



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS**

**Instituto de Química
Departamento de Físico-Química**

Dissertação de Mestrado

**REVESTIMENTO DE STENTS COM
FILMES DE PVA ELUIDORES DE
S-NITROSOGLUTATIONA**

Autora: Maíra Martins de Souza Godoy Simões

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Campinas
Junho de 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP

Si51r	<p>Simões, Maíra Martins de Souza Godoy. Revestimento de <i>stents</i> com filmes de poli (álcool vinílico) eluidores de S-nitrosoglutathione / Maíra Martins de Souza Godoy Simões. -- Campinas, SP: [s.n], 2006.</p> <p>Orientador: Marcelo Ganzarolli de Oliveira.</p> <p>Dissertação - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.</p> <p>1. <i>Stents</i>. 2. Reestenose. 3. Poli (álcool vinílico). 4. Óxido nítrico. I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli de. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.</p>
-------	--

Título em inglês: Stents coating with S-nitrosoglutathione-eluting poly (vinyl alcohol) films

Palavras-chaves em inglês: Stents, Restenosis, Poly (vinyl alcohol), Nitric oxide

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestre em Química na Área de Físico-Química

Banca examinadora: Marcelo Ganzarolli de Oliveira (orientador), Pedro Antonio Muniz Vazquez, Marisa Masumi Beppu

Data de defesa: 20/06/2006

Agradecimentos

- Ao Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira, pela orientação e acompanhamento.
- À Scitech Produtos Médicos Ltda., pela bolsa concedida e pelo suporte financeiro.
- À Inovatech, pelo fornecimento dos stents.
- À professora Inês Joekes, pelo empréstimo da lupa e pelas contribuições dadas a este trabalho.
- Ao professor Fernando Galembeck, pelo empréstimo do microscópio de inspeção.
- Ao Daniel Razzo, pela obtenção das micrografias eletrônicas.
- À Fabiane M. Favoretto, pela realização dos ensaios de DSC.
- À Raquel E. Miller, pela obtenção dos difratogramas de raios X.
- Aos amigos do laboratório I-114, pelas conversas, dicas e companhia neste tempo: Regiane, Fer Simplício, Déia, Gabi, Rogério, Fer Egídio, Ju, Lílian, Vanessa, Aletéia, Rodrigo Angarten, Anna, Rodrigo, Alex e Pri.

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome: Máira Martins de Souza Godoy Simões
Nacionalidade: Brasileira
Data de nascimento: 2 de novembro de 1981, São Paulo – SP
Endereço: R. Dr. Antônio Augusto de Almeida, 710 – Campinas – SP
CEP: 13083-755
e-mail: maira@iqm.unicamp.br

FORMAÇÃO

Mestrado em Química

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Área: Físico-Química
Período: Março 2004 – junho 2006
Título do projeto: Revestimento de stents com filmes de poli (álcool vinílico) eluidores de S-nitrosoglutathiona.

Graduação

Bacharel em química com atribuições tecnológicas
Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Período: 1999 - 2003

Bacharel em Química
Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Período: 1999 – 2003

PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1.1 Iniciação científica

Projeto: Síntese e caracterização de uma lactona naftalênica
Instituição Financiadora: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
Orientador: Prof. Dr. Sebastião Ferreira Fonseca
Área: Química Orgânica
Período: 01/06/2001 a 30/07/2002
Instituição: Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Química

1.2 Resumos de trabalhos científicos apresentados em congressos

Silva, R., Simões M. M. S. G. e Oliveira, M. G.; **PNIPAAm – AAc Hydrogels for topical nitric oxide delivery.** X International Macromolecular Colloquium, Gramado, Brazil – April 10th -13th, 2005

Seabra A. B., Simões M. M. S. G. e Oliveira M. G.; **Solid films of blended poly(vinylalcohol)/Poly(vinylpyrrolidone) for local nitric oxide release.** X International Macromolecular Colloquium, Gramado, Brazil – April 10th -13th, 2005

Silva, R., Simões M. M. S. G. e Oliveira, M. G.; **A new cross-linked hydrogel for the controlled delivery of Nitric Oxide.** Nitric Oxide, Cytokines & Inflammation - An International Symposium, Rio de Janeiro, Brazil - June 6th-9th, 2004.

Simões, M. M. S. G. e Fonseca, S. F.; **Síntese e caracterização de uma lactona naftalênica.** XI Congresso Interno de Iniciação científica; Unicamp – Campinas, SP, Brasil – setembro 2002.

1.3 Patentes

1. Depósito de Patente Internacional (Patent Cooperation Treaty – PCT)
Stents coated with NO- and S-nitrosothiol-eluting hydrophilic polymeric blends;
Oliveira, M. G., Moreira, A. M., Seabra, A. B., SIMÕES, M. M. S. G., Morato, S. P.
Scitech produtos medicos Ltda. e Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) –
PCT/BR2006/000073 de 19 de abril de 2006

2. Depósito de Patente Nacional
Stents revestidos com blendas poliméricas hidrofílicas eluidoras de NO e S-nitrosotióis;
Oliveira, M. G., Moreira, A. M., SIMÕES, M. M. S. G., Seabra, A. B.,
Morato, S. P. – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2005 – PI
0503201-6.

ESTÁGIOS

1. Programa Estágio Docente

Período: Mar-Jul/2005

Disciplina: Físico-Química Experimental II

Departamento: Físico-Química/ Instituto de Química

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

2. Estágio de nível superior

Período: jan-dez/2003

Área: Físico-Química

Departamento: Centro de Pesquisas de Paulínia - CPP

Instituição: Rhodia Brasil S.A.

RESUMO

REVESTIMENTO DE STENTS COM FILMES DE POLI (ÁLCOOL VINÍLICO) ELUIDORES DE S-NITROSOGLUTATIONA

Palavras chave: Stents, reestenose, poli(álcool vinílico), NO.

Stents são malhas metálicas expansíveis usadas em procedimentos de angioplastia, para a desobstrução das artérias coronárias. Atualmente há um grande interesse na obtenção de stents revestidos com matrizes poliméricas eluidoras de drogas que impeçam a reoclusão da artéria (reestenose). S-nitrosotióis doadores de óxido nítrico (NO) como a S-nitrosoglutationa (GSNO) possuem potencial para a inibição da reestenose. Neste trabalho, placas metálicas e stents foram revestidos com filmes de PVA contendo GSNO (107 $\mu\text{mol/g}$) através da imersão em soluções de PVA/GSNO com concentrações de PVA de 0,5 a 10,0% m/v. Filmes de PVA/GSNO foram submetidos a ciclos de congelamento/descongelamento (C/D), e analisados em relação ao seu grau de cristalinidade, dissolução, intumescimento, morfologia e propriedades de difusão e eluição da GSNO. Análises por DSC e difração de raios X, mostraram que o grau de cristalinidade do PVA aumenta com o número de ciclos de C/D, e com a secagem por sublimação do filme congelado. O aumento da cristalinidade se reflete em uma diminuição da velocidade de eluição da GSNO para a fase aquosa e da velocidade de dissolução e grau de intumescimento da matriz. Os coeficientes de difusão (D) da GSNO através de filmes de PVA foram medidos utilizando-se uma cela tipo Franz com monitoramento espectrofotométrico. Verificou-se que os valores de D são menores nos filmes secos por sublimação e submetidos a um ciclo de C/D. Este resultado foi atribuído ao aumento da densificação da fase amorfa, obtido na secagem por sublimação. Os filmes secos por esta técnica, apresentaram uma estrutura tridimensional esponjosa constituída por filamentos interligados, revelada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Estimou-se que stents revestidos com PVA/GSNO, a partir de soluções de PVA 0,5 % (m/v) esterilizados com óxido de etileno a 45-55 °C podem liberar cerca de 30 $\mu\text{moles/g}$ de PVA para a parede arterial e levaram à obtenção de revestimentos sem filmes entre as hastes metálicas.

ABSTRACT

STENTS COATING WITH S-NITROSOGLUTATHIONE-ELUTING POLY(VINYL ALCOHOL) FILMS

Palavras chave: Stents, restenosis, poly(vinyl alcohol), nitric oxide.

Stents are expandable wire mesh tubes used in angioplasty procedures in order to widening the luminal diameter of the coronary arteries. There is currently a great interest in the development of stents coated with drug-eluting polymeric matrices, which are able to prevent future closure of artery (restenosis). S-nitrosothiols which are nitric oxide (NO) donors, like S-nitrosoglutathione (GSNO) have potential to inhibit restenosis. In the present work, metallic plates and stents were coated with GSNO (107 $\mu\text{mol/g}$)-containing PVA films through their immersion in PVA/GSNO solutions with PVA concentration ranging from 0.5 to 10.0% wt/v. PVA/GSNO films were submitted to freezing/thawing cycles (F/T) and analyzed concerning their crystallinity dissolution, swelling, morphology and GSNO diffusion and elution properties. DSC and X Ray diffraction analysis have shown that the PVA crystallinity degree increases with the increase in the number of F/T cycles, and with the drying of the frozen film by sublimation. The increase in cristallinity was reflected in a decrease of the rate of GSNO elution to the aqueous phase, dissolution rate and swelling degree of the matrix. The diffusion coefficients of GSNO through PVA films were measured using a Franz-like cell with spectrophotometric monitoring. It was verified that D values are lower in the films dried by sublimation and submitted to one FT cycle. This result was attributed to the increase in the densification of the amorphous phase obtained in the drying by sublimation. The films dried by this technique, displayed a spongelike three-dimensional structure made by interconnecting filaments, revealed by scanning electron microscopy (SEM). Stents coated with PVA/GSNO, from solution of PVA 0.5 % (wt/v) have avoided the formation of films between the wires of the stent mesh. It was estimated that these stents are able to release ca. 30 $\mu\text{mol/g}$ of PVA to the arterial wall after sterilization with ethylene oxide at 45-55 °C.

Índice

I.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
1.	ATEROSCLEROSE.....	1
2.	ANGIOPLASTIA.....	3
3.	STENTS CORONÁRIOS.....	4
3.1.	<i>Reestenose intra-stent</i>	5
3.2.	<i>Stents liberadores de agentes bioativos</i>	7
4.	NO E SEU PAPEL NA REDUÇÃO DA REESTENOSE.....	7
4.1.	<i>Doadores de NO</i>	9
4.2.	<i>Stents revestidos com polímero contendo doadores de NO</i>	10
4.3.	<i>Polímeros liberadores de NO</i>	11
5.	POLI (ÁLCOOL VINÍLICO).....	12
5.1.	<i>Estrutura e propriedades do Poli (álcool vinílico) (PVA)</i>	12
5.2.	<i>Cristalinidade do PVA</i>	13
5.3.	<i>Hidrogéis de PVA</i>	15
5.3.1.	<i>Hidrogéis preparados por ciclos de congelamento/descongelamento (C/D) de soluções aquosas de PVA</i>	16
5.4.	<i>Aplicações biomédicas e farmacêuticas</i>	20
6.	COEFICIENTES DE DIFUSÃO.....	20
7.	MÉTODO DE GRIESS: DETECÇÃO COLORIMÉTRICA DE GSNO EM SOLUÇÃO.....	25
II.	PARTE EXPERIMENTAL.....	28
1.	MATERIAIS E REAGENTES.....	28
2.	SÍNTESE DA S-NITROSOGLUTATIONA (GSNO).....	28
3.	PREPARAÇÃO DE FILMES ISOLADOS DE PVA.....	28
3.1.	<i>Soluções de PVA</i>	28
3.2.	<i>Incorporação da GSNO em soluções de PVA</i>	29
3.3.	<i>Obtenção de filmes isolados, por moldagem a partir de solução</i>	30
3.4.	<i>Tratamento térmico para aumento do grau de reticulação</i>	30
3.5.	<i>Secagem dos filmes de PVA</i>	30
4.	CARACTERIZAÇÃO DE FILMES DE PVA ISOLADOS.....	31
4.1.	<i>Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)</i>	31
4.2.	<i>Difratometria de raios X</i>	32
5.	DETERMINAÇÃO DOS COEFICIENTES DE DIFUSÃO DA GSNO ATRAVÉS DE FILMES DE PVA ISOLADOS.....	32

6.	ANÁLISE COLORIMÉTRICA DA GSNO PELO MÉTODO DE GRIESS.....	34
6.1.	<i>Preparação das soluções estoque de GSNO.....</i>	34
6.2.	<i>Preparação do reagente de Griess</i>	35
6.3.	<i>Obtenção das curvas de calibração</i>	35
6.4.	<i>Cinética de eluição de GSNO a partir de filmes isolados.....</i>	36
7.	ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DA GSNO CONTIDA EM FILMES DE PVA APÓS SUA ESTERILIZAÇÃO COM ÓXIDO DE ETILENO	36
8.	PREPARAÇÃO DE PLACAS DE AÇO INOX REVESTIDAS COM FILMES DE PVA.....	37
8.1.	<i>Deposição dos filmes sobre placas de aço-inox.....</i>	37
8.2.	<i>Determinação da cinética de dissolução dos filmes</i>	38
8.3.	<i>Microscopia óptica</i>	38
8.4.	<i>Microscopia eletrônica por Varredura.....</i>	39
9.	REVESTIMENTO DE STENTS COM FILMES DE PVA/GSNO	39
9.1.	<i>Revestimento por imersão.....</i>	39
9.2.	<i>Aplicação de ciclos de C/D aos stents</i>	40
9.3.	<i>Caracterização Morfológica.....</i>	41
9.3.1.	<i>Microscopia óptica.....</i>	41
9.3.2.	<i>Microscopia eletrônica de varredura.....</i>	41
9.4.	<i>Cinética de eluição de GSNO a partir dos stents revestidos.....</i>	42
9.5.	<i>Estimativa da quantidade de GSNO eluída para a parede muscular de uma artéria coronária a partir de um stent revestido com PVA/GSNO</i>	42
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
1.	<i>Filmes de PVA isolados</i>	44
1.1.	<i>Efeito dos ciclos de congelamento/descongelamento sobre as propriedades térmicas e a cristalinidade dos filmes de PVA.....</i>	44
1.2.	<i>Efeito da concentração da solução polimérica de partida sobre as propriedades térmicas e a cristalinidade dos filmes de PVA.....</i>	50
1.3.	<i>Efeito do tempo de descongelamento sobre as propriedades térmicas e a cristalinidade dos filmes de PVA.....</i>	53
1.4.	<i>Efeito dos ciclos de congelamento/descongelamento sobre a velocidade de dissolução de filmes imersos em água depositados sobre placas de aço-inox</i>	56
1.5.	<i>Efeito dos ciclos de C/D sobre o intumescimento de filmes de PVA depositados sobre placas de aço-inox.....</i>	57
1.6.	<i>Efeito dos ciclos de C/D e da técnica de secagem sobre a morfologia de filmes depositados sobre placas de aço-inox</i>	59
1.7.	<i>Efeito do número de ciclos de C/D sobre a velocidade de difusão da GSNO a partir de solução, através de filmes de PVA</i>	62
1.8.	<i>Efeito da remoção da água por sublimação ou evaporação sobre a velocidade de difusão da GSNO a partir de solução, através de filmes de PVA.....</i>	64
1.9.	<i>Efeito da duração do ciclo de descongelamento sobre a velocidade de difusão da GSNO a partir de solução, através de filmes de PVA</i>	67
1.10.	<i>Cinéticas de eluição da GSNO para solução de Griess</i>	71
1.10.1.	<i>Curvas de calibração</i>	71
1.10.2.	<i>Deteção da GSNO eluída para Solução de Griess em meio ácido a partir de filmes isolados.....</i>	72
1.11.	<i>Análise de degradação da GSNO em filmes submetidos a processos de esterilização com óxido de etileno (ETO)</i>	75

1.12. Implicações dos resultados obtidos com filmes isolados e com placas revestidas para o revestimento de stents.	76
2. STENTS RECOBERTOS COM PVA E PVA/GSNO	77
2.1. Caracterização morfológica	77
2.1.1. Microscopia óptica.....	77
2.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	79
2.2. Caracterização gravimétrica	81
2.3. Cinéticas de eluição da GSNO a partir de stents recobertos para solução de Griess	82
2.3.1. Solução de Griess em meio ácido	82
2.3.2. Solução de Griess em meio neutro	87
2.4. Estimativa da quantidade de GSNO liberada para a parede muscular de uma artéria coronária a partir de um stent implantado	88
III. CONCLUSÕES	90
REFERÊNCIAS	91

I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. Aterosclerose

A aterosclerose é uma doença imuno-inflamatória (Ross, e cols.1976) causada pelo acúmulo de lipídios (principalmente colesterol), no espaço sub-endotelial das artérias. A figura 1 apresenta a formação e o desenvolvimento da placa aterosclerótica e pode ser acompanhada da explicação que se segue (Libby, 2002).

A aterosclerose se inicia quando partículas de LDL (lipoproteína de baixa densidade, em geral denominada colesterol ruim), responsáveis por transportar o colesterol na corrente sanguínea, se acumulam no espaço sub-endotelial e sofrem oxidação. As LDL modificadas estimulam as células endoteliais a secretarem moléculas de adesão, que passam a atrair os monócitos (células do sistema imunológico). No interior do endotélio, moléculas atrativas fazem os monócitos migrarem através dos poros do endotélio até alcançarem a íntima, onde se transformam em macrófagos. Os macrófagos passam a fagocitar as partículas de LDL modificadas. Porém, uma falha no processo faz os macrófagos ingerirem LDL em excesso, e se transformarem em células espumosas. Estas células crescem até se romperem, reiniciando o ciclo. Um processo de cicatrização acompanha a inflamação que ocorre na aterosclerose. Entretanto, ao invés de restaurar a artéria ao seu estado original, ocorre um remodelamento vascular, aumentando o tamanho da placa. Esse remodelamento ocorre com a proliferação e migração das células musculares lisas, que passam a se replicar e sintetizar componentes da matriz extracelular, levando à formação de uma capa fibrosa sobre a placa. Se o processo se encerrasse aqui a maior parte das placas não traria conseqüências a não ser um estreitamento da luz arterial. Porém, as células espumosas secretam enzimas que passam a digerir a capa fibrosa. Isso leva ao enfraquecimento da placa e, em geral, ao seu rompimento. O contato das substâncias do interior da placa com o sangue produz a imediata coagulação do sangue e, como conseqüência, a obstrução total e súbita do vaso, que leva ao infarto do miocárdio.

Formação da placa de aterosclerose

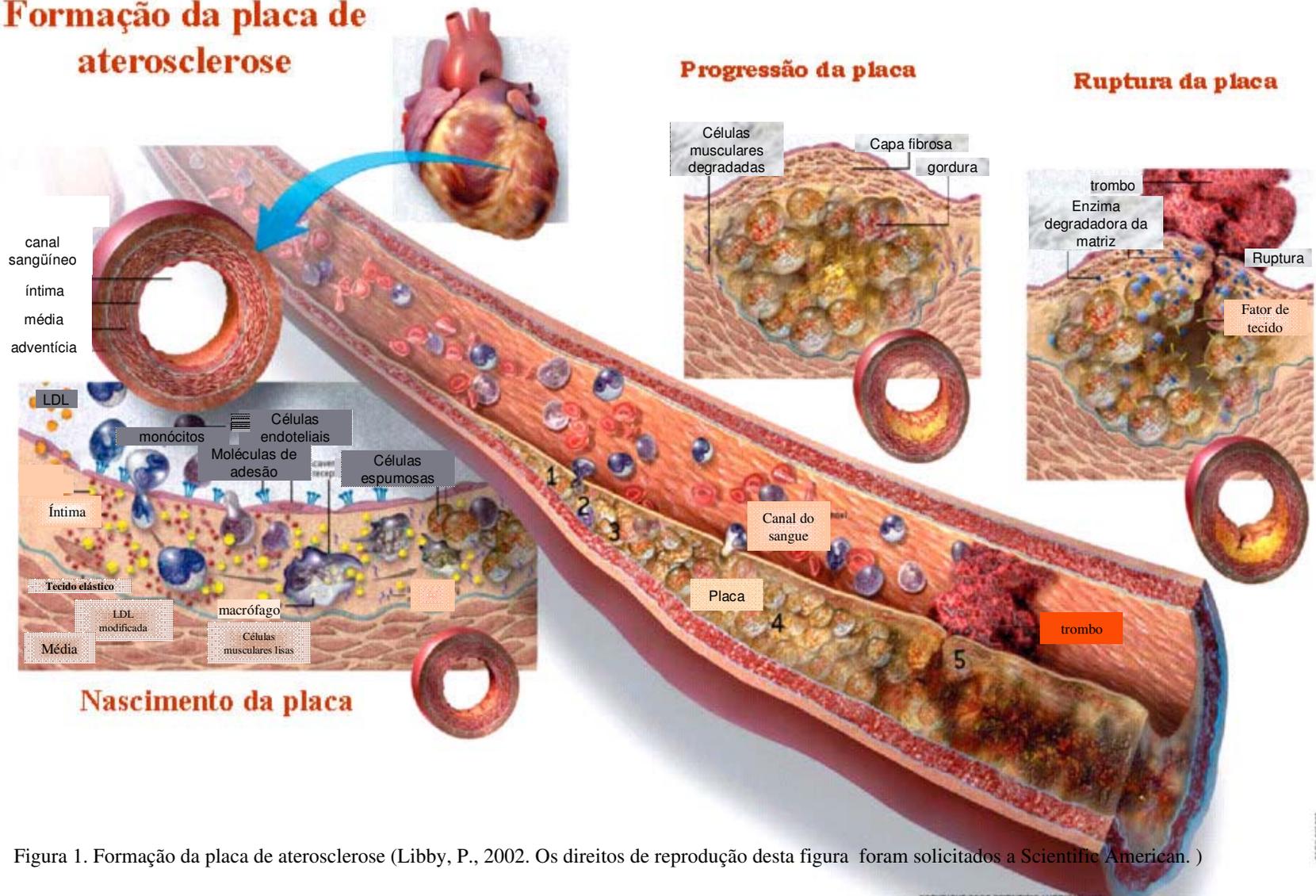


Figura 1. Formação da placa de aterosclerose (Libby, P., 2002. Os direitos de reprodução desta figura foram solicitados a Scientific American.)

Sabe-se que os principais fatores de risco para a aterosclerose são altos níveis de colesterol no sangue, hipertensão arterial, diabetes, fumo, histórico familiar de doença coronária e obesidade (Vogel, 1997 e Janero e Ewing, 2000).

No Brasil e no mundo, a doença arterial coronária em suas diversas manifestações crônicas ou agudas tem se tornado a causa mais comum de mortalidade (Garas e cols., 2001) De acordo com a Heart American Association (2000), em 1997, 466101 mortes nos Estados Unidos foram atribuídas à doença arterial coronária. Calcula-se que, mundialmente, mais de 19 milhões de pessoas apresentem um evento cardíaco agudo por ano (síndrome coronariana aguda ou morte súbita cardíaca). É neste cenário, que a intervenção percutânea coronária (ou angioplastia coronária) combinada à terapêutica farmacológica é a modalidade terapêutica mais utilizada (estimativa mundial de mais de 1,5 milhões de procedimentos/ano) para o tratamento da doença coronária, bem como está associada à melhora da qualidade de vida, especialmente em pacientes de maior risco.

2. Angioplastia

A angioplastia coronária transluminal percutânea (PTCA) é uma prática cardiológica não cirúrgica introduzida em 1977 (Gruetzing e cols., 1979), que representou uma revolução no tratamento da isquemia miocárdica decorrente da obstrução dos vasos coronários subepicárdicos. Baseada inicialmente na dilatação do vaso pela insuflação de um balão introduzido por um catéter no local da oclusão, esta técnica é extensivamente utilizada por pacientes que apresentam angina (dor no peito) ou infarto do miocárdio.

Um grande avanço na prática da angioplastia resultou da concepção de um dispositivo mecânico destinado a "sustentar" internamente a artéria coronária: o "stent" ou endoprótese coronária, introduzido clinicamente há cerca de 20 anos (Sigwart, e cols., 1987). A figura 2 exemplifica a inserção do catéter pela artéria femural e mostra artérias submetidas a angioplastia com catéter-balão e com stent.

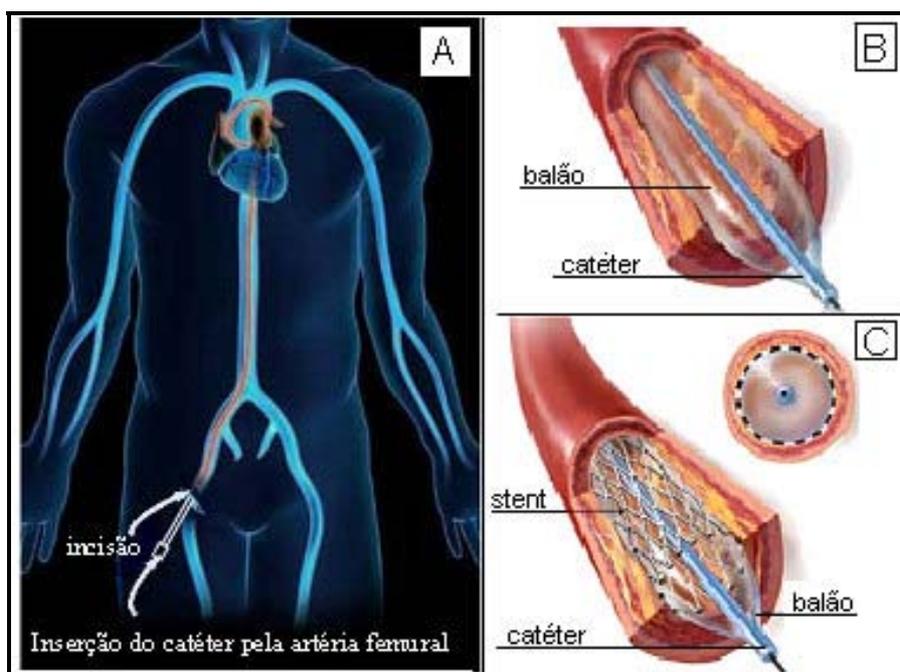


Figura 2. Procedimento de angioplastia. (A) Inserção do catéter pela artéria femoral (fonte <http://www.enfermedad-coronaria.com>). (B) Angioplastia por catéter balão e (C) angioplastia com stent (fonte http://www.inova.unicamp.br/campinasinova/apresentacoes/29_11/stents_eluidores.pdf).

3. Stents Coronários

Os stents (figura 3) são malhas metálicas expansíveis implantadas por catéters no interior das artérias obstruídas por processos de aterosclerose. A eficácia comprovada do uso de endopróteses vasculares metálicas como instrumento redutor de complicações agudas e tardias, tem motivado o uso predominante destes dispositivos na grande maioria dos procedimentos coronários percutâneos. Embora a implantação de stents tenha conseguido resolver em grande parte a reoclusão aguda (retração elástica do vaso em resposta ao trauma causado pela expansão do balão), a **reestenose intra-stent** (Missel e cols., 2002) continua sendo o maior problema clínico após a angioplastia, ocorrendo ainda em cerca de 30% dos pacientes (Le Breton, e cols., 1996). Assim, ainda que a utilização de stents se constitua em um

método terapêutico bem estabelecido, há um grande interesse no desenvolvimento de alternativas clínicas que ampliem as aplicações de stents.

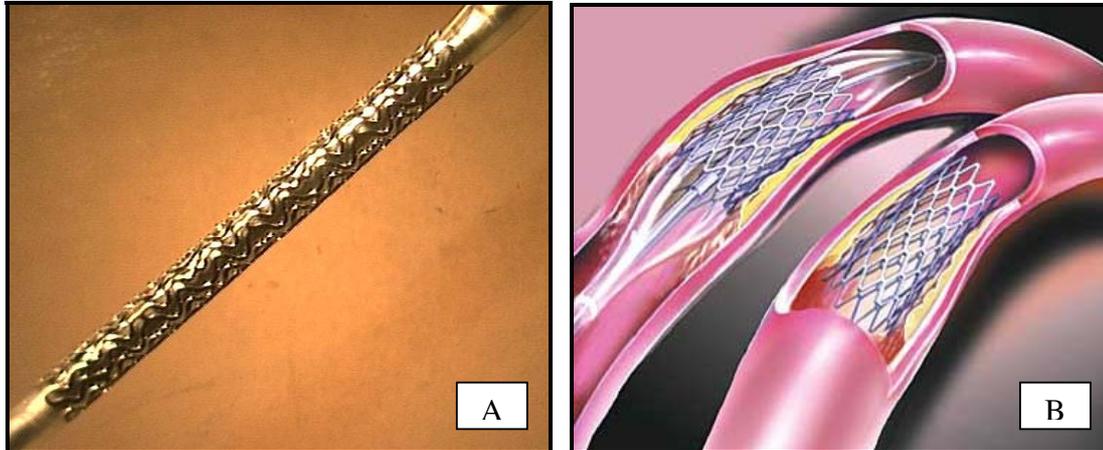


Figura 3. (A) Fotografia digital de stent sobre balão (Vazquez, P. A. M.). (B) Esquema da implantação de stent em uma artéria lesada (fonte <http://www.medartist.com/haney11.jpg>)

3.1. Reestenose intra-stent

Durante a PTCA, as altas pressões utilizadas para insuflar o balão, e a pressão mecânica imposta pelo stent, esticam as paredes do vaso acima dos limites de sua circunferência, levando ao rompimento da placa, e uma superexpansão do vaso (Missel e cols., 2002). Os danos causados pelo procedimento de angioplastia ao endotélio vascular expõem a matriz extracelular a componentes do fluxo sanguíneo, resultando em adesão, ativação e agregação plaquetária no local da lesão. As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento e citocinas que estimulam a migração e proliferação de células musculares lisas e a síntese de matriz extracelular. O trombo formado proporciona uma estrutura dentro das quais as células musculares lisas das camadas média e íntima da artéria podem migrar e então proliferar resultando na formação de neointima oclusiva (Allaire e Clowes, 1997; Lipke e West, 2005). A re-obstrução do local tratado nos primeiros meses após

a angioplastia está quase que exclusivamente relacionada à formação de tecido neointimal dentro do stent e caracteriza o quadro de **restenose intra-stent** (Missel e cols., 2002).

A figura 4 mostra o corte transversal de uma artéria sadia, indicando as camadas íntima, média e adventícia. A figura 5 apresenta os aspectos angiográfico e histológico de uma artéria coronária submetida à angiografia em que ocorreu a reestenose intra-stent.

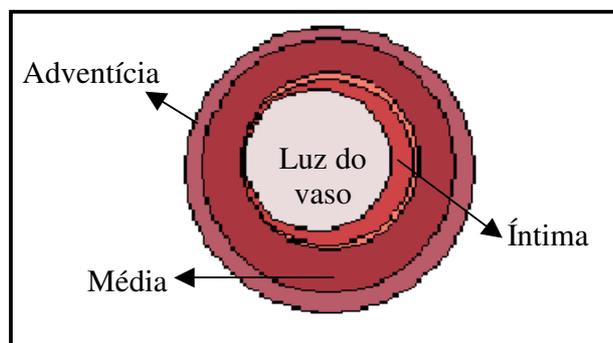


Figura 4. Esquema do corte transversal de uma artéria coronária sadia.

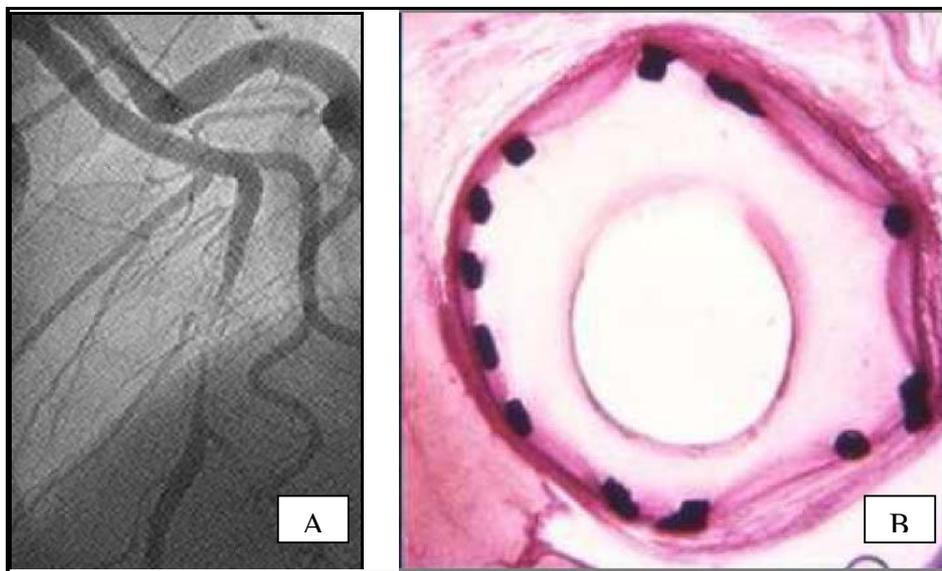


Figura 5. Estreitamento da luz da artéria resultante da reestenose intra-stent. (A) Aspecto Angiográfico e (B) Aspecto histológico.(fonte http://www.inova.unicamp.br/campinasnova/apresentacoes/29_11/stents_eluidores.pdf)

3.2. Stents liberadores de agentes bioativos

Recentemente, stents eluidores de agentes bioativos têm surgido como opção terapêutica para a prevenção da restenose (Lemos, e cols., 2004; Moses e cols., 2003; Stone e cols., 2004; Stone e cols., 2005; Lemos e cols., 2003). Nesta abordagem, drogas com ação antiproliferativas, antitrombóticas, antiinflamatórias e pró-endoteliais são adicionadas à superfície dos stents em suas formas puras ou incorporadas em matrizes poliméricas. Dessa maneira, o próprio stent passa a ser utilizado como veículo de liberação destes fármacos.

O grande avanço da utilização de stents eluidores é a aplicação do fármaco no momento da dilatação mecânica, no local da lesão, com pouco ou nenhum nível sistêmico circulante. Portanto, existe um grande interesse atual no desenvolvimento de materiais de recobrimento de stents que possam proporcionar a eluição de drogas, bem como no desenvolvimento de novas matrizes poliméricas que possam ser usadas para a incorporação destas drogas.

Atualmente, o stent recoberto com polímero-sirolimus (CypherR, Cordis Corporation, uma Companhia Johnson & Johnson) e o stent recoberto com polímero-paclitaxel (TAXUSR stent revestido com paclitaxel e polímero; Boston Scientific) estão disponíveis para uso clínico e têm demonstrado eficácia na redução da reestenose, em comparação com stents não recobertos. Entretanto, estes dispositivos ainda apresentam índices subótimos de restenose em alguns subgrupos. Também, têm-se sugerido que a utilização de drogas com efeito antiproliferativo retarda o processo de re-endotelização, o que pode potencialmente levar a uma maior predisposição a complicações trombóticas.

4. NO e seu papel na redução da reestenose

O óxido nítrico (NO) sintetizado endogenamente nos mamíferos previne a ativação e a adesão de plaquetas, reduz a proliferação das células musculares lisas, estimula a proliferação das células endoteliais e a gênese de novos vasos e promove

a vasodilatação de vasos sanguíneos (Mowery e cols., 2000). A figura 6 esquematiza todas as ações do NO, importantes para sua utilização em implantes coronários.

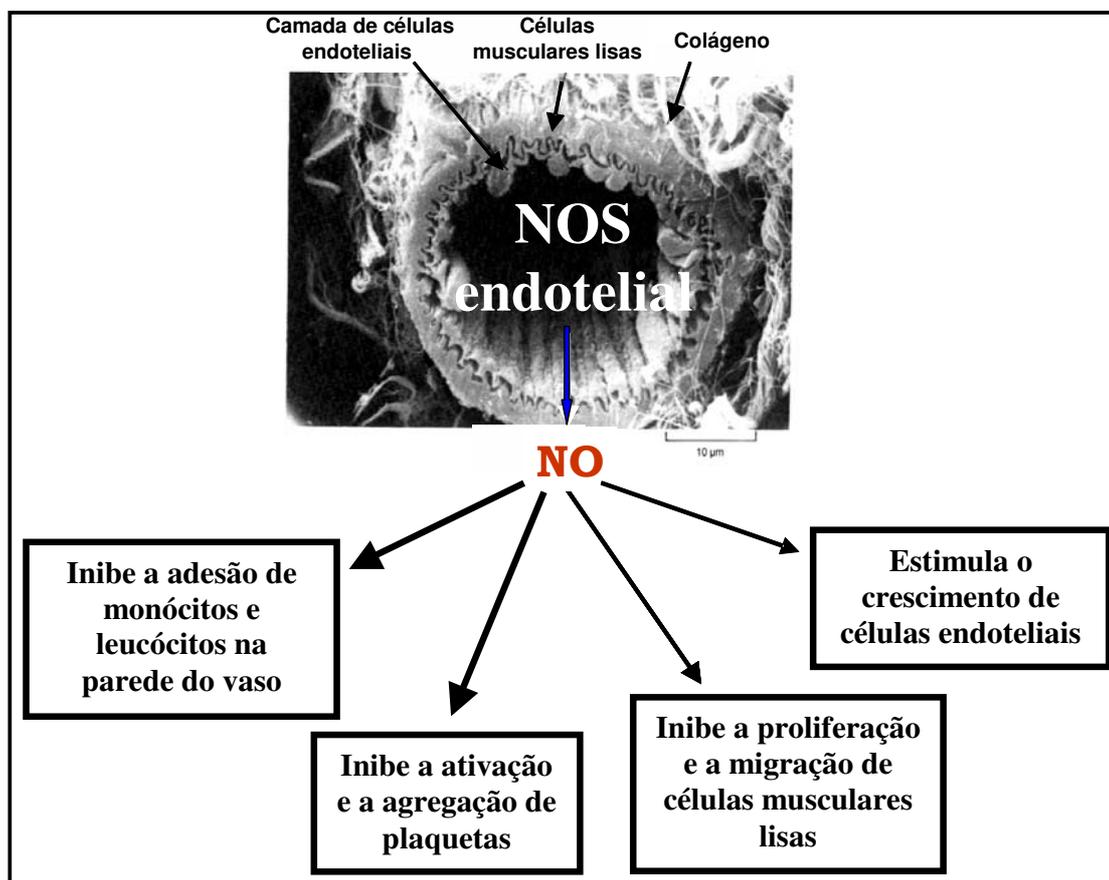


Figura 6. Ações biológicas do NO endógeno importantes para sua utilização em implantes coronários.

O conjunto destas ações indica que a liberação local de NO a partir de stents revestidos tem grande potencial na redução da trombose, podendo também inibir a proliferação neointimal (e a restenose) após a angioplastia. Além disso, a utilização de drogas antiproliferativas potentes (p.e. sirolimus e paclitaxel) em altas concentrações teciduais pode, teoricamente, provocar efeitos tóxicos locais. Desta forma, agentes bioativos com ação reparadora (ao invés de drogas com efeito inibitório sobre o processo cicatricial) poderiam minimizar o potencial tóxico dos stents. Neste contexto, o NO se apresenta como candidato adequado para uso,

isolado ou em combinação com outro agente bioativo, em formulações de stent farmacológico.

4.1. Doadores de NO

Devido ao curto tempo de meia-vida do NO in vivo (Ignarro, e cols., 2002), compostos que têm a capacidade de liberar NO tem sido amplamente utilizados como agentes terapêuticos e como ferramentas farmacológicas para investigar o papel do NO na fisiologia e patofisiologia cardiovascular. Doadores de NO são substâncias farmacologicamente ativas que liberam NO espontaneamente ou são metabolizados para liberar NO. Alguns doadores de NO já têm sido utilizados clinicamente há várias décadas, como a nitroglicerina e o nitroprussiato de sódio. Entretanto, o crescente interesse na fisiologia do NO desde a metade dos anos 80 levou ao desenvolvimento de uma série de novos doadores de NO que oferecem vantagens sobre os doadores de NO convencionais.

Dentre os doadores de NO mais recentemente descoberto, estão os S-nitrosotióis. Eles são uma classe de compostos que contém um grupo funcional S-NO a partir do qual o NO pode ser liberado ou transferido através da quebra homolítica ou heterolítica da ligação S-N (Jaworski, e cols., 2001). Em contraste com os nitratos orgânicos que precisam ser metabolizados para se tornarem ativos, esses agentes liberam NO espontaneamente (Parrat, 1979). Eles também têm facilidade de acesso ao compartimento intracelular por ação catalítica das membranas celulares e podem efetuar reações de transnitrosação. Essa classe de compostos inclui a S-nitrosoglutathiona, a S-nitroso-N-acetilpenicilamina e a S-nitrosoalbumina. O doador de NO utilizado nesse estudo é a S-nitrosoglutathiona (GSNO) cujas ações bioquímicas já foram comprovadas em estudos anteriores (Buttler e Rodhes, 1997). A estrutura molecular da GSNO está representada na figura 7.

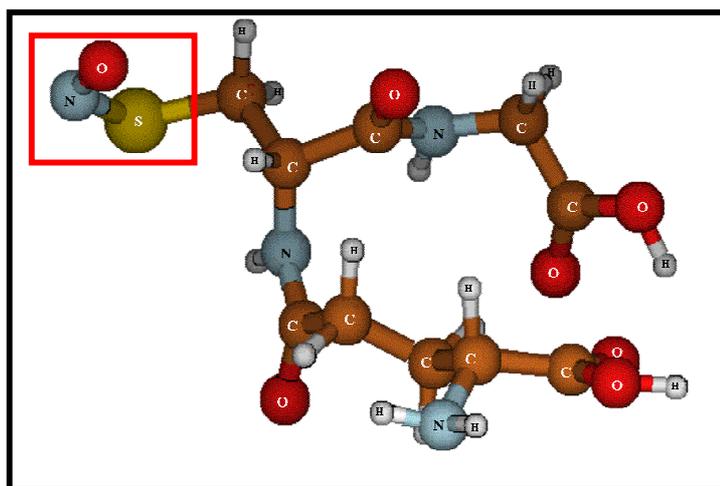


Figura 7. Estrutura molecular da GSNO. Realce no grupamento S-NO.

4.2 Stents revestidos com polímeros contendo doadores de NO

Stents vasculares com uma série de recobrimentos contendo doadores de NO têm sido testados, com efeitos variáveis (Ettenson e Edelman, 2000; Pulfer e cols., 1997; Smith e cols., 1996; Bertrand e cols., 1998). A albumina bovina S-nitrosada aplicada no local danificado na artéria reduziu a reestenose em coelhos (Marks e cols., 1995). A liberação de NO a partir da albumina bovina reduz a agregação plaquetária em 50-70% e a formação da neointima em 40%, em comparação com o polímero não nitrosado (Maalej, e cols., 1999). Yoon e cols. (2002), a fim de avaliar o efeito de NO eluído de um stent na redução da espessura da neointima, incorporaram nitroprussiato de sódio, um doador de NO, em uma matriz de poliuretano e recobriram stents metálicos. Neste trabalho, embora a liberação local de NO não tenha reduzido a hiperplasia da neointima, o stent recoberto com polímero mostrou-se uma ferramenta promissora para a administração de outros agentes que podem modificar as respostas dos tecidos que levam à reestenose. Entre os doadores de NO já utilizados em estudos de eluição a partir de stents destacam-se o nitroprussiato de sódio, os diazeniodiolatos e a nitrosoalbumina, que é uma proteína nitrosada.

Desta forma, pode-se propor que a liberação controlada de NO a partir da superfície dos stents é uma opção terapêutica atrativa para a prevenção da

reestenose, uma vez que ela inibe a ativação e a agregação plaquetárias bem como a proliferação de células musculares lisas, ao passo que estimula a proliferação das células endoteliais. A eluição localizada de NO em períodos de tempo que possam ser prolongados pelo efeito da matriz polimérica, poderá assim ser efetiva durante o período de resposta cicatricial que se segue à implantação do stent, ampliando sua ação na inibição da reestenose.

4.3. Polímeros liberadores de NO

Já foi verificado que é possível a incorporação de S-nitrosotióis em várias matrizes poliméricas (Oliveira e cols., 2002), incluindo a preparação de filmes sólidos de poli (álcool vinílico) (PVA) e de misturas de poli (álcool vinílico) com poli (vinil pirrolidona) (PVP) contendo S-nitrosotióis incorporados(Oliveira e cols. 2002). Essas matrizes sólidas estabilizam os S-nitrosotióis e são capazes de liberar NO espontaneamente em meio aquoso. Possuem, portanto, um grande potencial de aplicação para o revestimento de stents uma vez que podem promover a liberação de NO no local de implante do stent, reduzindo assim as chances de reestenose. Outros trabalhos mostraram que a agregação plaquetária e a proliferação de células musculares lisas em superfícies revestidas com colágeno foram inibidas após a exposição do sangue a esses hidrogéis doadores de NO (Brieger e Topol, 1997). Os principais polímeros utilizados como matrizes para a eluição de drogas em stents são: o poli-ácido láctico, poliuretano, politretrafluoretileno, poli (ácidolático-co-ácido glicólico) e polietileno glicol. Neste trabalho, o poli (álcool vinílico) foi utilizado como matriz eluidora de fármaco.

5. Poli (álcool vinílico)

5.1. Estrutura e propriedades do Poli (álcool vinílico)

O Poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero semicristalino (Cassu, 1995), que apresenta uma estrutura relativamente simples com grupamentos hidroxila pendentes, representada pela fórmula estrutural $[-CH_2CH(OH)-]_n$ onde n é o número de unidades de repetição de $-CH_2CH(OH)-$ (Fig. 1A). Seu monômero, o álcool vinílico, não existe em uma forma estável, rearranjando-se ao seu tautômero, acetaldeído. Portanto, PVA é produzido a partir da polimerização radicalar do acetato de vinila a poli (acetato de vinila) (PVAc) e subsequente hidrólise ou alcoólise, o que resulta em uma extensa distribuição de massa molar (Hassan e Peppas, 2000). A distribuição de massa molar do PVA influencia propriedades como cristalinidade, adesão, força mecânica e mobilidade das cadeias poliméricas.

A alcoólise pode ser catalisada por ácidos ou bases fortes, sendo que em escala industrial a alcoólise alcalina é geralmente empregada (Marten, 1988). A reação de alcoólise catalisada por base é extremamente rápida, e resulta em polímeros com certos graus de hidrólise, dependendo do tempo de reação, concentração de catalisador, temperatura e aditivos (Cassu, 1995). Essencialmente, o PVA é sempre um copolímero de PVA e PVAc que pode ser representado pela fórmula estrutural $[-CH_2CH(OH)-]_x[-CH_2CH(O_2CCH_3)-]_y$ onde x e y são os números das unidades de repetição de PVA e PVAc, respectivamente. (Fig. 8B).

Comercialmente, é possível encontrar PVA com graus de hidrólise bastante altos (98 - 99%). O grau de hidrólise ou o conteúdo de grupos acetato no polímero influencia as propriedades químicas, a solubilidade e a cristalinidade do PVA (Tubbs, 1966). Já se demonstrou que o PVA com alto grau de hidrólise apresenta baixa solubilidade em água (Finch, 1973). Os grupos acetato residuais, de natureza hidrofóbica, enfraquecem as ligações de hidrogênio intra e intermolecular dos grupos hidroxila adjacentes, sendo necessário que a temperatura esteja muito acima de 70°C para que ocorra a dissolução.

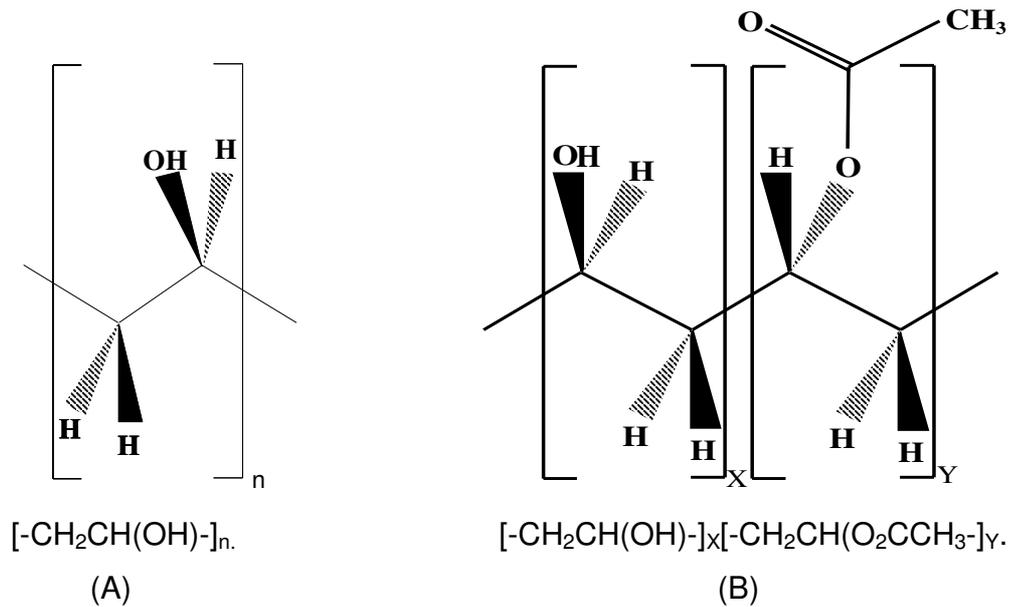


Figura 8. Estruturas do PVA (A) e do PVA-co-PVAc (B).

5.2. Cristalinidade do PVA

A estrutura semicristalina do PVA foi discutida em detalhes por Bunn. (Bunn, 1948). Os cristalitos de PVA podem ser descritos como uma estrutura lamelar. Uma dupla camada de moléculas mantém-se unida através de ligações de hidrogênio, enquanto forças de van der Waals operam sobre a dupla camada formando dobras nas cadeias de PVA que levam à formação de pequenas regiões altamente organizadas (cristalitos) em um domínio de alta concentração de PVA, a fase semicristalina, que se intercala com regiões desorganizadas da matriz, de menor concentração de PVA, denominada fase amorfa (Flory, 1953). A figura 9 apresenta a estrutura da rede tridimensional de membranas semicristalinas de PVA e o modelo de cadeias dobradas que descreve a formação dos cristalitos lamelares, mostrando a existência de imperfeições no retículo cristalino (Manas Chanda, 2000).

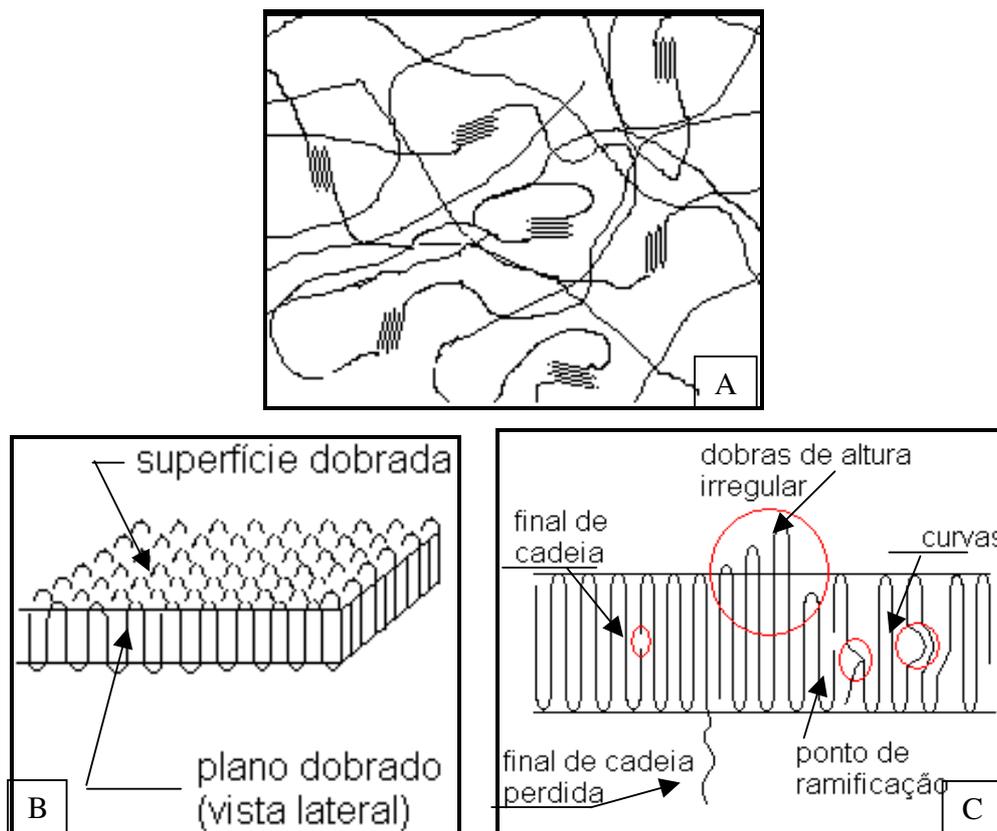


Figura 9. (A) Representação de uma estrutura polimérica semi-cristalina. (B) Modelo das cadeias dobradas que descreve a formação dos cristalitos lamelares. (C) Modelo das cadeias dobradas mostrando a existência de imperfeições no retículo cristalino.

Normalmente, há um comprimento de cadeia mínimo necessário para cristalizar o PVA. Mandelkern (2002) relatou que conforme a massa molar do polímero aumenta o tamanho dos cristalitos formados também aumenta. A estereoregularidade do PVA também influencia a sua cristalinidade (Harris e cols., 1966). O aumento da estereoregularidade não aumenta a cristalinidade do PVA, porém o PVA isotático resulta em amostras menos cristalinas que o PVA sindiotático, devido ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares, e conseqüente redução das forças intermoleculares. Fujii (1973) mostrou que estruturas estereoregulares não favorecem a cristalização do PVA e relatou que amostras de PVA atático são as formas mais cristalizáveis, enquanto PVA

sindiotático é menos cristalizável e a forma isotática apresenta-se pobre em cristalinidade.

O grau de cristalinidade do PVA é definido como a razão entre o volume dos cristalitos de PVA e volume total de PVA. Medidas de densidade, técnicas calorimétricas, espectroscópicas, de difração de raios X e de ressonância magnética nuclear de H^1 já foram utilizadas para determinar graus de cristalinidade de PVA (Tanigami, e cols., 1995). As técnicas calorimétricas para determinação de graus de cristalinidade de filmes secos de PVA incluem a calorimetria diferencial de varredura (DSC) e a análise termogravimétrica (TGA). Valores de cristalinidade e propriedades térmicas do PVA já foram relatados (Peppas, 1987). A faixa de fusão dos cristalitos de PVA é entre 220 e 240°C. A temperatura de transição vítrea de filmes secos de PVA foi observada a 85°C. Na presença de água (e outros solventes) a temperatura de transição vítrea diminui significativamente (Finch, 1973).

A difração de raios X também pode ser usada para a análise da cristalinidade de filmes e fibras de PVA. Métodos de difração de raios X são utilizados para determinar a porcentagem de PVA cristalino através da comparação do espalhamento com uma amostra completamente amorfa (Campbell e cols., 2000). Segundo Campbell e cols. o intumescimento de filmes de PVA não altera ("*melt out*") as regiões cristalinas do PVA. Entretanto, no caso de filmes intumescidos de PVA os resultados são difíceis de analisar devido à existência de um padrão de reflexão da água.

5.3. Reticulação do PVA

O PVA pode ser reticulado a fim de ampliar as possibilidades de aplicações especialmente nas áreas médica e de ciências farmacêuticas. Ao ser reticulado, o PVA torna-se insolúvel em solução devido à presença de pontos de reticulação e passa a se comportar como um hidrogel, um polímero hidrofílico, reticulado, que intumesce na presença de água ou fluidos biológicos (Hassan e Peppas, 2000).

A reticulação do PVA pode ocorrer através da utilização de agentes reticulantes, que quando utilizados na presença de ácido ou metanol formam ligações acetato entre os grupos hidroxila pendentes e as cadeias de PVA. Para aplicações farmacêuticas ou biomédicas, especialmente no caso do PVA ser utilizado como matriz carregadora de fármaco, a utilização desses agentes reticulantes pode ser prejudicial, devido à possibilidade da presença de resíduos tóxicos que ficam impregnados no hidrogel resultante, e que podem alterar a atividade biológica ou degradar o agente biologicamente ativo a ser liberado.

A utilização de um feixe de elétrons ou de radiação γ como método alternativo de reticulação química apresenta vantagens sobre o uso de reticulantes químicos já que estas técnicas não deixam resíduos tóxicos no gel. Porém, um problema observado na utilização desses métodos foi a formação de bolhas durante o processo de reticulação (Bray e Merrill, 1973).

5.3.1. Hidrogéis preparados por ciclos de congelamento/descongelamento (C/D) de soluções aquosas de PVA

Para evitar processos de reticulação que levam à liberação de agentes tóxicos, foi desenvolvido um método físico de gelificação e solidificação de alguns polímeros, particularmente do PVA. Esse processo envolve o congelamento e descongelamento ("freezing/thawing") de soluções de polímero e já foi discutido por vários autores (Peppas e Stauffer, 1991) que abordaram o efeito de várias condições de preparação nas propriedades desses materiais. Tais hidrogéis apresentam propriedades mecânicas melhores do que os hidrogéis reticulados por técnicas químicas ou técnicas baseadas no uso de radiação ionizante, porque a carga mecânica pode ser distribuída ao longo da estrutura tridimensional dos cristalitos. O número e a estabilidade desses cristalitos geralmente aumentam com o número de ciclos. Algumas características desses géis de PVA incluem um alto grau de intumescimento em água, natureza elástica, e grande força mecânica, sendo por isso considerados fisicamente reticulados.

A preparação de hidrogéis de PVA puro usando a técnica de congelamento/descongelamento (C/D) foi inicialmente relatada por Peppas (1975). Neste trabalho, soluções aquosas de PVA com concentração variando entre 2.5 e 15% (m/v) foram congeladas a -20°C e descongeladas à temperatura ambiente, resultando na formação dos cristalitos. Os cristalitos foram caracterizados por medidas de mudança na turbidez das amostras de PVA. A formação dos cristalitos mostrou estar relacionada à concentração de PVA na solução, e aos tempos de congelamento e de descongelamento.

Depois dessa descoberta, muitos estudos buscaram caracterizar os hidrogéis obtidos por ciclos de C/D. Nambu (1984) introduziu o uso desses géis para aplicações biomédicas e avaliou suas propriedades mecânicas. Nambu também analisou os mesmos géis por difração de raios X, microscopia eletrônica de varredura, microscopia óptica e ensaios mecânicos de tensão-estiramento. A estrutura descrita consistia de três fases: uma fase aquosa com concentração de PVA baixa, uma fase amorfa, e uma fase cristalina que restringe a mobilidade das cadeias de PVA da fase amorfa.

Watase e Nishinari (1985) caracterizaram estes hidrogéis por análise dos picos endotérmicos obtidos por calorimetria diferencial por varredura (DSC) e difração de raios X. Eles fizeram uma extensa análise relacionando o efeito do grau de hidrólise a várias propriedades dos géis de PVA preparados por ciclos de C/D. Eles relataram que a presença de grupos acetato pode inibir a formação do gel e causar uma diferença significativa no comportamento térmico dos géis.

O aumento do grau de cristalinidade devido aos ciclos de C/D é bastante aceito na literatura, mas há divergências relacionadas aos eventos que ocorrem para que os cristalitos se formem. Três modelos básicos, que incluem a separação de fases líquida-líquida, a formação dos cristalitos em solução e uma contribuição dos dois modelos, já foram descritos na literatura para explicar a formação dos géis de PVA. Alguns autores argumentam que inicialmente ocorre a separação de fases líquida-líquida, sendo uma fase rica em PVA (solução concentrada) e outra pobre em PVA (solução diluída), com a cristalização na fase rica em polímero reforçando estes domínios. Ricciardi e cols.(2005), através da técnica de SANS, propuseram uma

estrutura bicontínua para hidrogéis de PVA obtidos por ciclos de congelamento/descongelamento. A organização estrutural na escala microscópica se origina da presença de duas fases separadas, compostas de regiões pobres em PVA (fase amorfa) e regiões ricas em PVA (fase semicristalina), onde ocorre a formação dos cristalitos, conforme mostra a Fig. 10. A estrutura de rede pode ser interpretada em termos da conectividade das regiões ocupadas pela fase rica em PVA. Há também uma organização estrutural proporcionada pela presença de cristalitos, dentro da fase rica em PVA, que resultam do empacotamento das cadeias de polímero em lamelas que também se interconectam.

Outros autores consideram que há a formação de pontos de agregação na própria solução polimérica, e que a formação da rede pode ser entendida independente da cinética de cristalização. Segundo Willcox (1999), a segunda hipótese é sustentada por observações anteriores na literatura. Sabe-se que, próximo à temperatura ambiente, a água é um bom solvente para o PVA, o que explica parcialmente o fato da temperatura de fusão do PVA diminuir drasticamente quando na fase gel. Como não existe separação de fase líquido-líquido em um bom solvente, a gelificação de soluções de PVA à temperatura ambiente, sugere que a formação dos cristalitos ocorre na própria solução. Se a gelificação do PVA ocorresse via separação de fase líquido-líquido, três fases coexistiriam: uma solução pobre em polímero, uma solução rica em polímero e os cristalitos do polímero. Em um sistema bifásico, três fases podem existir apenas no ponto eutético. Entretanto, o início da temperatura de gelificação é dependente da concentração de polímero, descartando a possibilidade de ser um eutético. A avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (TEM) confirmou essa hipótese mostrando que soluções gelificadas à temperatura ambiente apresentam uma organização microestrutural com escala característica de dezenas de nanômetros, muito menor do que as estruturas formadas a partir de soluções poliméricas com separação de fase líquido-líquido. Como uma alternativa, propôs-se que a gelificação do PVA ocorre via ligações de hidrogênio e que as considerações termodinâmicas não são importantes, já que esses sistemas estão fora do equilíbrio.

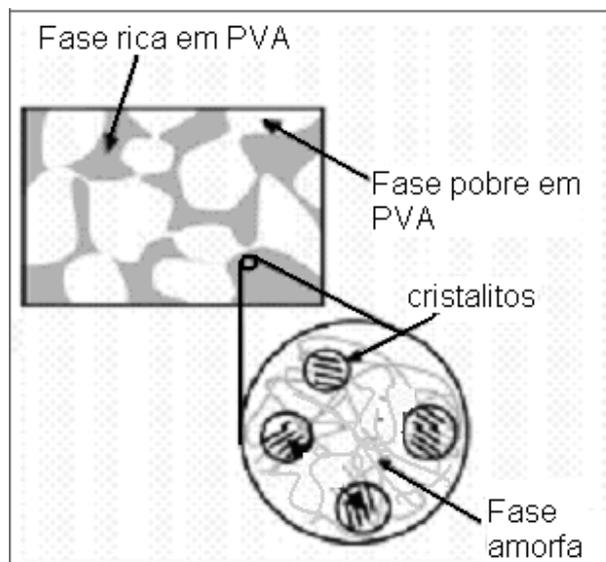


Figura 10. Estrutura bicontínua de hidrogel de PVA obtido por ciclos de congelamento/descongelamento (Baseado em Ricciardi e cols., 2005).

Em um trabalho mais recente, Hatakeyema (2005) esquematizou a densificação das cadeias de PVA durante os ciclos de congelamento/descongelamento. A mobilidade dos segmentos de PVA cessa quando a água congela. Com o decréscimo da temperatura, o volume do gelo aumenta em comparação ao volume ocupado pela água líquida e os grupos hidroxila das moléculas de PVA se aproximam, possibilitando a formação de mais ligações de hidrogênio. Redes frouxas são formadas no primeiro ciclo de C/D. Uma vez formada a rede, a mobilidade das cadeias poliméricas está restrita a uma região limitada à elasticidade da estrutura formada. Assim, os segmentos exibem flutuação térmica ao redor de determinados pontos fixos. Por conta disso, o número de pontos de agregação aumenta com a repetição dos ciclos. As mudanças macroscópicas foram observadas por microscopia eletrônica de varredura, evidenciando a densificação das paredes dos hidrogéis de PVA e o aumento dos poros formados com o aumento do número de ciclos.

5.4. Aplicações biomédicas e farmacêuticas

O PVA é um polímero hidrofílico, bio e hemocompatível, bastante conhecido por suas propriedades mecânicas e já foi utilizado em inúmeras aplicações biológicas e farmacêuticas (Peppas e cols., 2000). Entre as vantagens que esse polímero apresenta, destacam-se as suas características bioadesivas, não-carcinogênicas e atóxicas. Além disso, o PVA apresenta um alto grau de intumescimento em água ou fluidos biológicos. Devido a essas propriedades, o PVA foi um dos primeiros polímeros sintéticos a serem testados em cartilagens artificiais (Seal e Otero, 2001). Géis de PVA são utilizados em lentes de contato e em aplicações para liberação controlada de fármaco. O PVA também pode ser moldado como filme e aplicado como material funcional incluindo-se materiais biomédicos tais como membranas de diálise, membranas para a substituição de tecidos feridos, pele artificial, implantes cardiovasculares e como veículo para a liberação controlada de substâncias ativas (Brieger, 1997 e Cassu, 1995).

Peppas e Merrill (1977) avaliaram a utilização de PVA em aplicações em que a principal questão era a hemocompatibilidade. As propriedades físicas e de superfície foram examinadas e sua importância em várias aplicações biomédicas foi então comprovada.

6. Coeficientes de Difusão

Uma das mais importantes questões concernentes à liberação controlada de fármacos é a predição da taxa de liberação do ativo em função do tempo, utilizando modelos matemáticos. A grande maioria dos modelos teóricos é baseada nas equações de difusão (Peppas e cols., 2000).

A liberação de um agente ativo a partir de um sistema matricial consiste do movimento da droga através do interior da matriz. Este fenômeno, conhecido por difusão, é controlado principalmente por limitações de transferência de massa na fronteira entre a matriz polimérica e seus arredores.

Na escala macroscópica, a difusão das moléculas de um soluto através do polímero pode ser descrita pela 1ª lei de Fick da difusão, matematicamente representada pela equação 1 para transporte em uma dimensão (Crank, 1975).

$$J_i = -D_{ip} \left(\frac{dc_i}{dx} \right)_t \quad (1)$$

onde J_i é o fluxo, definido como a quantidade de material que passa através de uma secção de área unitária por unidade de tempo t ; c_i a concentração de soluto i ; D_{ip} é o coeficiente de difusão das espécies i na matriz polimérica e x , a variável de posição.

Uma outra maneira de representar a equação da 1ª Lei de Fick da difusão para transporte em uma dimensão é:

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{DC_0}{h} \quad (2)$$

onde, Q é a quantidade de soluto difundido por unidade de área no tempo t , dQ/dt é a taxa de liberação do soluto a partir da matriz, C_0 é a concentração inicial de soluto na matriz, D é o coeficiente de difusão e h a espessura da matriz.

A primeira lei de Fick estabelece que o fluxo de matéria é proporcional à diminuição da concentração (dc_i) e inversamente proporcional à distância (dx). Esta lei descreve o processo de difusão sob condições de *estado estacionário*, ou seja, o gradiente de concentração, dC/dx , não varia com o tempo. No entanto, na maioria dos métodos experimentais utilizados para estudar a difusão, tem-se interesse na variação da concentração com o tempo e a distância. Neste caso, a 1ª lei pode ser convertida em uma eq. diferencial parcial de 2ª ordem, a 2ª lei de Fick (eq. 3):

$$\left(\frac{dc_i}{dt} \right)_x = D_{ip} \left(\frac{d^2c_i}{dx^2} \right)_t \quad (3)$$

A segunda Lei de Fick (equação 3) representa a velocidade de alteração da concentração de soluto em função do tempo e o deslocamento, ou seja, dois fatores importantes na determinação do coeficiente de difusão de qualquer soluto em diferentes sistemas.

Apesar de bastante complexos, alguns modelos teóricos para os sistemas de liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais são bastante conhecidos e amplamente utilizados para analisar a liberação de substâncias ativas de tais sistemas (Lopes e cols., 2005). Os modelos mais amplamente utilizados e que descrevem melhor os fenômenos de liberação estão brevemente descritos abaixo.

Um modelo bastante simples (Lopes e cols., 2005) é denominado de cinética de ordem zero e baseia-se na liberação lenta da substância ativa a partir de matrizes que não sofrem desagregação, e liberam a droga lentamente (assumindo que não há mudança na área de liberação e que não são atingidas condições de equilíbrio). Pode-se expressar a taxa de difusão do fármaco segundo esse modelo pela seguinte equação:

$$Q_t = Q_0 + K_0 t \quad (4)$$

onde Q_t é a quantidade de droga acumulada no compartimento receptor no tempo t , Q_0 é a quantidade inicial de droga no compartimento receptor (geralmente, $Q_0 = 0$) e K_0 é a constante de liberação de ordem zero, ou taxa constante de difusão aparente.

Essa relação pode ser usada para descrever liberação de formas farmacêuticas que não intumescem nem degradam como sistemas transdérmicos, comprimidos com fármacos pouco solúveis, sistemas osmóticos, etc. As formas farmacêuticas que seguem esse perfil liberam a mesma quantidade de fármaco por unidade de tempo e são as formulações ideais de liberação quando se deseja atingir uma ação farmacológica prolongada.

Outro modelo freqüentemente utilizado para descrever a velocidade de liberação controlada de um fármaco foi desenvolvido Higuchi (1962). Ele descreveu a liberação do fármaco como um processo de difusão baseado na lei de Fick e

dependente da raiz quadrada do tempo, segundo a equação 5 (Merclin, 2004 e Papadokostaki e Petropoulos, 1998):

$$Q = 2C_0 \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (5)$$

onde Q é a quantidade de fármaco difundido por unidade de área no tempo t, C₀ é a concentração inicial de fármaco na matriz, e D é o coeficiente de difusão, considerando-se uma difusão constante e mantendo-se o sistema sob agitação. Higuchi desenvolveu esse modelo para descrever a liberação de drogas hidrossolúveis, ou com baixa solubilidade em água, incorporadas em matrizes sólidas ou semi-sólidas, como no caso de pomadas, mas o modelo se aplica para outros tipos de formas farmacêuticas. Porém, esse modelo tem aplicações limitadas no caso de membranas que intumescem, pois esses sistemas podem ser erodíveis e desconsideram o efeito do relaxamento das cadeias poliméricas para transporte do fármaco.

A maioria dos estudos de transporte através de membrana publicados envolve o uso de uma célula de difusão de Franz (1975). Essa cela consiste em dois compartimentos com uma membrana fixada entre o compartimento doador e o receptor. Essa cela de difusão ou permeação tem volume fixo de soluções de doador e receptor, que são mantidas sob agitação e podem ser usadas para avaliar o tempo necessário para que ocorra a permeação de um determinado composto através da membrana. Para este tipo de célula, um terceiro modelo matemático, proposto inicialmente por Gibaldi e Feldman (1967) e Wagner (1969) foi utilizado para descrever o perfil de liberação a partir de matrizes contendo fármacos solúveis em água, e que liberam a droga proporcionalmente à quantidade remanescente em seu interior, de maneira que a quantidade de droga liberada por unidade de tempo diminui. A equação 6 abaixo pode ser utilizada para expressar esse modelo:

$$\frac{VdC_2}{dt} = \frac{[DA(C_1 - C_2)]}{L} \quad (6)$$

onde C_1 e C_2 são as concentrações do fármaco nos compartimentos doador e receptor, respectivamente, A é a área da membrana através da qual o fármaco está difundindo, L é a espessura da membrana e V o volume total da câmara (compartimento doador + compartimento receptor). A equação 7 pode ser integrada levando a:

$$\ln Q = 2 \left(\frac{DA}{LV} \right) t \quad (7)$$

onde Q é a quantidade de soluto difundido no tempo t . A regressão linear da equação acima nos fornece como coeficiente linear $2DA/LV$, de onde se pode calcular o coeficiente de difusão (D). A determinação dos coeficientes de difusão com o uso da cela de Franz permite estabelecer uma correlação direta com a velocidade de eluição de GSNO incorporada em filmes de PVA, usados para recobrimento de stents, uma vez que o mecanismo de difusão da GSNO através da matriz amorfa hidratada é o mesmo nos dois casos.

Um número significativo de trabalhos experimentais e teóricos foi publicado na literatura com o objetivo de elucidar o modelo de transporte do fármaco e o mecanismo de liberação da matriz (Lopes e cols., 2005). Uma das primeiras tentativas de estimar o coeficiente de difusão através de uma matriz polimérica foi a de Eyring (1936). Em sua teoria, a difusão de um soluto através de um meio é apresentada como um processo descontínuo, que ele denominou de saltos difusionais (*"diffusional jumps"*). Fujita (1961) utilizou a idéia de volume livre nos polímeros para estimar o coeficiente de difusão de drogas e chegou a uma dependência exponencial entre volume livre e o coeficiente de difusão. Yasuda e Lamaze (1971) refinaram a teoria de Fujita e apresentaram uma teoria molecular, que prediz o coeficiente de difusão de maneira bem mais precisa. Em seu

tratamento, o coeficiente de difusão normalizado, dado pela razão entre o coeficiente de difusão do soluto no polímero pelo coeficiente de difusão do soluto no solvente puro, é relacionado ao grau de hidratação e ao volume livre ocupado pelo meio intumescido. Siepmann e Peppas (2001) desenvolveram um modelo teórico baseado no volume livre da matriz polimérica. Eles relacionaram o coeficiente de difusão normalizado ao grau de intumescimento, ao raio do soluto e à massa molecular das cadeias poliméricas. Siepmann e Peppas (2000) também compilaram vários tipos de modelos matemáticos desenvolvidos para sistemas de difusão de soluto através de matrizes poliméricas hidrofílicas intumescidas. Costa e Sousa Lobo (2001) publicaram um artigo de revisão bastante detalhado sobre perfis de dissolução de fármacos liberados a partir de matrizes poliméricas hidrofílicas.

7. Método de Griess: detecção colorimétrica de GSNO em solução

O método de Griess é um método espectrofotométrico padrão para detecção de nitrito, amplamente utilizado para quantificar S-nitrosotióis (RSNOs) em sistemas biológicos. A técnica se baseia nas propriedades químicas dos intermediários formados na reação entre NO (NO) e oxigênio (O₂), que podem oxidar ou nitrosar o substrato e sua sensibilidade é de cerca de 5µM.

Inicialmente, o deslocamento de NO dos S-nitrosotióis é catalisado por íons mercúrio presentes em solução, conforme observado por Saville (1958) (Eq. 8):



Soluções contendo sulfanilamida (SULF) e cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina (NEED) expostas a RSNOs não apresentam nenhuma variação espectral na faixa de 400 a 800 nm. Entretanto, a adição de cloreto de mercúrio (HgCl₂) muda a coloração da solução de incolor para rosa intenso, resultando no aparecimento de uma banda de absorção na faixa do visível atribuída à formação de

um composto azo (grupo funcional -N=N-) (Nims e cols., 1995 e Cook e cols., 1996). A figura 11 apresenta o esquema da formação do composto azo, responsável pela coloração rosa da solução utilizada no método de Griess.

Quando a sulfanilamida está dissolvida com NEED em meio sob condições aeróbicas, a adição de solução estoque de NO ou de um doador de NO na presença de íons mercúrio, resulta na N-nitrosação da sulfanilamida pelos intermediários gerados na reação entre NO/O₂, gerando uma arilnitrosoamina primária que rapidamente se decompõe para o correspondente íon diazônio. Estas espécies reagem com NEDD para formar um composto azo, cuja banda de absorção característica apresenta $\lambda_{\text{máx}}$ em 540 nm e coeficiente de absorvidade molar (ϵ) de 58000 M⁻¹ cm⁻¹ (Nims e cols., 1995). A figura 12 apresenta a variação espectral na faixa do visível devido à formação do composto azo na reação de NO/O₂ com solução de Griess em meio ácido.

O método de Griess também pode ser realizado em meio neutro, preparando-se os reagentes em tampão fosfato (pH 7.4). Neste caso, a formação do composto do azo resulta num espectro de absorbância com $\lambda_{\text{máx}}$ em 496 nm e $\epsilon = 13940$ M⁻¹ cm⁻¹.

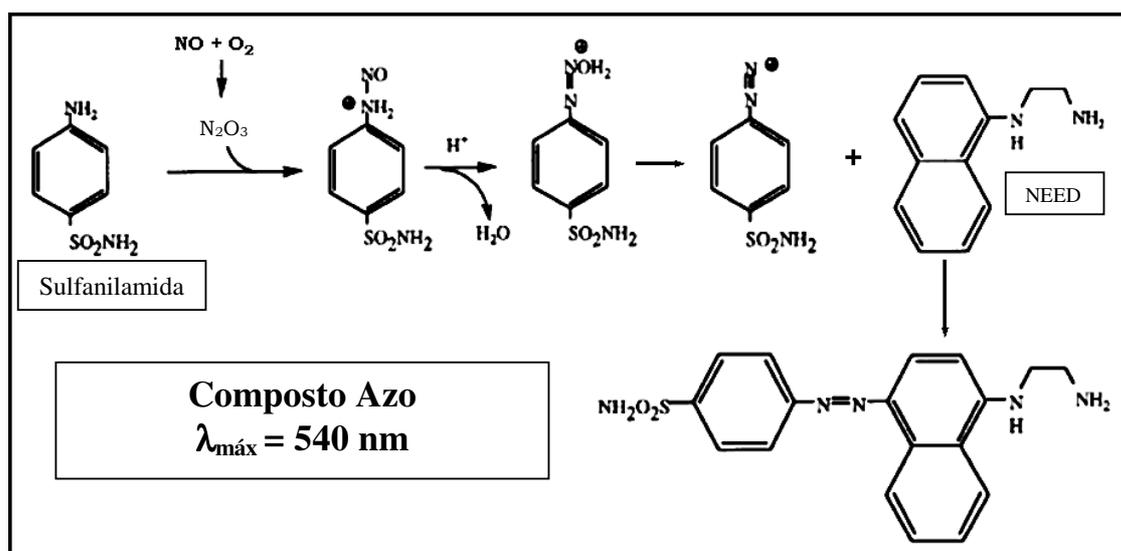


Figura 11. Esquema de formação do composto azo resultante da reação de sulfanilamida nitrosada através dos intermediários da reação NO/O₂ com NEED.

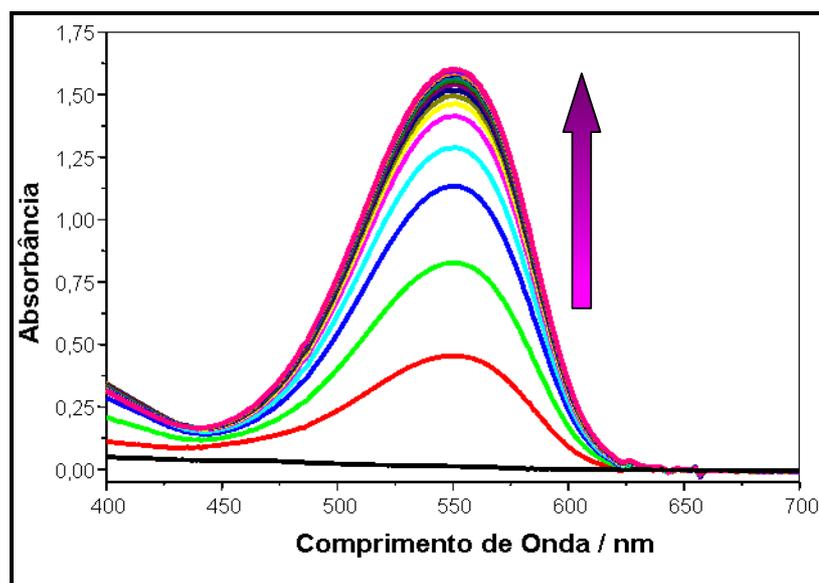


Figura 12. Variação espectral na faixa do visível ($\lambda_{\text{máx}}$ em 545 nm) devido à formação do composto azo na reação de GSNO com solução ácida do reagente de Griess na presença de íons mercúrio.

II. Parte Experimental

1. Materiais e reagentes

Poli (álcool vinílico) (PVA 99+% hidrolizado; M_w 85000-146000, Sulfanilamida, N-(1-cloreto de naftil-etilenodiamina) (NEDD), glutationa (GSH), nitrito de sódio (NaNO_2), solução tampão salina de fosfato de sódio pH 7,4, ácido clorídrico (HCl), hexano, acetona, diclorometano, azul de metileno, foram obtidos da Sigma-Aldrich e utilizados sem nenhuma purificação prévia. Os stents utilizados foram fornecidos pela empresa INNOVATECH MEDICAL Ltda, IPEN/USP, São Paulo, SP.

2. Síntese da S-nitrosoglutationa (GSNO)

A GSNO foi sintetizada de acordo com procedimentos previamente descritos na literatura (Oliveira, 2002). Resumidamente, 1,50 g de GSH foram adicionados a uma solução de HCl 0,5 M e esta solução foi mantida sob agitação constante até a completa dissolução da GSH. Em seguida, adicionou-se 0,35 g de nitrito de sódio, a esta solução, mantendo-se a agitação constante por mais 40 min, em banho de gelo. A formação da GSNO foi constatada pelo desenvolvimento de cor vermelha-alaranjada na solução. A GSNO foi então precipitada com a adição de 20 mL de acetona, lavada com pequenas quantidades de água gelada e acetona, filtrada à vácuo e seca por liofilização por 24h. A GSNO seca foi armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$, protegida da luz.

3. Preparação de filmes isolados de PVA

3.1. Soluções de PVA

Soluções aquosas de PVA de concentrações 0,5, 2,5, 5,0 e 10,0 % (m/v) foram preparadas pela dissolução do polímero seco em 20 mL de água desionizada

a ca. 95°C, sob refluxo e agitação, por 3 h. Após a completa dissolução do polímero, as soluções obtidas foram resfriadas até a temperatura ambiente e usadas imediatamente.

3.2. Incorporação da GSNO em soluções de PVA

Soluções de PVA com concentrações de 0,5, 2,5, 5,0 e 10,0 % (m/v) foram preparadas conforme o item 3.1. Em todos os casos, adicionou-se quantidades apropriadas de GSNO sólida às soluções de PVA, à temperatura ambiente, de modo a se obter uma proporção em massa de PVA:GSNO constante, de $1:3,6 \times 10^{-2}$ que corresponde a uma concentração molar de GSNO de $107 \mu\text{mol/g}$ de PVA. As soluções foram agitadas por cerca de 5 min com uma barra magnética para garantir a completa dissolução do soluto. As soluções obtidas dessa maneira estão listadas na tabela 1.

Tabela 1. Concentrações das soluções de PVA e GSNO utilizadas para a preparação de filmes.

[PVA] (g/L) na solução	[GSNO] (g/L) na solução	Designação dos filmes de PVA puros	Designação dos filmes de PVA/GSNO
100	3,6	PVA 100	PVA/GSNO 100
50	1,8	PVA 50	PVA/GSNO 50
25	0,9	PVA 25	PVA/GSNO 25
5	0,18	PVA 5	PVA/GSNO 5

3.3. Obtenção de filmes isolados, por moldagem a partir de solução

Filmes circulares de PVA e PVA/GSNO hidratado, submetidos ou não a ciclos de congelamento/descongelamento* (veja abaixo), foram obtidos através da adição de 2,0 mL de solução de PVA ou PVA/GSNO em moldes circulares de *nylon* de 2.0 cm de diâmetro e 0.5 cm de altura. Após o preenchimento dos moldes, os mesmos foram colocados no freezer a -20 °C e mantidos nesta temperatura por 20h.

3.4. Ciclos de congelamento/descongelamento* para aumento do grau de cristalinidade

Os filmes submetidos ao tratamento térmico para aumento do grau de cristalinidade foram retirados do freezer e mantidos a 25 °C por 2h ou 4h com repetição dos ciclos de C/D ("freezing/thawing") a -20 e 25 °C por até 5 vezes. Os filmes não submetidos ao tratamento térmico para aumento do grau de cristalinidade** foram retirados do freezer e secos imediatamente.

3.5. Secagem dos filmes de PVA

Os filmes obtidos por moldagem de acordo com o item acima, foram secos por dois métodos distintos:

* Filmes submetidos a ciclos de congelamento/descongelamento serão indicados pela sigla C/D.

** Filmes não submetidos ao tratamento térmico para aumento do grau de reticulação serão denominados neste trabalho por filmes "não reticulados". Deve-se observar que, a rigor, todas as amostras de PVA são semicristalinas e, portanto apresentam algum grau de reticulação atribuído à presença de cristalitos. A denominação "não reticulada" tem apenas o propósito de facilitar a identificação das amostras.

- **Secagem por evaporação:** Após o último ciclo C/D, os filmes descongelados foram secos no liofilizador por 24 h, sem congelamento posterior.

- **Secagem por sublimação:** Após o último ciclo C/D os filmes congelados foram secos no liofilizador por 24h, mantendo-se o congelamento durante a secagem.

4. Caracterização de filmes de PVA isolados

4.1. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Medidas de DSC foram realizadas utilizando-se um calorímetro 2920 *Modulated TA Instruments* (EUA). O padrão de calibração utilizado foi o Índio metálico (temperatura de fusão, $T_f = 156,6 \text{ }^\circ\text{C}$).

Amostras de filmes isolados de PVA com massas variando de 3,0 a 6,0 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio com tampa hermética e aquecidas a uma taxa de $20^\circ\text{C}/\text{min}$ na faixa de -20 a 250°C . Os termogramas foram os obtidos nas primeiras corridas de aquecimento e, desta forma, permitem uma análise da história térmica de preparação da amostra. As temperaturas de fusão (T_f) foram obtidas nos pontos máximos dos picos de fusão. As entalpias dos picos de fusão (ΔH_f) foram calculadas com base na calibração com Índio, através do programa operacional do instrumento.

O grau de cristalinidade dos filmes de PVA foi calculado através da razão entre o ΔH_f das amostras e o ΔH_f de uma amostra de PVA 100% cristalina ($\Delta H_{100\% \text{ crist}} = 150,0 \text{ J/g}$)* (Mark, 1996; Ricciardi e cols., 2004 e Willcox, 1999) (Eq. 9)

$$X(\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100\% \text{ crist}}} \times 100 \quad (9)$$

*Obs.: Valores de $\Delta H_{100\% \text{ crist}}$ se encontram tabelados para uma série de polímeros e são determinados indiretamente, através da caracterização térmica de várias amostras de um mesmo polímero com diferentes graus de cristalinidade. Estas amostras têm a porcentagem de cristalinidade determinada por uma técnica direta como a difração de raios X, e os valores de ΔH_f determinados por DSC. Construindo-se um gráfico de porcentagem de cristalinidade versus ΔH_f , obtêm-se uma estimativa do ΔH_f de uma amostra 100% cristalina por extrapolação.

4.2. Difratometria de raios X

Filmes isolados de PVA foram analisados por difratometria de raios X (DRX) à temperatura ambiente, com um difratômetro Shimadzu Modelo XRD 7000 (Japão) utilizando-se uma lâmpada de cobre com radiação $K\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e velocidade de varredura de 2°/min, com 2θ variando de 10° a 50°. Utilizou-se um porta amostras de alumínio, específico para filmes.

Analisou-se a influência do número de ciclos de C/D, da concentração da solução de partida e do tempo de descongelamento dos ciclos sobre os termogramas de DSC e sobre os difratogramas de raios X.

5. Determinação dos coeficientes de difusão da GSNO através de filmes de PVA isolados

As medidas de difusão foram realizadas utilizando-se uma cela de difusão vertical, construída com base no modelo da cela de Franz (Franz, 1975), conforme esquematizado na figura 13. O sistema possui dois flanges de nylon, um superior e outro inferior, fixados por quatro parafusos nos cantos dos flanges. O flange superior possui um orifício de 1 cm x 1 cm x 1 cm, onde foi colado 1 mL de solução 12 mM de GSNO. O flange inferior possui um orifício de 1 cm x 1 cm x 4.5 cm acoplado a uma

cubeta (figura 13(B)), que foi completamente preenchida com uma solução receptora de tampão fosfato (PBS pH 7,4).

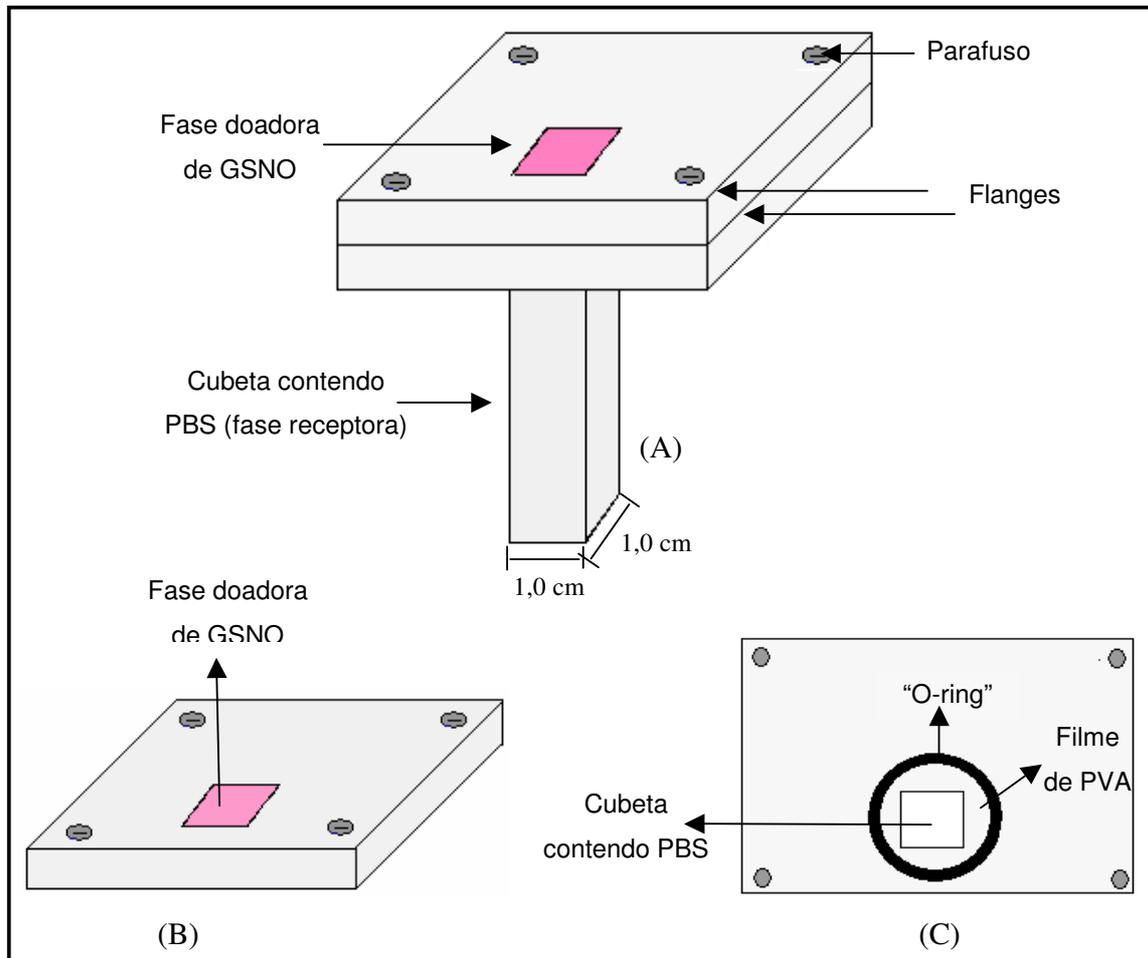


Figura 13. Esquema da cela vertical utilizada para realizar as medidas de difusão. (A) cela montada, (B) flange superior, (C) flange inferior.

Filmes de PVA preparados a partir de solução 2.5% (m/v) tratados por até 5 ciclos C/D, e secos por sublimação ou evaporação da água foram colocadas entre os dois flanges e presos com o auxílio de um anel de borracha de silicone ("O – ring"). O sistema foi colocado no espectrofotômetro e foi observada a variação espectral em função do tempo (em $\lambda = 336 \text{ nm}$) na solução de PBS a 37°C sob agitação

magnética de 200 rpm. Uma vez que os filmes de PVA utilizados intumescem quando em contato com solução aquosa, a cinética de liberação da GSNO foi determinada plotando-se gráficos de logaritmo da quantidade média liberada ($-\ln Q$) versus tempo (t). As curvas obtidas apresentaram coeficiente de linearidade bastante próximo de 1, validando a escolha do modelo de difusão. Os coeficientes de difusão foram obtidos a partir do coeficiente angular da reta, de acordo com a equação já apresentada para modelos de difusão utilizando-se cela de Franz (Eq. 7):

$$\ln Q = 2 \left(\frac{DA}{LV} \right) t \quad (7)$$

Analisou-se a influência do número de ciclos de C/D, secagem por evaporação ou sublimação da água e do tempo de descongelamento dos ciclos sobre o coeficiente de difusão da GSNO através dos filmes de PVA.

6. Análise colorimétrica da GSNO pelo método de Griess

Utilizou-se o método de Griess para a caracterização da cinética de difusão da GSNO para a fase aquosa. O acompanhamento cinético da liberação de GSNO foi realizado em um espectrofotômetro UV-Vis com arranjo de diodos HP 8452A (EUA).

6.1. Preparação das soluções estoque de GSNO

Soluções estoque de GSNO com concentrações variando de 250 μM a 1 mM foram preparadas pesando-se a quantidade apropriada de GSNO e adicionando-se a mesma a um volume conhecido de água desionizada. As concentrações finais das

soluções obtidas foram corrigidas utilizando-se o valor de coeficiente de extinção molar da GSNO (Nims e cols., 1995 e Cook e cols., 1996) ($\epsilon_{336} = 900 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Em seguida, essas soluções foram diluídas de maneira que as concentrações de GSNO na solução do reagente de Griess variassem de 1.0 a 75.0 μM .

6.2. Preparação do reagente de Griess

O reagente de Griess em meio ácido foi preparado pela dissolução de 5.7 mmoles sulfanilamida e 0.12 mmoles de NEED em 100 mL de solução de HCl 4M. Para a preparação do reagente de Griess em meio neutro, dissolveu-se 1.7 mmoles de sulfanilamida e 0.04 mmol de NEED em 100 ml de tampão fosfato, pH 7.4 (PBS). A solução estoque de cloreto de mercúrio (HgCl_2) foi preparada pela dissolução de 0.5 mmol de HgCl_2 em 50mL de dimetilsulfóxido (DMSO).

6.3. Obtenção das curvas de calibração

Soluções de GSNO foram adicionadas ao reagente de Griess em meio ácido ou neutro de modo que a concentração final de GSNO variasse de 1.0 a 75 μM . Essas soluções foram mantidas sob agitação constante a 37°C por 180 minutos. Passado este tempo, as soluções foram transferidas para uma cubeta de quartzo de caminho óptico 1.0 cm e analisadas espectrofotometricamente em $\lambda = 540 \text{ nm}$ para o reagente de Griess em meio ácido e $\lambda = 496 \text{ nm}$ para o reagente de Griess em meio neutro. Curvas de concentração X absorvância foram obtidas em cada caso e os coeficientes de absorção molares (ϵ) foram obtidos a partir dos coeficientes angulares de cada curva, de acordo com a lei de Beer (Eq. 10):

$$A = \epsilon bc \quad (10)$$

onde A é a absorvância, ϵ é o coeficiente de absorvidade molar, b o caminho óptico e c a concentração do soluto na cubeta.

6.4. Cinética de eluição de GSNO a partir de filmes isolados

Filmes de PVA/GSNO 25 com massa variando entre 1,5 e 2,0 x 10⁻³ g, não reticulados, submetidos a 3 ciclos de C/D e secos por evaporação foram colocados em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 2.0 cm. Em seguida, o volume da cubeta foi preenchido com o reagente de Griess em meio ácido. Acompanhou-se espectrofotometricamente em $\lambda = 540$ nm a cinética de eluição da GSNO a partir dos filmes de PVA/GSNO para a solução de Griess. Foram obtidos espectros a cada 10 min.

7. Análise da degradação da GSNO contida em filmes de PVA após sua esterilização com óxido de etileno

Filmes de PVA/GSNO 25, tratados por 3 ciclos de C/D e secos por evaporação foram submetidos à esterilização com óxido de etileno (ETO) nas condições da tabela 2. A esterilização das amostras foi efetuada pela empresa Cebras Centro de Esterilização do Brasil Ltda, Goiânia GO. Após estes tratamentos, as quantidades restantes de GSNO nas amostras esterilizadas foram determinadas pelo método de Griess e comparadas com a quantidade de GSNO restante em uma amostra preparada nas mesmas condições e mantida a 10 °C durante o mesmo período (30 dias). As análises foram realizadas em duplicata.

Tabela 2. Condições de esterilização de filmes isolados de PVA/GSNO com óxido de etileno.

CONDIÇÃO DE ESTERILIZAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE GÁS (mg/L)	TEMPERATURA (°C)	PRESSÃO DE VÁCUO (Kgf)
1	400	45	-0,70
2	500	50	-0,75
3	600	55	-0,80

Tempo de Esterilização: 4h; Umidade intra-câmara: 60%; Pressão de trabalho: -0,15 kgf; Ciclo de aeração intra-câmara: 10 ciclos/10min; Aeração extra câmara: 48 h.

8. Preparação de placas de aço inox revestidas com filmes de PVA

8.1. Deposição dos filmes sobre placas de aço-inox

Cerca de 200 µL das soluções de PVA 25 ou 5 foram aplicados sobre a superfície de placas de aço-inox com dimensões de 3.0 X 0.5 X 0.2 cm e espalhados uniformemente para a obtenção de um filme aderido, após a secagem. Essas placas foram submetidas ou não aos ciclos de C/D e, em seguida, secas por evaporação ou sublimação da água.

As placas foram pesadas antes e após a aplicação e secagem das soluções de PVA para a determinação da massa de filme depositada sobre cada placa, utilizando-se uma balança analítica Mettler AE200S, com cinco casas decimais após a vírgula. A massa do filme de PVA seco, depositada sobre a placa, m_i , foi determinada gravimetricamente, de acordo com a Eq. 11.

$$m_i = m_2 - m_1 \quad (11)$$

onde m_2 é a massa da placa contendo o filme de PVA seco e m_1 a massa da placa metálica limpa, sem o filme.

8.2. Determinação da cinética de dissolução dos filmes

As placas de aço-inox revestidas com filmes de PVA 25 não reticulados ou tratados por até 5 ciclos de C/D, com tempo de descongelamento de 4h, e secos por sublimação da água, foram imersas durante 24h em água desionizada a 37 °C. Em seguida, as placas foram secas por sublimação por 24h e sua massa final foi determinada. A massa de filme perdida por dissolução, m_f , após a imersão e secagem, foi calculada como:

$$m_f = m_2 - m_3 \quad (12)$$

Onde m_3 é a massa da placa mais a massa do filme obtida após a imersão e secagem e m_2 a massa da placa contendo o filme de PVA/GSNO seco.

A porcentagem de perda de massa do filme por dissolução foi calculada como (eq. 13):

$$\% = \frac{m_f}{m_i} \times 100 \quad (13)$$

8.3. Microscopia óptica

Placas de aço-inox revestidas com filmes de PVA 25 não reticulado ou tratado por três ciclos de C/D com tempo de descongelamento de 4 h e secos por evaporação foram imersas durante 24 h em água desionizada à 37 °C. Foram obtidas fotos antes e após a imersão, utilizando-se uma lupa Micronal acoplada a

uma câmera CCD. Para a digitalização das imagens, utilizou-se o programa Image-pro Plus.

8.4. Microscopia eletrônica de Varredura

A morfologia de filmes de PVA 25, não reticulados ou tratados por três ciclos de C/D com tempo de descongelamento de 4 h, depositados sobre placas de aço-inox, e secos por evaporação ou sublimação da água foi analisada em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol JSM 6360 LV (Japão), com potência de 20KV.

9. Revestimento de stents com filmes de PVA/GSNO

9.1. Revestimento por imersão

O revestimento de stents com filmes PVA e PVA/GSNO foi obtido através da imersão dos stents em soluções de PVA ou PVA/GSNO (preparadas de acordo com o procedimento descrito acima). Os stents foram previamente lavados com hexano para remoção de possíveis resíduos de gordura e secos na estufa por 2h. Após a secagem, os stents foram fixados com uma pinça fina através de uma de suas extremidades, mergulhados na solução polimérica na posição vertical e mantidos na solução por cerca de 1 min (figua 14). Após este tempo os stents foram removidos lentamente da solução. O excesso de solução escorrida para a extremidade inferior do stent foi removido com papel absorvente. Este procedimento foi efetuado uma vez para as soluções de PVA ou PVA/GSNO 100, 50 e 25 e repetido mais duas vezes para as soluções de PVA ou PVA/GSNO 5. Em seguida, a pinça que prendia os stents foi acoplada, na posição horizontal, a um agitador mecânico rotatório, e os stents foram mantidos sob rotação a 200 rpm para uma secagem prévia, protegidos

da luz durante 1h. Após esta secagem, os stents foram transferidos para um recipiente seco, protegidos da luz e secos no liofilizador sem congelamento prévio.

Os stents foram pesados antes e depois do recobrimento para a determinação da massa dos filmes, com precisão de $\pm 1 \times 10^{-5}$ g.

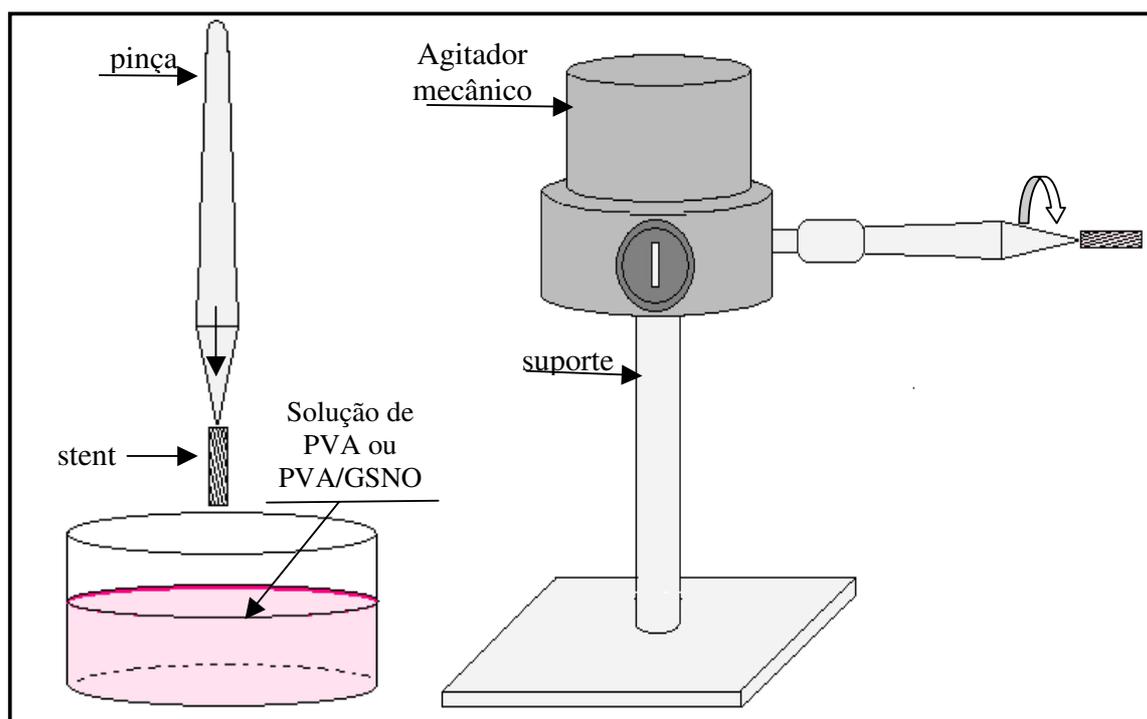


Figura 14. Esquema do recobrimento de stents a partir da imersão em solução de PVA ou PVA/GSNO seguida da secagem preliminar sob rotação em agitador mecânico.

9.2. Aplicação de ciclos de C/D aos stents

Stents recobertos com filmes de PVA 25 foram submetidos a ciclos de C/D. Imediatamente após o processo de imersão e retirada do excesso de solução polimérica, os stents foram suspensos por um fio de nylon fixado na borda de um

béquer de 100 mL. O béquer com os stents foi coberto com papel alumínio e transferido para o freezer a -20°C permanecendo nesta condição por 20 h. Em seguida o béquer foi retirado do freezer e mantido à temperatura ambiente (sala termostatizada a 25°C) por 4h. Este ciclo foi repetido um total de três vezes. Por fim os stents foram secos no liofilizador por evaporação durante 4h.

9.3. Caracterização Morfológica

9.3.1. Microscopia óptica

Para facilitar a visualização dos revestimentos poliméricos por microscopia óptica, foram obtidos stents recobertos com PVA 50 contendo azul de metileno como corante. O azul de metileno foi adicionado à solução polimérica em quantidade suficiente para a obtenção de coloração azul intensa. O revestimento foi obtido de acordo com o item 9.1. Os stents secos foram examinados e fotografados com uma lupa Micronal acoplada a uma câmera CCD. Para o tratamento das imagens, utilizou-se o programa Image-pro Plus.

9.3.2. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia da superfície de stents recobertos com filmes de PVA 5, 25 e 50 foi analisada em um Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) Jeol JSM 6360 LV, com potência de 20KV. Os stents recobertos foram metalizados com ouro por 30 min. Para permitir a visualização do filme depositado sobre os stents, foram realizados riscos na superfície dos stents com um bisturi antes da metalização com ouro.

9.4. Cinética de eluição de GSNO a partir dos stents revestidos

Os stents revestidos com filmes de PVA/GSNO 5, 25 e 50, submetidos ou não a ciclos de C/D e secos por evaporação da água, foram imersos em uma cubeta de quartzo contendo o reagente de Griess, em meios ácido ou neutro a 37°C, sob agitação magnética a 400 rpm. Foram obtidos espectros da solução a cada 10 minutos.

Para verificar a influência dos metais do stent na formação do composto azo no meio ácido reacional, acompanhou-se a cinética de reação entre reagente de Griess e uma solução de GSNO de concentração 7,5 µM na presença de uma placa de aço-inox não revestida.

9.5. Estimativa da quantidade de GSNO eluída para a parede muscular de uma artéria coronária a partir de um stent revestido com PVA/GSNO

Foi estimada a quantidade de GSNO que se difundiria para a o interior da camada muscular de uma artéria que recebesse um stent revestido com filme de PVA/GSNO 5 não submetido aos ciclos de C/D. Considerou-se a hipótese da GSNO se difundir completamente do stent, com 50% da GSNO indo para a corrente sangüínea e os outros 50% se acumulando na parede da artéria em contato com o stent. A figura 21 apresenta o esquema dos cortes transversal e longitudinal de uma artéria indicando os parâmetros utilizados para o cálculo do volume da camada arterial que receberia a GSNO eluída do stent.

O volume da camada arterial que recebe a GSNO é dado por:

$$\text{Vol da camada arterial} = \pi L (2 r d + d^2) \quad (14)$$

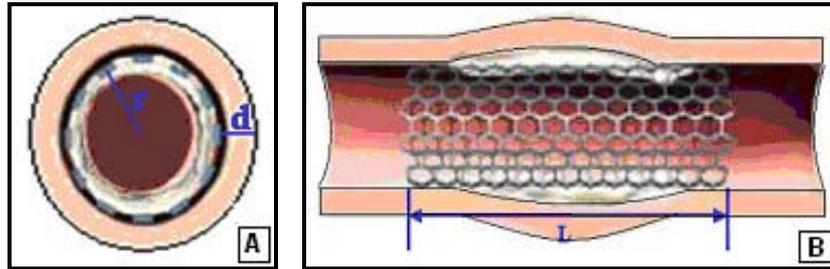


Figura 15. Esquema do corte transversal (A) e longitudinal (B) de uma artéria, com stent implantado onde r é o raio interno da artéria, d a espessura da camada arterial para a qual a GSNO se difunde e L o comprimento do stent. (Fonte: <http://www.mplsheart.com/Pages/NewsArticle.asp?ID=2>)

III. RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Filmes de PVA isolados

1.1. Efeito dos ciclos de congelamento/descongelamento sobre as propriedades térmicas e a cristalinidade dos filmes de PVA.

Na análise por DSC, a diferença no fluxo de calor entre uma amostra e uma referência inerte é medida conforme ambas (amostra e referência) são submetidas às mesmas mudanças de temperatura. O termograma de DSC de um filme de PVA 25 preparado por 5 ciclos de C/D é apresentado na figura 16 como exemplo. O primeiro pico endotérmico (Hassan e cols. 1998; Bajpai e Saini, 2006 e Hassan e Peppas, 2000), mais largo, que se inicia perto de 100 °C, corresponde à evaporação de água residual presente na amostra. O pico mais estreito e intenso perto de 230 °C representa a fusão dos cristalitos de PVA. A fusão do PVA ocorre numa faixa de temperaturas por causa da distribuição de tamanhos dos cristalitos. As linhas tracejadas representam linhas-base utilizadas para a determinação das áreas dos picos, a partir das quais se podem calcular as entalpias dos processos correspondentes que estão indicadas em unidades de J/g. As temperaturas de 107 e 216 °C correspondem ao início dos processos que originam os picos (“onset temperatures”). As temperaturas de 159 e 229 °C correspondem às temperaturas nos máximos dos picos.

A figura 17 mostra os termogramas de DSC dos filmes de PVA 25 isolados, não tratado por ciclos C/D (não reticulado) e tratados por 1, 3 e 5 ciclos de C/D, com tempo de descongelamento de 4 h, e secos por evaporação, a partir de soluções PVA 25.

Os termogramas de DSC obtidos na faixa de temperatura de 0 a 250 °C apresentam dois picos endotérmicos; um localizado próximo a 230 °C, que é atribuído à fusão da fase cristalina do PVA e um que ocorre em temperaturas mais baixas, com pico em 135 °C nos filmes não reticulado e submetido a 1 ciclo de C/D e se desloca para temperaturas mais altas nos filmes submetidos a 3 e 5 ciclos: ca.

175 e 159 °C, respectivamente, atribuído à evaporação de água residual presente nas amostras (Bajpai e Saini, 2006 e Hassan e Peppas, 2000). Este pico diminui de intensidade com o aumento do número de ciclos, indicando perda de água residual durante o tratamento térmico.

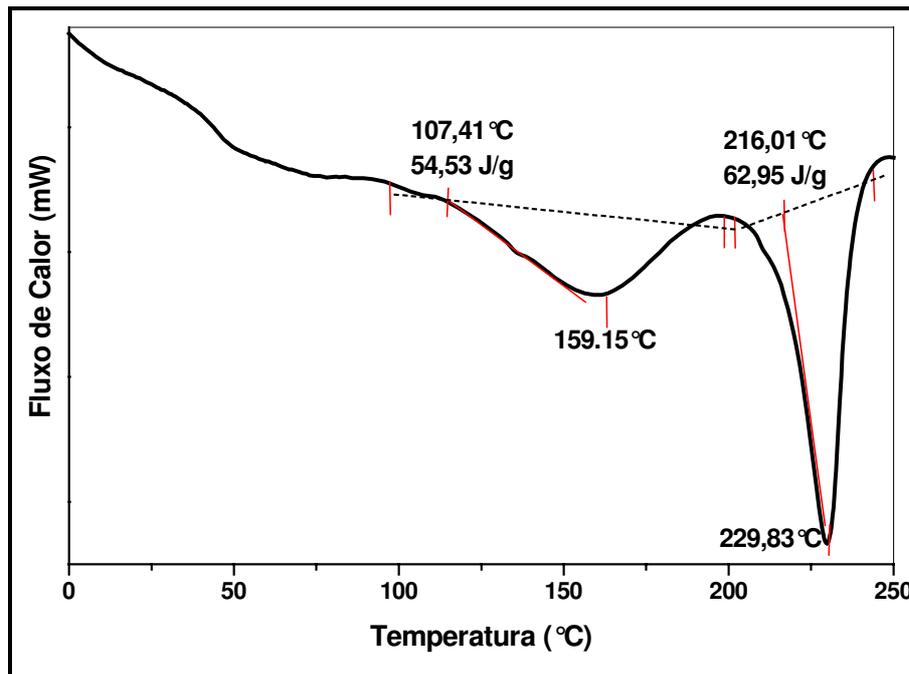


Figura 16. Termograma de DSC de filme de PVA 25, tratado por 5 ciclos de C/D e seco por evaporação.

O estado da água em hidrogéis de PVA preparados por ciclos de C/D já foi investigado por várias técnicas como DSC e espectrometria de ressonância magnética nuclear (Hatakeyema e cols., 2005). Os autores sugerem a presença de dois tipos diferentes de água: uma água livre e uma água ligada ("bound water"), que evapora a uma temperatura maior do que a água livre. No caso dos filmes preparados por ciclos de C/D, a liofilização (evaporação ou sublimação do solvente) arrasta a água livre do filme. Entretanto, a presença do primeiro pico endotérmico indica a presença de grande quantidade de água ligada à matriz polimérica.

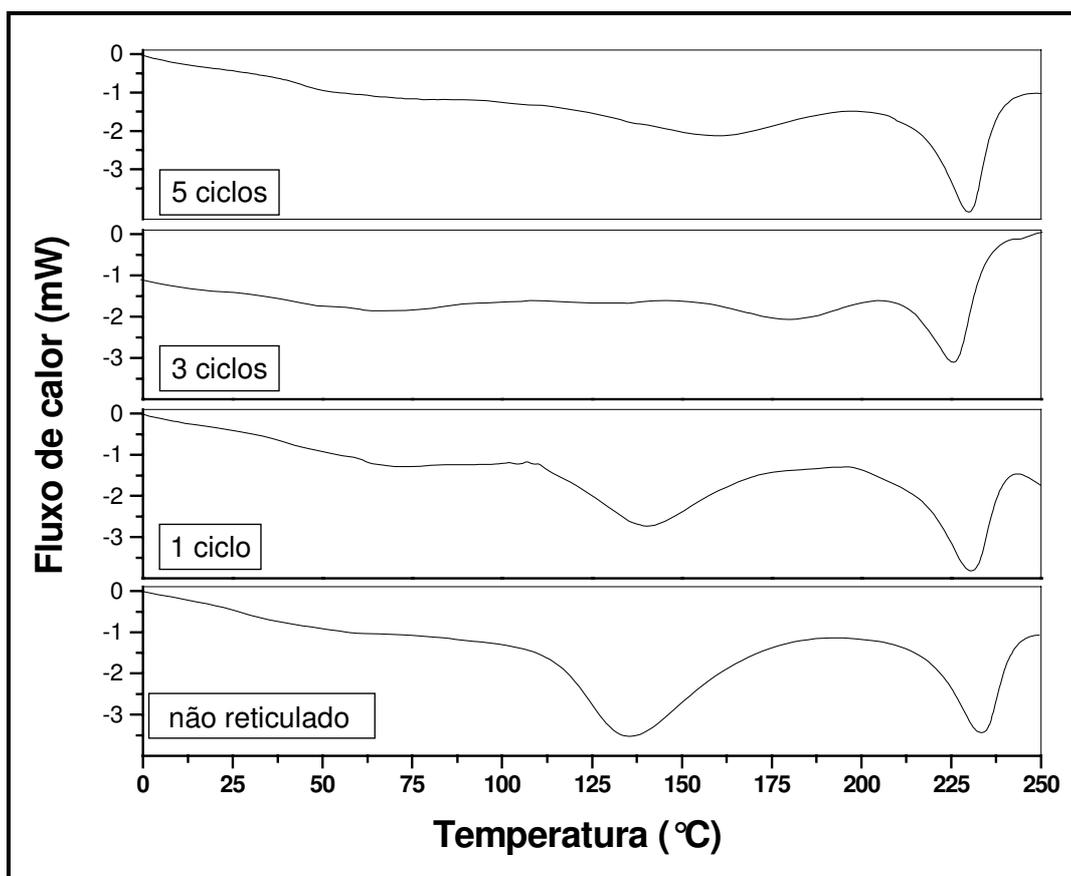


Figura 17. Termogramas de DSC de filmes de PVA 25 não reticulado e submetidos a 1, 3 e 5 ciclos de C/D.

As entalpias de fusão das diferentes amostras de PVA estão apresentadas na tabela 3. As temperaturas de fusão com picos em ca. 230 °C estão de acordo com dados da literatura (Hassan e Peppas, 2000 e Bajpai e Saini, 2006). O grau de cristalinidade obtido pela análise do termograma de DSC do PVA não tratado por ciclos foi 28,3%. Este valor está de acordo com resultado prévio da literatura (Cassu, 1995) que relata um grau de cristalinidade de 30% para PVAs com grau de hidrólise de 99%. Após o tratamento por ciclos de C/D, as amostras submetidas a 1, 3 e 5 ciclos apresentaram graus de cristalinidade bastante similares, de aproximadamente 40%. Esses resultados indicam que o tratamento por ciclos de C/D aumentou a cristalinidade, mas o aumento do número de ciclos, de um para cinco, não aumentou significativamente o grau de cristalinidade de filmes preparados a partir de solução PVA 25 (m/v) de polímero.

Tabela 3. Entalpias (ΔH_f) de fusão obtidas por DSC e graus de cristalinidades (X_c) para amostras de PVA submetidas a diferentes números de ciclos de C/D.

Amostra	ΔH_m (J/g)	X_c (%)
Não reticulado	42,5	28
1 ciclo	61,3	41
3 ciclos	58,1	39
5 ciclos	62,9	42

O perfil de difração de raios X de um filme seco de PVA 25 preparado por três ciclos de C/D e seco por evaporação está apresentado na figura 18, como um exemplo. O difratograma apresenta um pico mais intenso e estreito em $2\theta \cong 20^\circ$, atribuído à difração causada pelos cristalitos de PVA (Ricciardi e cols., 2005). Um segundo pico, mais alargado, e de intensidade baixa em $2\theta \cong 41^\circ$ está relacionado à presença de água residual na amostra. Há ainda um terceiro componente de difração que aparece como um ombro ou um alargamento da base do pico mais intenso, atribuído ao espalhamento da fase amorfa no filme de PVA.

Os difratogramas de raios X dos filmes de PVA 25 isolados, não tratado por ciclos C/D e tratados por 1 e 3 ciclos de C/D, com tempo de descongelamento de 4 h estão apresentados na figura 19. Os difratogramas são bastante semelhantes, apresentando picos característicos em $2\theta \cong 20^\circ$, que podem ser atribuídos à presença da fase cristalina de PVA nos filmes (Ricciardi e cols., 2004). Também se observa um pico próximo de $2\theta = 40^\circ$, atribuído à presença de água residual nos filmes de PVA. O alargamento na base do pico principal de difração pode ser atribuído à sobreposição do pico de difração dos cristalitos com o espalhamento de raio-X da fase amorfa (halo amorfo). Percebe-se que este alargamento da base do pico principal é maior na amostra não submetida aos ciclos, diminuindo conforme o número de ciclos aumenta. Esta diminuição pode ser constatada pela comparação

das razões entre a largura das bases e a altura dos picos de intensidade em $2\theta = 20^\circ$, apresentadas na tabela 4. A intensidade do pico com $2\theta \cong 20^\circ$, também aumenta em função do número de ciclos. Isso indica a formação de mais agregados cristalinos e uma quantidade menor de PVA na fase amorfa quando se repetem os ciclos. Estas características indicam que a execução de um e três ciclos de C/D aumenta o grau de cristalinidade dos filmes de PVA. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por DSC, indicando que o ciclo de C/D aumenta a cristalinidade do PVA, além de permitir uma observação mais precisa da cristalinidade dos filmes de PVA submetidos a diferentes números de ciclos.

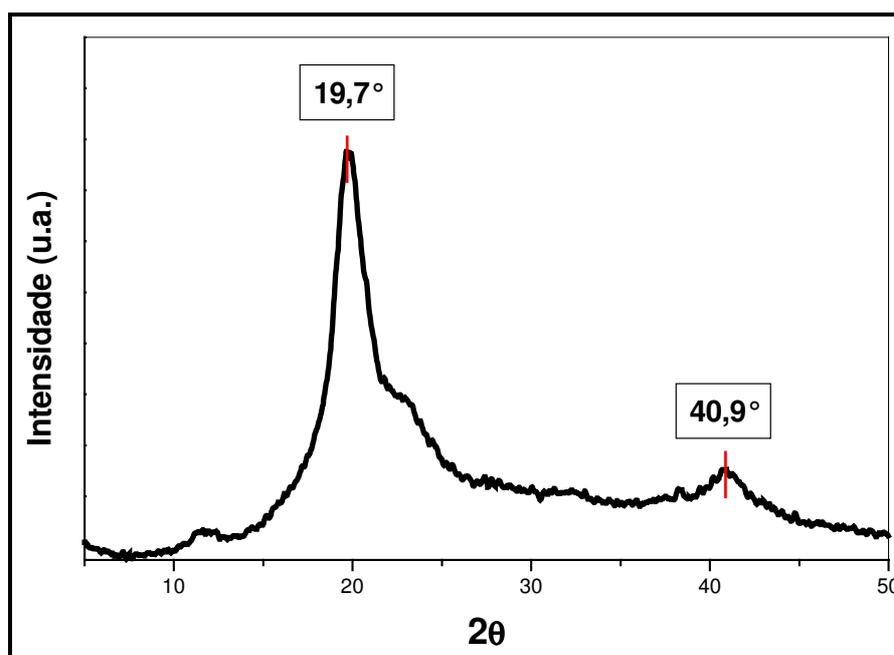


Figura 18. Difratograma de raios X de filme de PVA 25, tratado por três ciclos de C/D e seco por evaporação. Os valores de 2θ indicados correspondem aos picos de difração.

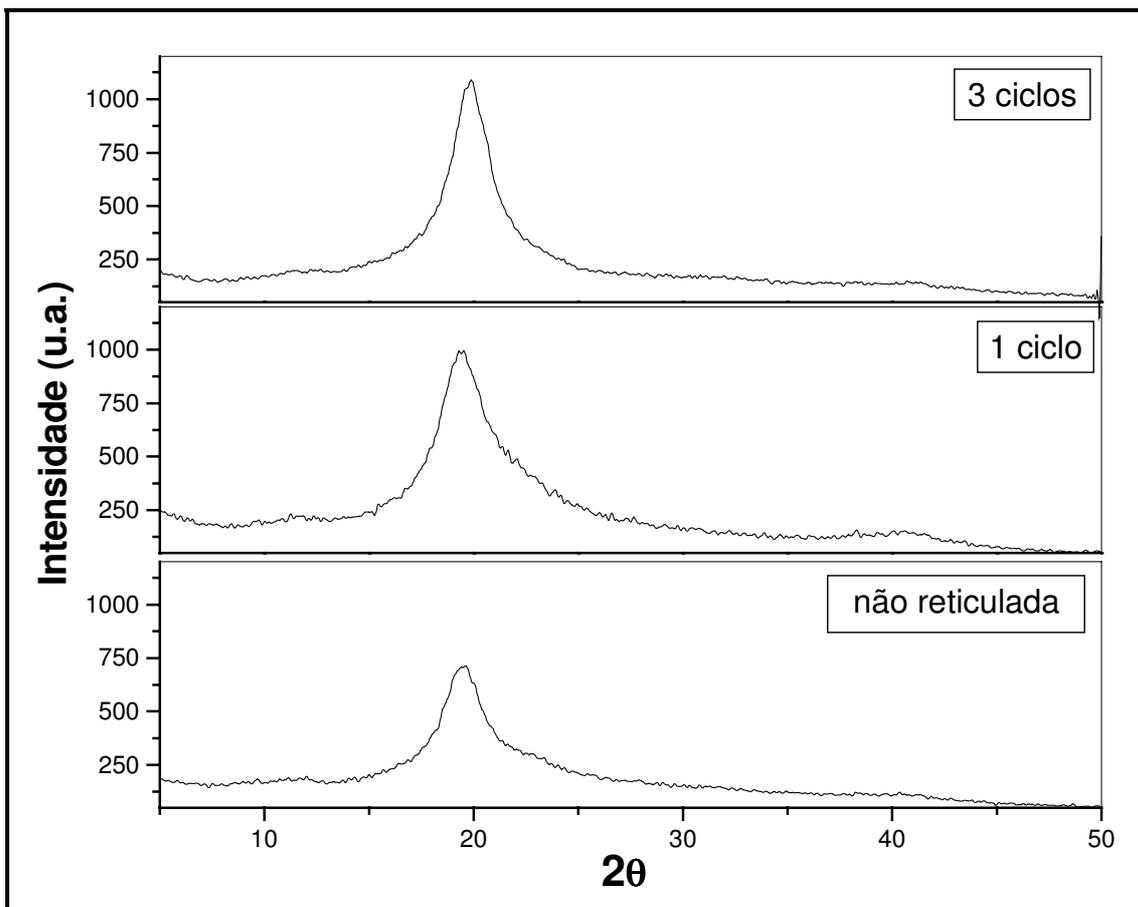


Figura 19. Difratoogramas de raios X de filmes de PVA 25 obtidos não reticulados e obtidos por 1, 3 e 5 ciclos de C/D, secos por evaporação.

Tabela 4. Valores de largura (L) e altura (H) dos picos de difração de raios-X e as razões (L/H) para filmes de PVA 25 submetidos a diferentes números de ciclos de C/D.

AMOSTRA	L (cm)	H (cm)	L/H
Não reticulada	6,5	1,85	3,5
1 ciclo	8,2	3,25	2,5
3 ciclos	5,3	3,8	1,4

1.2.Efeito da concentração da solução polimérica de partida sobre as propriedades térmicas e a cristalinidade dos filmes de PVA.

A figura 20 mostra os termogramas de DSC de filmes de PVA5, 25 e 100 submetidos a 3 ciclos de C/D com tempo de descongelamento de 2 h e secos por evaporação.

De forma análoga à figura 16, observa-se a presença de dois picos endotérmicos; um centrado em 230 °C em todos os casos, atribuído à fusão da fase cristalina do PVA e um que ocorre em temperaturas mais baixas, com máximo próximo a 175 °C nos filmes de PVA 5 e 25. Estes picos devem estar associados à evaporação de água residual nos filmes. No termograma da amostra PVA 100 não é possível identificar a presença deste pico. Além disso, a variação da linha base neste termograma impediu a estimativa da entalpia do pico de fusão. O pico endotérmico obtido para esta amostra apresenta-se bastante alargado em comparação aos picos das amostras PVA 5 e 25 indicando a presença de cristais mais mal formados (com defeitos) no filme PVA 100 (Lucas e cols., 2001).

As entalpias de fusão e os correspondentes graus de cristalinidade obtidos dos termogramas da figura 20 estão apresentados na tabela 5. Observa-se que o grau de cristalinidade aumentou de PVA 5 para 25.

Os difratogramas de raios-X correspondentes aos filmes de PVA 5, 25 e 100 estão apresentados na figura 21. De forma análoga à figura 18, estes difratogramas apresentam o principal pico de difração em $2\theta \cong 20^\circ$, sendo que a intensidade dos picos aumenta do filme PVA5 para PVA 25, o que corresponde a um aumento do grau de cristalinidade. Esse aumento é refletido num estreitamento da base do pico, correspondente à difração da fase amorfa, e representada na tabela 6 pela diminuição da razão L/H. Porém, quando a concentração aumenta de 2.5% para 10.0% (PVA 25 para PVA 100), a intensidade do principal pico de difração diminui, indicando menor grau de cristalinidade.

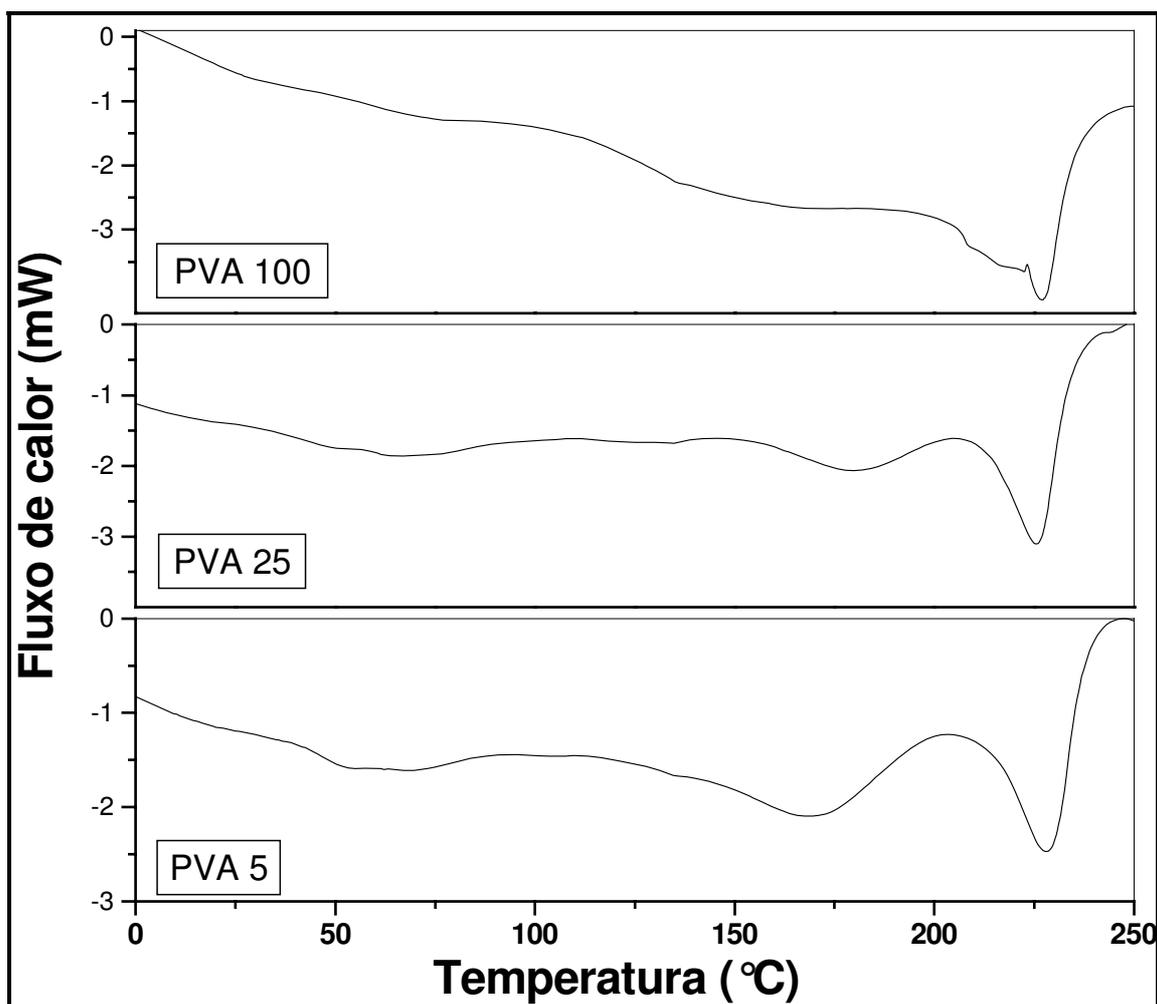


Figura 20. Termogramas de DSC de filmes de PVA 5, 25 e 100 secos por evaporação e preparados por 3 ciclos de C/D.

Tabela 5. Entalpias de fusão (ΔH_f) e graus de cristalinidade (X_c) para filmes de PVA 5 e 25 , submetidas a 3 ciclos de C/D, secos por evaporação.

Amostra	ΔH_f (J/g)	X_c (%)
5	41,8	28
25	58,1	39

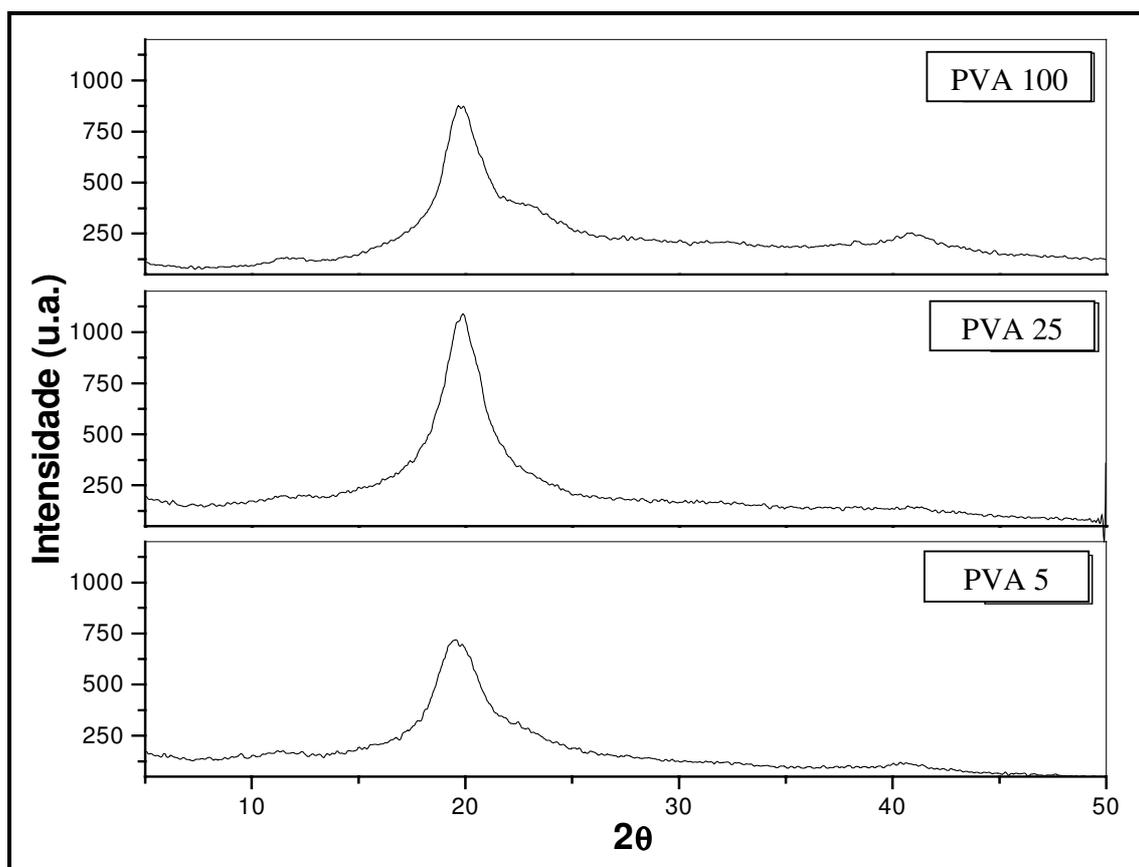


Figura 21. (A) Termogramas de DSC de filmes de PVA secos e liofilizados preparados por 3 ciclos de C/D a partir de soluções de PVA 5, 25 e 100.

A redução da cristalinidade a partir de certo limite de concentração da solução polimérica está de acordo com os resultados relatados por Hassan e Peppas (2000). Estes autores consideraram que a formação de regiões cristalinas estáveis é mais provável quando se aumenta a concentração de PVA devido à maior sobreposição de cadeias e conseqüentes dobras nas cadeias poliméricas de acordo com o modelo de cadeias dobradas (Figura 9). Entretanto, conforme a viscosidade da solução aumenta, juntamente com o grau de enovelamento das cadeias poliméricas (que limita a difusão dos segmentos de PVA), espera-se que o grau de cristalinidade estabilize ou mesmo diminua, evitando ou retardando a formação de cristalitos bem formados.

Tabela 6. Valores de largura (L) e altura (H) dos picos de difração de raios-X e as razões (L/H) para filmes de PVA 5, 25 e 100 submetidos a três ciclos de C/D e secos por evaporação .

Filme de PVA	L (cm)	H (cm)	L/H
5	4,7	2,4	2,0
25	5,3	3,8	1,4
100	5,2	3,0	1,7

1.3.Efeito do tempo de descongelamento sobre as propriedades térmicas e a cristalinidade dos filmes de PVA.

A figura 22 mostra os termogramas de DSC de filmes de PVA 25 submetidos a 3 ciclos de C/D para tempos de descongelamento de 2 e 4 h. A tabela 7 apresenta os valores de entalpias de fusão e graus de cristalinidade obtidos por DSC.

Como observado nos termogramas anteriores, há dois picos endotérmicos; um com máximo em ca. 230 °C, relativo à fusão de cristalitos do PVA e outro próximo a 175 °C, relativo à evaporação de água de hidratação ou água ligada à matriz polimérica. Observa-se também que o aumento do tempo de descongelamento de 2h para 4h não aumentou significativamente a entalpia de fusão, bem como a cristalinidade de filmes de PVA usados neste ensaio, como pode ser constatado pelos valores destes parâmetros apresentados na tabela 7. Este resultado está de acordo com o relatado por Hassan e Peppas (2000) que observaram que durante o tempo de descongelamento o tamanho dos cristalitos inicialmente aumenta, e então diminui devido à dissolução da estrutura cristalina.

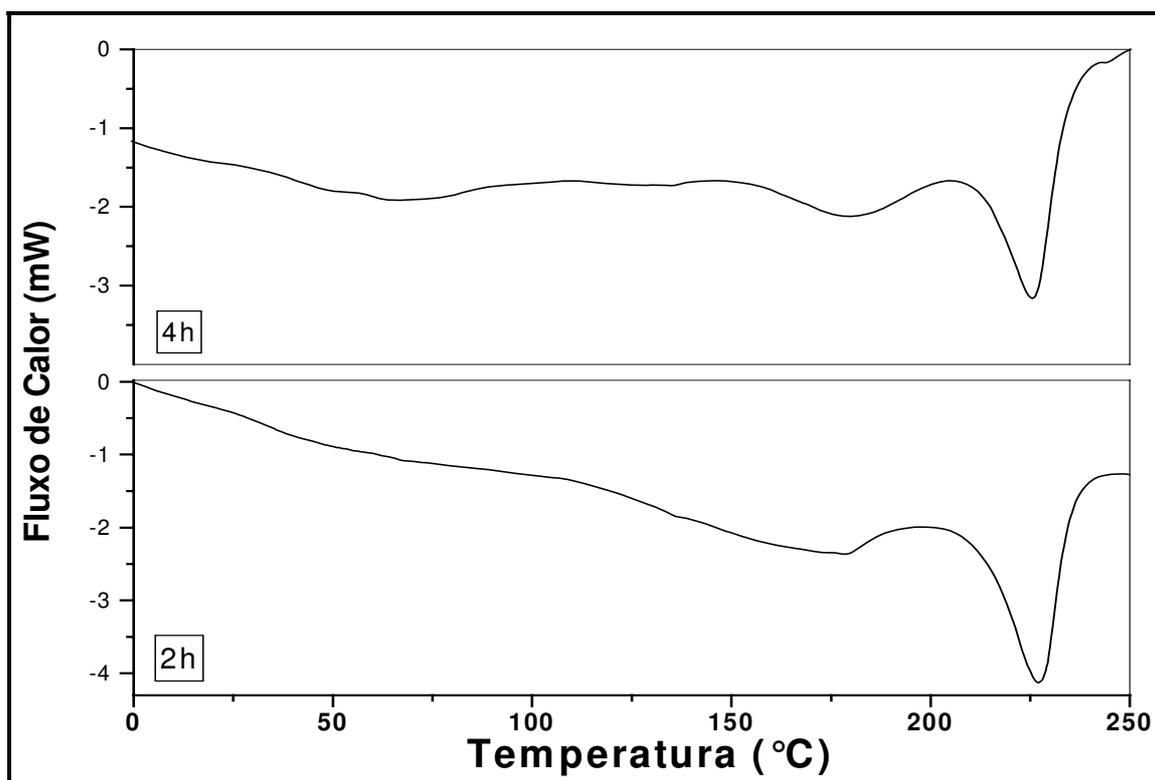


Figura 22. Termogramas de DSC de filmes de PVA 25 secos e liofilizados, submetidos a 3 ciclos de C/D, com tempos de descongelamento de 2 e 4 h.

Tabela 7. Entalpia de fusão e grau de cristalinidade de filmes de PVA 25 submetidos a 3 ciclos de C/D, com tempos de descongelamento variando entre 2 ou 4h.

Amostra	ΔH_f (J/g)	X_c (%)
4h	58,1	39
2h	56,9	38

Os difratogramas de raios-X correspondentes aos filmes de PVA da figura 22 estão apresentados na figura 23. Pelo difratograma de raios X, observa-se que a amostra tratada por ciclos de C/D com tempo de descongelamento de 4h apresenta

um pico mais estreito de difração da fase cristalina e de maior intensidade, indicando a presença de uma quantidade maior de cristais. Este estreitamento se reflete na diminuição dos valores da razão L/H apresentados na tabela 8. Apesar de aumentar o número de cristais na amostra, um tempo maior de descongelamento não garante cristais mais bem formados. Desta forma, esta técnica permitiu uma avaliação mais precisa da variação do grau de cristalinidade, que não pôde ser obtida pela análise dos termogramas de DSC.

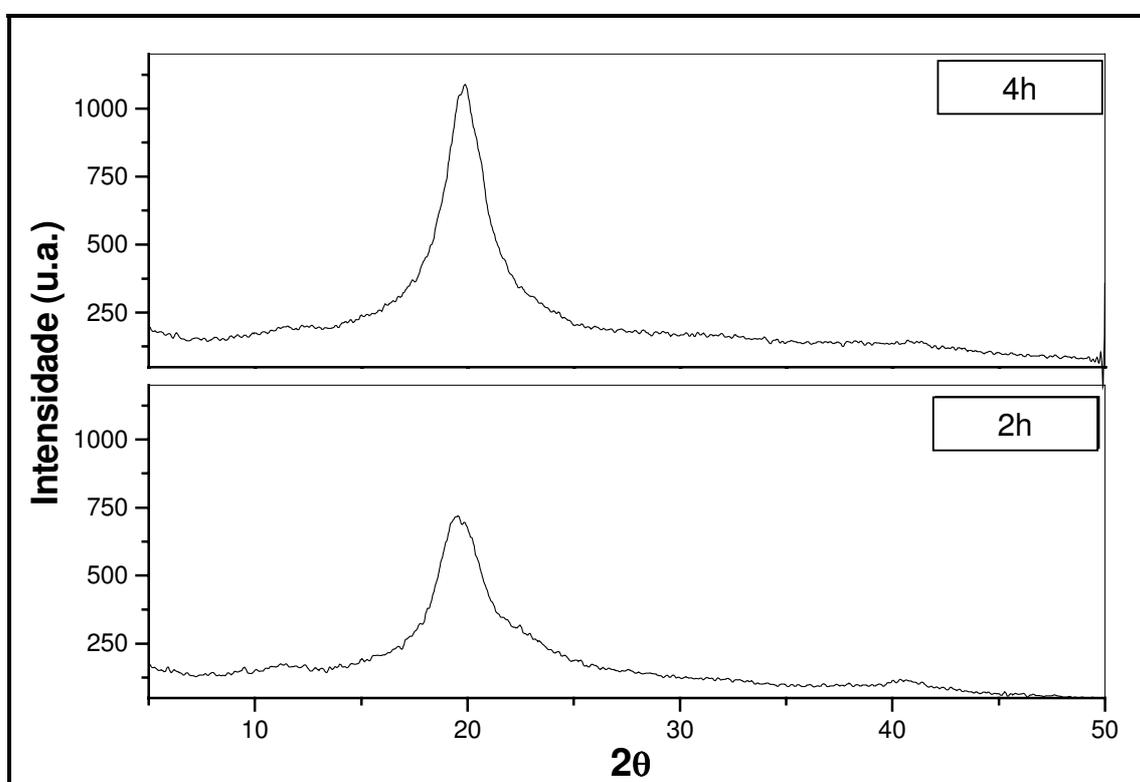


Figura 23. Difratomogramas de raios-X de filmes de PVA secos por sublimação a partir de soluções de PVA 25 e submetidos a 3 ciclos de C/D, com tempos de descongelamento de 2 e 4 h.

Tabela 8. Valores de largura (L) e altura (H) dos picos de difração de raios-X e as razões (L/H) para filmes de PVA 5, 25 e 100 submetidos a três ciclos de C/D e secos por evaporação .

Amostra	L (cm)	H (cm)	L/H
2h	5,2	3,1	1,7
4h	5,3	3,8	1,4

1.4. Efeito dos ciclos de congelamento/descongelamento sobre a velocidade de dissolução de filmes imersos em água depositados sobre placas de aço-inox

A tabela 9 apresenta as massas de filmes depositados sobre placas de aço-inox, preparados a partir de solução de PVA 5, submetidos a diferentes números de ciclos e secos por sublimação, antes e após sua imersão durante 24h em água desionizada a 37°C, e a porcentagem em massa de filme perdida por dissolução nestas condições.

Quando imersas em água a 37°C, todas as amostras de PVA intumesceram em diferentes graus. Além disso, os resultados de gravimetria indicam que uma fração significativa das cadeias de PVA dissolve em solução, mesmo nos filmes submetidos aos ciclos.

A avaliação gravimétrica indicou um grau de dissolução menor para amostras submetidas a mais ciclos de C/D. Por exemplo, aumentando-se o número de ciclos de um para cinco, há uma redução de cerca de 10% no grau de dissolução dos filmes de PVA depositados sobre as placas. Estes resultados confirmam o aumento no grau de cristalinidade associado ao aumento do número de ciclos de C/D verificado por difração de raios X e estão de acordo com resultados já relatados na

literatura. Hassan e Peppas (2000), utilizando-se da técnica de complexação de PVA com ácido bórico, estudaram o comportamento de dissolução de géis de PVA preparados por técnicas de C/D. Eles observaram que há uma dissolução inicial das amostras devido à presença de segmentos de PVA que não participam dos processos de formação dos cristalitos e, portanto, não foram incorporados à estrutura física dos géis. Um grau menor de dissolução foi observado para amostras que foram preparadas com números maiores de ciclos de C/D.

Tabela 9. Valores de massa de filmes de PVA 5 depositados sobre placas de aço-inox, antes (massa inicial) e após (massa final) sua imersão durante 24h em água desionizada a 37°C, sem agitação.

Filme	Massa inicial (g)/10 ⁻⁴	Massa final (g)/10 ⁻⁴	Massa perdida	
			(g)/10 ⁻⁴	(%)
Não reticulado	2,7	1,0	1,7	63
Um	4,0	2,5	1,5	37
Três	3,0	2,0	1,0	33
cinco	4,2	3,0	1,2	29

1.5.Efeito dos ciclos de C/D sobre o intumescimento de filmes de PVA depositados sobre placas de aço-inox

As fotos obtidas por câmera CCD de filmes de PVA 25 secos por evaporação, depositados sobre placas de aço-inox e submetidos a 0 e 3 ciclos de C/D para tempos de descongelamento de 2 h encontram-se na figura 24. Estas fotos foram obtidas antes e depois das placas revestidas serem imersas durante 24h em água deionizada h à 37°C.

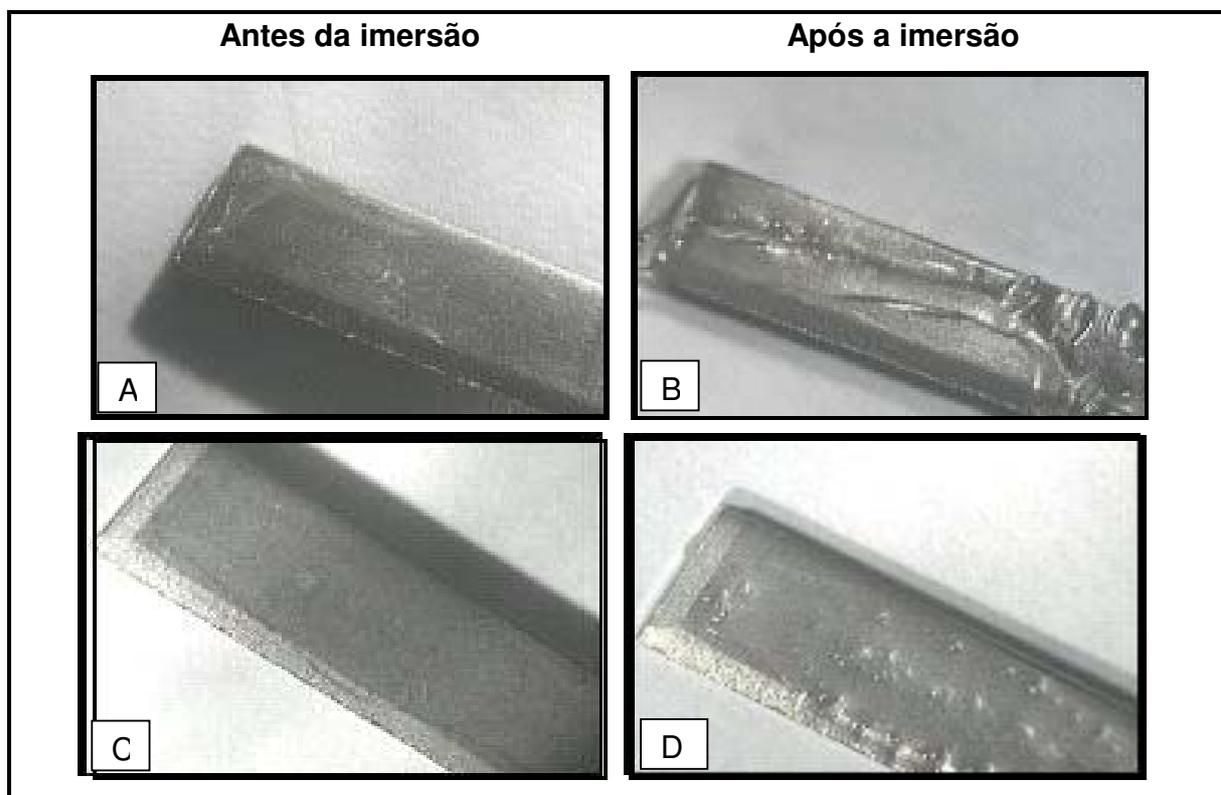


Figura 24. Micrografias ópticas de filmes de PVA 25 secos por evaporação, depositados sobre placas de aço-inox, não tratados por ciclos C/D (A e B) e submetidos 3 ciclos de C/D (C e D) para tempos de descongelamento de 2 h, antes e após sua imersão em água desionizada a 37°C, por 24 h.

Observou-se que os filmes de PVA depositados sobre placas de aço-inox apresentam-se lisos, homogêneos e transparentes, quando secos. Após imersão em água durante 24h a 37°C o PVA não submetido aos ciclos se apresenta bastante disforme. Pode-se notar o enrugamento e descolamento do filme da placa de aço-inox, devido à expansão tridimensional das cadeias poliméricas causada pela absorção de água durante o intumescimento. No caso do filme tratado por 3 ciclos, não houve enrugamento ou descolamento do filme. Observa-se também que neste caso o grau de intumescimento é muito menor. A redução do intumescimento do filme submetido a 3 ciclos evitando o seu descolamento da superfície do aço-inox,

pode ser atribuída ao maior grau de cristalinidade da fase rica em PVA. A quantidade de água absorvida pelo filme fica limitada ao espaço intersticial disponível na fase amorfa, diminuindo-se assim sua expansão tridimensional e conseqüentemente o seu grau de intumescimento.

1.6. Efeito dos ciclos de C/D e da técnica de secagem sobre a morfologia de filmes depositados sobre placas de aço-inox

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura apresentadas na figura 26 são representativas do tipo de superfície apresentado por filmes de PVA 25 depositados sobre placas de aço-inox, submetidos ou não a ciclos de C/D e a duas técnicas diferentes de secagem.

Comparando-se as fotos dos filmes não reticulado e submetido e três ciclos de C/D e secos por evaporação, observa-se que os ciclos afetam a textura da superfície dos filmes de PVA, deixando a superfície mais rugosa. Comparando-se a segunda e terceira colunas da figura 26, observa-se uma grande diferença entre as morfologias dos filmes secos por evaporação ou sublimação da água. A secagem por sublimação leva à formação de poros na matriz polimérica que não são observados no caso do filme seco por evaporação da água. Estes poros estão associados ao desenvolvimento de uma estrutura tridimensional esponjosa constituída por filamentos interligados como se pode ver mais claramente na micrografia com aumento de 500 X. A formação de poros em matrizes poliméricas de PVA submetidas a ciclos de C/D já foi observada por Hatakeyema (2005). De acordo com esse trabalho, a mobilidade dos segmentos das cadeias de PVA na solução cessa quando a água congela. Quando a temperatura diminui, as cadeias da fase amorfa dissolvidas na água são expelidas para que se formem os cristais de gelo. A expansão da água durante a formação do gelo causa uma maior aproximação das cadeias poliméricas. Assim, as paredes que delimitam os poros na matriz de PVA tornam-se mais densas com o aumento do número de ciclos, e as dimensões dos poros aumentam. Quando os filmes são secos por sublimação, o tamanho desses

poros é preservado. Por outro lado, durante a secagem por evaporação, as cadeias que formam a matriz apresentam pequena mobilidade, que permite que os poros diminuam ou que a estrutura porosa desapareça. Macroscopicamente, isso resulta em matrizes mais homogêneas e translúcidas.

A figura 25 mostra um esquema da formação da estrutura do gel, começando pela distribuição das cadeias poliméricas em solução, o aparecimento dos primeiros cristallitos após o primeiro ciclo de C/D, e a formação dos poros durante a secagem por sublimação ou evaporação.

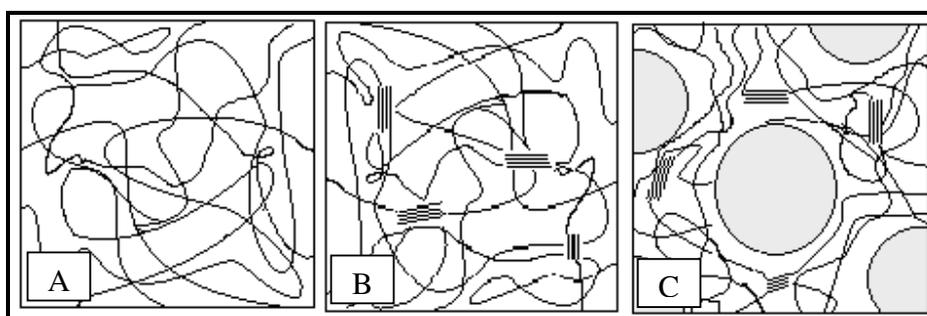


Figura 25. Esquema da formação da estrutura do gel. (A) Distribuição das cadeias poliméricas em solução aquosa. (B) Modelo da estrutura semicristalina do PVA obtida por ciclos de congelamento/descongelamento na secagem por evaporação. (C) Estrutura semicristalina obtida através de secagem por sublimação, com criação de poros e densificação da fase amorfa. Baseado no trabalho de Willcox e cols., (1999).

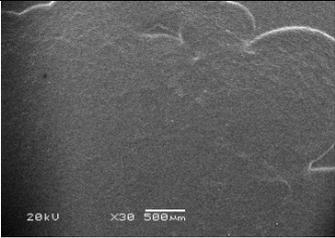
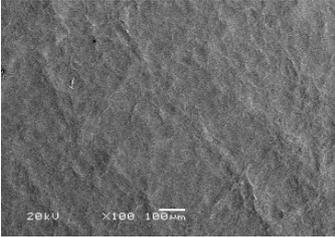
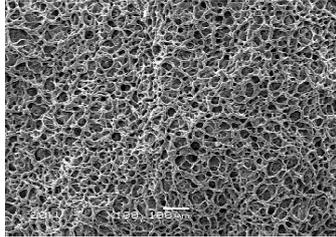
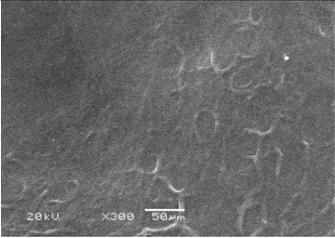
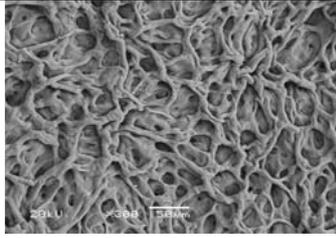
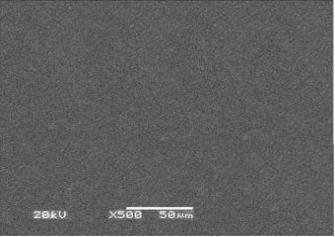
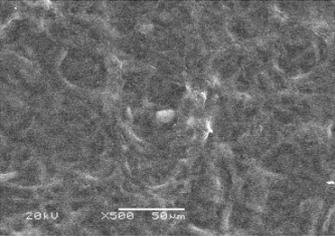
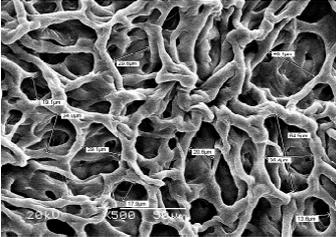
	Não reticulado	3 ciclos	
	Evaporação (a)	Evaporação (b)	Sublimação (c)
SEM 30X	/		
SEM 100X			
SEM 300X*	/		
SEM 500X			

Figura 26. Micrografias obtidas por MEV de filmes de PVA 25 depositados sobre placas de aço-inox (a) não submetido a ciclos de C/D, seco por evaporação (b) submetidos a três ciclos de C/D e seco por evaporação ou (c) submetidos a três ciclos de C/D e seco por sublimação da água.

*Obs: A micrografia do filme submetido a três ciclos, seco por sublimação com aumento de 300x foi obtida por reflexão de elétrons retroespalhados.

1.7. Efeito do número de ciclos de C/D sobre a velocidade de difusão da GSNO a partir de solução, através de filmes de PVA

A figura 27 mostra as curvas do logaritmo da quantidade de GSNO difundida por unidade de área de filmes de PVA ($-\ln Q$) versus tempo (em segundos), para filmes de PVA 25 não reticulado e submetidos a 1, 3 e 5 ciclos de C/D, e secos por sublimação. Os coeficientes angulares das retas obtidas por regressão linear das curvas correspondem aos coeficientes de difusão (D) de acordo com a equação 7. Os valores de coeficiente de difusão obtidos estão apresentados na tabela 10.

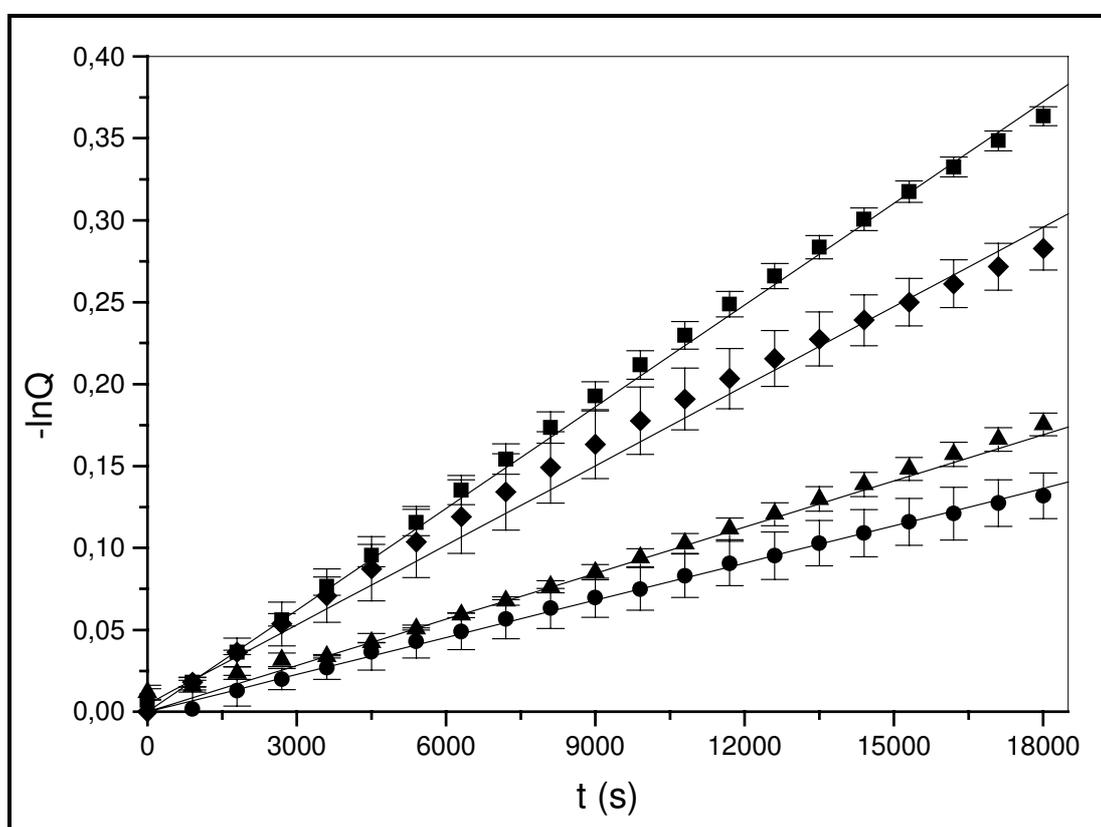


Figura 27. Logaritmo da quantidade de GSNO ($-\ln Q$) difundida por unidade de área, em função do tempo (t), em segundos, para filmes de PVA 25, secos por sublimação e não reticulado (■) e submetidos a 1 (●), 3 (▲) e 5 (◆) ciclos de C/D. [GSNO] utilizada: 12mM L^{-1} . Meio receptor: tampão fosfato (pH = 7,4). Temperatura = $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. As barras de erro correspondem ao desvio padrão da média (SE) de duplicatas.

A avaliação dos coeficientes de difusão, apresentados na tabela 10 e calculados de acordo com a equação 7 mostra uma diminuição de cerca de 3 vezes na magnitude do coeficiente de difusão da GSNO através da matriz de PVA submetida a um ciclo de C/D em relação à matriz não tratada por ciclos. Entretanto, conforme o número de ciclos aumenta para 3 e 5 há um aumento gradual na taxa de difusão.

Tabela 10. Coeficientes de difusão (D) da GSNO a partir de solução de GSNO 12.0 mM L⁻¹ para tampão fosfato (pH = 7,4), através de membranas de PVA preparadas a partir de solução 2.5% (m/v), secas por sublimação e submetidas a diferentes números de ciclos de C/D. O Erro se refere ao erro padrão da média de duplicatas.

filme	D / 10⁻⁷ (cm² s⁻¹)	Erro/10⁻⁹
Não reticulado	5,68	± 5
1 ciclo C/D	1,98	± 5
3 ciclos C/D	2,46	± 7
5 ciclos C/D	4,24	± 6

A redução na taxa de difusão da GSNO através da matriz de PVA submetida a 1 ciclo, comparada à matriz de PVA não submetida a ciclos pode ser atribuída ao processo de densificação que ocorre durante o ciclo de C/D, como discutido no item anterior, e já foi relatada em outros trabalhos (Peppas e Stauffer, 1991 e Hickey e Peppas, 1995; Hatakeyema e cols., 2005). Com o aumento do número de ciclos, o processo de densificação que ocorre durante os ciclos de C/D leva ao aumento da dimensão dos poros, conforme observado por Hatakeyema e cols. (2005) e exemplificado na figura 28. Assim, pode-se considerar que a repetição dos ciclos de C/D leva à formação de poros sobrepostos interconectados, que permitem a difusão

livre da GSNO pela matriz de PVA através de canais contínuos preenchidos de solução, levando ao aumento da velocidade de difusão observado nos filmes submetidos a 3 e 5 ciclos.

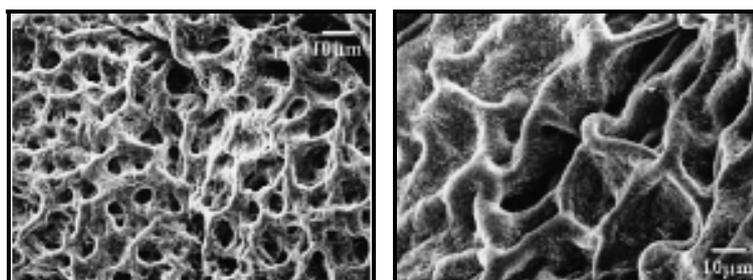


Figura 28. Micrografias eletrônicas de varredura de hidrogéis de PVA preparados a partir de solução com concentração de 5% (m/v) tratados por 2 ciclos (à esquerda) e 5 ciclos (direita) de C/D. A barra de escala representa 10µm. (Hatakeyema et al., 2005)

1.8.Efeito da remoção da água por sublimação ou evaporação sobre a velocidade de difusão da GSNO a partir de solução, através de filmes de PVA

A figura 29 apresenta as curvas de logaritmo da quantidade de GSNO difundida por unidade de área ($-\ln Q$) em função do tempo em segundos para filmes de PVA 25 submetidos a 3 ciclos de C/D e secos por evaporação ou sublimação da água. Os valores de coeficiente de difusão de GSNO através destes filmes estão apresentados na tabela 11.

Pode-se observar que quando o filme de PVA é seco por sublimação ocorre uma diminuição de cerca de 4 vezes no coeficiente de difusão da GSNO. Isso indica que o congelamento da água da solução polimérica leva a um aumento da densidade da fase amorfa através da qual a GSNO deve se difundir. Este efeito é esperado, uma vez que durante o congelamento da água, ocorre a segregação do polímero como soluto. A fase amorfa segregada deve assim se tornar mais densa do que a

fase amorfa que se forma no filme seco por evaporação (onde não ocorre segregação do polímero). Este resultado está de acordo com os dados da Tabela 10 que mostram que a densificação da fase amorfa produzida por ciclos de C/D também reduz os coeficientes de difusão. A densificação da fase amorfa pode ser interpretada de acordo com o modelo da figura 25, apresentada anteriormente. Ressalta-se que a densificação da fase amorfa não implica em aumento do grau de cristalinidade. Os cristalitos são formados durante o descongelamento, quando as cadeias têm mobilidade para dobrar e se organizar na forma de lamelas. Durante o congelamento, a segregação das cadeias de PVA as torna mais próximas, permitindo a formação de cristalitos em ciclos subseqüentes. A diferença entre o filme seco por evaporação e o seco por sublimação, portanto, é o espaço intersticial entre os cristalitos e a densidade da fase amorfa que são menores para os filmes secos por evaporação do que para os secos por sublimação.

Macroscopicamente, os filmes de PVA secos por sublimação são brancos e com aparência esponjosa, enquanto os filmes secos por evaporação são translúcidos e mais homogêneos, como foi observado pelas micrografias apresentadas na figura 26. Os filmes com aparência esponjosa apresentam um coeficiente de difusão menor, já que a compactação das cadeias reduz a velocidade de difusão GSNO através da fase amorfa no interior dos filmes até que ela alcance a solução receptora.

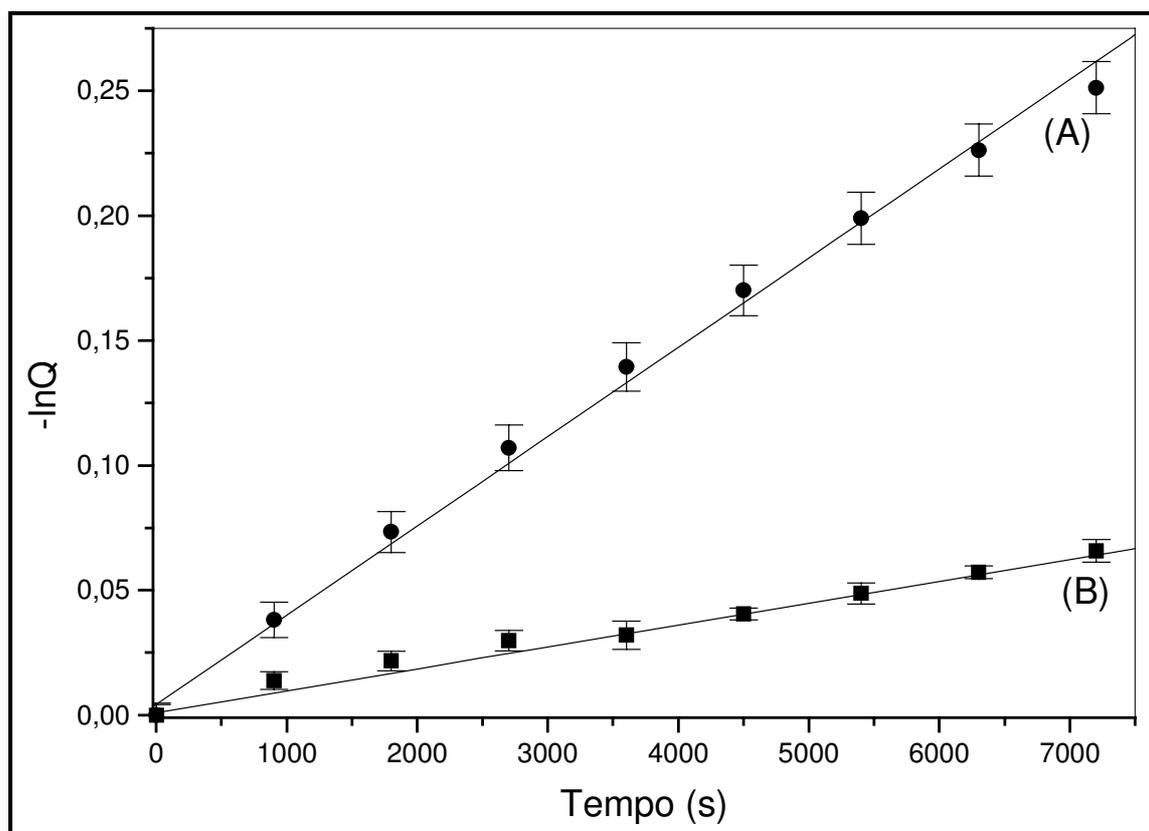


Figura 29. Curvas de Logaritmo da quantidade de GSNO difundida por unidade de área ($-\ln Q$), para filmes de PVA 25 submetidos a 3 ciclos de C/D e (A) secos por evaporação ou (B) secos por sublimação.

Tabela 11. Coeficiente de difusão (D) da GSNO a partir de solução de GSNO $12,0 \text{ mmol L}^{-1}$ para água desionizada, através de membranas de PVA 25, submetidas a 3 ciclos de C/D e secas por sublimação ou evaporação da água. O erro se refere ao desvio padrão associado ao coeficiente de fusão obtido.

Filme	$D/10^{-7} (\text{cm}^2 \text{ s}^{-1})$	Erro/ 10^{-9}
sublimado	2,46	± 7
evaporado	9,35	± 2

1.9. Efeito da duração do ciclo de descongelamento sobre a velocidade de difusão da GSNO a partir de solução, através de filmes de PVA

A figura 30 apresenta as curvas do logaritmo da quantidade de GSNO difundida por unidade de área ($-\ln Q$) em função do tempo, em segundos, de filmes de PVA 25 secos por evaporação, submetidos a 3 ciclos (C/D) com diferentes tempos de descongelamento. A tabela 12 apresenta os correspondentes coeficientes de difusão (D).

A análise da figura 30, juntamente com os valores de D apresentados na tabela 12, mostram que o coeficiente de difusão da GSNO através de filmes de PVA é inversamente proporcional ao tempo de descongelamento nos ciclos, ou seja, o coeficiente de difusão diminui quando o tempo de descongelamento nos ciclos aumenta. O mesmo resultado foi obtido por Hickey e Peppas (1995) ao avaliar as características de difusão e a distância entre os cristalitos formados em membranas de PVA preparadas por técnicas de C/D. Utilizando uma cela de difusão com monitoramento espectrofotométrico, estes autores verificaram que o aumento do número de ciclos de C/D de membranas de PVA leva a uma redução do coeficiente de difusão da teofilina de 3.07 para 1,33 (10^{-7}) $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ a partir de uma solução aquosa para uma solução receptora de água desionizada a 25 °C. Estes autores encontraram uma correlação entre o aumento do número de pontos de reticulação (com aumento da cristalinidade) e a diminuição de D. Os valores de coeficiente de difusão (D) da GSNO ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$; MM 336,3 g/mol) foram comparados com os valores obtidos para a difusão da teofilina ($\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_4\text{O}$, MM 180.2 g/mol) através de filmes de PVA preparados por ciclos de C/D relatados no trabalho de Hickey e Peppas (1995). As fórmulas estruturais da teofilina e da GSNO estão apresentadas na figura 31.

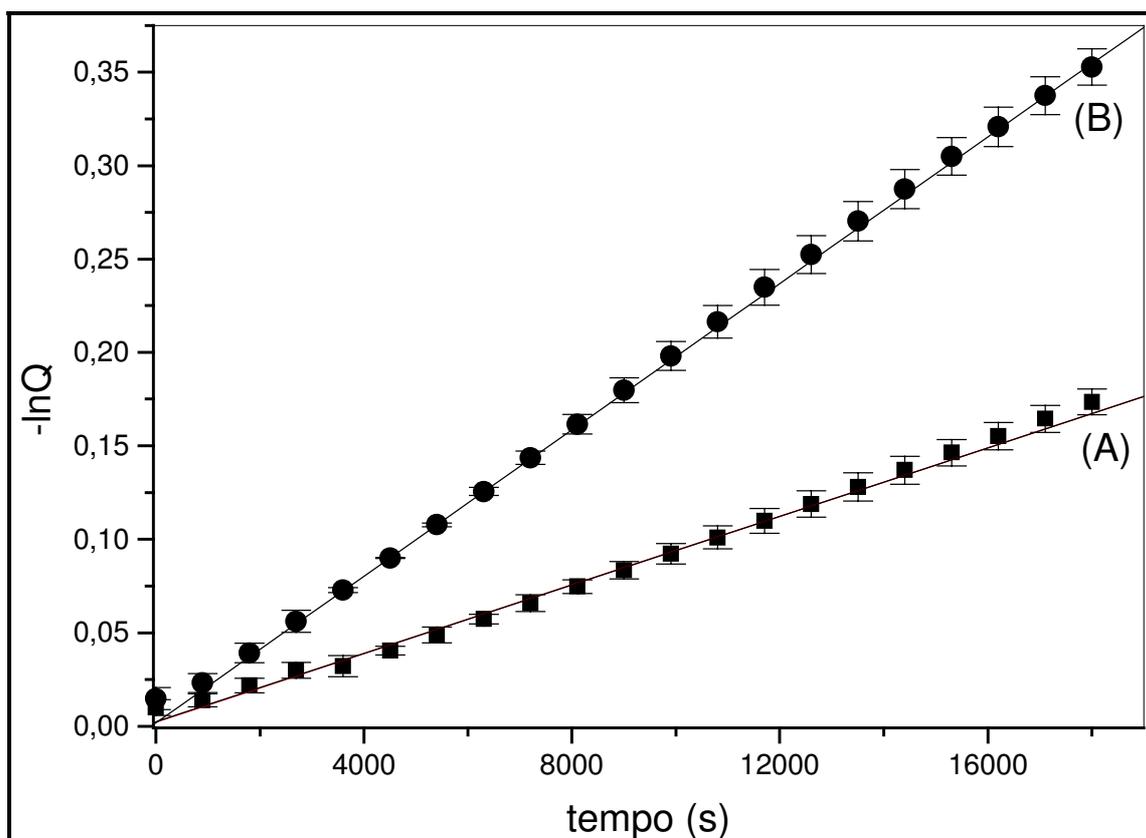


Figura 30. Curvas do logaritmo da quantidade de GSNO difundida por unidade de área, em função do tempo em segundos, para filmes de PVA 25 submetidos a 3 ciclos de C/D com diferentes tempos de descongelamento.

Tabela 12. Coeficiente de difusão (D) da GSNO a partir de solução de concentração 12.0 mmol L^{-1} para tampão fosfato, através de filmes de PVA 25 submetidos a 3 ciclos de C/D, com diferentes tempos de congelamento, secos por sublimação da água. O erro se refere ao desvio padrão associado ao coeficiente de fusão obtido.

Amostra	$D/10^{-7} \text{ (cm}^2 \text{ s}^{-1}\text{)}$	Erro/ 10^{-9}
2h	5,13	± 4
4h	2,46	± 7

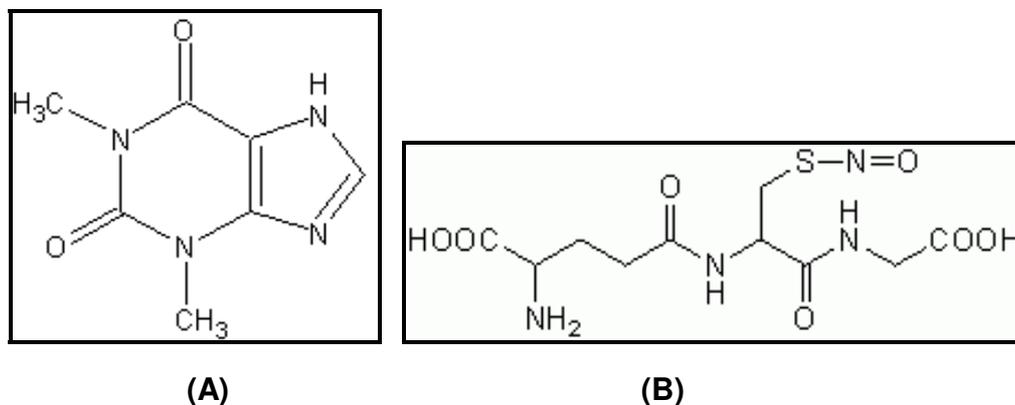


Figura 31. Fórmulas estruturais da teofilina (A) e da GSNO (B).

O raio hidrodinâmico da teofilina é de 3,7 Å, ao qual corresponde um volume hidrodinâmico de 212 Å³. O volume molecular da GSNO foi calculado a partir da estrutura de equilíbrio de menor energia representada na figura 32 (Oliveira e cols., 2002). Nesta estrutura foram considerados os espaços intersticiais entre os átomos da molécula, resultando num volume de 328,1 Å³ e numa área molecular de 358,3 Å². O volume da molécula de GSNO, portanto, é da mesma ordem de grandeza do volume da molécula de Teofilina.

A difusão de teofilina e de GSNO através das membranas de PVA preparadas por ciclos de C/D resulta em coeficientes de difusão na faixa de 1 a 5 (10⁻⁷) cm² s⁻¹. As tendências observadas nos valores de coeficientes de difusão em função do número de ciclos e do tempo de descongelamento são as mesmas em ambos os casos.

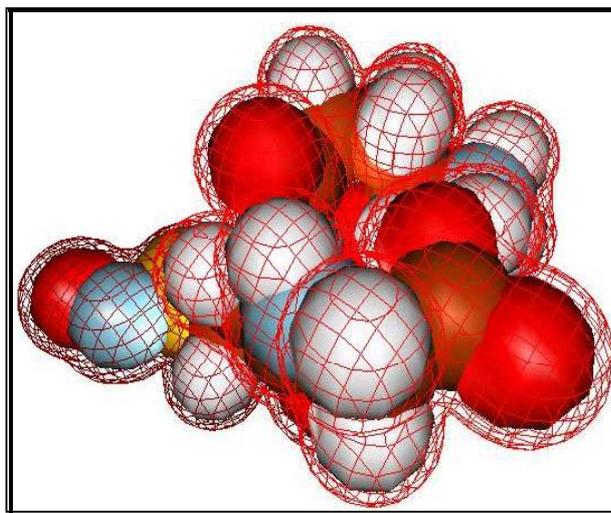


Figura 32. Estrutura de equilíbrio utilizada no cálculo do volume molecular da GSNO, onde as esferas marrons representam os átomos de carbono, as azuis os de nitrogênio, amarelas os de enxofre, as vermelhas os de oxigênio e as brancas os de hidrogênio. (Oliveira e cols., 2002)

Os valores relatados de coeficientes de difusão da teofilina através de filmes de PVA são um pouco menores do que os observados no caso da GSNO. Isso pode ser atribuído às diferenças nas concentrações das soluções de PVA utilizadas para preparar os filmes (15% (m/v) no caso dos filmes utilizados nos experimentos com teofilina e 2,5% (m/v) nos experimentos com GSNO) e às concentrações das soluções de teofilina e GSNO colocadas no compartimento doador das celas de difusão (0,1 g/L no caso da teofilina e 4,0 g/L no caso da GSNO). Além disso, os experimentos de difusão com a GSNO foram feitos a 37 °C enquanto os experimentos com teofilina foram feitos a 25 °C.

Estes resultados estão de acordo com o aumento do grau de cristalinidade observados por DSC e difração de raios X. O aumento do grau de cristalinidade da matriz aumenta a tortuosidade do caminho a ser percorrido pela GSNO, diminuindo o coeficiente de difusão. A densificação da fase amorfa da matriz inibe a passagem da GSNO, contribuindo para a diminuição do coeficiente de difusão.

1.10. Cinéticas de eluição da GSNO para solução de Griess

1.10.1. Curvas de calibração

A figura 33 mostra as curvas de calibração obtidas para a reação da GSNO com solução de Griess em meios ácido e neutro, com base nas medidas de absorvância em 540 e 496 nm, respectivamente. A Tabela 13 apresenta os coeficientes de absorção molares obtidos através da regressão linear das curvas.

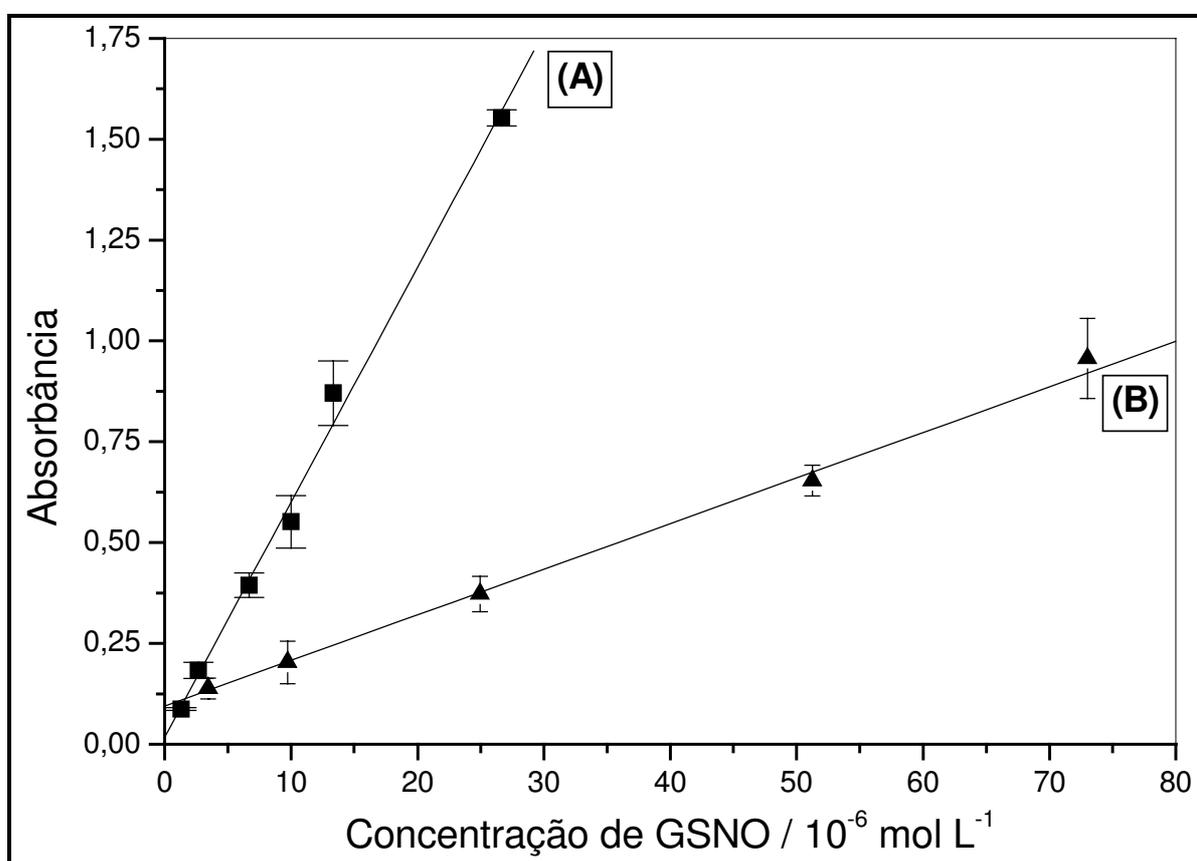


Figura 33. Curvas de calibração obtidas para a reação de GSNO com solução de Griess em meios ácido (A) e neutro (B).

Tabela 13. Coeficientes de absorção molares obtidos a partir da regressão linear das curvas de calibração de GSNO em reagente de Griess em meios ácido e neutro.

Meio	$\epsilon/ 10^{-7} (M^{-1} cm^{-1})$	Erro/ 10^{-7}
Ácido	59160	± 20
Neutro	11455	± 4

Os valores de ϵ obtidos para o reagente de Griess em meio ácido é ca. 5X maior que o ϵ obtido em meio neutro. Portanto, em meio ácido, a sensibilidade do método de Griess é maior, possibilitando a determinação de quantidades de GSNO de concentração da ordem de poucos μmol por litro, necessária para a utilização do método em stents. Entretanto, a presença de metais na reação de GSNO com Griess, interfere na determinação da quantidade de GSNO presente em solução ácida. Assim, a detecção da GSNO presente nos stents pelo método de Griess deve ser realizada em meio neutro. (Veja sessão 2.3.2).

1.10.2. Detecção da GSNO eluída para Solução de Griess em meio ácido a partir de filmes isolados.

Na Figura 34 estão apresentadas as curvas de quantidade de GSNO *versus* tempo a partir de filmes de PVA/GSNO 25, não reticulado e submetido a três ciclos de C/D, secos por evaporação de água, e imersos em solução ácida de reagente de Griess. A partir das regressões lineares das curvas nos primeiros 45 min e nas duas horas finais de imersão dos filmes nas soluções, foi possível calcular as velocidades de eluição de GSNO em cada caso, apresentadas na tabela 14.

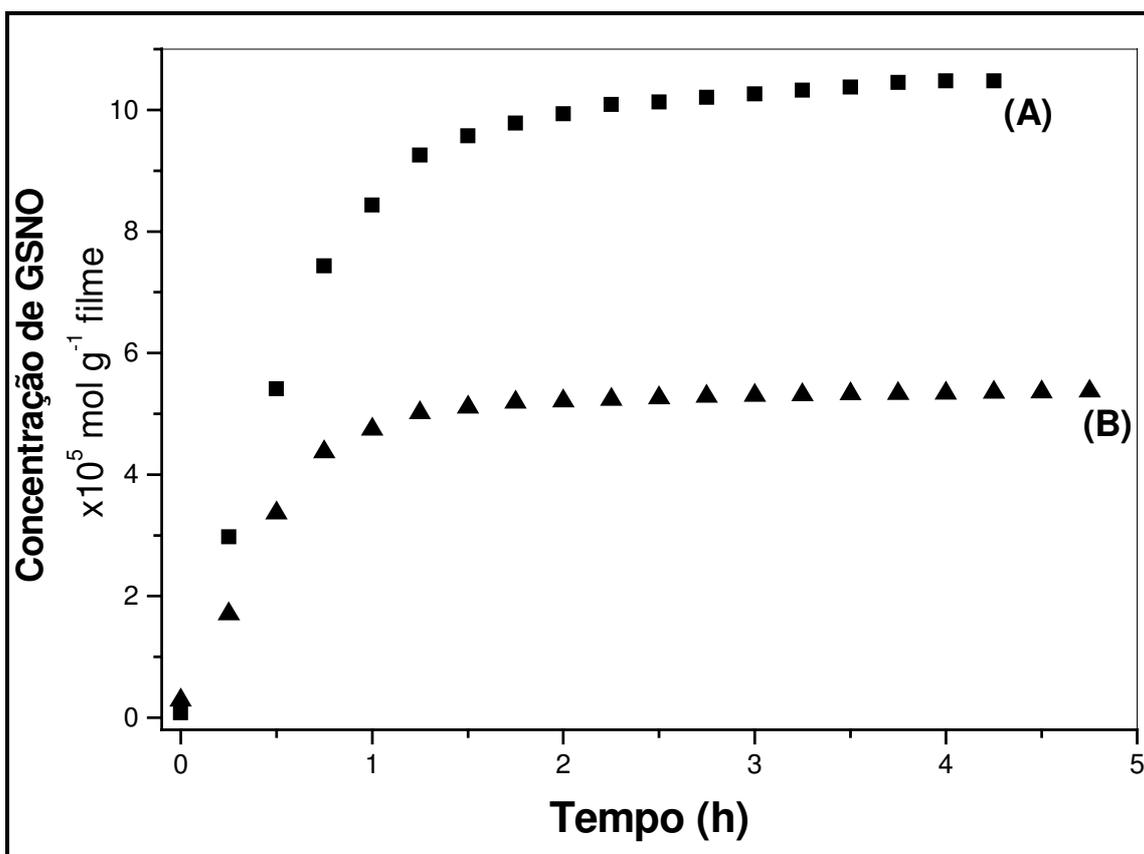


Figura 34. (A) Curvas cinéticas de eluição de GSNO a partir de filmes de PVA/GSNO 25 (A) não reticulado e (B) submetido a três ciclos de C/D, para solução ácida do reagente de Griess.

Tabela 14. Velocidades iniciais e finais de eluição de GSNO a partir de filmes de PVA/GSNO 25 não reticulados e submetidos a três ciclos de C/D obtidas a partir das regressões lineares das curvas cinéticas nos primeiros 45 min e após 2,5h.

Tratamento	Taxa de eluição (nmol/h)	
	45 min iniciais	2,5 - 4h finais
Não reticulado	160	4
3 ciclos C/D	94	0,8

Na primeira hora, a velocidade de eluição da GSNO a partir do PVA não submetido a ciclos de C/D é cerca de duas vezes maior comparada à do PVA tratado por três ciclos de C/D. Essa diferença pode ser atribuída à redução da velocidade de difusão da GSNO na fase rica em PVA, devido à presença dos cristalitos, que torna mais tortuoso o caminho a ser percorrido pela GSNO dentro da matriz polimérica até alcançar o reagente de Griess.

Os resultados de eluição de GSNO, juntamente com os resultados de difusão previamente apresentados indicam efeitos antagônicos dos filmes de PVA, que devem ser modulados para se obter as características de liberação desejadas. Observa-se que o aumento do número de ciclos leva ao aumento do grau de cristalinidade e, conseqüentemente, do número de cristalitos, aumentando o caminho livre médio a ser percorrido pela GSNO até alcançar a solução. Entretanto, a repetição dos ciclos leva à densificação da fase amorfa, aumentando a dimensão dos poros formados, permitindo a difusão livre da GSNO através do filme de PVA.

A existência de uma quantidade menor de GSNO no polímero tratado por três ciclos de C/D (patamar mais baixo de difusão na Fig. 3) pode ser atribuída à sua degradação térmica durante os ciclos. Observa-se que a quantidade de GSNO eluída do filme de PVA não submetido aos ciclos é de $10,4 \times 10^{-5}$ mol de GSNO por grama de filme, que corresponde ao número de moles inicial presente no filme. O mesmo não ocorreu no caso do filme submetido aos ciclos de C/D, cuja quantidade de GSNO eluída para solução de Griess foi de $5,36 \times 10^{-5}$ mol g^{-1} filme, devido à degradação da GSNO durante os tempos de descongelamento dos ciclos. A redução da concentração de GSNO também contribui para a redução da velocidade de eluição.

Observa-se que após os períodos de eluição rápida a velocidade de eluição de GSNO diminui cerca de 40 vezes para o polímero não submetido aos ciclos de C/D e cerca de 100 vezes para o polímero tratado por 3 ciclos de C/D. Este resultado está de acordo com o efeito dos ciclos de C/D sobre a velocidade de difusão relatado no item 1.7, atribuído à densificação da fase amorfa e ao aumento do grau de cristalinidade da matriz de PVA.

1.11. Análise de degradação da GSNO em filmes submetidos a processos de esterilização com óxido de etileno (ETO)

A figura 35 apresenta as quantidades de GSNO restantes nos filmes após as esterilizações com ETO em três condições diferentes; ETO1, ETO2 e ETO3 (veja tabela 2 na parte experimental). A degradação do filme de PVA/GSNO não submetido a esterilização e estocado a 13°C como controle, foi de cerca de 3%, e está dentro da faixa de incerteza experimental.

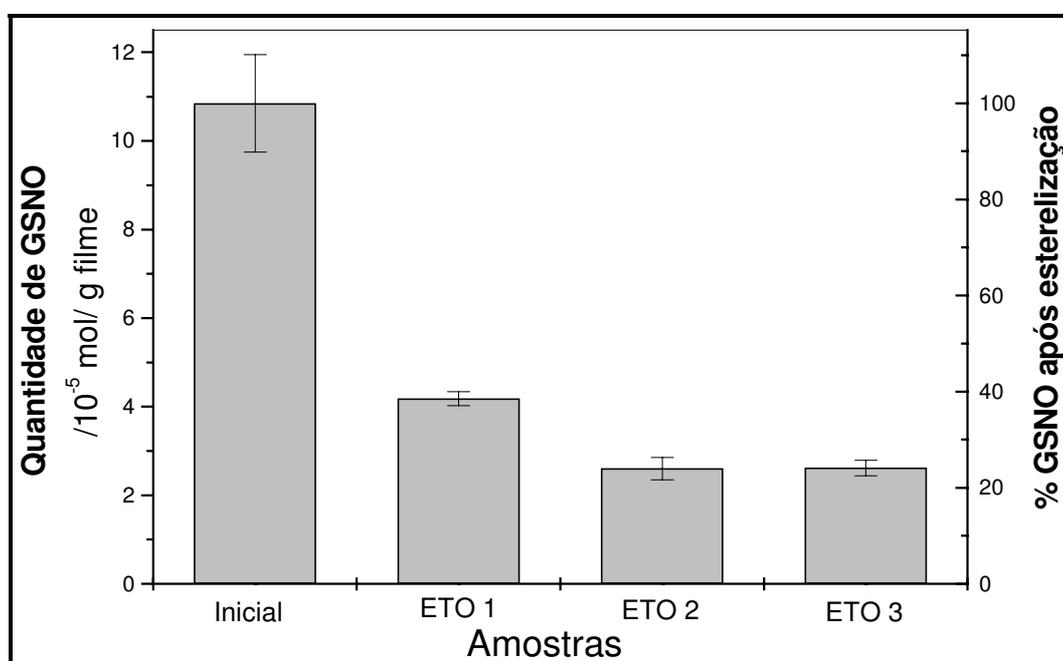


Figura 35. Gráfico de barras mostrando as quantidades de GSNO ($\times 10^5$ mol/g filme) restantes em filmes de PVA não submetidos a esterilização (Inicial) e submetidos à esterilização com óxido de etileno em três condições diferentes (ETO1, ETO2 e ETO3).

A concentração de GSNO imediatamente após a preparação e secagem do filme medida pelo método de Griess foi de $10,9 \times 10^{-5}$ mol por grama de filme. Este valor está de acordo com a concentração esperada a partir da preparação da

amostra. Após 30 dias, mediu-se a concentração de GSNO do filme não esterilizado mantido à temperatura de 13°C e protegido da luz e obteve-se um valor de $10,2 \times 10^{-5}$ mol por grama de filme (inicial). Para as amostras esterilizadas, as quantidades de GSNO medidas foram de 4.18; 2.60 e 2.62 (10^{-5} mol de GSNO por grama de filme) para as amostras ETO 1, ETO 2 e ETO 3, respectivamente. Estes resultados indicam que a esterilização com óxido de etileno pode levar a uma degradação térmica de até 80% da GSNO presente inicialmente em filmes de PVA, dependendo das condições de esterilização utilizadas. Porém, a concentração de GSNO residual nos filmes, após a esterilização por este método pode ser suficiente para a obtenção de efeitos farmacológicos na inibição da reestenose (veja abaixo).

1.12. Implicações dos resultados obtidos com filmes isolados e com placas revestidas para o revestimento de stents.

O sucesso dos stents farmacológicos está intrinsicamente relacionado à tríade stent, polímero e medicação (Missel, e cols.; 2002) Dentre as características ideais que os polímeros devem ter para que os fármacos atinjam efeito ótimo estão: cinética previsível da medicação a ser adicionada; elasticidade, sem perder a integridade da superfície, não-interferência na integridade da medicação adicionada, não interferência nas características estruturais e operacionais do stent, além de possibilidade de esterilização, estabilidade, longa-vida e custo efetividade. O PVA utilizado neste estudo atende a todos estes pré-requisitos, podendo sua utilização ser melhorada para aplicação desejada, de acordo com o tratamento a que é submetido.

Através dos estudos desenvolvidos, observou-se que a realização de ciclos de C/D aumenta o grau de cristalinidade, tornando-o menos solúveis em solução fisiológica, diminuindo sua taxa de intumescimento, e conseqüentemente evitando o descolamento do polímero do substrato metálico. Esta é uma propriedade bastante importante para sua utilização como matriz carregadora de fármaco em stents, uma vez que o dispositivo implantado estará submetido a um regime de fluxo sangüíneo,

em que o polímero deverá manter-se fixo ao metal do stent, para garantir o efeito local do fármaco e evitar o bloqueio da luz arterial devido ao descolamento do polímero. A menor velocidade de dissolução (obtida com o aumento do número de ciclos de C/D) e a diminuição do coeficiente de difusão da GSNO (conseguida através do aumento do número de cristalitos e com a densificação da fase amorfa através do congelamento por sublimação) evitam um efeito citotóxico no local lesionado que poderia ser causado por uma concentração excessiva de GSNO acumulado no local da implantação.

Mario C. e cols. (2005) estudaram a implantação de stents recobertos com óxido de Irídio e relataram que a estrutura rugosa da superfície pode ajudar na redução da rejeição do organismo devido à implantação dos stents. Assim, a secagem por sublimação, além de reduzir o coeficiente de difusão da GSNO, torna a superfície mais rugosa, o que pode ser importante para a aplicação em stents.

De acordo com os resultados obtidos e as características desejáveis para a aplicação de polímeros em recobrimento de stents, conclui-se que o melhor revestimento obtido neste estudo foi o preparado a partir de solução de concentração de PVA 2.5% (m/v), tratado por três ciclos de C/D e seco por sublimação.

2. Stents recobertos com PVA e PVA/GSNO

2.1. Caracterização morfológica

2.1.1. Microscopia óptica

A Figura 36 apresenta as fotografias de stents fornecidos pela Inovatech revestidos com filme de PVA 5 contendo azul de metileno e de dois stents comerciais das marcas Taxus (Boston Scientific) e Cypher (Johnson&Johnson) obtidas com uma câmera digital. O azul de metileno foi utilizado para facilitar a visualização do filme polimérico na fotografia óptica.

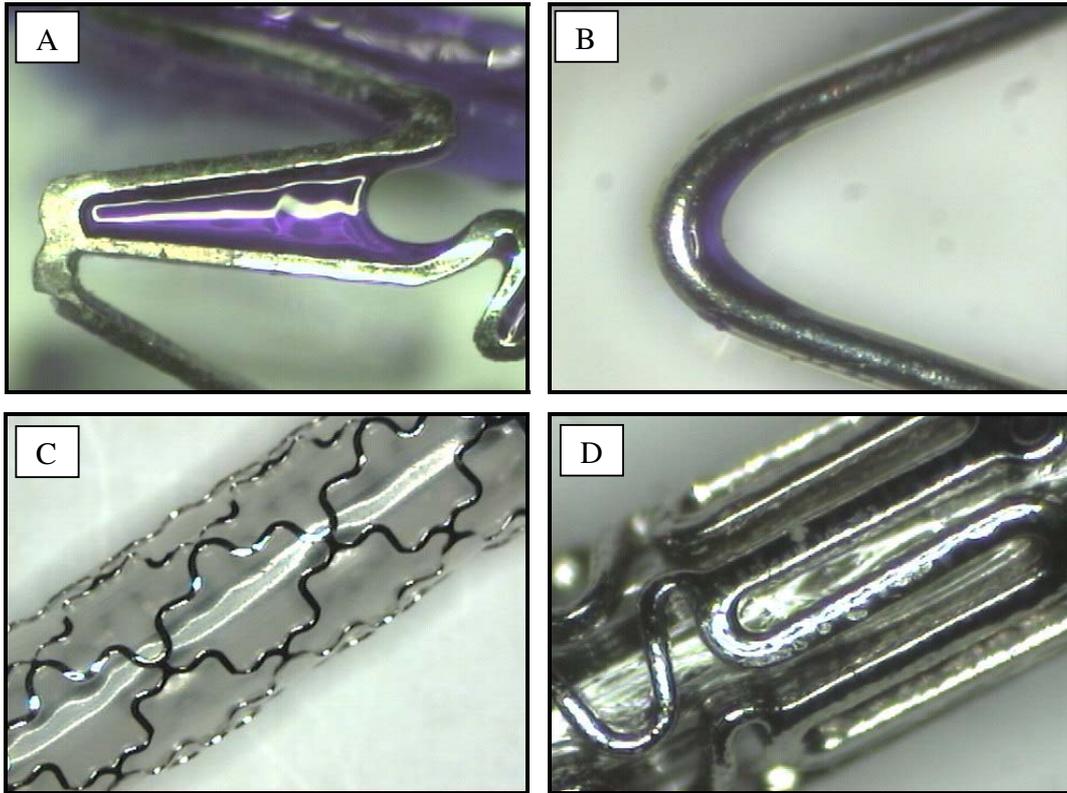


Figura 36. Fotos obtidas por microscopia óptica de stents revestido em laboratório com solução de PVA 5% (m/v) e corante azul de metileno (A) fornecido pela Inovatech, (B) stent comercial (C) stent Cypher (D) stent Taxus.

A foto 36A mostra o detalhe de uma alça com pequeno ângulo de abertura no stent Inovatech. Observa-se a formação de filme entre as hastes do stent, evidenciada pela coloração azul do corante. Estes filmes são resultantes do processo de remoção do stent da solução polimérica, devido ao escoamento da solução por ação da gravidade. Esse acúmulo de polímero na forma de filme entre as hastes dos stents é indesejável, pois ele pode bloquear pequenos vasos sanguíneos que afluem da artéria que receberá o stent. Na haste metálica, devido à reflexão da luz na superfície do stent, não é possível perceber a presença do filme. A figura 36B apresenta uma das alças de um stent comercial, revestido com PVA contendo azul de metileno. Ainda se observa, embora em menor quantidade, o acúmulo de polímero na parte interna da alça, porém não é possível perceber se o

restante da haste está revestido com o filme polimérico. As figuras 36C e 36D mostram os stents comerciais, Taxus, e Cypher revestidos com matrizes poliméricas que contém as drogas anti-reestenose Paclitaxel e Sirolimus, respectivamente. Nestes casos, não se observa acúmulo de filme polimérico nas dobras das hastes, mas também não é possível, através dessa técnica, observar a presença dos revestimentos poliméricos, devido à transparência dos filmes e à reflexão de luz pela superfície metálica.

Embora a microscopia óptica não permita caracterizar a continuidade do revestimento polimérico ela permite visualizar a existência de filmes entre as alças dos stents e assim é uma técnica rápida e barata para o controle deste problema.

2.1.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A figura 37 apresenta as micrografias obtidas por MEV de um stent não revestido e de stents revestidos com filmes de PVA 5, 25 e 50 e secos por evaporação. Conforme a concentração da solução de PVA diminui, observa-se uma quantidade menor de filme formado entre as alças do stent.

Apesar das micrografias de varredura eletrônica permitirem uma análise detalhada da topografia da superfície dos stents, após a metalização com ouro não é possível constatar a existência do revestimento polimérico sobre as hastes do stent. Para constatar a existência do recobrimento foram feitos riscos com um bisturi sobre as hastes do stent antes da metalização com ouro. A figura 38 mostra stents revestidos com filmes de PVA 5 e 25 riscadas com bisturi. Pode-se observar a remoção de parte do revestimento nas áreas riscadas. Esse resultado confirma a presença de filme polimérico sobre as hastes metálicas do stent.

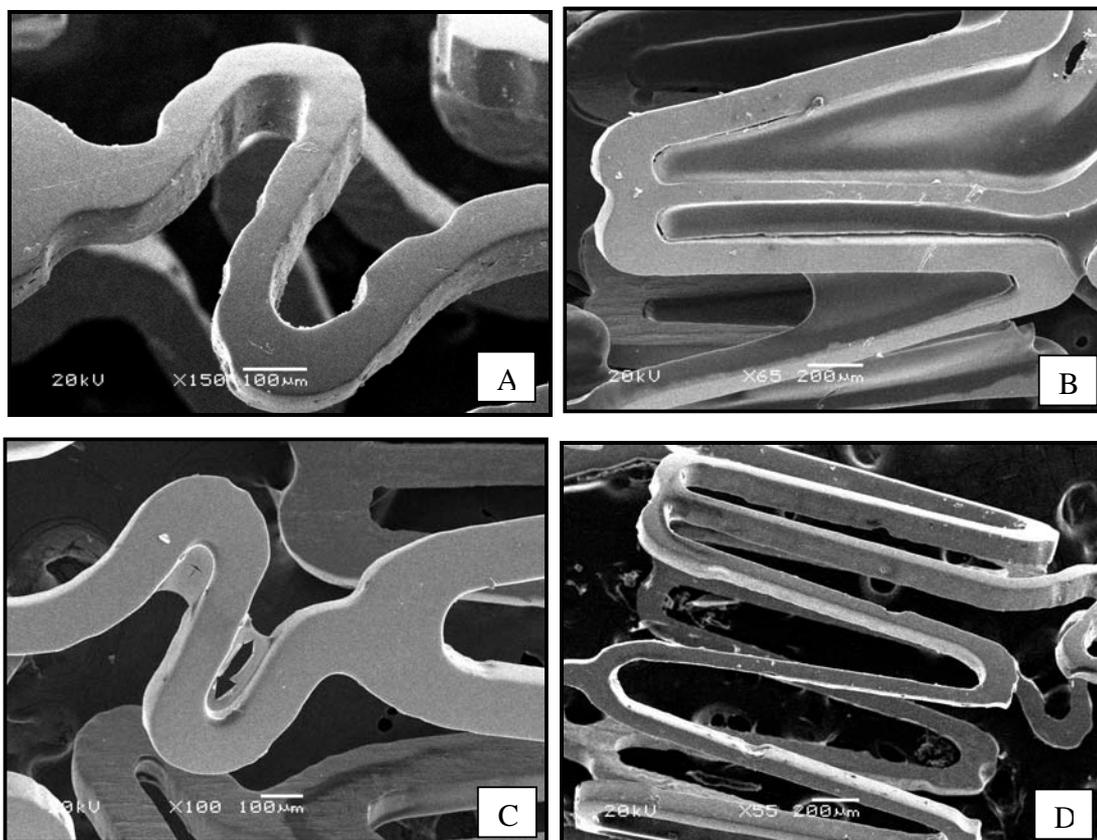


Figura 37. Micrografias de varredura eletrônica de stents (A) não revestido, com aumento de 150X; e revestidos por imersão em soluções poliméricas de PVA com concentrações de (B) 5.0% (m/v) de polímero, com aumento de 65X (C) 2.5% (m/v) de polímero, com aumento de 100X e (D) 0.5% (m/v) de polímero, com aumento de 55X. Obs: Os stents das fotos A e B foram imersos uma vez na solução polimérica antes da secagem e o stent da foto C, três vezes.

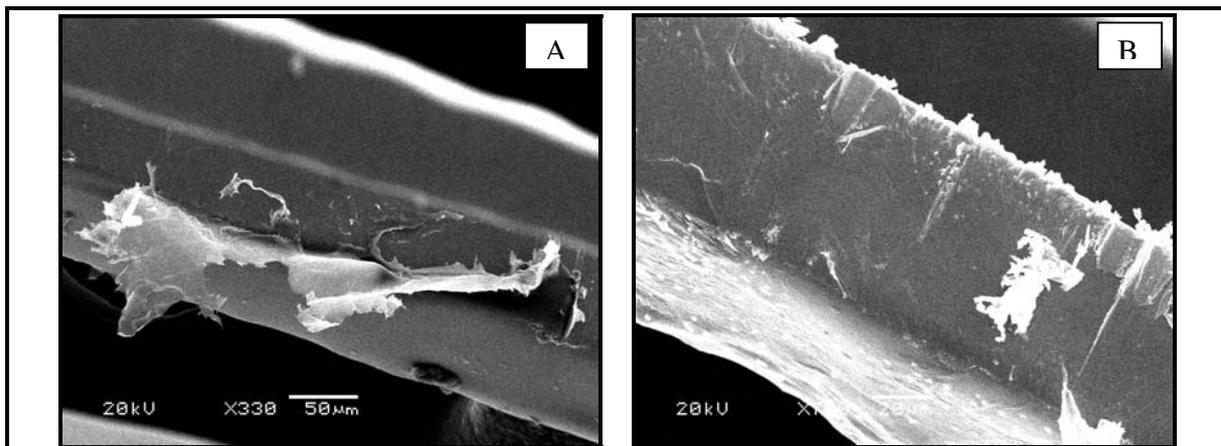


Figura 38. Micrografias de varredura eletrônica de stents revestidos com PVA: (A) 25 com aumento de 330X e (B) 5 com aumento de 700X, e riscados com bisturi, antes da metalização com ouro.

2.2. Caracterização gravimétrica

A tabela 15 apresenta os dados de caracterização gravimétrica dos stents revestidos com filmes de PVA/GSNO 5 a 50. A caracterização gravimétrica permitiu determinar a massa de filme que fica aderida no corpo do stent após o revestimento e a secagem por evaporação. Quanto mais concentrada a solução de PVA utilizada, maior foi a quantidade de filme depositado sobre os stents, de acordo com o esperado.

Os valores apresentados na tabela 15 indicam que a quantidade de filme depositado sobre um stent INOVATECH de 1.0 cm de comprimento varia de 0.4 a $4,0 \times 10^{-4}$ g, o que corresponde a porcentagens em massa de ca. 0,4 a 3,0 % em relação à massa total dos stents revestidos. Deve-se salientar que os stents revestidos com soluções de PVA 50 e 25 foram imersos uma vez enquanto o stent revestido com solução de PVA 5 foi imerso 3 vezes na solução, antes de serem secos e liofilizados.

Tabela 15. Dados gravimétricos de stents revestidos com filmes de PVA/GSNO 50, 25 e 5, por imersão e secos por evaporação.

Revestimento	Massa stent + filme /10 ⁻⁴ (g)	Massa do Stent /10 ⁻⁴ (g)	Massa do filme de PVA/GSNO/10 ⁻⁴ (g)	% em massa de PVA/GSNO
50 não reticulado	133,9	130,0	3,9	3
25 não reticulado	189,8	188,3	1,5	1
25 reticulado	162,9	161,3	1,6	1
5 não reticulado	112,4	111,9	0,5	0,5

2.3. Cinéticas de eluição da GSNO a partir de stents recobertos para solução de Griess

2.3.1. Solução de Griess em meio ácido

As curvas cinéticas de eluição de GSNO para solução ácida do reagente de Griess a partir de stents revestidos com filmes de PVA/GSNO preparados com soluções de diferentes concentrações estão apresentadas na figura 39. A partir destas curvas, foram calculadas as concentrações máximas de GSNO (moles de GSNO por g de filme de PVA) presentes nos stents revestidos. A tabela 16 apresenta esses valores.

O perfil das curvas cinéticas de eluição de GSNO a partir dos stents é bastante diferente do apresentado na figura 34, referente às curvas cinéticas de eluição de GSNO para solução ácida de Griess a partir de filmes isolados. Nesta, a reação da GSNO com os reagentes de Griess atinge um patamar num tempo de reação próximo a 1 hora, e se mantém estável por pelo menos quatro horas depois de iniciada a reação. As curvas cinéticas de eluição de GSNO a partir dos stents revestidos (Figura 39) atingem um valor máximo cerca de 30 minutos após o início

da reação. Em seguida, a concentração acumulada na solução começa a cair, indicando a degradação do composto azo formado. Além disso, a concentração máxima de GSNO eluída dos stents é bastante inferior à obtida para os filmes isolados. O gráfico de barras da figura 40 compara os valores máximos de concentração de GSNO em solução ácida de Griess eluída dos stents e de filmes isolados.

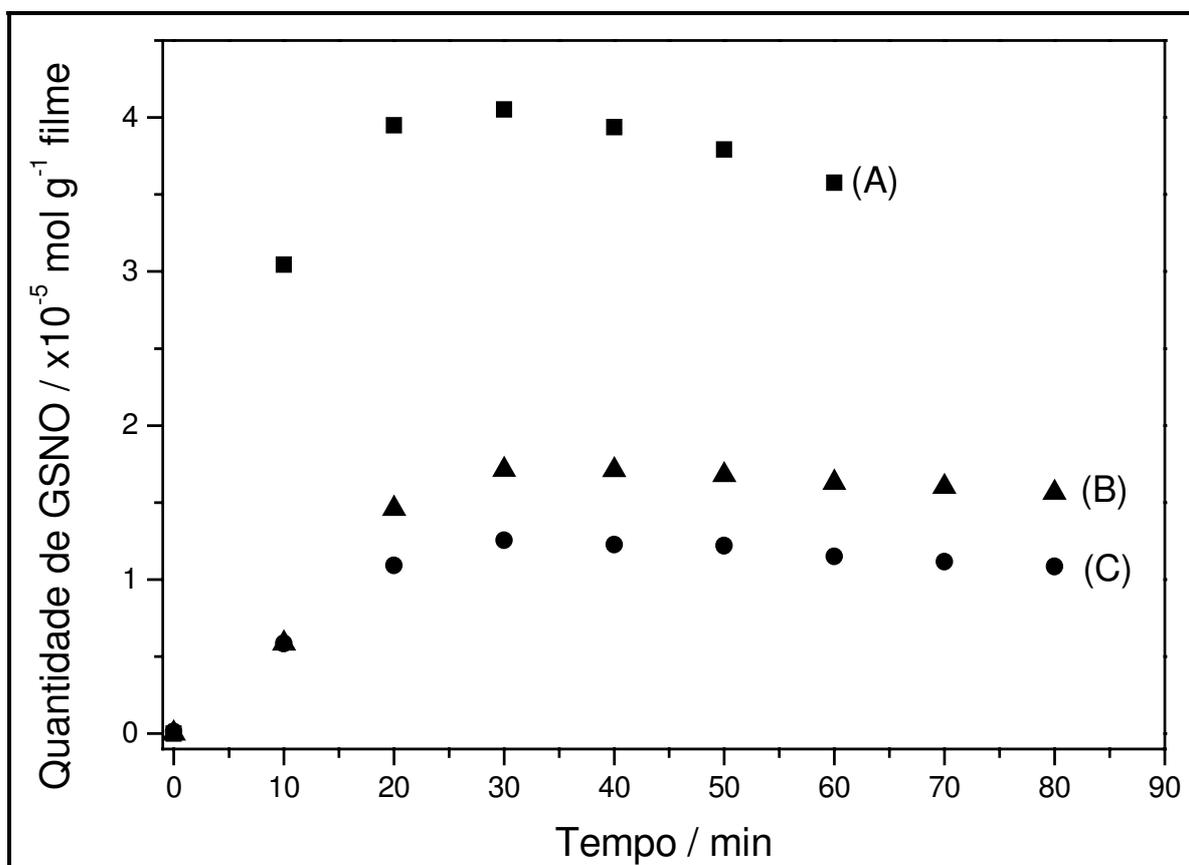


Figura 39. Curvas cinéticas obtidas a partir da reação do reagente de Griess em meio ácido com a GSNO eluída de stents revestidos com filmes de PVA (A) 50 não reticulado, (B) 25 não reticulado e (C) 25 reticulado. Todos os filmes foram secos por evaporação.

Tabela 16. Valores experimentais de concentração máxima de GSNO (mol g⁻¹ de filme) eluída para solução de Griess a partir de stents revestidos em diferentes condições.

Condição de preparação do filme		Concentração* /10 ⁻⁵ (Moles GSNO/ g filme)
Concentração da Solução de PVA/GSNO	tratamento	
50	Não reticulado	4,0
25	Não reticulado	1,7
25	3 ciclos de C/D	1,3

*Valores obtidos através da variação espectroscópica de solução de Griess com o stent revestido por imersão, considerando-se ϵ da solução de Griess como 59160 ± 199 , referente a $\lambda_{\text{máx}} = 545$ nm, resultante de curva de calibração de GSNO em solução ácida de Griess.

A quantidade de GSNO eluída do filme isolado para a solução de Griess foi $10,41 \times 10^{-5}$ mol de GSNO g⁻¹ filme. Essa concentração caiu para $4,52 \times 10^{-5}$ mol de GSNO g⁻¹ filme no caso do stent revestido com PVA 50, o que equivale a 40% da quantidade determinada para o filme solto. Nos stents revestidos com solução de PVA 25 não reticulado e submetido a três ciclos de C/D obteve-se cerca de 20 % da quantidade de GSNO obtida nos filmes isolados. Estes resultados indicam que a formação de azo composto é influenciada pela presença de metais do aço-inox dos stents no meio ácido reacional.

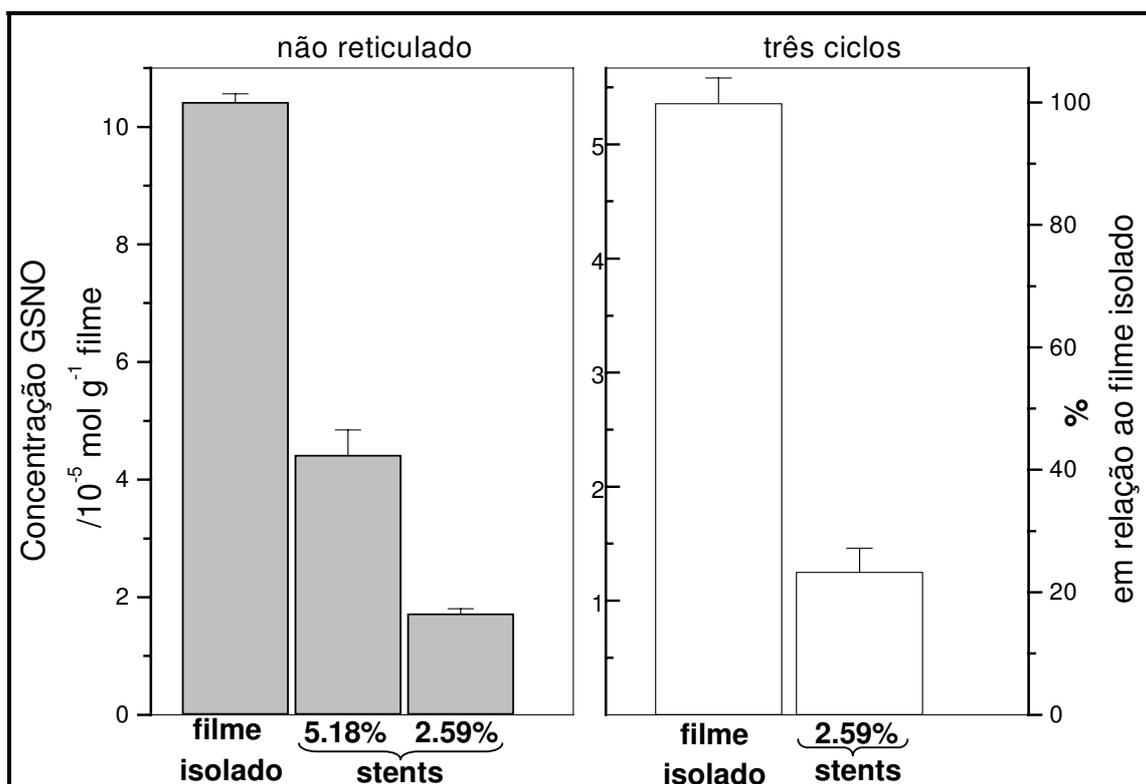


Figura 40. Comparação dos valores máximos de concentração de GSNO eluída para solução de Griess a partir de filmes isolados e dos stents com diferentes recobrimentos com filmes preparados a partir de solução PVA/GSNO 50 e 25. Colunas azuis referentes aos filmes não submetidos aos ciclos e colunas vermelhas referentes aos filmes submetidos a três ciclos de C/D.

Para se verificar essa hipótese, acompanhou-se a cinética de reação de GSNO em solução aquosa com Griess em meio ácido. Esta cinética foi comparada com a cinética da mesma solução de GSNO adicionando-se uma pequena placa de aço-inox à solução ácida de Griess. A figura 41 apresenta os gráficos de concentração de GSNO *versus* tempo de reação nestes dois casos.

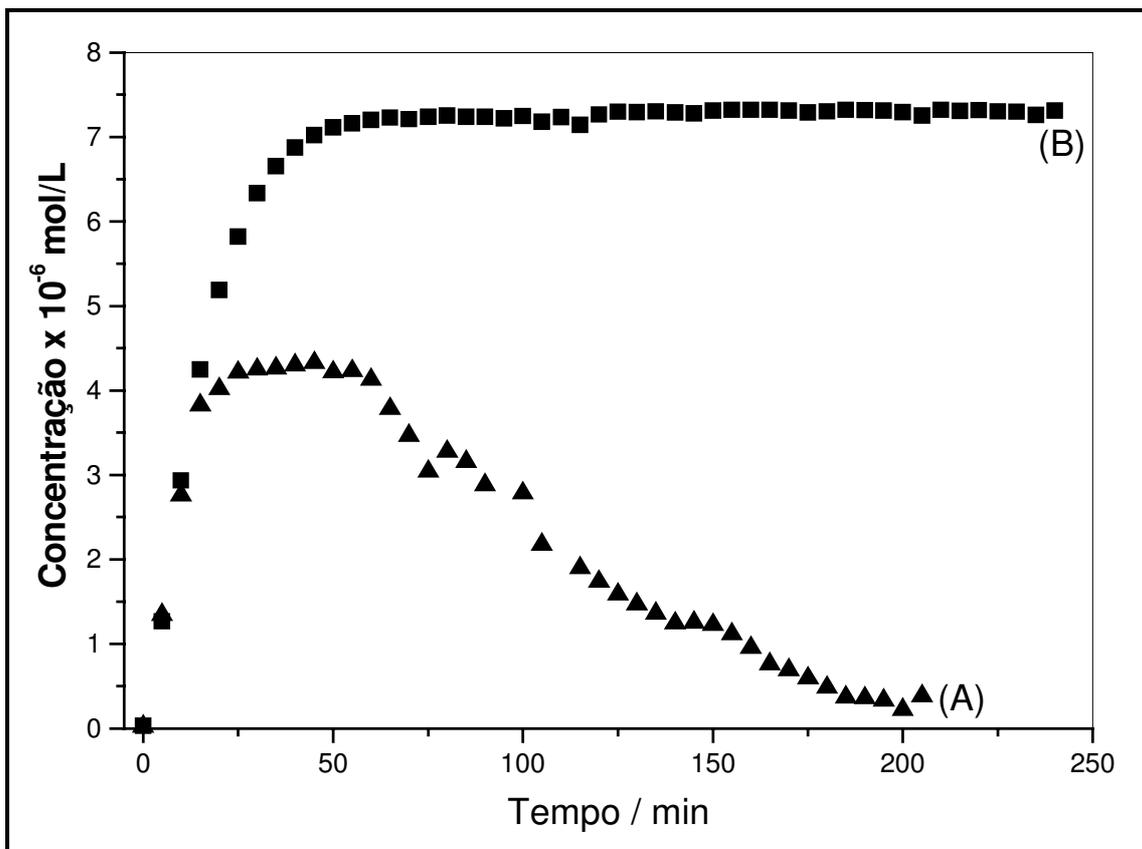


Figura 41. Curvas cinéticas de reação de GSNO com reagente de Griess (A) na presença e (B) ausência de aço-inox no meio reacional.

As curvas apresentadas na figura 41 mostram que a reação da GSNO com solução ácida de Griess resulta na formação do azo composto cerca de 60 minutos após o início da reação e que a concentração deste composto se mantém estável por pelo menos 240 minutos. A concentração de GSNO medida na ausência da placa de aço foi de $7,30 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Essa concentração caiu para $4,33 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com a presença do aço no meio reacional. Essa concentração equivale a 60% da quantidade esperada de GSNO. Portanto, a presença da placa de aço na reação de GSNO com Griess, interfere na determinação da quantidade de GSNO presente em solução. Da mesma maneira, a detecção da GSNO presente nos stents pelo método de Griess em meio ácido foi dificultada devido à decomposição do composto azo na presença de metais do aço dos stents no meio reacional. Desta forma, constatou-se

no presente trabalho que o método de Griess em meio ácido não pode ser usado para a quantificação da eluição de S-nitrosotióis a partir de stents mergulhados diretamente na solução de Griess.

2.3.2. Solução de Griess em meio neutro

A figura 42 mostra a curva cinética de eluição de GSNO para a solução de Griess em meio neutro, a partir de stents revestidos com filmes de PVA/GSNO 5, e o gráfico de barras da quantidade total da GSNO eluída para solução de Griess a partir de filmes soltos ou depositados em stents.

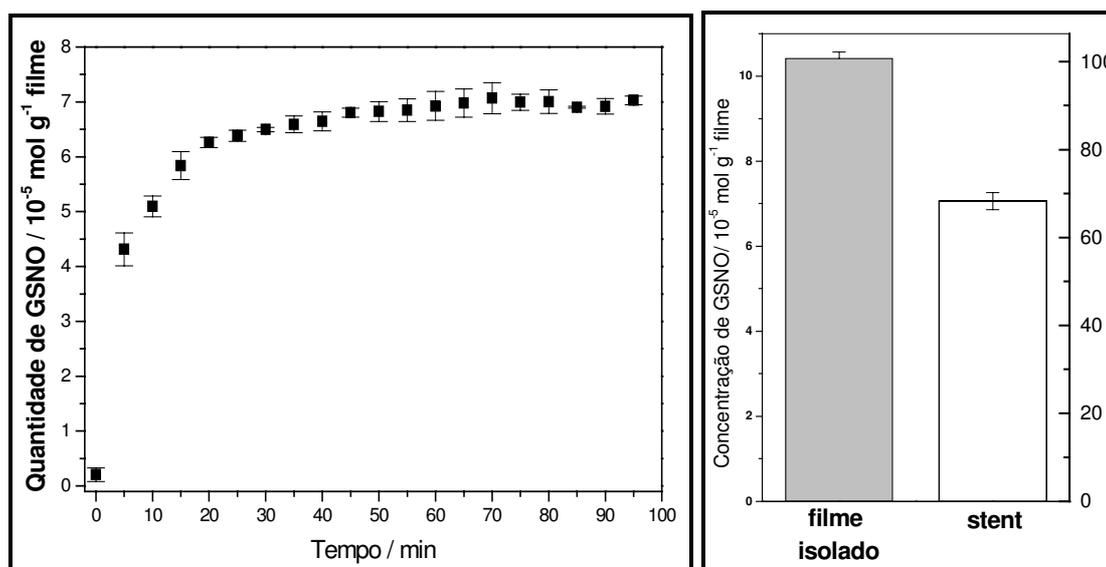


Figura 42. (A) Curva cinética de eluição de GSNO para solução neutra de reagente de Griess a partir de stent revestido com filme não reticulado preparado a partir de solução de PVA/GSNO 5. (B) Gráfico de colunas comparativo da concentração de GSNO eluída para solução neutra de Griess a partir de filmes isolados e de stents revestidos.

A curva cinética apresentada na figura 42 atingiu um patamar em um tempo de reação próximo de 30 minutos, e tem um perfil semelhante à curva de eluição de

GSNO a partir de filmes soltos imersos em solução ácida de Griess (Figura 34). A quantidade de GSNO medida em meio neutro é de 7.5×10^{-5} mol/g filme, cerca de 70% da quantidade de GSNO presente no filme isolado. Portanto, a determinação da quantidade de GSNO eluída de stents pode ser realizada através de reagente de Griess em meio neutro.

2.4. Estimativa da quantidade de GSNO liberada para a parede muscular de uma artéria coronária a partir de um stent implantado

Na hipótese da GSNO se acumular em um espaço correspondente a uma camada de tecido arterial de espessura $d = 0,1$ mm, e considerando-se um stent de comprimento $L = 2$ cm e raio $r = 0,2$ cm, o volume da camada arterial calculado pela equação 14 é de $1,3 \times 10^{-5}$ L.

De acordo com a tabela 15 da sessão 2.2, um stent recoberto com filme não reticulado, preparado a partir de solução PVA/GSNO 5, seco por evaporação, possui $4,0 \times 10^{-5}$ g de filme depositado. Pelo método de Griess em meio neutro, este stent pode eluir 7.5×10^{-5} mol de GSNO por grama de filme, ou seja, um total de 3×10^{-9} mol de GSNO. Considerando-se que 60% da GSNO presente no stent decomponha termicamente devido à esterilização por óxido de etileno a 45°C , de acordo com os resultados obtidos na sessão 1.11, a quantidade de GSNO que pode eluir do stent é de 3×10^{-5} mol de GSNO por grama de filme.

Em geral, os stents implantados medem 2.0 cm de comprimento, o dobro do tamanho dos stents utilizados nos experimentos de eluição de GSNO. Assim, considerando-se um stent de 2,0 cm de comprimento, a quantidade máxima de GSNO que pode eluir do stent de acordo com os resultados obtidos pelo método de Griess é de 6×10^{-5} mol por grama de filme depositado sobre o stent. A massa de filme depositada sobre um stent de 2,0 cm revestido com PVA 5 é ca. 8×10^{-5} g. Assim, a quantidade máxima que pode eluir desse stent, após a implantação é de $4,8 \times 10^{-5}$ mol.

Se 50% da quantidade de GSNO se difundir para o interior da camada arterial

e a outra metade se difundir para o sangue, na luz do vaso, tem-se uma carga total de GSNO acumulada nesta camada da parede arterial de 2.4×10^{-9} mol. Assim, a concentração de GSNO na camada arterial é de cerca de 180 $\mu\text{mol GSNO/L}$ de camada arterial. Em outras palavras, a concentração de GSNO nesta camada de tecido arterial poderia atingir um valor da ordem de 200 μM .

Dados da literatura indicam que concentrações de NO acima de 100 μM exercem ação tóxica apoptótica (Iipke e West, 2005). Este valor representa uma concentração cerca de 1000 vezes maior que as concentrações endógenas de NO que exercem ação sinalizadora, que se encontram na faixa nanomolar (Koesling, 2000). Portanto, mesmo considerando-se as perdas por decomposição, esterilização e eluição durante a angioplastia, a concentração de GSNO disponível nos stents pode ser considerada suficiente para produzir ações sinalizadoras do NO na inibição da proliferação de células musculares lisas e da agregação plaquetária. Além disso, a possibilidade de reduzir a concentração de GSNO no filme polimérico pode levar a um aumento da sua estabilidade, conforme já se verificou em trabalhos anteriores (Oliveira e cols., 2002).

III. CONCLUSÕES

- Análises por DSC e difração de raios X, mostraram que o grau de cristalinidade do PVA aumenta com o número de ciclos de C/D, e com a secagem por sublimação do filme congelado.
- O aumento da concentração da solução de PVA de 0,5 para 2,5 % (m/v) leva a um aumento da cristalinidade dos filmes secos por evaporação. A cristalinidade de filmes obtidos a partir de soluções 10% (m/v) é menor do que a obtida com soluções 2,5 % (m/v).
- O aumento da cristalinidade se reflete em uma diminuição da velocidade de eluição da GSNO para a fase aquosa e da velocidade de dissolução e grau de intumescimento da matriz.
- A secagem por sublimação e a utilização de apenas um ciclo de C/D, são as estratégias que levam a uma maior redução do coeficiente de difusão da GSNO. Este efeito pode ser atribuído ao aumento da densificação da fase amorfa, obtido nestes processos.
- Os filmes secos por sublimação apresentaram uma estrutura tridimensional esponjosa constituída por filamentos interligados.
- A utilização da solução PVA/GSNO 0,5 % (m/v) permitiu a obtenção de revestimentos sem a formação de filmes entre as hastes metálicas dos stents. Estimou-se que estes stents podem liberar cerca de 30 μ moles/g de PVA para a parede arterial, após a esterilização com óxido de etileno a 45-65 °C.
- O filme de PVA/GSNO com maior potencial para o revestimento de stents, com a finalidade de inibição da reestenose, é o filme preparado a partir de solução de PVA 0,5 % (m/v), contendo 0.018% (m/v) de GSNO, submetido a três ciclos de C/D e seco por sublimação.

Referências

Allaire E., Clowes A. W.; Endothelial cell injury in cardiovascular surgery: the intimal hyperplastic response. *Ann thorac Surg* ; 63, p. 582-591 (1997)

Bajpai, A. K., Saini, R.; Preparation and characterization of novel biocompatible cryogels of poly(vinyl alcohol) and egg-albumin and their water sorption study; *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 17, p. 49-61 (2006)

Bertrand O. F., Sipehia R., Mongrain R., Rodes J., Tardif J. C., Bilodeau L., Cote G., Bourassa M. G.; Biocompatibility aspects of new stent technology. *J. Am. Coll. Cardiol.*; 32:562-571 (1998).

Bray, J. C., Merrill E. W.; Poly(vinyl alcohol) hydrogels. Formation by electron beam irradiation of aqueous solutions and subsequent crystallization. *J. Appl. Polym. Sci.* 17, 3779-3794 (1973)

Brieger D., Topol E.; Local drug delivery systems and prevention of restenosis. *Cardiovasc. Res.*; 35:405-413 (1997)

Bunn C. W.; Crystal structure of poly (vinyl alcohol); *Nature* 161, 929-930, (1948)

Butler A. R. and Rhodes P.; Chemistry, analysis, and biological roles of S-Nitrosothiols, *Anal. Biochem.* 249, 1-9 (1997)

Campbell D., Pethrick R. A., White J. R.; *Polymer characterization: Physical techniques*, second edition, Staley Thornes (publishers) Ltd, United Kingdom (2000)

Cassu, S. N., *Blendas e poli(álcool vinílico) e poli (vinil pirrolidona): estudo do comportamento de fases*, Tese de Mestrado, Unicamp, (1995)

Cook, J. A, Kim S.Y., Teague D., Krishna M.C., Pacelli R., Mitchell J.B., Vodovotz Y., Nims R.W., Christodoulou D., Miles A.M., Grisham M.B., Wink D.A.; Convenient colorimetric and fluorimetric assays for s-nitrosothiols; *Analytical Biochemistry*; 238, 150-158 (1996)

Costa P., Sousa Lobo J. M.; Modelling and comparison of dissolution profiles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, Amsterdam, v.13, n. 2, p. 123-133 (2001)

Crank, J.; *The mathematics of diffusion*, 2nd ed, Oxford University Press, New York, (1975).

Ettenson D. S., Edelman E. R.; Local drug delivery: an emerging approach in the treatment of restenosis. *Vasc Med.*;5:97-102 (2000).

Eyring H.; Theory of rate processes, *J. Chem. Phys.*, 4, p. 283-289, (1936)

Field L., Dilts R. V., Ravichandran R., Lenhert P. G., Carnahan, G. E.; J. C. S. Chem. Commun. 249-250 (1978)

Finch C. A.; Poly (vinyl alcohol): Properties and applications. Wiley, New York (1973).

Flory P.J.; Principles of polymer Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, NY, (1953).

Franz, T. J., Percutaneous absorption and the relevance of in vitro data. J. Invest. Derm., 64, 190-195 (1975)

Fujii K., In: Finch C. A.; PVA properties and applications. Wiley, New York, pp 203-231 (1973).

Fujita, H.; Diffusion in polymer-diluent systems, Fortschr. Hochpolym.-Forsch, 3, p. 1-47, (1961)

Garas S. M., Huber P., Scott N. A.; Overview of therapies for prevention of restenosis after coronary interventions. Pharmacology & Therapeutics, 92, p. 165-178 (2001)

Gibaldi M., Feldman S.; Establishment of sink conditions in dissolution rate determinations – theoretical considerations and application to nondesintegrating dosage forms. J. Pharm. Sci., 56, 1238-1242 , (1967)

Gruentzig A. P., Senning A., Siengenthaler W. E.; Nonoperative dilation of coronary-artery stenosis: Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. N. Engl. J. Med. 301, 61-68 (1979)

Harris H. E., Kenney J. F., Willcockson G. W., Chiang R., Friedlander H.N.; Structure-property relationships of poly(vinyl alcohol). II. The influence of molecular regularity on the crystallization-dissolution temperature relationships of poly(vinyl alcohol) J.Polym. Sci A1, 4, 665 - 677 (1966).

Hassan C. M., Peppas N. A.; Structure and applications of poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods; Advances in polymer Science, 153, p. 38-65, (2000)

Hassan C. M., Trakarnpan P., Peppas N.A.; Water solubility characteristics of poly(vinyl alcohol) and gels prepared by freezing /thawing Processes; in: Water soluble polymers, Amjad Plenum Press, New York, p. 31-40 (1998)

Hassan C., Peppas N.A.; Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels, Macromolecules, 33, 2472-2479 (2000)

Hatakeyema T., Uno J., Yamada C., Kishi A., Hatakeyema, H.; Gel –sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing and thawing techniques. Thermochimica acta 431, p. 144-148 (2005)

Hickey A. S., Peppas N. A.; Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranas prepared by freezing/thawing techniques; *J. Membrane Science*, 107, p. 229-237, (1995).

Ignarro L. J., Napoli C., Loscalzo J.; Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview; *Circulation research, Review*, 11, p. 21- 28, (2002)

Janero D. R. and Ewing J. F.; Nitric oxide and post angioplasty restenosis: pathological correlates and therapeutic potential; *Free Radical Biology & Medicine*, vol.29, n. 12, p. 1199-1221; (2000)

Jaworski K., Kinard F., Goldstein D., Holvoet P., Trouet A., Schneider Y-J., Remacle C.; S-nitrosothiols do not include oxidative stress, contrary to other nitric oxide donors, in cultures of vascular endothelial or smooth muscle cells. *Eur. J. Pharmacol.*; 425, p. 11-19; (2001)

Koesling D., Friebe A.; Structure-Function Relationships in NO-Sensitive Guanylyl Cyclase; in *Nitric Oxide – Biology and Pathobiology*; edited by Louis Ignarro; Academic Press, (2000)

LeBreton, H.; Topol, E.; Plow, E. F.; Evidence for a pivotal role of platelets in vascular reocclusion and restenosis. *Cardiovasc. Res.*, 31, 235-236 (1996).

Lemos P. A., Serruys P. W., Sousa J. E.; Drug-eluting stents: cost versus clinical benefit. *Circulation*;107:3003-7 (2003)

Lemos P. A., Serruys P. W., van Domburg R. T., Saia F., Arampatzis C. A., Hoyer A., Degertekin M., Tanabe K., Daemen J., Liu T. K., McFadden E., Sianos G., Hofma S. H., Smits P. C., van der Giessen W. J., de Feyter P. J.; Unrestricted utilization of sirolimus-eluting stents compared with conventional bare stent implantation in the "real world": the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) registry. *Circulation*;109:190-195 (2004).

Libby P.; Atherosclerosis: The new view; *Scientific American*,p. 47-55; (2002)

Lipke E. A., West J. L.; Localized delivery of nitric oxide from hydrogels inhibits neointima formation in a rat carotid balloon injury model; *Acta Biomaterialia* 1; p. 597-606; (2005)

Lopes C. M., Lobo J. M. S., Costa P., Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos, *Revista brasileira de ciências farmacêuticas*, vol.41, 2, p. 143-154, (2005)

Lucas E. F., Soares B. G., Monteiro E.; Caracterização de polímeros: Determinação de peso molecular e análise térmica, Ed. E-papers, Rio de Janeiro, (2001)

Maalej N., Albrecht R., Loscalzo J., Folts J. D.; The potent platelet inhibitory effects of S-nitrosated albumin coating of artificial surfaces. *J Am Coll Cardiol.*;33:1408-1414 (1999).

Manas Chanda; *Advanced polymer chemistry: a problem solving guide*; Marcel Dekker Inc. New York, (2000)

Mandelkern L. J.; *Cristallization of Polymers*, vol 1, 2nd ed. Equilibrium concepts. Cambridge University Press, Cambridge, p. 70, (2002)

Mario C., Grube E., Nisanci Y., Reifart N., Colombo A., Rodermann J., Muller R., Umman S., Liistro F., Montorfano M., Alt E.; Moonlight: a controlled registry of an iridium oxide-coated stent with angiographic follow up. *Int. J. Cardiol.* , 95, 329-331 (2004).

Mark, J. E.; *Physical Properties of Polymers Handbook*; American Institute of Physics: Woodbury, NY, (1996).

Marks D. S., Vita J. A., Folts J. D., Keaney J. F. Jr., Welch G. N., Loscalzo J.; Inhibition of neointimal proliferation in rabbits after vascular injury by a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *J Clin Invest*;96:2630-8 (1995).

Marten F. L.; Vinyl Alcohol Polymers, em: "Encyclopedia of polymers science and Engineering", Mark, H. F., Bikales N. M., Overberger, C. G., Menges, G., Kroschwitz, J. I., (eds.), 2^a ed., John Wiley & Sons, New York, vol. 17, p. 167-198 (1988)

Merclin N., Bramer T., Edsman K.; Iontophoretic delivery of 5-aminolevulinic acid and its methyl ester using a carbopol gel as vehicle, *J. Control. Release*, v. 98, p. 57-65, (2004)

Missel E., César F.B., Dutra F.L., Cordeiro F. B., Fraiha F.; Stents com eluição de medicamentos, *Série Monografias Dante Pazanese*, São Paulo, IDCP, Volume 1 – n° 1, p. 1-6, (2002)

Moses J. W., Leon M. B., Popma J. J., Fitzgerald P. J., Holmes D. R., O'Shaughnessy C., Caputo R. P., Kereiakes D. J., Williams D. O., Teirstein P. S., Jaeger J. L., Kuntz R. E.; Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.*;349:1315-23 (2003).

Mori Y., Tokura H., Yoshikawa M.; Properties of hydrogels synthesized by freezing and thawing aqueous polyvinyl alcohol solutions and their applications; *Journal of materials science*; 32; p. 491-496; (1997).

Mowery K. A., Schoenfisch M. H., Saavedra J. E., Keefer L. K., Meyerhoff M. E.; Preparation and characterization of hydrophobic polymeric films that are thromboresistant via nitric oxide release. *Biomaterials*;21:9-21(2000).

Nambu M., US Patent 4,472,542 (1984)

Nims R. W., Darbyshire J.F., Saavedra, J.E., Christodoulou D., Hanbauer I., Cox G.W., Grisham M.B., Laval F., Cook J.A., Krishna M.C., and Wink D.A.; Colorimetric Methods for the determination of Nitric Oxide concentration in Neutral Aqueous Solution, *Methods: A companion to methods in Enzymology* 7, 48-54 (1995)

Oliveira M. G., Seabra A. B.; Filmes poliméricos sólidos de poli (álcool vinílico) e poli (álcool vínílico) – poli (vinil pirrolidona), contendo S-nitrosotióis doadores de NO, bem como os métodos para a sua preparação. PI 0201167-0, (2002)

Oliveira M. G., Shishido S. M., Seabra A. B., Morgon N. H.; Thermal stability of primary s-nitrosothiols: roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *J Phys Chem A*; 106(38):8963-8970 (2002).

Papadokostaki K. G., Petropoulos J. H.; Kinetics of release of a model disperse dye from supersaturated cellulose acetate matrices, *J. Control. Release*, v. 54, p. 251-264, (1998)

Parrat J. R.; Nitroglycerine, the first one hundred years: new facts about an old drug; *J. Pharm. Pharmacol.*; 31, p. 801-809, (1979)

Peppas N.A., em: Peppas N.A., (ed) *Hydrogels in medicine and pharmacy*, vol2, Polymers. CRC, Boca Raton, FL, pp 1-48 (1987).

Peppas N.A., Merrill E. W.; Crosslinked poly(vinyl alcohol) hydrogels as swollen elastic networks; *J. Appl Polym Sci* 21: 1763-1770 (1977).

Peppas N.A., Merrill E. W.; Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications; *J. Biomed Mater. Res.*, 11: 423-434.(1977)

Peppas N.A.; Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing; *Makromol. Chem.* 176, 3433-3437 (1975)

Peppas N.A., Stauffer S.R.; Reinforced uncrosslinked poly (vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review; *J. Controll. Release* 16, 305-310 (1991)

Peppas N. A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H.; Hydrogels in pharmaceutical formulations, Review article, *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*, v. 50, p. 27-46, (2000)

Pulfer S. K., Ott D., Smith D. J.; Incorporation of nitric oxide-releasing crosslinked polyethyleneimine microspheres into vascular grafts. *J Biomed Mater Res.*;37:182-9 (1997).

Ricciardi R., Auriemma F., Gaillet C., de Rosa C., Lauprête F.; Investigation of the Crystallinity of freeze/thaw poly(vinyl alcohol) hydrogels by different techniques; *Macromolecules*, 37, p. 9510-9516 (2004)

Ricciardi R., Mangiapia G., Lo Celso F., Paduano L., Triolo R., Auriema F., De Rosa C., Lauprête F.; Structural organization of Poly(vinyl alcohol) hydrogels obtained by freezing and thawing techniques: a SANS study; *Chem. Mater*, 17, 1183-1189 (2005)

Ross R., Glomset J.; The pathogenesis of atherosclerosis; *N. Engl. J. Med.* 295, p. 369-377; (1976)

Saville B.; A scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols; *Analyst* 83, p. 670-672 (1958)

Seal B. L., Otero T. C.; Polymeric biomaterials for Tissue and organ regeneration; *Mat Sci Eng*, 34, p.147-230 (2001)

Siepmann J., Peppas N. A.; Hydrophilic matrices for controlled drug delivery: An improved mathematical model to predict the resulting drug release kinetics (the "sequential layer" model), *Pharm. Res.*, v. 17, n. 10, p. 1290-1298, (2000)

Siepmann J., Peppas N.A.; Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropylmethylcellulose (HPMC). *Adv. Drug Deliv. Rev.*, New York, v. 48, n. 2-3, p. 139-157, (2001).

Sigwart U.; Puel J.; Irkovitch M.; Joffre F.; Kappenberger L.; Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty. *N. Engl. J. Med.* 316, 70-76 (1987)

Shishido S. M., de Oliveira M. G.; Polyethylene glycol matrix reduces the rates of photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteine, *Photochem. Photobiol*; 71(3): 273-280 (2000).

Smith D. J., Chakravarthy D., Pulfer S., Simmons M. L., Hrabie J. A., Citro M. L., Saavedra J. E., Davies K. M., Hutsell T. C., Mooradian D. L., Hanson S. R., Keefer L. K.; Nitric oxide releasing polymers containing the [N(O)NO]- group. *J Med Chem.*;39:1148-1156 (1996).

Stone G. W., Ellis S. G., Cannon L., Mann J. T., Greenberg J. D., Spriggs D., O'Shaughnessy C. D., DeMaio S., Hall P., Popma J. J., Koglin J., Russell M. E.; Comparison of a polymer-based paclitaxel-eluting stent with a bare metal stent in patients with complex coronary artery disease: a randomized controlled trial. *Jama.*;294:1215-23 (2005).

Stone G. W., Ellis S. G., Cox D. A., Hermiller J., O'Shaughnessy C., Mann J. T., Turco M., Caputo R., Bergin P., Greenberg J. Popma J. J., Russell M. E.; One-year

clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation*;109:1942-7 (2004).

Higuchi T.; Analysis of data on the medicament release from ointments, *J. Pharm. Sci.*, 51, 802-804, (1962)

Tanigami T., Yano K., Yamaura K., Matsuzawa S.; Anomalous swelling of poly(vinyl alcohol) film in mixed solvents of dimethylsulfoxide and water *Polymer*, 36, 2941 - 2946 (1995).

Tubbs R. K.; Sequence distribution of partially hydrolyzed poly(vinyl acetate) *J Polym Sci A1* 4, 623 - 629 (1966) .

Vogel R.A.; Coronary risk factors, endothelial function and atherosclerosis: a review. *Clin. Cardiol.*; 20, p. 426-432; (1997)

Wagner J. G.; Interpretation of percent dissolved-time plots derived from In vitro testing of conventional tablets and capsules. *J. Pharm. Sci.*, 58, 1253-1257, (1969)

Watase M., Nishinari K.; Rheological and DSC changes in poly(vinyl alcohol) gels induced by immersion in water, *J. Appl Polym. Sci. Polym. Phys.*, 23, 1803 (1985)

Willcox P. J., Howie D. W., Schmidt-Rohr K., Hoagland D. A., Gido S. P., Pudjijanto S., Kleiner L. W., Venkatraman S.; Microstructure of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling; *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Physics*, vol. 37, 3438-3454 (1999)

Yasuda H., Lamaze C. E.; Permselectivity of solutes in homogeneous water-swollen polymer membranes, *J. Macromol. Sci. Phys. B5*, p. 111-134, (1971)

Yoon J. H., Wu C. J., Homme J., Tuch R. J., Wolff R. G., Topol E. J., Lincoff A. M.; Local delivery of nitric oxide from an eluting stent to inhibit neointimal thickening in a porcine coronary injury model. *Yonsei Med J.*;43:242-51 (2002).