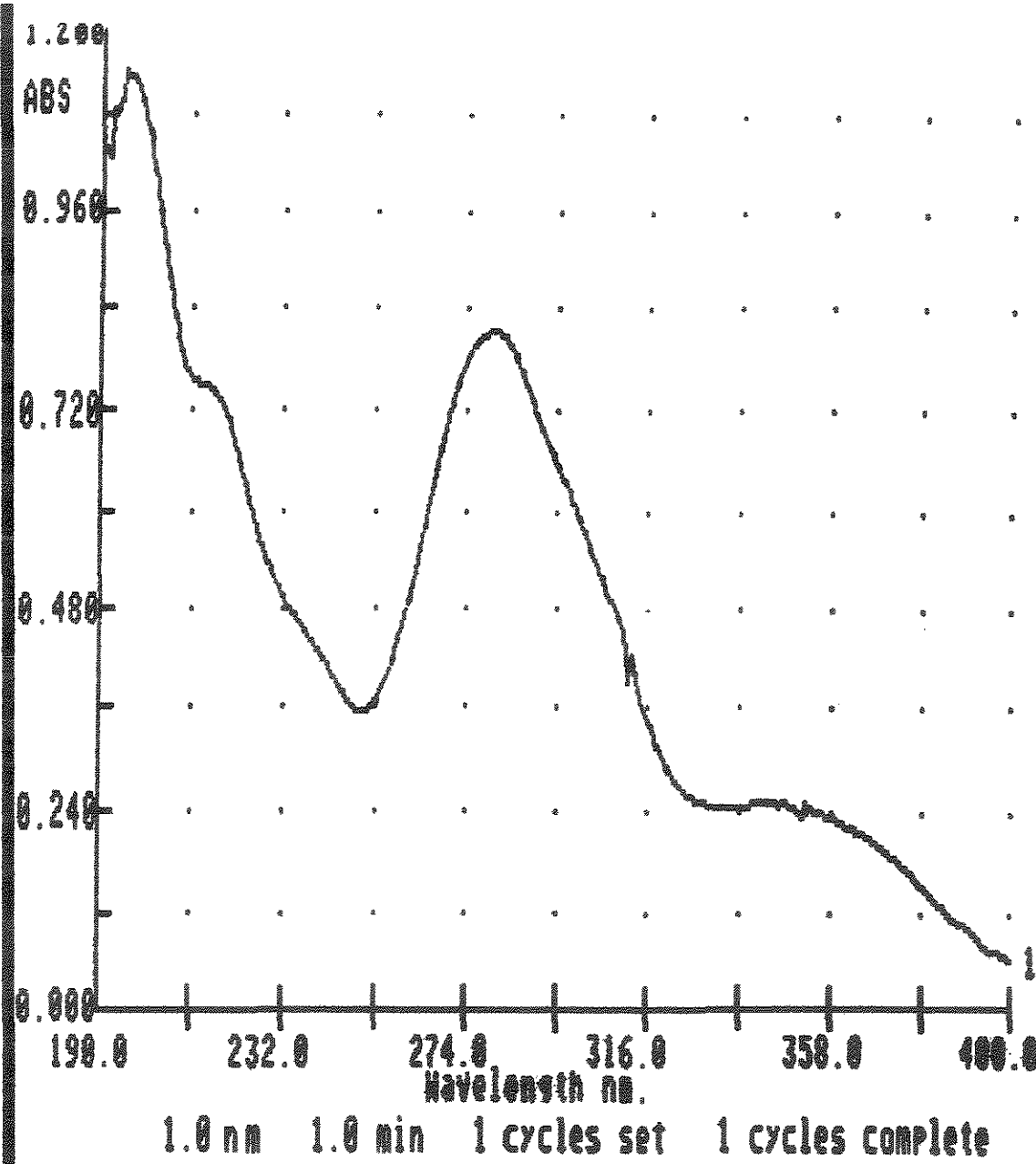


Figura 12: Curva de Absorbância (Abs) x Comprimento de Onda (λ ,nm) do Ácido Fólico

Tabela 6) Resultados dos efeitos obtidos no processo de absorção do Ácido Fólico, calculados através do Planejamento Fatorial 2^3 , com base nas Tabelas 5a e 5b

	Tab.3a	Tab.3b
Efeitos	Estimativa±Erro Padrão	Estimativa±ErroPadrão
pH	0.268 ± 0.104	0.180 ± 0.029
Temperatura (T)	0.343 ± 0.104	0.292 ± 0.029
tempo (t)	-0.126 ± 0.104	-0.154 ± 0.029
pHxT	0.090 ± 0.104	-0.302 ± 0.029
pHxt	-0.084 ± 0.104	-0.096 ± 0.029
Txt	-0.047 ± 0.104	0.020 ± 0.029
pHxTxt	-0.022 ± 0.104	0.021 ± 0.029

Tabela 7) Ensaio do Planejamento Fatorial 2^2 feitos para o processo de liberação do Ácido Fólico das pérolas do hidrogel

Condições utilizadas:

Variáveis	Nível Baixo	Nível Alto
pH	1 (-)	4 (+)
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	30 (-)	42 (+)

tempo fixo de 4 horas (variável independente)

		Interação	Replicatas		
pH	T	pHxT	I	II	Média
-	-	+	0.037	0.065	0.051
+	-	-	0.014	0.009	0.012
-	+	-	0.030	0.016	0.022
+	+	+	0.018	0.070	0.044

Tabela 8) Resultados dos efeitos obtidos no processo de liberação do Ácido Fólico, calculados a partir do Planejamento Fatorial 2^2 , com base na Tabela 7.

Efeitos	Estimativa±Erro Padrão
pH	-0.009 ± 0.015
T	0.002 ± 0.015
pHxT	0.031 ± 0.015

4.2) ENSAIOS REALIZADOS COM O ALARANJADO DE METILA

Tabela 9) Estudo da variação da absorbância em função do pH para soluções do corante Alaranjado de Metila.

pH	Absorbância	λ (nm)
1.34	0.816	520.9
3.00	0.686	434.5
5.34	0.676	434.5
6.80	0.690	431.8
10.30	0.740	434.5

Tabela 10) Ensaios do Planejamento Fatorial 2³ feitos para a absorção do Alaranjado de Metila pelas pérolas do hidrogel.

10a) Condições utilizadas:

Variáveis	Nível Baixo		Nível Alto						
pH	1 (-)		4 (+)						
Temperatura (° C)	25 (-)		65 (+)						
tempo (horas)	1 (-)		4 (+)						
<u>Interações</u>							<u>Replicatas</u>		
pH	T	t	<u>pHxT</u>	<u>pHxt</u>	<u>Txt</u>	<u>pHxTxt</u>	<u>Primeira</u>	<u>Segunda</u>	Média
-	-	-	+	+	+	-	0.435	0.413	0.424
+	-	-	-	-	+	+	0.670	0.677	0.674
-	+	-	-	+	-	+	0.464	0.463	0.464
+	+	-	+	-	-	-	0.654	0.650	0.652
-	-	+	+	-	-	+	0.387	0.388	0.388
+	-	+	-	+	-	+	0.592	0.595	0.594
-	+	+	-	-	+	-	0.374	0.388	0.381
+	+	+	+	+	+	+	0.578	0.575	0.577

média : 0.5193 ± 0.0017

10b) Condições utilizadas:

Variáveis	Nível Baixo	Nível Alto
pH	5 (-)	8 (+)
Temperatura (° C)	25 (-)	65 (+)
tempo (horas)	1 (-)	4 (+)

Interações							Replicatas		
pH	T	t	pHxT	pHxt	Txt	pHxTxt	Primeira	Segunda	Média
-	-	-	+	+	+	-	0.651	0.635	0.643
+	-	-	-	-	+	+	0.653	0.661	0.657
-	+	-	-	+	-	+	0.623	0.626	0.625
+	+	-	+	-	-	-	0.626	0.617	0.622
-	-	+	+	-	-	+	0.600	0.620	0.610
+	-	+	-	+	-	-	0.629	0.639	0.634
-	+	+	-	-	+	-	0.564	0.570	0.567
+	+	+	+	+	+	+	0.565	0.573	0.569

média : 0.6159 ± 0.0020

Tabela 11) Resultados dos efeitos obtidos no processo de absorção do Alaranjado de Metila calculados através do Planejamento Fatorial 2³, com base nas Tabelas 10a e 10b.

	Tab. 8a	Tab. 8b
Efeitos	Estimativa±Erro Padrão	Estimativa±ErroPadrão
pH	0.210 ± 0.004	0.009 ± 0.004
Temperatura (T)	-0.002 ± 0.004	-0.040 ± 0.004
tempo (t)	-0.069 ± 0.004	-0.042 ± 0.004
pHxT	-0.018 ± 0.004	-0.010 ± 0.004
pHxt	-0.009 ± 0.004	0.004 ± 0.004
Txt	-0.011 ± 0.004	-0.014 ± 0.004
pHxTxt	0.013 ± 0.004	-0.001 ± 0.004

Os resultados mais significativos dos efeitos foram provenientes da Tabela 10a. Devido a isto, os dados contidos nesta tabela foram utilizados no Programa Fatorial descrito na parte de discussão dos resultados (pág. 73).

Os efeitos mais importantes foram pH e tempo⁽⁴³⁾.

Tabela 12) Ensaios do Planejamento Fatorial 2³ feitos para a liberação do Alaranjado de Metila das pérolas do hidrogel.

12a) Condições utilizadas :

Variáveis	Nível Baixo	Nível Alto
pH	1 (-)	4 (+)
Temperatura (° C)	30 (-)	42 (+)
tempo (horas)	1 (-)	3 (+)

Interações							Replicatas		
pH	T	t	pHxT	pHxt	Txt	pHxTxt	Primeira	Segunda	Média
-	-	-	+	+	+	-	0.026	0.025	0.025
+	-	-	-	-	+	+	0.006	0.007	0.006
-	+	-	-	+	-	+	0.021	0.020	0.021
+	+	-	+	-	-	-	0.009	0.003	0.006
-	-	+	+	-	-	+	0.059	0.058	0.059
+	-	+	-	+	-	-	0.030	0.031	0.031
-	+	+	-	-	+	-	0.059	0.058	0.058
+	+	+	+	+	+	+	0.021	0.029	0.025

média : 0.0289 ± 0.0006

12b) Condições utilizadas :

Variáveis	Nível Baixo	Nível Alto
pH	5 (-)	8 (+)
Temperatura (° C)	30 (-)	42 (+)
tempo (horas)	1 (-)	3 (+)

Interações							Replicatas		
pH	T	t	pHxT	pHxt	Txt	pHxTxt	Primeira	Segunda	Média
-	-	-	+	+	+	-	0.026	0.024	0.025
+	-	-	-	-	+	+	0.006	0.006	0.006
-	+	-	-	+	-	+	0.028	0.034	0.031
+	+	-	+	-	-	-	0.011	0.011	0.011
-	-	+	+	-	-	+	0.059	0.053	0.056
+	-	+	-	+	-	+	0.024	0.021	0.023
-	+	+	-	-	+	-	0.063	0.073	0.068
+	+	+	+	+	+	+	0.028	0.027	0.028

média : 0.0308 ± 0.0009

Tabela 13) Resultados dos efeitos obtidos no processo de liberação do Alaranjado de Metila calculados através do Planejamento Fatorial 2^3 , com base nas Tabelas 12a e 12b.

	Tab. 10a	Tab. 10b
Efeitos	Estimativa $\pm$ Erro Padrão	Estimativa $\pm$ ErroPadrão
pH	-0.0238 $\pm$ 0.0012	-0.0281 $\pm$ 0.0017
Temperatura (T)	-0.0028 $\pm$ 0.0012	0.0068 $\pm$ 0.0017
tempo (t)	0.0287 $\pm$ 0.0012	0.0255 $\pm$ 0.0017
pHxT	-0.0001 $\pm$ 0.0012	-0.0016 $\pm$ 0.0017
pHxt	-0.0068 $\pm$ 0.0012	-0.0088 $\pm$ 0.0017
Txt	-0.0003 $\pm$ 0.0012	0.0016 $\pm$ 0.0017
pHxTxt	0.0023 $\pm$ 0.0012	-0.0014 $\pm$ 0.0017

Os resultados mais significativos dos efeitos foram provenientes da Tabela 12a. Devido a isto, os dados contidos nesta tabela foram utilizados no Programa Fatorial descrito na parte de discussão dos resultados (pág. 74).

Os efeitos mais importantes foram : pH, tempo e a interação entre o pH e o tempo (pHxt)⁽⁴³⁾.

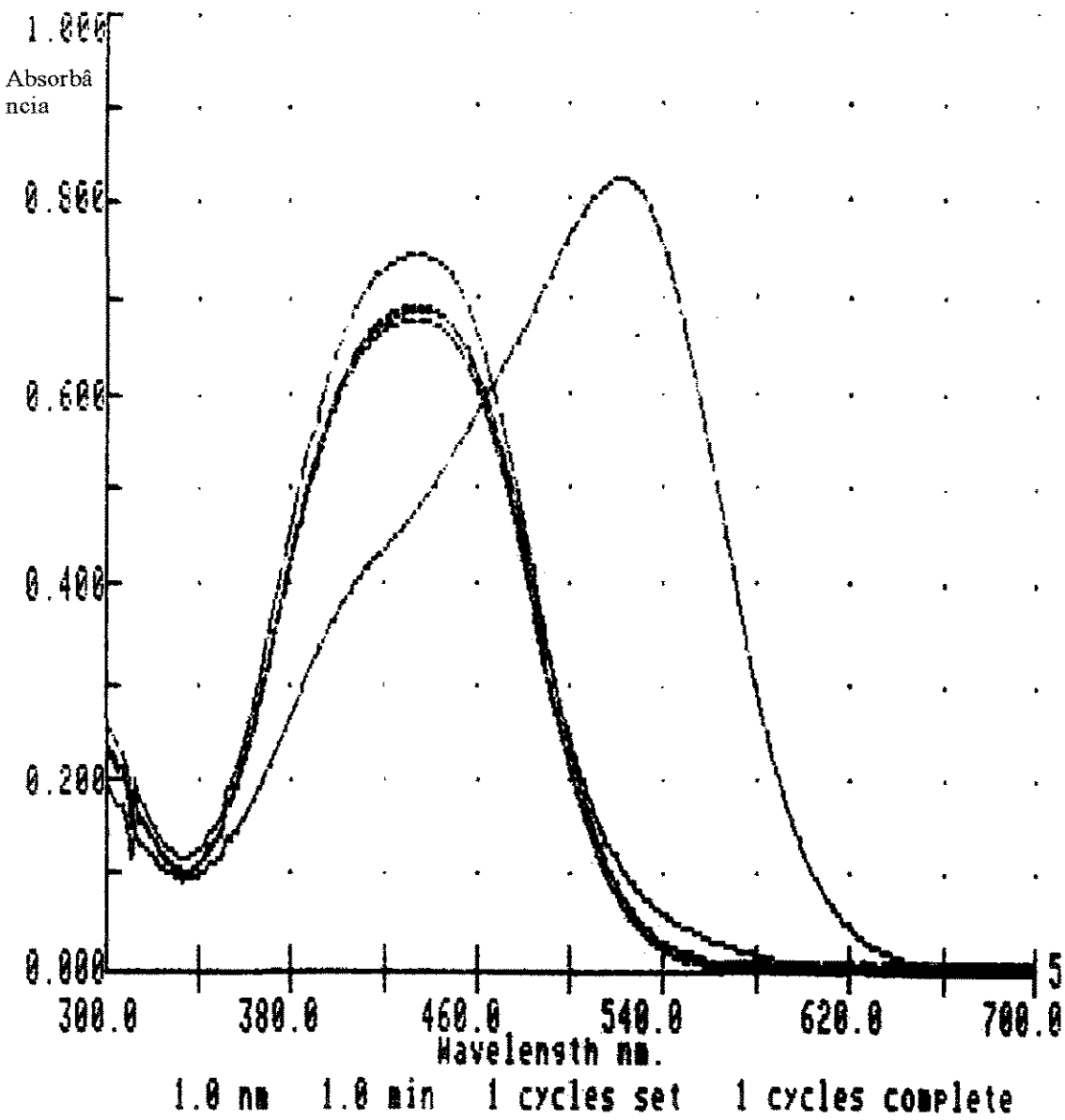


Figura 13: Curva de Absorbância (ABS)xComprimento de Onda (λ ,nm) do Alaranjado de Metila (em função do pH; dados da Tab. 9; pág.48)

Tabela 14) Curvas de liberação controlada do Alaranjado de Metila ($C=5 \times 10^{-5} M$) pelas pérolas do hidrogel (com e sem troca da solução-tampão de HCl/KCl, pH=1, $T=25^{\circ}C$); $\lambda=520,9$ nm.

14a) Com troca de solução :

Tempo (horas)	Absorbância
0	0
0.5	0.035
1.0	0.029
1.5	0.016
2.0	0.020
2.5	0.010
3.0	0.011
3.5	0.009
4.0	0.005
4.5	0.002
5.0	0.003

14b) Sem troca de solução :

Tempo (horas)	Absorbância
0	0
0.5	0.010
1.0	0.016
1.5	0.019
2.0	0.024
2.5	0.026
3.0	0.027
3.5	0.029
4.0	0.030
4.5	0.031
5.0	0.032
264.0	0.035
266.0	0.035

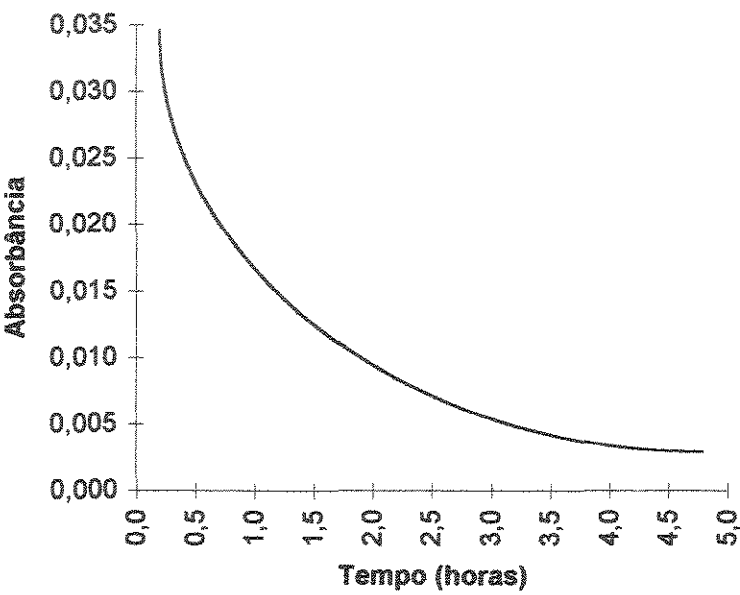


Figura 14: Curva de liberação Controlada do Alaranjado de Metila (com troca da solução-tampão)

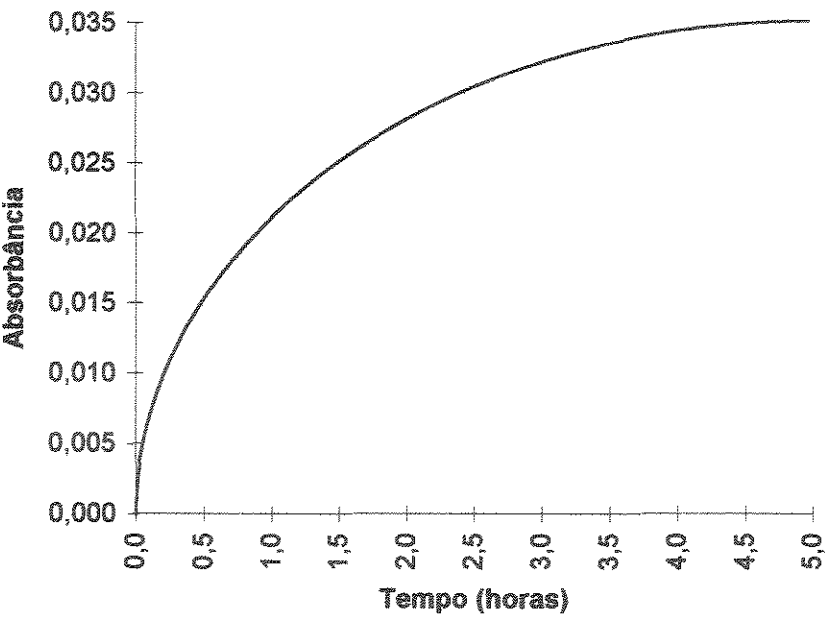


Figura 15: Curva de liberação Controlada do Alaranjado de Metila (sem troca da solução-tampão)

Tabela 15) Estudo da variação da absorbância em função do pH para as seguintes substâncias de Peso Molecular crescente.

15a) Alaranjado de Metila ($5 \times 10^{-5} \text{M}$; PM = 327.34)

pH	Absorbância	λ (nm)
1.34	0.816	520.9
3.00	0.686	434.5
5.34	0.676	434.5
6.80	0.690	431.8
10.30	0.740	434.5

15b) Nitro Blue Tetrazolium ($5 \times 10^{-5} \text{M}$; PM = 817.60)

pH	Absorbância	λ (nm)
1.30	0.243	268.1
3.03	0.273	266.1
6.89	0.268	265.4
8.31	0.260	266.1
9.93	0.254	267.4

15c) Vitamina B12 ($5 \times 10^{-5} \text{M}$; PM = 1355.38)

pH	Absorbância	λ (nm)
1.17	0.951	367.8
2.84	1.155	369.3
6.64	1.168	369.3
8.09	1.164	368.5
9.98	1.183	369.3

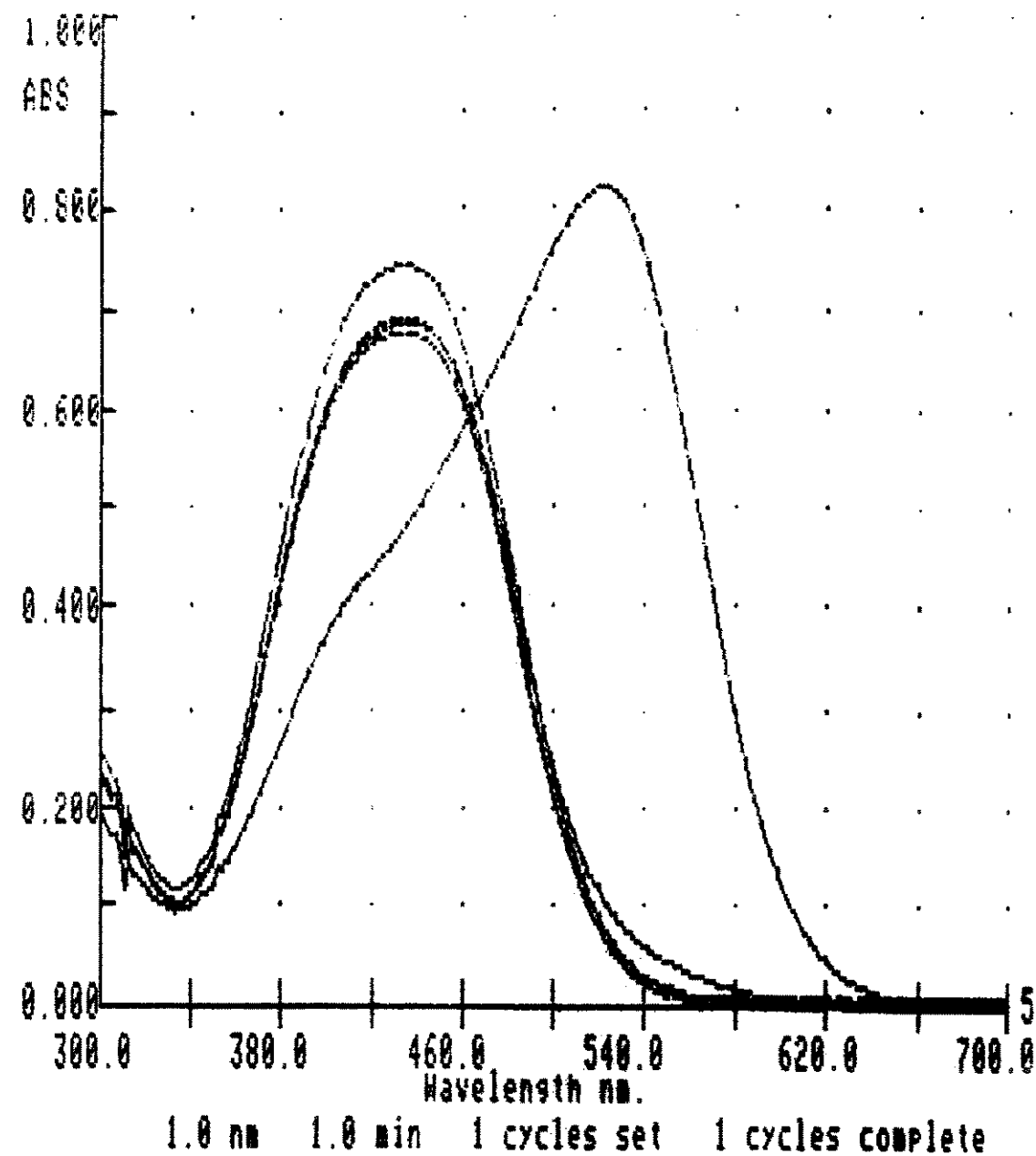


Figura 16: Curva de Absorbância (ABS)xComprimento de Onda (λ ,nm) do Alaranjado de Metila em função do pH (dados da Tab 15a; pág. 55)

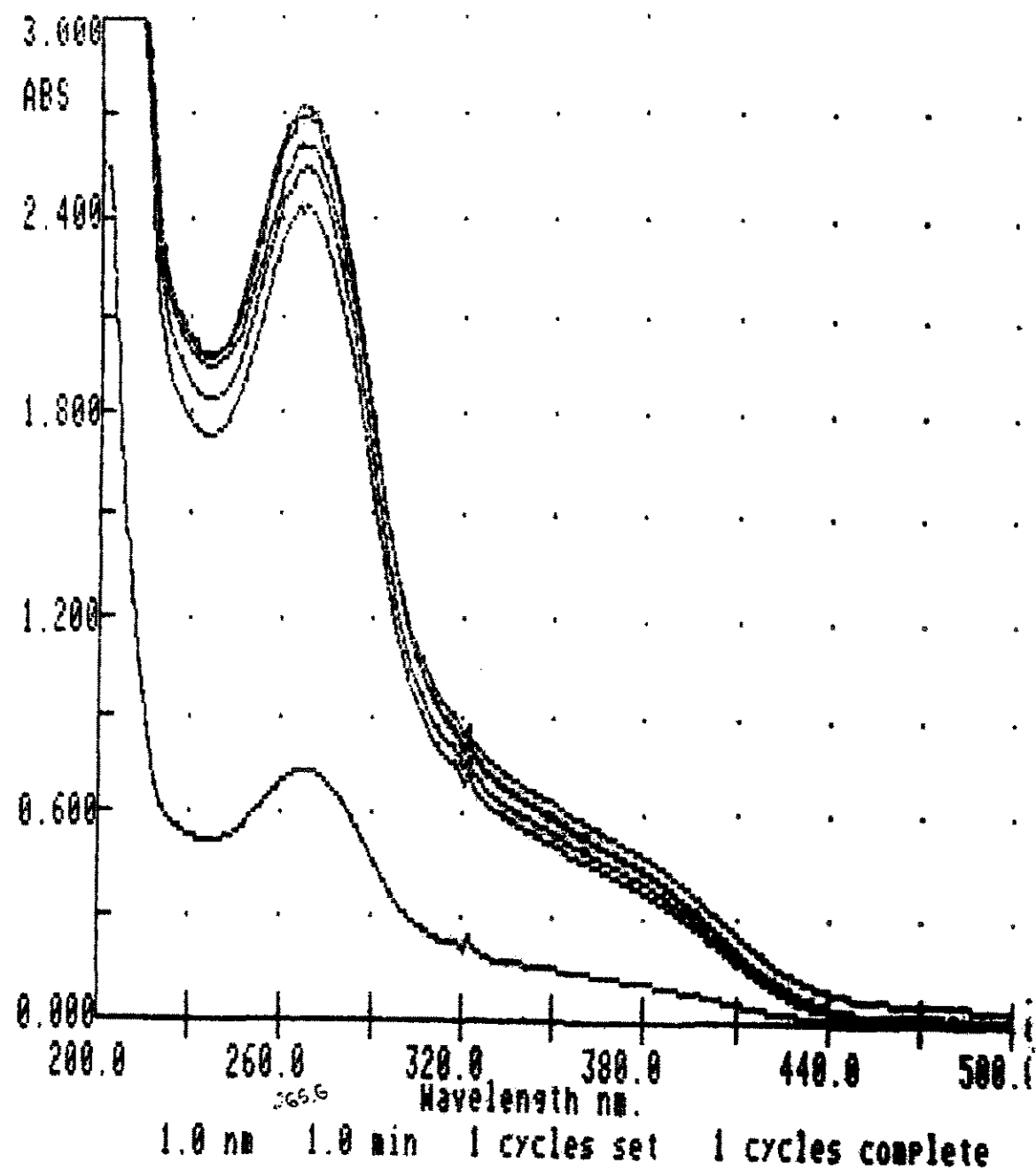


Figura 17: Curvas de Variação de Absorbância (ABS) com o Comprimento de Onda (wavelength, λ , nm) em Função do pH do Nitro Blue Tetrazolium (dados da Tab. 15b, pág. 55)

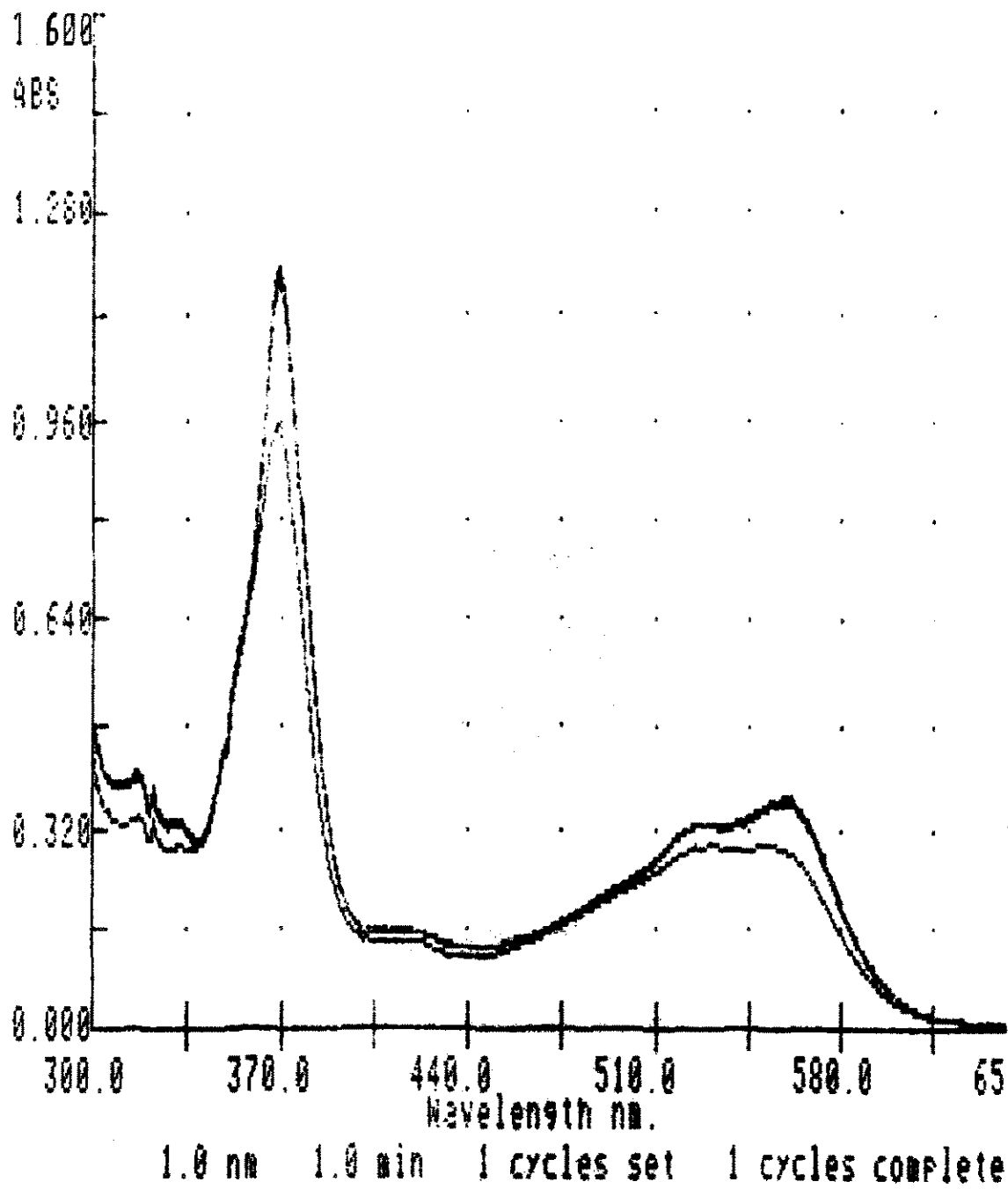


Figura 18: Curva de Absorbância (ABS)xComprimento de Onda (λ ,nm) da Vitamina B12 em função do pH (dados da Tab. 15c, pág. 55)

Tabela 16) Estudo da absorção com substâncias de Pesos Moleculares crescentes em função do tempo.

16a) Alaranjado de Metila($5 \times 10^{-5} \text{M}$; pH 1.28; PM=327.34); $\lambda=520,9 \text{nm}$.

Tempo (horas)	Absorbância	% de Absorção
0	0.788	
2	0.643	18.40
4	0.588	25.38
6	0.575	27.03

16b) Nitro Blue Tetrazolium($5 \times 10^{-5} \text{M}$; pH 1.27; PM=817.60); $\lambda=265,6 \text{nm}$.

Tempo (horas)	Absorbância	% de Absorção
0	0.246	
2	0.234	4.87
4	0.215	13.60
6	0.204	17.07

16c) Vitamina B12($5 \times 10^{-5} \text{M}$; pH 1.28; PM=1355.38); $\lambda=367,8 \text{nm}$.

Tempo (horas)	Absorbância	% de Absorção
0	0.863	
2	0.842	2.43
4	0.832	3.59
6	0.828	4.06

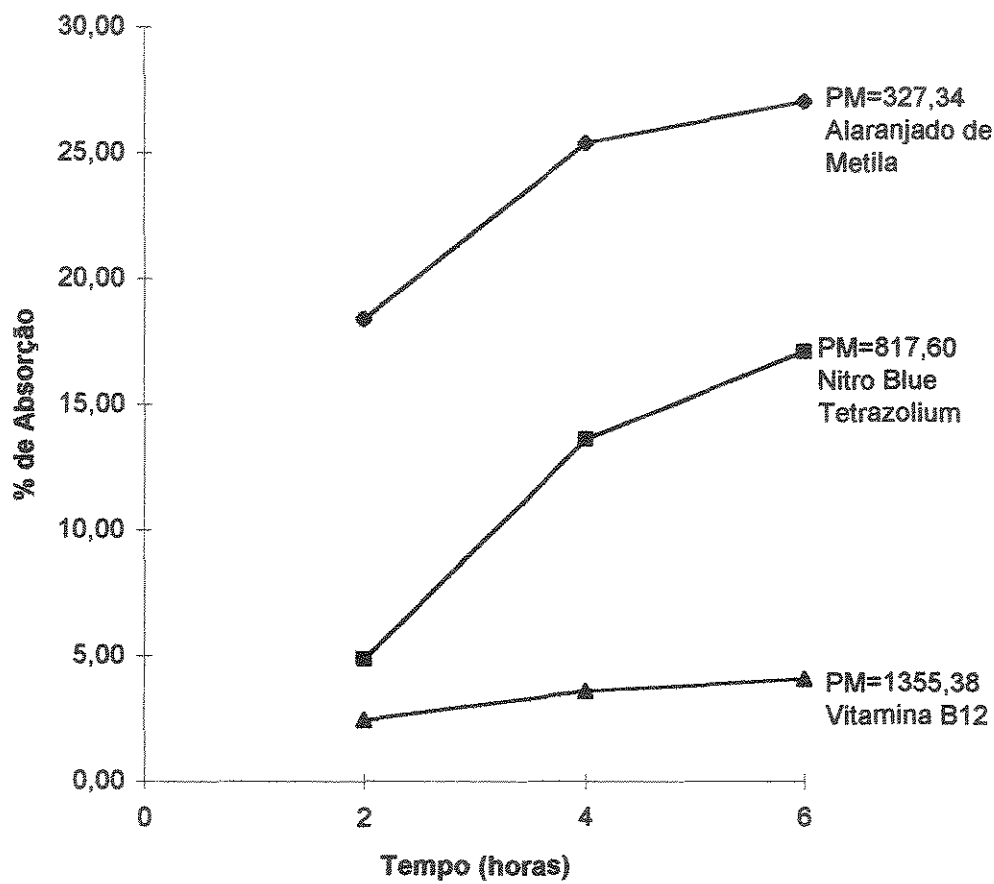
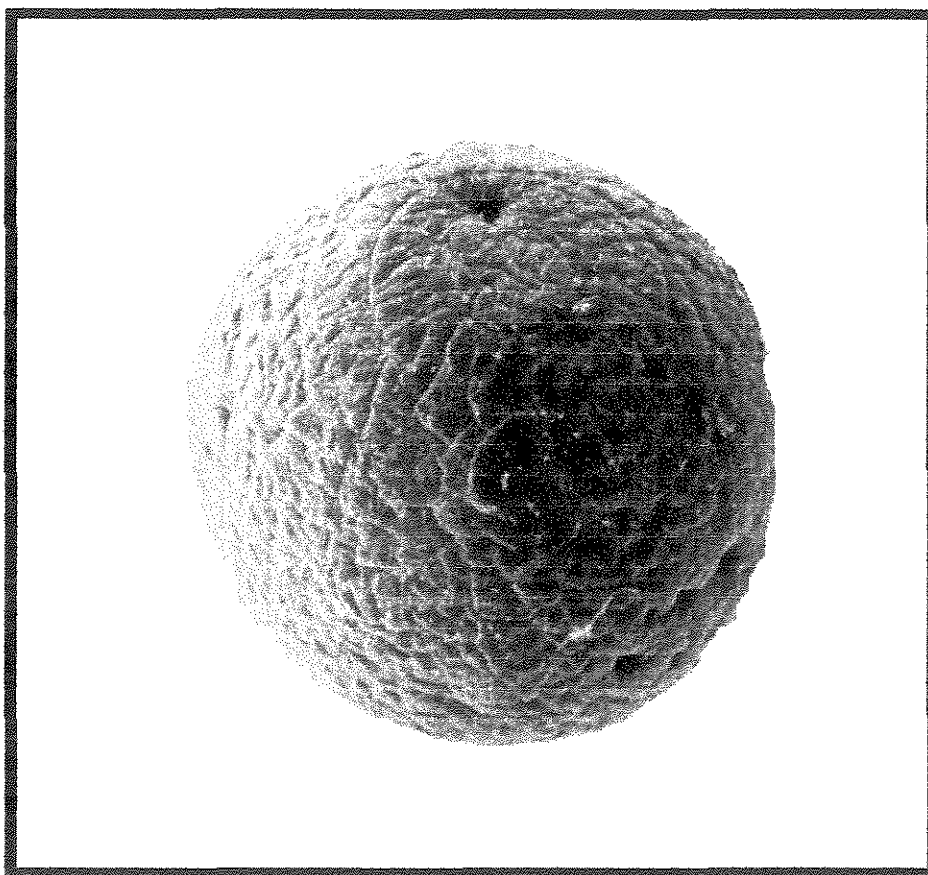


Figura 19: Curva de Absorção de Substâncias com Variação de Peso Molecular



**Figura 20: Micrografia da Pérola do Hidrogel de poli-2 HEMA
obtida por MEV**

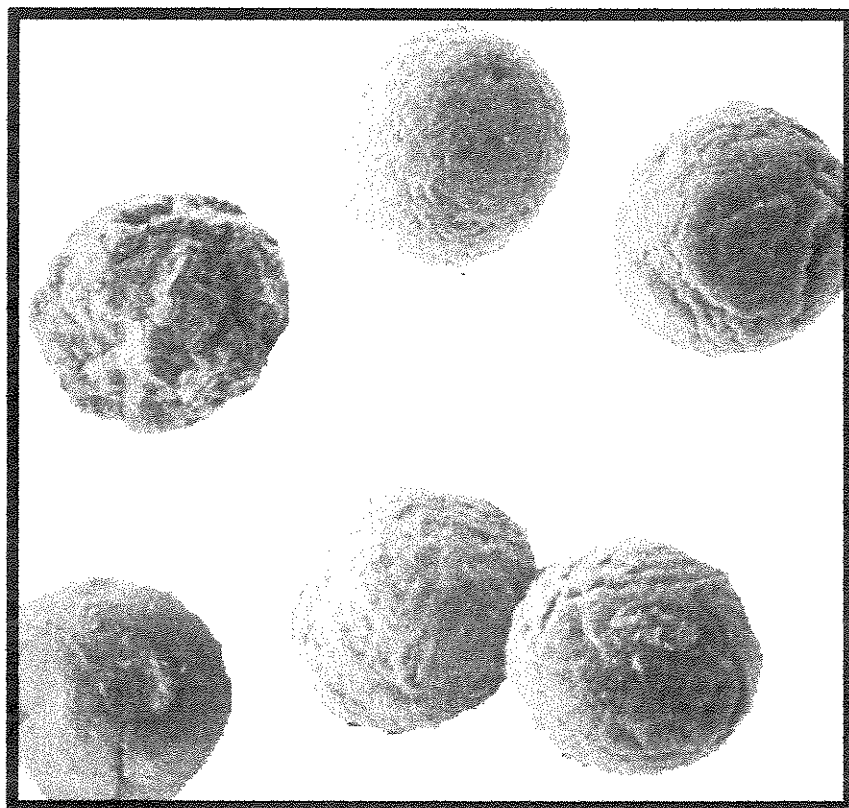


Figura 21: Micrografia da Uniformidade das Pérolas do Hidrogel de poli-2 HEMA obtida por MEV

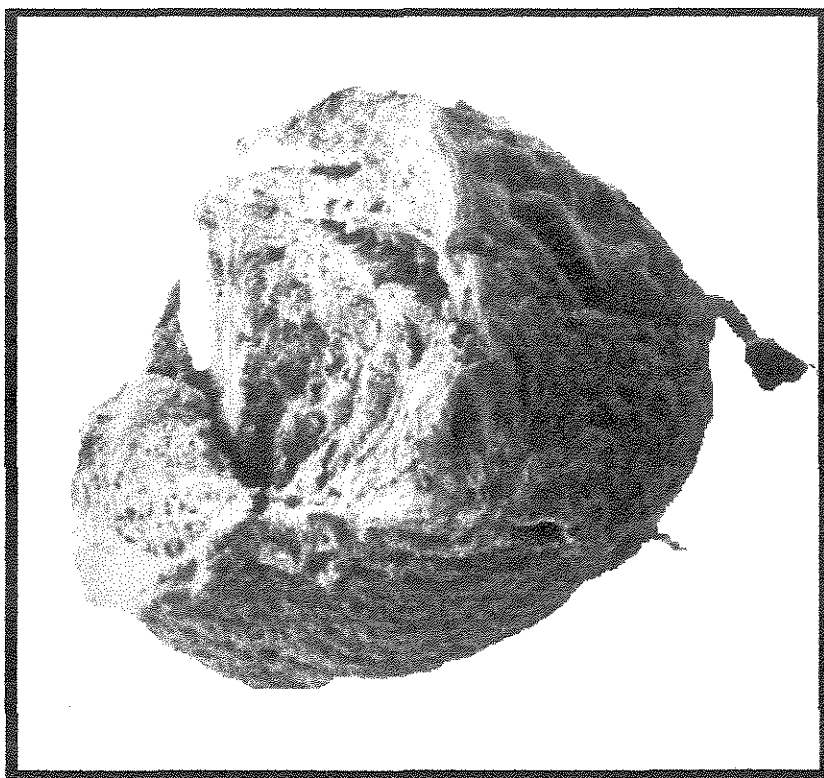


Figura 22: Micrografia do Interior Poroso da Pérola do Hidrogel de poli-2 HEMA obtida por MEV

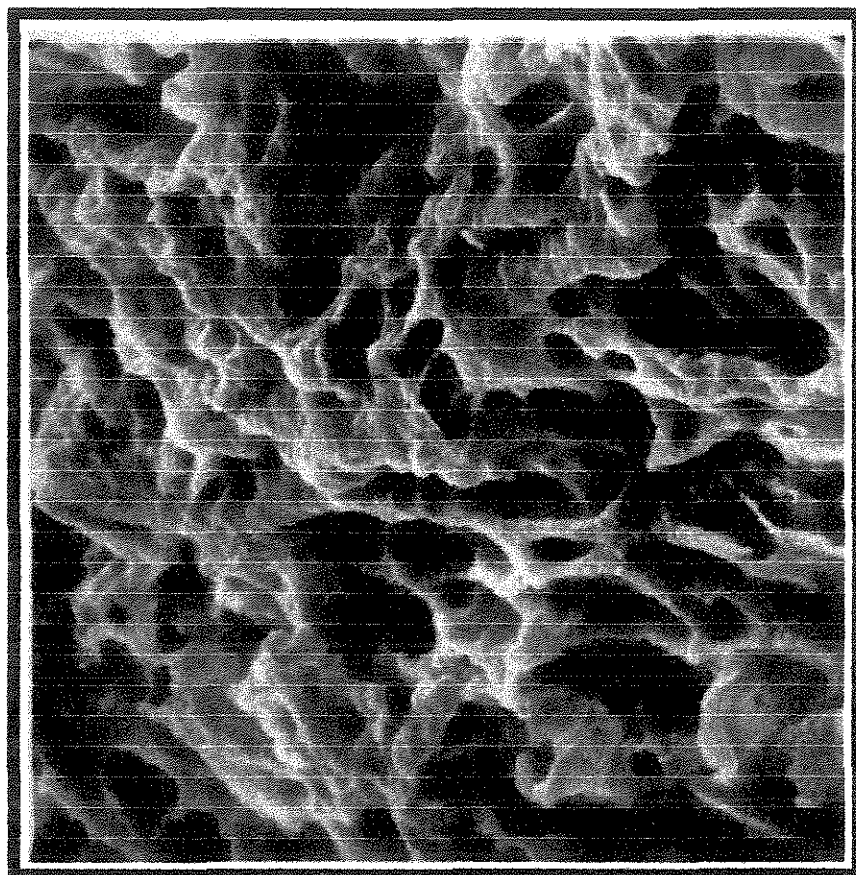


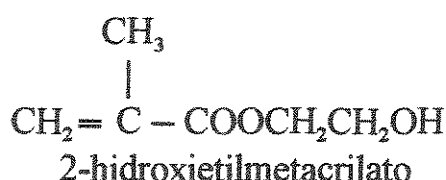
Figura 23: Micrografia dos Poros no Interior das Pérolas do Hidrogel de poli-2 HEMA obtida por MEV

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1) SÍNTESE DE PÉROLAS DE TAMANHO UNIFORME DO HIDROGEL DE POLI-2-HIDROXIETILMETACRILATO (POLI-2-HEMA)⁽¹⁴⁾

5.1.1) Função dos Reagentes e Polimerização com Iniciação Redox:

Antes da síntese, fez-se a purificação do monômero 2-hidroxietilmetacrilato, 2-HEMA, através de uma destilação a vácuo, para a remoção do inibidor hidroquinona, como detalhado em Materiais e Métodos.



A polimerização ocorrida na síntese deste hidrogel foi por adição, a qual pode ser representada pelo seguinte esquema⁽⁵¹⁾:



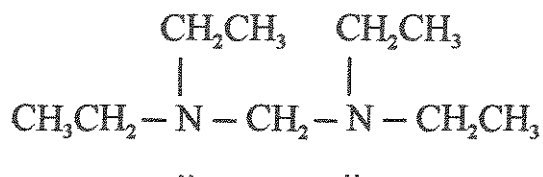
O processo de iniciação consistiu na produção de radicais livres dentro da solução de monômero, pela quebra homolítica das ligações covalentes do iniciador.

Neste caso, a dissociação homolítica foi feita quimicamente, através de um sistema redox.

Os iniciadores redox são formados por um agente oxidante e um agente redutor. A reação entre estes compostos produz radicais intermediários, os quais iniciam, então, a polimerização do monômero.

A vantagem deste tipo de iniciação (redox) é que se tem a produção de radicais à taxas razoáveis em temperatura moderadas (0-50° C)⁽⁵¹⁾.

O agente redutor utilizado para esta síntese foi o grupo amina (iniciador redox), proveniente da substância N,N,N',N'-tetraetilmetilenodiamina (TEMED):



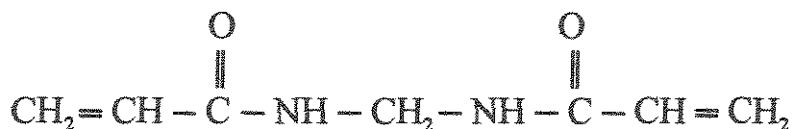
e o persulfato foi usado como co-iniciador redox (agente oxidante) proveniente do persulfato de amônio:



O persulfato foi utilizado por ser um bom formador de radicais livres em meio aquoso.

O polímero sintetizado possui ligações cruzadas formando uma rede tridimensional, com poros, que permitem a absorção de água sem dissolução do polímero (fenômeno denominado entumescimento).

Para a formação dessas ligações cruzadas utilizou-se como reticulador tetrafuncional o N,N'-metileno-bis-acrilamida:



Já foi comentado anteriormente que o oxigênio deve ser eliminado da solução reacional. Isto deve ser feito porque o oxigênio molecular pode inibir ou acelerar a polimerização, dependendo das condições do experimento.

O problema de se ter oxigênio no meio reacional é que este tem a capacidade de reagir com compostos insaturados (no caso, os monômeros) e também com radicais livres (no caso, o iniciador da polimerização).

O oxigênio pode, então, atuar de duas formas opostas, segundo as seguintes reações⁽⁵¹⁾:



$R'O_2R' \rightarrow$ aldeídos, que são agentes de transferência muito efetivos (aceleram a polimerização).

Devido a isto, eliminou-se o oxigênio do meio reacional, através do borbulhamento de nitrogênio.

5.1.2) Discussão sobre o Processo de Síntese⁽¹⁴⁾ :

Pérolas de gel esféricas de alginato de cálcio tem sido amplamente utilizadas para a imobilização de biocatalisadores, uma vez que elas são facilmente preparadas sob condições brandas.

Os íons cálcio e o alginato carregado negativamente são estabilizados via a formação de um complexo, levando à formação imediata de uma rede porosa de gel que incha com água.

Quando o monômero polimerizável (2-HEMA), o agente reticulador (N,N' metileno-bis-acrilamida) e um dos iniciadores redox (TEMED ou tetraetilenodiamina) foram embebidos nas pérolas do gel de alginato de cálcio, o co-iniciador redox (persulfato de amônio) do meio, rapidamente se difunde dentro do gel e inicia a polimerização.

A completa remoção do oxigênio dissolvido no meio, o qual induz a uma polimerização imediata, foi um fator importante para iniciar a polimerização do monômero intacto e manter a concentração das ligações cruzadas nas pérolas do alginato de cálcio.

Uma polimerização lenta resultaria num poli-2-HEMA com ligações não efetivas (loosely) devido à difusão do monômero e do agente reticulador das pérolas para dentro da fase aquosa.

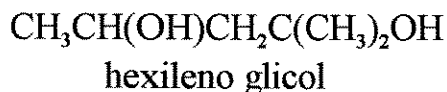
O poli-2-HEMA reticulado dentro do gel de alginato de cálcio pode ser descrito como uma estrutura de rede polimérica interpenetrante (IPN), onde as duas redes poliméricas estão entrelaçadas umas com as outras.

Do gel IPN, pérolas do gel poli-2-HEMA foram facilmente fabricadas, de forma esférica e grande, quando o polímero alginato foi dissolvido para fora pela adição do agente quelante de cálcio (solução de fosfato + EDTA).

As pérolas do gel obtidas tinham uma forma esférica uniforme (2mm de diâmetro) com uma estreita distribuição de tamanho, sugerindo que as pérolas do gel de poli-2-HEMA tinham a mesma dimensão que no gel IPN de poli-2HEMA e alginato, depois da dissolução do alginato das pérolas.

As pérolas obtidas foram colocadas posteriormente em hexileno glicol, 2-metil-2,4-pentanediol, que é bastante higroscópico, para

As pérolas obtidas foram colocadas posteriormente em hexileno glicol, 2-metil-2,4-pentanediol, que é bastante higroscópico, para a retirada da água do interior das mesmas e cuja fórmula molecular é a seguinte:



5.2) ESTUDO DA ABSORÇÃO E LIBERAÇÃO DE DROGAS PELAS PÉROLAS DO HIDROGEL DE POLI-2-HEMA^(43,47,50)

Como já foi comentado em Materiais e Métodos a droga escolhida para os estudos de absorção e liberação foi o ácido fólico por ter estrutura semelhante a um antimetabólito muito utilizado em tratamentos de câncer (methotrexate) e cuja fórmula estrutural é a seguinte:

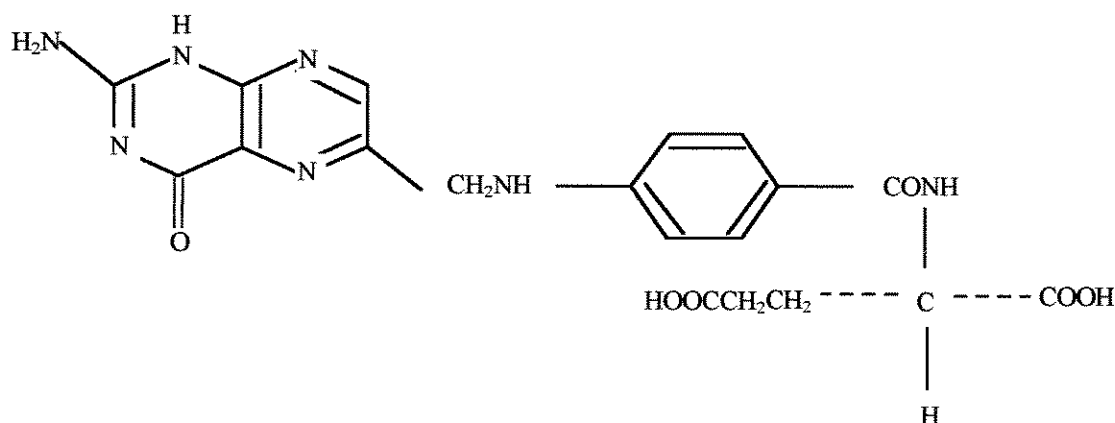


Figura 24: Fórmula Estrutural do Ácido Fólico
($\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{N}_7\text{O}_6$; PM = 441.4)⁽⁵⁴⁾

Fez-se uma curva de Absorbância x Comprimento de Onda (λ) (nm) para se verificar qual o melhor comprimento de onda (valor máximo de Absorbância), onde todas as medidas posteriores seriam feitas. O melhor (λ) encontrado para o ácido fólico foi em 280nm (ultra-violeta, uv) (fig. 12, pág. 45).

Pela curva de calibração (fig.11) foi possível escolher a melhor concentração da solução de ácido fólico que seria utilizada nos testes, que foi de $5 \times 10^{-5}\text{M}$ ($A=0.836$).

Como os estudos de absorção e liberação envolviam variações de pH, foi feito um gráfico de Absorbância em função do pH para várias soluções de ácido fólico e verificou-se grandes alterações

nos valores de Absorbância em função dos diferentes pHs, segundo podemos verificar na Tabela 4 (pág. 43).

Sendo assim, para todos os testes realizados, as medidas de Absorbância foram sempre feitas no mesmo pH, garantindo que qualquer alteração nas medidas da Absorbância seriam exclusivamente decorrentes da absorção ou liberação do ácido fólico pelas pérolas do hidrogel.

Em relação ao Planejamento Fatorial, fez-se sempre em primeiro lugar o estudo da absorção (tab. 5a e 5b, pág. 46). Com os melhores resultados obtidos nesta etapa, carregava-se as pérolas para, posteriormente, fazer um outro Planejamento Fatorial, visando o estudo da liberação (tab. 7, pág. 47).

A liberação foi feita sempre em soluções-tampão, para garantir que não houvesse mudanças bruscas de pH durante a realização dos ensaios.

Os resultados obtidos com o ácido como podemos verificar nas tabelas 5a, 5b e 7 (replicatas), não foram satisfatórios devido à vários fatores, tais como:

- variações muito significativas na intensidade de Absorbância em função do pH;
- dificuldades em se manter um pH fixo durante todo o tempo utilizado na realização dos ensaios e também muitas mudanças durante a leitura das medidas de Absorbância, devido, talvez, à presença de ácido fólico na solução;
- leituras feitas num comprimento de onda onde pode haver interferência de muitos outros íons pois o λ não é muito seletivo neste valor;
- medidas pouco reprodutíveis.

Devido a estas dificuldades, decidiu-se repetir todo o estudo, só que utilizando um corante.

Dentre os vários corantes testados⁽⁴⁷⁾, escolheu-se o alaranjado de metila ($C_{14}H_{14}N_3NaSO_3$; PM=327.34), por ser solúvel em água, não ter mudanças muito significativas de Absorbância em função do pH como visto na tabela 9 (pág. 48), ter um λ mais seletivo, evitando interferências de outros íons e pelo fato de se conseguir manter fixo um determinado pH desejado. Sua fórmula estrutural é a seguinte:

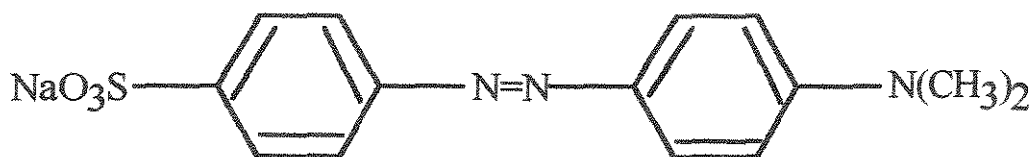


Figura 25: Fórmula Estrutural do Alaranjado de Metila
($C_{14}H_{14}N_3NaSO_3$; PM=327,34)₍₅₄₎

Em todos os ensaios, fez-se as leituras de Absorbância sempre no mesmo pH para garantir que qualquer mudança de Absorbância seria decorrente apenas dos processos de absorção ou liberação do corante pelas pérolas do hidrogel. Além disto, todas as medidas foram feitas no mesmo comprimento de onda.

Pelo Planejamento Fatorial feito para a absorção do alaranjado de metila (tab. 11), os efeitos mais importantes foram pH e tempo, valores dos efeitos da mesma grandeza que o erro não são significativos.

Com isto, verificou-se que variações de temperatura não influenciam o processo de absorção do corante pelas pérolas do hidrogel, assim como não existem efeitos de interação significativos.

O efeito pH foi positivo indicando que quanto maior o pH, maior o valor da Absorbância da solução e, portanto, menor a absorção do corante pelas pérolas. Sendo assim, valores de pH baixos favorecem o processo de absorção.

O efeito tempo teve valor negativo, indicando que quanto maior o tempo, menor o valor da Absorbância e maior a absorção. Portanto, tempos longos também favorecem o processo de absorção.

Com base nestes resultados (tab. 11), carregou-se as pérolas com uma solução do corante em pH por volta de 1.0 por 24 horas, à temperatura ambiente.

Observou-se degradação do polímero em valores de pH entre 5 e 8. Por isso, o Planejamento fatorial feito para a absorção, nessas condições, tiveram resultados pouco satisfatórios em relação ao Planejamento Fatorial feito entre pH 1 e 4 (tabelas 10a e 10b).

Os Planejamentos Fatoriais feitos tanto para a absorção quanto para a liberação foram divididos em duas partes porque a faixa de pH de interesse variava de 1, pH do estômago, à 8, pH do intestino, sendo portanto muito extensa para que se fizesse somente um Planejamento fatorial, o que acarretaria em resultados não conclusivos.

Após o carregamento das pérolas, fez-se o estudo da liberação em soluções-tampão. Da mesma forma que para absorção, valores altos de pH, de 5 à 8 degradaram o polímero e, semelhante à absorção, a liberação também foi favorecida por valores de pH baixos, isto é, na faixa de 1 à 4.

Os efeitos mais importantes no caso da liberação foram: pH, tempo e a interação entre pH e tempo (pHxt) (tab. 13). Neste caso, observou-se que o efeito pH foi negativo, indicando que quanto maior o valor de pH, menor o valor da Absorbância e portanto menor a liberação do corante. Portanto, quanto menor for o valor de pH, maior será a liberação.

O efeito tempo foi positivo, indicando que tempos longos favorecem a liberação. O efeito temperatura assim como as outras interações não foram significativos.

Comparando-se os resultados obtidos com o ácido fólico (tabelas 5 e 7) e com o alaranjado de metila (tabelas 10 e 12), observou-se que os mais significativos e mais confiáveis (reprodutibilidade melhor), foram aqueles provenientes dos ensaios com o corante. Com base nisto, utilizou-se para o Programa Fatorial os resultados obtidos na absorção e liberação feitas com o corante.

Primeiramente, construiu-se o gráfico normal das estimativas (figuras 26a e 27a, pág. 73 e 74). A reta obtida neste gráfico é decorrente do erro aleatório (experimental) e os valores dentro da reta não são significativos.

Os valores significativos são somente aqueles que estão fora da reta, sendo portanto incluídos na modelagem, zerando-se os demais.

Obteve-se, então, o gráfico dos resíduos contra as respostas previstas (figuras 26b e 27b, pág. 73 e 74). Os resíduos são calculados como resposta experimental menos resposta prevista. Esta diferença é devida ao erro experimental e ao fato da equação não ser exata, havendo a necessidade de ajuste.

Se o gráfico dos resíduos versus respostas previstas for aleatório, deduz-se que o erro é aleatório e decorrente somente do erro

experimental, o que em outras palavras significa que a modelagem não necessita de muito ajuste.

Por último, fez-se o gráfico normal dos resíduos (figuras 26c e 27c, pág. 73 e 74). Neste caso, uma reta significa distribuição normal, o que levou à conclusão de que o modelo estava bom.

Conseguiu-se assim um bom modelo em ambos os casos, como mostrado abaixo.

As equações que descrevem os modelos são:

- para absorção:

$$A = 0.5193 + 0.1050 \text{ pH} - 0.0343 \text{ t} \quad (\text{Eq.1})$$

$$Y = \text{média} + (\text{efeito} \div 2) x_1 - (\text{efeito} \div 2) x_2$$

$$(b_0) \quad (b_1) x_1 \quad (b_2) x_2$$

onde A=Absorbância.

- para liberação:

$$A = 0.0289 - 0.0119 \text{ pH} + 0.0143 \text{ t} - 0.0034 \text{ pHxt} \quad (\text{Eq.2})$$

$$Y = \text{média} - (\text{efeito} \div 2) x_1 + (\text{efeito} \div 2) x_2 - (\text{efeito} \div 2) x_1 x_2$$

$$(b_0) - (b_1) x_1 + (b_2) x_2 - (b_{12}) x_1 x_2$$

onde: A=Absorbância.

É importante ressaltar que as equações acima apresentadas correspondem a modelos teóricos, cuja função é descrever aproximadamente um comportamento experimental.

Logicamente, o modelo funcionará de maneira mais adequada quando o valor das variáveis se encontrar dentro da faixa abrangida por ele.

Os gráficos do Programa Fatorial utilizado para a absorção e a liberação foram os seguintes:

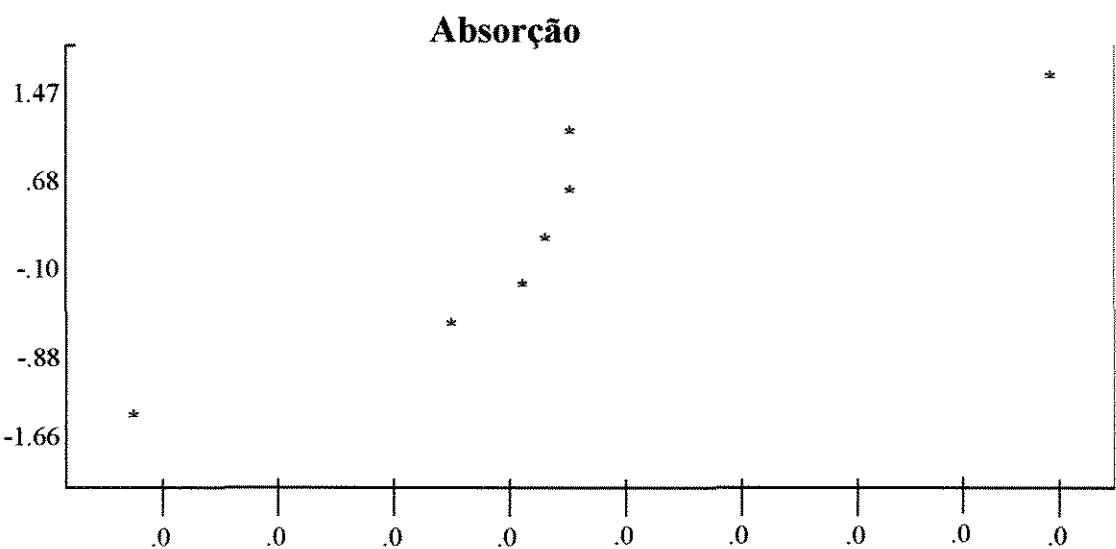


Figura 26a: Gráfico normal das estimativas

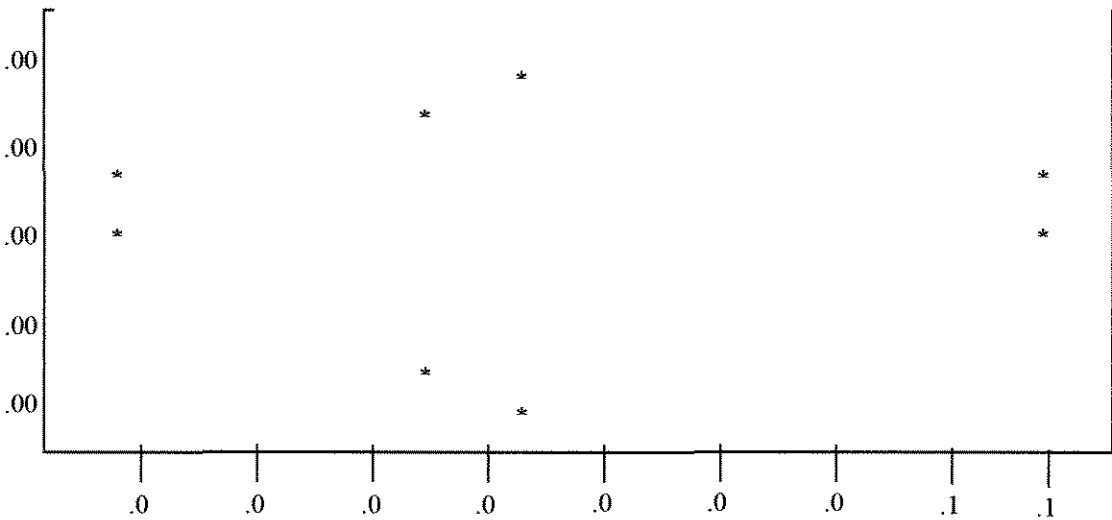


Figura 26b: Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas

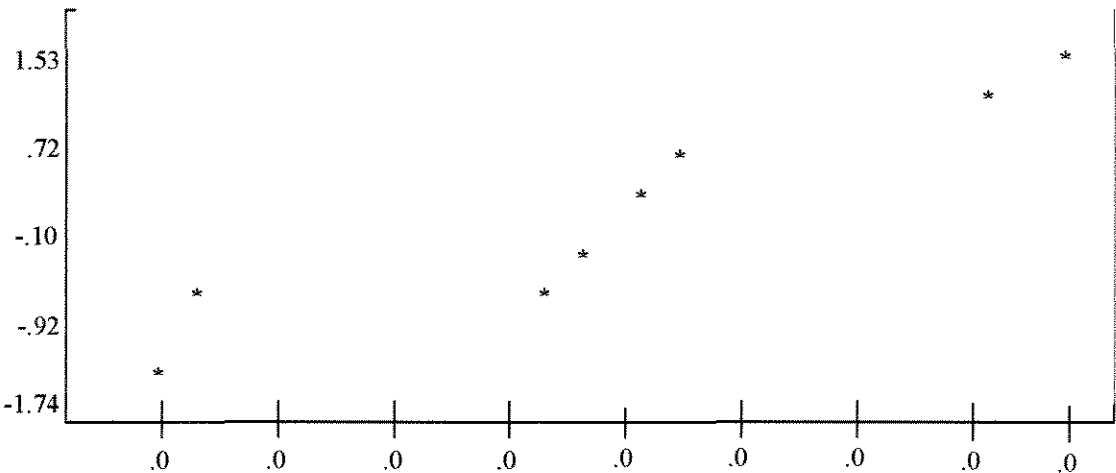


Figura 26c: Gráfico normal dos resíduos

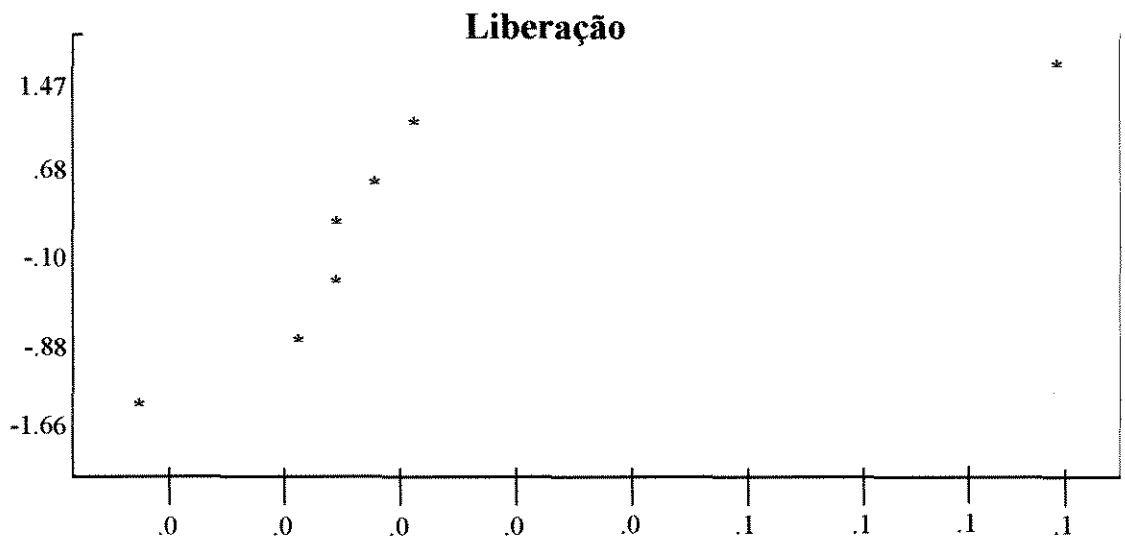


Figura 27a: Gráfico normal das estimativas

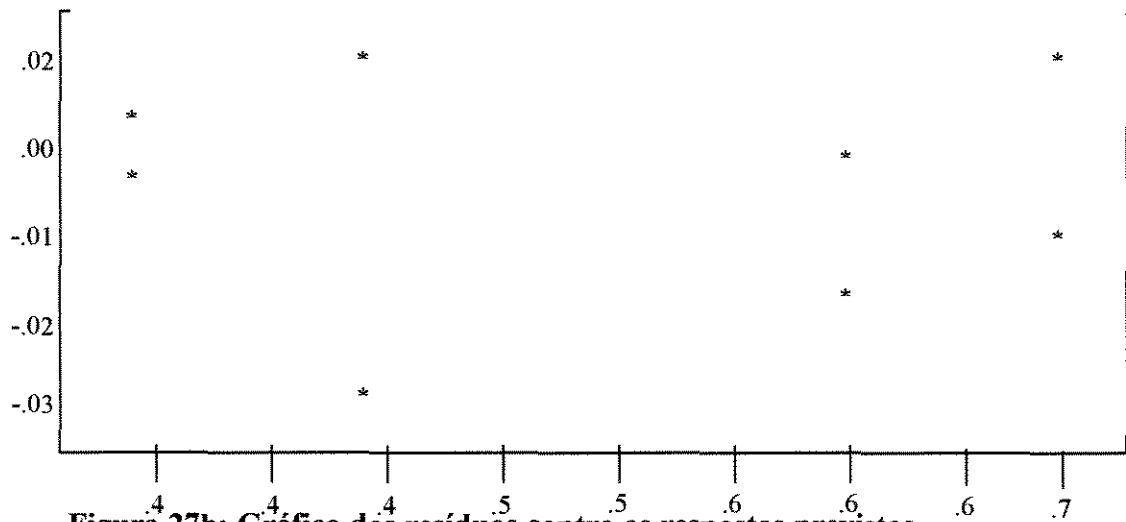


Figura 27b: Gráfico dos resíduos contra as respostas previstas

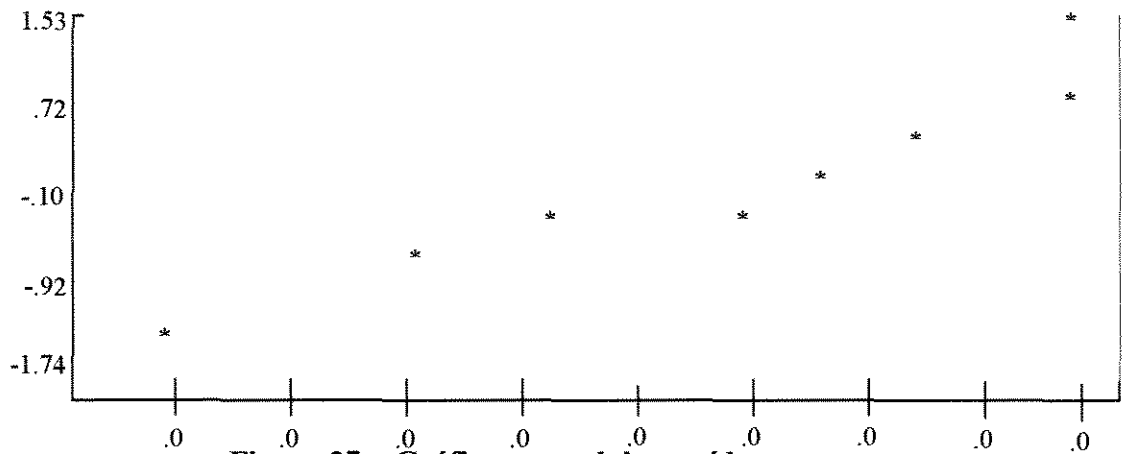


Figura 27c: Gráfico normal dos resíduos

5.3) CURVAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE DROGAS

Fez-se duas curvas de liberação controlada para comparação (tabela 14a e tabela 14b). Uma com troca da solução (tabela 14a), supondo que o princípio ativo estivesse sendo consumido pelo organismo.

Haveria, então, a liberação da droga até que se esgotasse a quantidade da mesma contida dentro das pérolas, o que é mostrado pela figura 14.

A outra curva foi feita sem troca da solução (tabela 14b). Neste caso, haveria liberação do princípio ativo de dentro das pérolas até que se atingisse um equilíbrio com o meio. Teria-se, inicialmente um grande aumento da concentração da droga liberada no meio em função do tempo, até se atingir um patamar ou a condição de equilíbrio (fig.15).

Na figura 28, a seguir, apresentam-se as curvas experimental e teórica para o processo de liberação controlada do alaranjado de metila. Observa-se, nesta figura, a existência de um certo grau de discrepância entre o comportamento experimental e a liberação prevista pelo modelo. Estas discrepâncias podem ser explicadas em termos da inabilidade do procedimento estatístico em interpretar um comportamento contínuo regido por processos de equilíbrio, a partir de resultados que envolvem intervalos compreendidos entre apenas dois valores de tempo. O modelo, que baseia o cálculo a partir destes resultados, somente pode fornecer um modelo linear, uma vez que não considera o efeito produzido pela diminuição da concentração da droga em função do tempo.

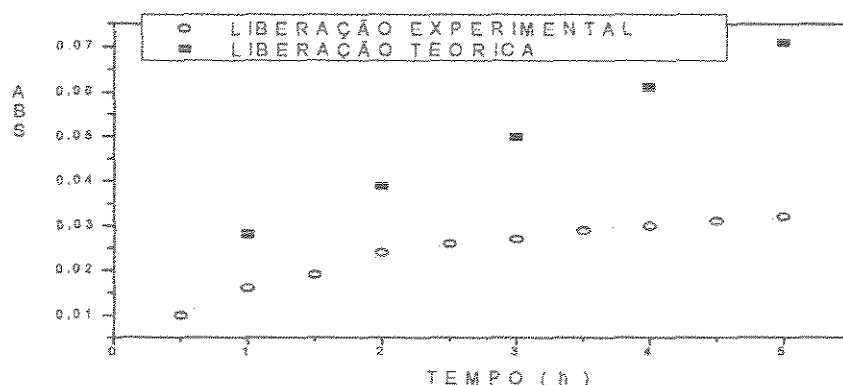


Figura 28: Curvas Comparativas da Liberação Controlada do Alaranjado de Metila (Tempo (h) versus ABS=Absorbância)

Na figura 29 abaixo, apresentam-se as curvas experimentais de absorção de substâncias de diferentes massas moleculares em comparação com a prevista pelo modelo. Observou-se através desta figura que a absorção do alaranjado de metila prevista pelo modelo é bastante coerente com os valores experimentais. O fato do modelo representar mais adequadamente o processo de absorção é devido ao fato de que as pérolas do hidrogel apresentam uma capacidade de absorção maior que as concentrações absorvidas no intervalo de tempo estudado.

Isto faz com que o comportamento da absorção não seja alterado por efeito de saturação do polímero, o que leva à obtenção de um gráfico linear, bastante próximo ao modelo previsto.

10

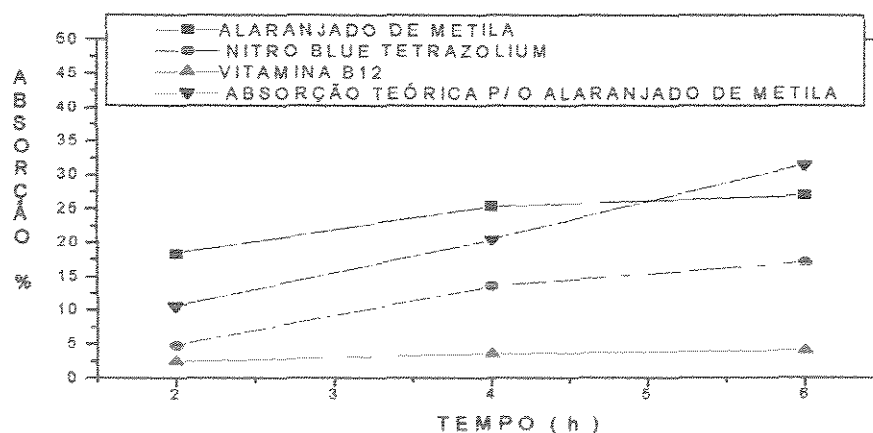


Figura 29: Curvas Comparativas de Tempo (h) versus Absorção (em %) de Substâncias.

5.4) ESTUDO DA ABSORÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM VARIAÇÃO DE PESO MOLECULAR

Escolheu-se para este estudo três substâncias, isto é, o Alaranjado de Metila (PM=327,34), o Nitroblue Tetrazolium (PM=817,69) e a Vitamina B12 (PM=1.355,38), e observou-se como variava a % de absorção destas pelas pérolas do hidrogel em função do Peso Molecular.

Pelos resultados obtidos, verificou-se que quanto maior o Peso Molecular da substância, menor sua absorção pelas pérolas do hidrogel (fig. 19).

Isto está relacionado com o grau de reticulação do polímero, o qual é o responsável pelo "Tamanho de Poro" do gel e portanto pelo tamanho de molécula que poderá ser absorvida..

Como foi observado neste caso, substâncias de Peso Molecular muito maior que 1000 foram pouco absorvidas por estas pérolas, o que significa que os poros de dentro do hidrogel são relativamente pequenos e que os processos de absorção e liberação são mais eficazes se trabalharmos com drogas de baixo Peso Molecular.

5.5) MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Como podemos observar pelas micrografias, as partículas obtidas foram bastante uniformes e apresentaram uma geometria esférica dentro do esperado (fig. 20 e 21, pág. 61 e 62).

Nota-se também a presença de porosidade a qual foi provocada pela retirada do alginato de cálcio após a síntese do poli-2-HEMA (fig. 22 e 23, pág. 63 e 64).

A medida do tamanho de poro médio das pérolas é importante para se ter uma idéia do perfil de distribuição de tamanho de poro do material obtido, mas, como o material é muito frágil e não aguenta muita pressão, não foi possível fazer uma análise do tamanho de poro por porosimetria de Hg.

Micrografias deste material sintetizado neste formato não foram encontradas nas literaturas consultadas.

CONCLUSÕES

Segundo o método de síntese descrito, utilizando-se alginato de cálcio como molde de polimerização, foi possível obter pérolas de tamanho uniforme (2-3mm de diâmetro) do hidrogel de poli-2-hidroxietilmetacrilato (poli-2-HEMA).

Com estas pérolas, fez-se o estudo de absorção e liberação de substâncias através do hidrogel. Para isto, utilizou-se um método de otimização denominado Planejamento Fatorial.

O Planejamento Fatorial feito para estes estudos (de absorção e liberação) foi do tipo 2^3 , ou seja, com 2 níveis e 3 variáveis (pH, tempo e Temperatura) e, a partir dos resultados obtidos, foi possível verificar quais fatores realmente afetaram a resposta e quais não foram significativos.

Desta forma, conseguiu-se obter o máximo de informação útil com um número mínimo de ensaios, evitando ensaios desnecessários.

Concluiu-se, então, que para o processo de absorção, somente as variáveis pH e tempo foram realmente importantes e para o processo de liberação as variáveis pH, tempo e a interação entre pH e tempo (pHxt) afetaram a resposta.

Nos dois processos estudados, diferenças de Temperatura não afetaram o sistema.

Foi possível, então, desenvolver uma equação matemática para descrever cada processo. No caso da absorção, favorecida por valores de pH baixos e longos tempos, a equação obtida para este processo foi a seguinte:

$$A = 0.5193 + 0.1050\text{pH} - 0.0343t$$

No caso da liberação, esta foi favorecida por valores de pH baixos, longos tempos, houve uma interação importante de pHxt. A equação obtida neste caso pode ser descrita como:

$$A = 0.0289 - 0.0119\text{pH} + 0.0143t - 0.0034(\text{pHxt})$$

Verificou-se, também, que em ambos os casos, absorção e liberação, houve degradação das pérolas do polímero, com perda do formato original, para valores altos de pH (valores ≥ 5).

Pelas curvas de liberação controlada foi possível concluir que este hidrogel sintetizado na forma de pérolas pode ser utilizado em sistemas de liberação controlada de drogas.

Pelo estudo da absorção com variações de Peso Molecular, pôde-se verificar que os poros existentes no interior das pérolas do hidrogel são relativamente pequenos, e, substâncias de Peso Molecular muito maiores que 1000 são pouco absorvidas pelo polímero. Com isto, verificou-se que estas pérolas tem uma maior eficácia quando utilizada com drogas de baixo Peso Molecular.

Observou-se a existência de poros no interior das pérolas do hidrogel, através da Microscopia Eletrônica de Varredura, e, com isto, pôde-se concluir que a absorção e a liberação de substâncias através do polímero ocorriam não só a nível da superfície mas também através dos poros existentes em seu interior.

**SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS
TRABALHOS**

1) Estudar variações tanto no grau da reticulação quanto no tamanho das pérolas do hidrogel, verificando as mudanças no tamanho dos poros e observando-se a faixa de Peso Molecular das substâncias que poderiam ficar retidas no interior do polímero.

2) Pesquisar outras maneiras de se sintetizar o hidrogel poli-2-HEMA em formatos diferentes, verificar seu comportamento em função de variações de pH, tempo e temperatura, e estabelecer comparações com o formato de pérolas.

3) Tentar copolimerizar o hidrogel poli-2-HEMA com um monômero que forma um polímero hidrofóbico e estudar suas características e seu comportamento frente às mesmas condições que as realizadas neste trabalho.

4) Estudar a aplicação das pérolas do hidrogel de poli-2-HEMA em processos de imobilização de enzimas.

5) Fazer um amplo estudo matemático do processo de difusão de substâncias através das pérolas do hidrogel de poli-2-HEMA, determinando todas as equações que regem o processo.

6) Estudar detalhadamente as propriedades mecânicas do material sintetizado em vários formatos estabelecendo as devidas comparações.

APÊNDICE

Procedimento Multivariado de Otimização:

Método do Planejamento Fatorial^(42,43,49)

O planejamento fatorial, como técnica de otimização, é classificado como método do tipo simultâneo e geralmente é utilizado para selecionar as variáveis que realmente apresentam influências significativas na resposta. Também nos permite saber se uma variável apresenta um efeito positivo ou negativo na resposta quando a mesma passa de um nível (valor) para outro, e se as variáveis são independentes ou apresentam interações.

O método do planejamento fatorial é mais eficaz quando utilizado para detectar diferenças causadas por dois ou mais fatores.

O método pode também explorar uma pequena região compressivamente, de maneira a dar, no máximo, uma indicação da direção a mover para efetuar uma nova série de experimentos, ou explorar uma grande região superficialmente, de maneira que um ótimo, se encontrado, necessitará de experimentos posteriores para melhor caracterizá-lo.

Pode, além disso, explorar regiões que estejam muito afastadas de um ótimo de maneira a fornecer resultados de pouco interesse.

Para realizar um planejamento fatorial, escolhe-se um número de níveis (valores) para cada uma das variáveis (fatores) e efetua-se experimentos em todas as combinações possíveis destes níveis selecionados.

O planejamento fatorial pode ser representado de uma maneira geral por b^a , onde a é o número de variáveis estudadas e b é o número de níveis escolhidos. Pode-se ter, também, fatoriais com valores de b diferentes para cada variável (fatorial $2^1 \times 3^1 \times 5^1$, isto é, 2, 3 e 5 são níveis para as variáveis A, B e C, respectivamente).

Os fatoriais do tipo 2^a são os mais comuns. Estes planos, onde para cada variável são escolhidos apenas dois níveis, são importantes porque requerem relativamente poucos experimentos e embora sejam incapazes de explorar completamente uma grande região no espaço das variáveis, podem indicar tendências para posteriores realizações de experimentos.

O planejamento fatorial apresentado por Box et al.⁽⁴⁹⁾ pode ilustrar a técnica que a seguir será apresentada como um resumo deste estudo.

A tabela A1.1 mostra um planejamento fatorial 2^3 , onde duas variáveis são quantitativas (temperatura e concentração) e uma variável é qualitativa (espécie de catalisador). A resposta é o rendimento de uma planta piloto⁽⁴²⁾.

TABELA A1.1 PLANEJAMENTO FATORIAL 2^3 ⁽⁴²⁾

Variáveis			Nível baixo				Nível alto		
Temperatura (T), °C			160 (-)				180 (+)		
Concentração (C), %			20 (-)				40 (+)		
Catalisador (K)			A (-)				B (+)		

Interações							Replicatas		
T	C	K	TxC	TxK	CxK	TxCxK	Primeira	Segunda	Média
-	-	-	+	+	+	-	59	61	60
+	-	-	-	-	+	+	74	70	72
-	+	-	-	+	-	+	50	58	54
+	+	-	+	-	-	-	69	67	68
-	-	+	+	-	-	+	50	54	52
+	-	+	-	+	-	-	81	85	83
-	+	+	-	-	+	-	46	44	45
+	+	+	+	+	+	+	79	81	80

Os efeitos, definidos como mudança ocorrida na resposta quando se move do nível baixo para o nível alto são classificados em duas categorias: efeito principal (isto é, efeito causado por cada uma das variáveis) e efeitos de interação (isto é, efeito causado pela interação entre as variáveis; podem ser de segunda, terceira ou enésima ordem conforme o número de fatores considerados). Assim, a média dos efeitos mede o efeito médio da variável sobre todas as condições de outras variáveis.

Efeito Principal = $Y^+ - Y^-$, onde

Y = média dos efeitos individuais da medida

(+) = nível alto e (-) = nível baixo

Efeito da Temperatura (T):

Temperatura	Concentração	Catalisador
$Y = 72 - 60 = 12$	20	A
$Y = 68 - 54 = 14$	40	A
$Y = 83 - 52 = 31$	20	B
$Y = 80 - 45 = \underline{35}$	40	B
92		

$$\text{Efeito Principal da Temperatura} = \frac{92}{4} = 23,0$$

Efeito da Interação Temperatura x Concentração, TxC:

Uma medida de interação é fornecida pela diferença entre a média do efeito da temperatura em relação ao nível alto (+) da concentração e a média do efeito da temperatura com o nível baixo (-) da concentração:

Concentração	Média do Efeito Temperatura
(+) 40	$\frac{(68 - 54) + (80 - 45)}{2} = 24,5$
(-) 20	$\frac{(72 - 60) + (83 - 52)}{2} = 21,5$

$$\text{Diferença: } 24,5 - 21,5 = 3,0$$

$$\text{Efeito de Interação TxC} = \frac{\text{Diferença}}{2} = \frac{3,0}{2} = 1,5$$

Efeito Trifatorial, TxCxK:

A interação trifatorial pode ser definida como sendo a metade da diferença entre as interações da TxC para os dois níveis de concentração C:

Interação TxK com nível de C alto (+):

$$\frac{(Y^8 - Y^7) - (Y^4 - Y^3)}{2} = \frac{(80 - 45) - (68 - 54)}{2} = 10,5$$

Interação TxK com nível de C baixo (-):

$$\frac{(Y^6 - Y^5) - (Y^2 - Y^1)}{2} = \frac{(83 - 52) - (72 - 60)}{2} = 9,5$$

Diferença: $10,5 - 9,5 = 1,0$

Efeito de Interação TxKxC: $\frac{\text{Diferença}}{2} = \frac{1,0}{2} = 0,5$

Como é muito tedioso o cálculo dos efeitos seguindo as definições, uma alternativa mais rápida é a Tabela de Coeficientes em Contrastes (sinais (+) e (-) da Tabela A1.1). Todos os efeitos, principais e de interação, podem ser calculados da mesma forma, como mostrado no exemplo para o efeito principal da Temperatura, porém nas suas respectivas colunas de sinais.

Efeito da Temperatura: Conforme sinais da primeira coluna da Tabela A2.1 e o divisor 4, que é igual a Y^+ ou Y^- , temos:

$$\frac{-60 + 72 - 54 + 68 - 52 + 83 - 45 + 80}{4} = \frac{+92}{4} = 23,0$$

Cálculo do Desvio Padrão para os Efeitos:

Em geral, se q séries de experimentos são realizados e cada série i de experimentos rende n_i replicatas, então o grau de liberdade, $\nu_i = n_i - 1$, e a estimativa combinada da variância será:

$$S = \frac{v_1 \cdot S_1^2 + v_2 \cdot S_2^2 + \dots + v_g \cdot S_g^2}{v}$$

$$v = v_1 + v_2 + \dots + v_g$$

Como cada efeito principal e de interações são medidas estatísticas do tipo $(Y^+ - Y^-)$, a variância de cada efeito será dada por:

$$V(\text{efeito}) = V(Y^+ - Y^-), \text{ ou seja}$$

$$V(\text{efeito}) = \left[\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2} \right] \cdot \sigma^2$$

n_1 = número total de replicatas para o cálculo de Y^+

n_2 = número total de replicatas para o cálculo de Y^- .

Num planejamento fatorial onde o número de replicatas é constante para todas as combinações de níveis, então $n_1 + n_2 = N$, número total de experimentos. Portanto, se um total de N experimentos são realizados num procedimento fatorial de dois níveis:

$$V(\text{efeito}) = \frac{4}{N} \cdot \sigma^2. \text{ Como } S^2 \text{ é uma estimativa de } \sigma^2, \text{ então}$$

$$V(\text{efeito}) = \frac{4}{N} \cdot S^2, \text{ logo}$$

$$\text{Desvio Padrão(efeito)} = \left[\frac{4}{N} \cdot S^2 \right]^{1/2}$$

Os efeitos e o desvio padrão de efeito do fatorial exemplo são:

Temperatura	= 23,0 ± 1,4
Concentração	= -5,0 ± 1,4
Catalisador	= +1,5 ± 1,4
TxC	= +1,5 ± 1,4
TxK	= 10,0 ± 1,4

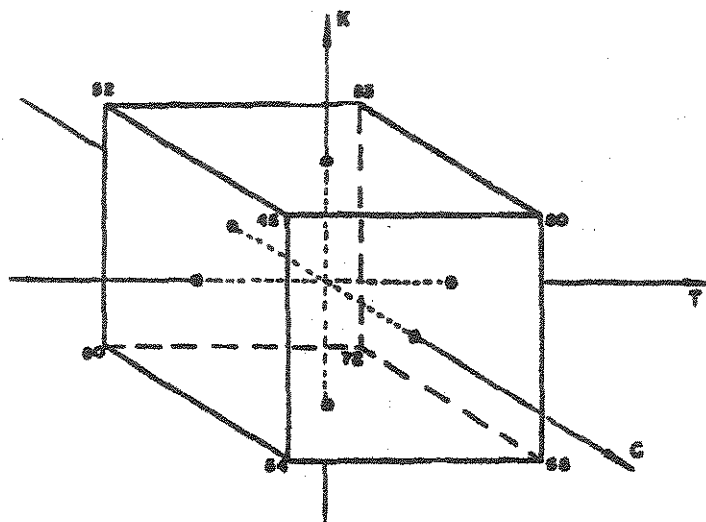


Figura A1.3: Representação do Exemplo do Fatorial 2^3 .

Interpretação do Fatorial:

1) a concentração é independente da temperatura e do catalisador.

2) o efeito de aumentar a concentração é uma diminuição no rendimento de 5 unidades. Este efeito é constante para os níveis das outras variáveis testadas.

3) os efeitos de temperatura e catalisador não podem ser interpretados separadamente por razão do valor grande do efeito da interação entre eles.

BIBLIOGRAFIA

1) Ferruti, Paolo; Scapini, Gian Carlo; Rusconi, Luísa; Tanzi, Maria Cristina; "New Polymeric and Oligomeric Matrices as Drug Carriers"; *Polymers in Medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Editado por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.77; 1982.

2) Duncan, Ruth; Kopecek, Jindrich; Llyod, Jonh B.; "Development of N-(2-Hydroxypropyl)Methacrylamide Copolymers as carriers of Therapeutic Agents"; *Polymers in Medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Ed. por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.97; 1982.

3) Heeswijk, W.A.R van; Brinks, G.J.; Feijen, J.; "Synthesis and Characterization of Covalently Bound Polymer-Hormone Conjugates for the Controlled Release of Hormones", *Polymers in medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Ed. por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.147; 1982.

4) Saettone, Marco F.; Giannaccini, Boris; Chetoni, Patrizia; Galli, Giancarlo; Chiellini, Emo; "Polymeric Ophthalmic Drug Delivery Systems: Preparation and Evaluation of Pilocarpine-Containing Inserts"; *Polymers in Medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Ed. por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.187; 1982.

5) Carli, Fabio; "Basic Physical Parameters of polymeric Matrices Influencing Drug Release; *Polymers in Medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Ed. por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.201; 1982.

6) Lyman, Donald J.; "Polymers in Medicine - An Overview"; *Polymers in medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Ed. por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.215; 1982.

7) Carfagna, C.; Migliaresi, C.; Nicolais, L.; Sacerdoti, A.; "Physical Characterization of Poly(2-Hydroxyethylmethacrylate) Gels: Effect of Diluent Content on the Mechanical and Transport Properties"; *Polymers in Medicine - Biomedical and Pharmacological Applications*; Ed. por Emo Chiellini e Paolo Giusti; Universidade de Pisa, Itália; pg.311; 1982.

8) Eckstein, E.C.; Pinchuk, J.; Van De Mark, M.R.; "A Responsive Hydrogel as a Means of Preventing Calcification in Urological Prostheses"; *Polymers as Biomaterials*; pg.323; 1984.

9) Wood, J.M.; Attwood, D.; Collett, J.H.; "Influence of Gel and Solute Structure on *In Vitro* and *In Vivo* Release Kinetics from Hydrogels"; *Polymers as Biomaterials*; pg.347; 1984.

10) Rapra Review Reports 5 (3) ; *Biomedical Applications of Polymers*; 1991.

11) Martinsen, Anita; Storro, Ivar; Skjak-Braek, Gudmund; "Alginate as Immobilization Material: Diffusional Properties"; *Biotechnology and Bioengineering*; vol.39; pg.186-194; 1992.

12) Mark-Bikales-Overberg-Menges; *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; Second Edition; vol.07 (Hydrogels); pg.783-802; 1988.

13) Mark-Bikales-Overberg-Menges; *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*; Second Edition; Supplement Volume (Controlled-Release Technology); pg.164-186; 1988.

14) Park, Tae; Hoffman, Allan S.; "Preparation of Large, Uniform Size Temperature-Sensitive Hydrogels Beads"; *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*; vol.30,505-507; 1992.

15) Taylor, Lloyd D.; Cerankowski, Leon D.; "Preparation of Films Exhibiting a Balanced Temperature Dependence to Permeation by Aqueous Solutions - A Study of Lower Consolute Behavior"; *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition*; vol.13; pg.2551-2570; 1975.

16) Williams, David; Munnecke, Douglas M.; "The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells"; *Biotechnology and Bioengineering*; vol.XXIII; pg.1813-1825; 1981.

17) Brook, I.M.; van Noort, R.; "Drug Release from Acrylic Polymers *Via* Channels and Cracks: *In Vitro* Studies with Hydrocortisone"; *Biomaterials*; vol.6 (July); pg.281; 1985.

18) Denizli, Adil; Kiremitci, Menemse; Piskin, Erhan; "Subcutaneous Polymeric Matrix System poly(HEMA-BGA) for Controlled Release of an Anticancer Drug (5-Fluorouracil) - (I) Synthesis and Structure"; *Biomaterials*; vol.9 (May); pg.257; 1988.

19) Folkman, Judah; "How the Field of Controlled-Release Technology began, and its Central Role in the Development of Antiogenesis Research"; *Biomaterials*; vol.11 (November); pg.615; 1990.

20) Corkhill, Philip H.; Hamilton, Colin J.; Tighe, Brian J.; "Review: Synthetic Hydrogels - (IV) Hydrogel Composites as wound Dressings and Implant Materials"; *Biomaterials*; vol.10 (January); pg.3; 1989.

- 21) Horák, Daniel et al; "Hydrogels in Endovascular Embolization - (V) Antitumor agent methotrexate-containing p(HEMA)"; *Biomaterials*; vol.13 (número 6); pg.361; 1992.
- 22) Horák, Daniel et al; "Haemostatic activity of Ethamsylate and Aminocaproic Acid adsorbed poly(2-Hidroxyethyl methacrylate) Particles"; *Biomaterials*; vol.13 (número 8); pg.521; 1992.
- 23) Langer, R.S.; Peppas, N.A.; "Present and Future Applications of Biomaterials in Controlled Drug Delivery Systems"; *Biomaterials*; vol.2 (October); pg.201; 1981.
- 24) Denizli, A.; Kiremitci, M.; Piskin, E.; "Subcutaneous Polymeric Matrix System p(HEMA-BGA) for Controlled Release of an Anticancer Drug (5-Fluorouracil) - (II) Release Kinetics"; *Biomaterials*; vol. 9 (July); pg.363; 1988.
- 25) Andreopoulos, A.G.; "Sodium Alginate as a mould Release Agent"; *Biomaterials*; vol.6 (March); Technical Note; pg.138; 1985.
- 26) Jeyanthi, R.; Rao Panduranga, K.; "*In vivo* biocompatibility of collagen-poly(hidroxyethyl methacrylate) hydrogels"; *Biomaterials*; vol.11 (May); pg.238; 1990.
- 27) Kobmethl, Gerhard et al; "Hydrogels based on N-vinylpyrrolidinone and 2-hydroxyethyl methacrylate"; *Makromol. Chem.*; 190; pg.1253-1262; 1989.
- 28) Wu, Xue Shen; Hoffman, Allan S.; Yager, Paul; "Synthesis and Characterization of Thermally Reversible Macroporous Poly(N-Isopropylacrylamide) Hydrogels"; *Journal of Polymer Science; Part A: Polymer Chemistry*; vol.30 (number 10); pg.2121-2129; September; 1992.
- 29) Thanoo, B. Chithambara et al; "Cross-linked Chitosan Microspheres: Preparation and Evaluation as a Matrix for the Controlled Release of Pharmaceuticals"; *J.Pharm.Pharmacol.*;44:pg.283-286; 1992.
- 30) Donbrow, Max et al; "Variation of Population Release Kinetics in Polydisperse Multiparticulate Systems (Microcapsules, Microspheres, Droplets, Cells) with Heterogeneity of One, Two or Three Parameters in the Population of Individuals"; *J.Pharm.Pharmacol.*; 40:pg.93-96; 1988.
- 31) Thanoo, B.C. et al; "Controlled Release of Oral Drugs from Cross-linked Polyvinyl Alcohol Microspheres"; *J.Pharm.Pharmacol.*; 45:pg.16-20; 1993.

32) Thanoo, B.C. et al; "Oral Sustained-release Drug Delivery Systems using Polycarbonate Microspheres Capable of Floating on the Gastric Fluid"; J.Pharm.Pharmacol.; 45:pg.21-24; 1993.

33) Jeyanthi,R. et al; "Solid tumor chemotherapy using implantable collagen-poly(HEMA) hydrogel containing 5-fluorouracil"; J.Pharm.Pharmacol.; 43:pg.60-62; 1991.

34) Miyazaki, Shozo et al; "Sustained release of indomethacin from chitosan granules in beagle dogs"; J.Pharm.Pharmacol.; 40:pg.642-643 (Communications); 1988.

35) Miyazaki, Shozo et al; "External control of drug release: controlled release of insulin from a hydrophilic polymer implant by ultrasound irradiation in diabetic rats"; J.Pharm.Pharmacol.; 40:pg.716-717 (Communications); 1988.

36) Refojo, Miguel F.; "Artificial Membranes for Corneal Surgery"; Journal of Biomedical Materials Research; vol. 3; pg.333-347; 1969.

37) Imai, Yohji; Masuhara, Eiichi; "Long-term *in vivo* studies of poly(2-hydroxyethyl methacrylate)"; Journal of Biomedical Materials Research; vol. 16;pg.609-617; 1982.

38) Pongpaibul, Yanee et al; "Formation and *In-vitro* Evaluation of Theophylline-loaded Poly(methyl methacrylate) Microspheres"; J.Pharm.Pharmacol.; 40:pg.530-533; 1988.

39) Jayakrishnan, A., Thanoo, Chithambara B.; "Suspension polymerization of 2-hydroxyethyl methacrylate in the presence of polymeric diluents: a novel route to spherical highly porous beads for biomedical applications"; Journal of Biomedical Materials Research; vol.24;pg.913-927;1990.

40) Buckles, Richard G.; "Biomaterials for drug delivery systems"; Journal of Biomedical Materials Research; vol.17;pg.109-128; 1983.

41) Chen, Dianja et al; "Amphiphilic networks: II) Biocompatibility and controlled drug release of poly[isobutylene-co-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate]"; Journal of Biomedical Materials Research; vol.23;pg.1327-1342; 1989.

42) Eiras, Sebastião de Paula; Tese de Doutorado:"Determinação catalítica de Molibdênio em plantas, usando análise em fluxo contínuo monossegmentado com detecção espectrofotométrica"; Instituto de Química; Unicamp; 1991.

43) Bruns, Roy Edward; Apostila: "Quimiometria-Otimização em Química"; Instituto de Química; Unicamp.

44) Langer, Robert; "New Methods of Drug Delivery"; Science; vol.249; pg.1527-1533; 1990.

45) Arranz,F., Sanches-Chaves, M.; "Polímeros como soportes para la dosificación controlada de compuestos bioactivos.I) Sistemas de acción física"; Revista de Plásticos Modernos; num.365 ;pg.637-646; 1986.

46) Langer, Robert; Karel, Marcus; "Controlled Release Technology: Polymers in Medicine, Food and Agriculture"; Polymer News; vol.07; número 6; pg.250-258; 1981.

47) Indicators Edited by Edmund Bishop Oxford: Pergamon Press, c; 1972.

48) Graham,N.B.; "Hydrogels in Controlled Drug Delivery"; Polymeric Biomaterials; Ed. by E.Piskin and A.S.Hoffman; Martinus Nijhoff Publishers; pg.171-195; 1986.

49) Box, G.E.P.; Hunter, W.G.; Hunter, J.S.; "Statistics for Experimenters" John Wiley CO, NY; cap.10,11,15; 1978.

50) Tubino, Matthieu; "Anotações sobre Espectroscopia Visível e Ultra-Violeta"; Apostila de Química Analítica Instrumental; Instituto de Química; 1989.

51) Elias, Hans-Georg; "Macromolecules"; Plenum Press; vol.02; cap.20; pg.695; 1984.

52) Bruns, Roy E., Faigle, J.F.G.; "Quimiometria"; Instituto de Química; Unicamp; Revista Química Nova; pg.84-98; 1985.

53) Davidson, Robert L. (Editor in Chief), "Handbook of water-soluble gums and resins", Mac Graw-Hill Book Company, Printed by the Kingston Press, capítulo 02; 1980.

54) The Merck Index, an Encyclopedia of Chemicals, drugs and biologicals, 11th Edition, Published by Merck & CO., Inc, USA, pg.660 e 959; 1989.