



**UNIVERSIDADE ESTADUAL
DE CAMPINAS**

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

Tese de Doutorado

**Filmes sólidos de PVA eluidores de GSNO
para aplicações tópicas e para o revestimento
de stents**

Candidata: Maíra Martins de Souza Godoy Simões

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira

Junho de 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Si51f Simões, Maíra Martins de Souza Godoy.
Filmes sólidos de PVA eluidores de GSNO para
aplicações tópicas e para revestimento de stents / Maíra
Martins de Souza Godoy. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Poli (álcool vinílico). 2. S-nitrosoglutathione.
3. Reticulação física. 4. Ciclos de congelamento/
descongelamento. I. Oliveira, Marcelo Ganzarolli de.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. III. Título.

Título em inglês: GSNO-eluting PVA solid films for topical application and for stents coatings

Palavras-chaves em inglês: Poly (vinyl alcohol), S-nitrosoglutathione, Physical crosslinking, Freezing/thawing cycles

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Marcelo Ganzarolli de Oliveira (orientador), Prof. Dr. Luis Henrique Catalani (IQ-USP), Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santa (FEQ-UNICAMP), Prof. Dr. Daniel Rettori (Depto Ciências Exatas e da Terra/UNIFESP)

Data de defesa: 20/06/2011

À minha mãe, Yara.
Aos meus irmãos Omar, Silmara e José Luiz.

Agradecimentos

- Ao Prof. Marcelo Ganzarolli de Oliveira, pela orientação e incentivo.
- À Scitech Produtos Médicos Ltda., e a Inovatech, pelo fornecimento dos stents.
- Ao Daniel Razzo, pela obtenção das micrografias eletrônicas.
- À Fabiane M. Favoretto, pela realização dos ensaios de DSC e pelo suporte durante o desenvolvimento desse trabalho.
- Ao Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, pela utilização da linha de SAXS.
- Ao CNPq, pela bolsa de doutorado.
- Ao professor Marcelo Brocchi e ao seu aluno Dorival Martins; ao professor Cássio e seu aluno Alessandro; e ao Dr. Fernando Ganzarolli de Oliveira pela realização de trabalhos em colaboração;
- Às minhas gerentes Patrícia Steinmetz e Simone Tioffi por compreenderem minhas ausências em função da elaboração da tese;
- Aos amigos do IQ, pelas conversas, desafios, desabafos e companhia neste longo período;
- Aos amigos da Theraskin, que me acolheram, incentivaram e deram força para continuar a jornada.

CURRICULUM VITAE

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Maíra Martins de Souza Godoy Simões

Data de nascimento: 02/11/1981

2. FORMAÇÃO

2.1. Doutorado

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Área: Físico – Química

Período: Agosto de 2006 – junho de 2011

Título do projeto: Filmes sólidos de PVA eluidores de GSNO para aplicações tópicas e para o revestimento de stents.

2.2. MESTRADO

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Área: Físico – Química

Período: Agosto de 2004 – junho de 2006

Título do projeto: Revestimento de stents com filmes de PVA eluidores de S-nitrosoglutationa

2.3. GRADUAÇÃO

Curso: Bacharelado em Química com atribuições tecnológicas e Licenciatura em Química.

Instituição: Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

Período: 1999-2003

3. ATUAÇÃO PROFISSIONAL

Jan/2010-atual: Theraskin Laboratórios Ltda.

Cargo: Pesquisadora Química

Atribuições: Pesquisa Bibliográfica para o desenvolvimento de novos produtos, busca e avaliação de patentes, auxílio ao desenvolvimento de formulações, avaliação de estabilidade de emulsões, acompanhamento de testes físico-químicos, pesquisa de produtos de degradação, realização de testes de pré-formulação, avaliação de “Drug Master Files”.

4. ESTÁGIOS

Estágio de nível superior

Rhodia Brasil S.A. - jan-dez/2003 - 40h/semana - Físico-Química

Departamento: Centro de Pesquisas de Paulínia – CPP

5. PATENTES

5.1. Depósito de Patente Internacional

Stents coated with NO- and S-nitrosothiol-eluting hydrophilic polymeric

blends; Oliveira, M. G., Moreira, A. M., **SIMÕES, M. M. S. G.**, Seabra, A. B.

Morato, S. P. Scitech produtos medicos Ltda. E Universidade Estadual de Campinas (Unicamp) – US 11/997,087 (28.01.2008)

5.2. 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.

6. **ARTIGOS PUBLICADOS**

- 6.1. **Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Polyester for the Coating of Blood-Contacting Artificial Materials**; Seabra, A.B., Martins, D., da Silva R., **SIMOES, M.M.S.G.**, Brocchi, M., and de Oliveira, M. G. *Artificial Organs*, 34 (7): E204-E214 (2010).
- 6.2. Poly(vinyl alcohol) Films for Topical Delivery of S-Nitrosoglutathione: Effect of Freezing–Thawing on the Diffusion Properties ; **Simões, M. M. S. G.** and Oliveira M. G. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 93B (2):416-424 (2010)

7. **CONGRESSOS INTERNACIONAIS E NACIONAIS (MAIS RECENTES)**

- 7.1. **SIMÕES, M. M. S. G.** ; F. G. de Oliveira ; Barreto, G. ; Oliveira, M. G. Sodium nitroprusside-eluting stents as a new alternative for reducing platelet adhesion and smooth muscle cell proliferation. 6th International Conference on the Chemistry, Biology and Therapeutic applications of Nitric Oxide – jun/2010 – Kyoto – Japão.
- 7.2. **M. M. S. G. Simões**, R. S. Vieira and M. G. de Oliveira. Anti-thrombogenic properties of blended Poly (vinyl alcohol)/chitosan films. 11th International Conference on Advanced Materials (ICAM 2009) – Rio de Janeiro, 2009 – Oral presentation.
- 7.3. **SIMÕES, M. M. S. G.**; F. G. de Oliveira; Barreto, G. ; Oliveira, M. G. Translational Research Symposium - Society for Biomaterials, Atlanta, Georgia – USA. 2008.- Oral presentation
- 7.4. **SIMOES, M. M. S. G.**; de Oliveira, M. G., I Encontro sobre Estruturas Auto-Organizadas em Soluções e Interfaces – I AutoOrg, São Pedro, SP.-2008
- 7.5. F. G. de Oliveira ; **SIMÕES, M. M. S. G.**; Barreto, G. ; Oliveira, M. G., São Paulo, SP. XXIX Congresso da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo, 2008 – Apresentação Oral.
- 7.6. **SIMÕES M. M. S. G.**, da Silva R., and de Oliveira MG; Effect of freezing-thawing and chemical crosslinking on the structure of poly (vinyl alcohol) films. **18ª Reunião Anual de Usuários (RAU)** do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) – Campinas, SP – 18 e 19 de fevereiro de 2008.

8. **IDIOMAS**

- Inglês (Avançado)

9. **CURSOS EXTRACURRICULARES**

- 9.1. **Curso de procedimentos em dermatologia experimental**
Associação Brasileira de Cosmetologia
14 a 18 de fevereiro de 2011 – carga horária 40h
- 9.2. **Escola de Nanobiotecnologia – Centro Brasileiro-Argentino de Nanotecnologia**
Universidad Nacional de La Plata – Buenos Aires - Argentina
03 a 12 de novembro de 2008 – carga horária:64h
- 9.3. **Curso Intermediário de Capacitação em Propriedade Intelectual**
24 a 28 de maio de 2010 - USP - São Carlos / SP -
Carga horária: 40h
- 9.4. **Curso Base Derwent II – Patentes**
Instituto de Inovação (INOVA/Universidade Estadual de Campinas)
28/06/2004 – carga horária: 8h

1. Resumo

O Poli(álcool vinílico) (PVA) é polímero biocompatível que pode ser usado como matriz para a incorporação de S-nitrosoglutationa (GSNO), que é uma molécula endógena que exerce todas as funções bioquímicas do óxido nítrico (NO). Os principais objetivos deste trabalho foram a obtenção de filmes sólidos de PVA capazes de eluir GSNO localmente, que pudessem ser utilizados para aplicações tópicas e para o recobrimento de stents. Os filmes de PVA foram reticulados fisicamente através de ciclos de congelamento/descongelamento (C/D). Verificou-se que a aplicação de 1 a 5 ciclos C/D leva a um aumento da cristalinidade dos filmes comparada aos filmes não submetidos a C/D. Este efeito está associado ao aumento do raio de giro de estruturas espalhadoras de raios X e com a redução do coeficiente de difusão da GSNO. A liberação tópica de GSNO a partir de filmes de PVA na pele de voluntários levou a um aumento significativo do fluxo sanguíneo dérmico, medido por fluxometria com laser Doppler. Demonstrou-se que a aplicação de ciclos C/D pode ser usada para controlar a velocidade e a intensidade de aumento de fluxo sanguíneo. Filmes de PVA/GSNO aplicados como revestimentos de poços de placas de cultura de células mostraram atividade bactericida dose e tempo-dependentes contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, sendo capazes de esterilizar completamente estas duas bactérias multi-resistentes após 6 h de incubação. Filmes de PVA/GSNO permitiram a obtenção de revestimentos aderentes sobre a superfície de stents intracoronários de aço inox levando a uma redução significativa da adesão plaquetária após incubação com sangue total. Estes resultados permitem propor o uso de filmes de PVA/GSNO fisicamente reticulados para aplicações tópicas no tratamento de lesões infectadas, para promover a vasodilatação de tecidos isquêmicos e para a melhoria das propriedades hemocompatíveis de dispositivos de contato sanguíneo.

2. Abstract

Poly(vinyl alcohol) (PVA) is a biocompatible polymer that can be used as a matrix for incorporation of S-nitrosoglutathione (GSNO), an endogenous molecule that exerts all the biochemical functions of nitric oxide (NO). The main objectives of this work were to obtain solid PVA films capable of releasing GSNO locally, which could be used in topical applications and for the coating for stents. PVA films were physically crosslinked through freezing-thawing cycles (F/T). It was observed that films subjected to 1 to 5 cycles shows higher crystallinity than films not subjected to F/T. This effect is associated with an increase in the gyration radius of the X-ray scattering structures and with a decrease in the GSNO diffusion coefficient. Topical GSNO release from PVA films on the skin of volunteers led to a significant increase of dermal blood flow, measured by laser Doppler flowmetry. It was shown that F/T cycles can be used to control the rate and intensity of blood flow increase. PVA/GSNO films applied as coatings of cell-culture plate wells showed dose and time-dependent bactericidal activities against *S. aureus* and *P. aeruginosa*, being able of completely sterilizing these mult-resistant bacteria after 6 h of incubation. PVA/GSNO films allowed the formation of adherent coatings on the surface of intracoronary stainless steel stents, and lead to a significant reduction of platelet adhesion after incubation with whole blood. These results allow suggesting the use of physically crosslinked PVA/GSNO films in topical applications for the treatment of infected lesions, for promoting the vasodilation of ischemic tissues and for improving the hemocompatible properties of blood contact devices.

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Propriedades químicas e bioquímicas do NO	1
1.2. Doadores de NO	8
1.3. Materiais poliméricos liberadores de RSNOs e NO	17
1.4. Poli(álcool vinílico) como matriz para liberação de RSNOs	18
2. OBJETIVOS	21
3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE DIFUSÃO IN VITRO DE FILMES DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) PREPARADOS POR CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO.	22
3.1. Hidrogéis de PVA produzidos por ciclos de congelamento/descongelamento	22
3.1.1. Influência da estrutura do PVA nas propriedades dos Criogéis	28
3.1.2. Influência da temperatura e velocidade de resfriamento nas características dos hidrogéis de PVA	29
3.1.3. Efeito dos ciclos de congelamento/descongelamento nas propriedades de difusão de géis de PVA30	
3.2. Parte experimental	32
3.2.1. Materiais e reagentes	32
3.2.2. Síntese da S-nitrosoglutationa	32
3.2.3. Preparação das soluções de PVA	32
3.2.4. Preparação dos filmes de PVA e realização dos ciclos de congelamento/descongelamento (C/D)	33
3.2.5. Calorimetria Diferencial por Varredura (<i>Differential Scanning Calorimetry – DSC</i>)	33
3.2.6. Espalhamento de Raio-X de baixo ângulo (<i>Small Angle X-ray scattering – SAXS</i>)	34
3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
3.2.8. Grau de Intumescimento (<i>Swelling Degree – SD</i>)	35
3.2.9. Difusão de GSNO	36
3.2.10. Cálculo do coeficiente de difusão	36
3.3. Resultados e Discussão	37
3.3.1. Propriedades Térmicas	37
3.3.2. Perfis de SAXS	39
3.3.3. Morfologia da Superfície	45
3.3.4. Grau de Intumescimento	48
3.3.5. Medidas de difusão	50
3.4. Conclusões	53
4. APLICAÇÃO TÓPICA DE FILMES DE PVA/GSNO E AVALIAÇÃO DE SUA AÇÃO VASODILADORA	54
4.1. Cicatrização de feridas e fenômeno de Raynaud	54

4.2. Procedimento Experimental	56
4.2.1. Medidas de perfusão sanguínea microvascular por laser Doppler	56
4.3. Resultados e Discussão	58
4.3.1. Fluxometria por Laser Doppler	58
4.4. Conclusões	62
5. AÇÃO BACTERICIDA DE FILMES DE PVA ELUIDORES DE GSNO	64
5.1. Introdução	64
5.2. Parte experimental	67
5.2.1. Materiais e reagentes	67
5.2.2. Incorporação de GSNO na solução de PVA	67
5.2.3. Revestimento dos poços de placas de cultura com filmes de PVA e PVA/GSNO	68
5.2.4. Liberação de GSNO a partir dos filmes de PVA/GSNO	68
5.2.5. Linhagem de bactérias	70
5.2.6. Atividade bactericida de filmes de PVA/GSNO	70
5.2.7. Análise estatística	71
5.3. Resultados e Discussão	71
5.3.1. Liberação de GSNO a partir de filmes de hidrogéis de PVA/GSNO	71
5.3.2. Atividade bactericida	74
5.4. Conclusões	79
6. PROPRIEDADES ANTIPLAQUETÁRIAS DE FILMES DE PVA ELUIDORES DE GSNO	80
6.1. Problemas associados ao uso de dispositivos médicos de contato sanguíneo	80
6.1.1. Processos Fisiológicos envolvidos na cascata de coagulação	83
6.1.2. Materiais hemocompatíveis	85
6.2. Procedimento Experimental	88
6.2.1. Materiais e reagentes	88
6.2.2. Preparação das soluções de PVA contendo GSNO	89
6.2.3. Revestimento de stents metálicos com soluções de PVA/GSNO	89
6.2.4. Eluição de NO dos stents revestidos com PVA-GSNO	89
6.2.5. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)	91
6.2.6. Testes de adesão plaquetária	91
6.3. RESULTADOS	92
6.3.1. Perfil de liberação de NO	92
6.3.2. Morfologia da Superfície de stents revestidos	94

6.3.3. Avaliação de adesão plaquetária	96
6.4. Conclusões	102
7. FILMES DE PVA ELUIDORES DE RAPAMICINA	103
7.1. Stents eluidores de Rapamicina e o risco de trombose tardia	103
7.2. Procedimento experimental	104
7.2.1. Preparação da solução de PVA/Rapamicina	104
7.2.2. Revestimento de stents com filmes de PVA/Rapamicina	105
7.2.3. Acompanhamento da eluição de Rapamicina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	105
7.2.4. Avaliação morfológica	106
7.3. Resultados e discussão	106
7.3.1. Acompanhamento da eluição de agente imunossupressor para solução fisiológica a partir de matriz de PVA por HPLC.	106
7.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	110
7.4. Conclusões	111
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	112
9. REFERÊNCIAS	113

1. INTRODUÇÃO

O controle da fisiologia celular nos organismos ocorre através de um sistema de transdução de sinais extremamente complexo e dependente de mecanismos de estímulo-resposta (Matsumoto, et al., 2011). Um estímulo extracelular transmite um sinal para a célula através da membrana plasmática via receptor. Em resposta ao estímulo, as células reagem e produzem sinais secundários que podem ser transferidos para as células adjacentes, resultando em uma resposta tecidual. Entretanto, após a descoberta do papel fisiológico do óxido nítrico (NO) como fator de relaxação derivado do endotélio (EDRF) observou-se que células contíguas podem transmitir sinais por rotas independentes de receptores (Ignarro, et al., 2002). O NO pode atravessar as membranas plasmáticas como um segundo mensageiro e daí transmitir estímulos e iniciar respostas para as células adjacentes. A descoberta da transdução de sinal intercelular pelo NO evidenciou um novo modelo para a sinalização em sistemas biológicos.

1.1. Propriedades químicas e bioquímicas do NO

Nos mamíferos, o endotélio normal libera óxido nítrico (NO) como um inibidor endógeno da ativação e agregação plaquetárias, impedindo a trombose intravascular (Frost, et al., 2005). O óxido nítrico é uma espécie paramagnética (Figura 1) e a presença do elétron desemparelhado em sua estrutura aumenta sua reatividade frente a outros radicais livres (Vural, et al., 2001).

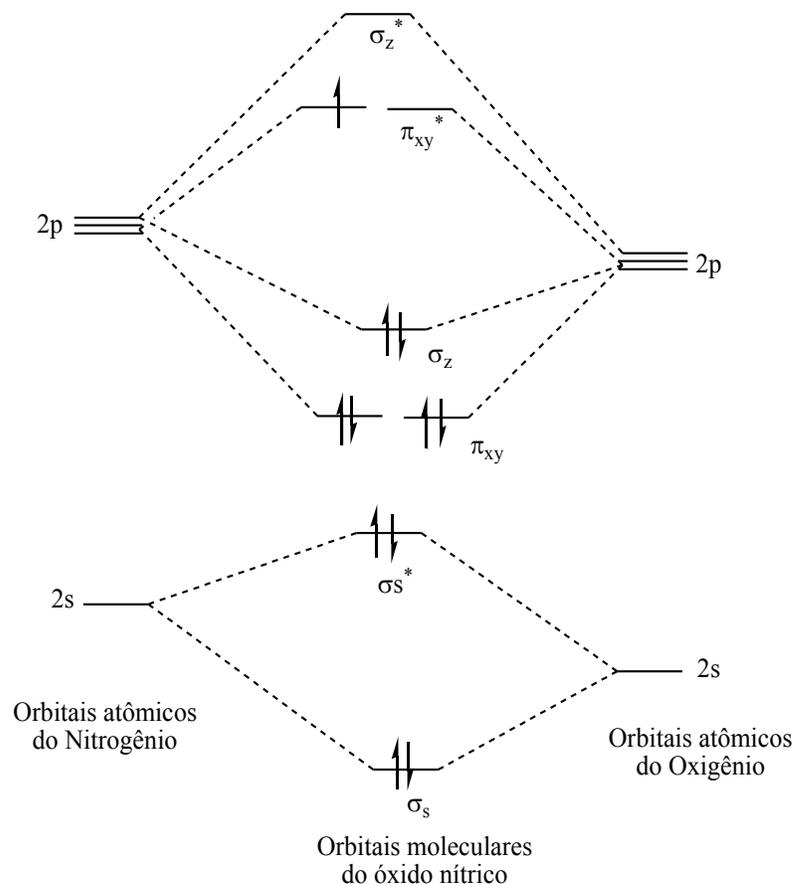


Figura 1. Diagrama de níveis de energia do óxido nítrico (Wilkinson, 1987).

Uma reação importante do NO é a conversão de Fe^{2+} no grupo heme da hemoglobina (Hb^{2+}) a Fe^{3+} formando Nitrato (NO_3^-) e metahemoglobina (Hb^{3+}), que evita a vasodilatação sistêmica (Kim-Shapiro, et al., 2006). O NO também pode reagir com o ânion superóxido (O_2^-), formando peroxinitrito que é um agente oxidante potente capaz de nitrosar proteínas, ácidos nucleicos e de causar a peroxidação lipídica *in vivo* (Al-Sa'doni, et al., 2000). Em solução, o NO reage com oxigênio para formar nitrito (NO_2^-) enquanto na fase gasosa forma dióxido de nitrogênio (NO_2) (Butler, et al., 1993). O NO ainda pode reagir com o NO_2 , formando o intermediário trióxido de dinitrogênio, capaz de reagir com grupos tióis livres (R-SH) formando os S-nitrosotióis (RSNO) *in vivo*, como a S-nitrosocisteína e a S-nitrosoglutatona, embora não esteja claro o mecanismo de formação de S-

nitrosotióis *in vivo*. A Figura 2 apresenta um resumo das principais reações em que o NO está envolvido.

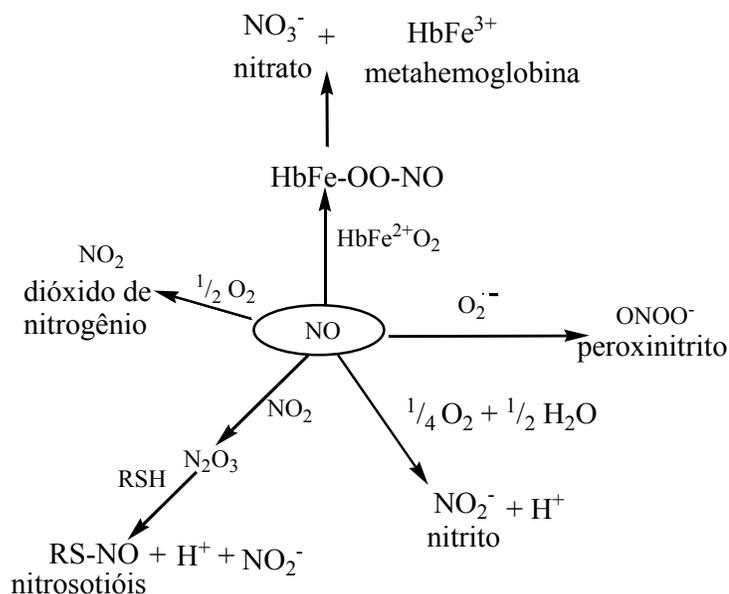


Figura 2. Reações químicas em que o óxido nítrico está envolvido.

A solubilidade do NO em água a 1 atm e a 25°C é ~1,8 mmol L⁻¹ (Butler, e cols., 1993) e a sua velocidade de difusão através de membranas biológicas é de 50 μm s⁻¹ com uma constante de difusão de 3300 μm² s⁻¹ (Lancaster, 1997).

O NO é produzido endogenamente da oxidação da L-arginina a L-Citrulina catalisada pelas enzimas óxido nítrico sintase (NOS) (Voetsch, et al., 2004). A Figura 3 apresenta o esquema da síntese endógena do NO.

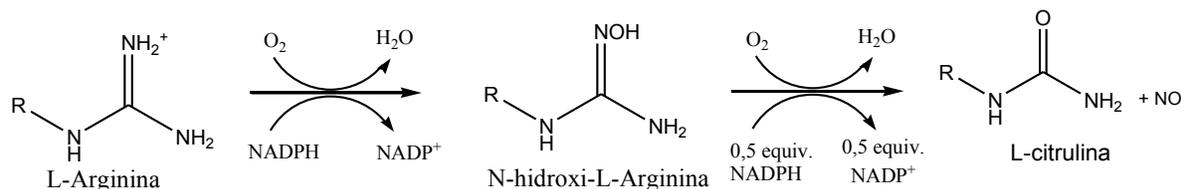


Figura 3. Esquema da síntese endógena de NO.

As NOS existem em três isoformas (Vural, et al., 2001): neuronal (nNOS), encontrada principalmente nos terminais nervosos nos sistema nervoso periférico e central, responsável por regular a liberação de norepinefrina; endotelial (eNOS), encontrada nas células endoteliais das veias, artérias, capilares e nas plaquetas, media a proliferação de células endoteliais e a vasodilatação, além de inibir a proliferação das células musculares lisas e a adesão e agregação plaquetária e de monócitos (Frost, et al., 2005; Mowery, et al., 2000); e a indutiva (iNOS), cuja expressão é induzida após imunoativação dos macrófagos, monócitos e outros componentes celulares. As duas primeiras NOS, nNOS e eNOS, também são conhecidas por óxido nítrico sintetase constitutivas, cNOS.

A Figura 4 mostra o esquema representativo dos mecanismos de ativação das diferentes isoformas da NOS, com os efeitos gerados pelo NO.

Quando as células endoteliais são ativadas por agonistas como a acetilcolina e a bradiquinina, ou mesmo pela pressão de cisalhamento (*shear stress*) nas paredes do vaso devido ao fluxo sanguíneo, os canais de cálcio são ativados, aumentando a concentração citosólica de Ca²⁺. Assim, a formação do complexo Ca²⁺-calmodulina é favorecida, o que ativa a eNOS e resulta na síntese do NO (Voetsch, et al., 2004). Nas células endoteliais o NO desempenha um papel anti-apoptótico, e estimula o crescimento endotelial, especialmente durante a angiogênese e cicatrização de feridas (Vural, et al., 2001). Após a síntese, o NO difunde para as células musculares lisas, onde estimula a Guanilato ciclase para

produzir 3,5-guanosina monofosfato cíclica (cGMP) a partir da Guanosina trifosfato (GTP) causando a relaxação dos vasos (Voetsch, et al., 2004). As respostas biológicas mediadas pela cGMP nas células musculares lisas estimulam a vasodilatação, a inibição de crescimento das células musculares lisas e diminui a adesão de leucócitos (Vural, et al., 2001; Voetsch, et al., 2004). Dessa forma, a geração basal de NO desempenha um papel importante na manutenção da circulação arterial em um estado de vasodilatação tônica.

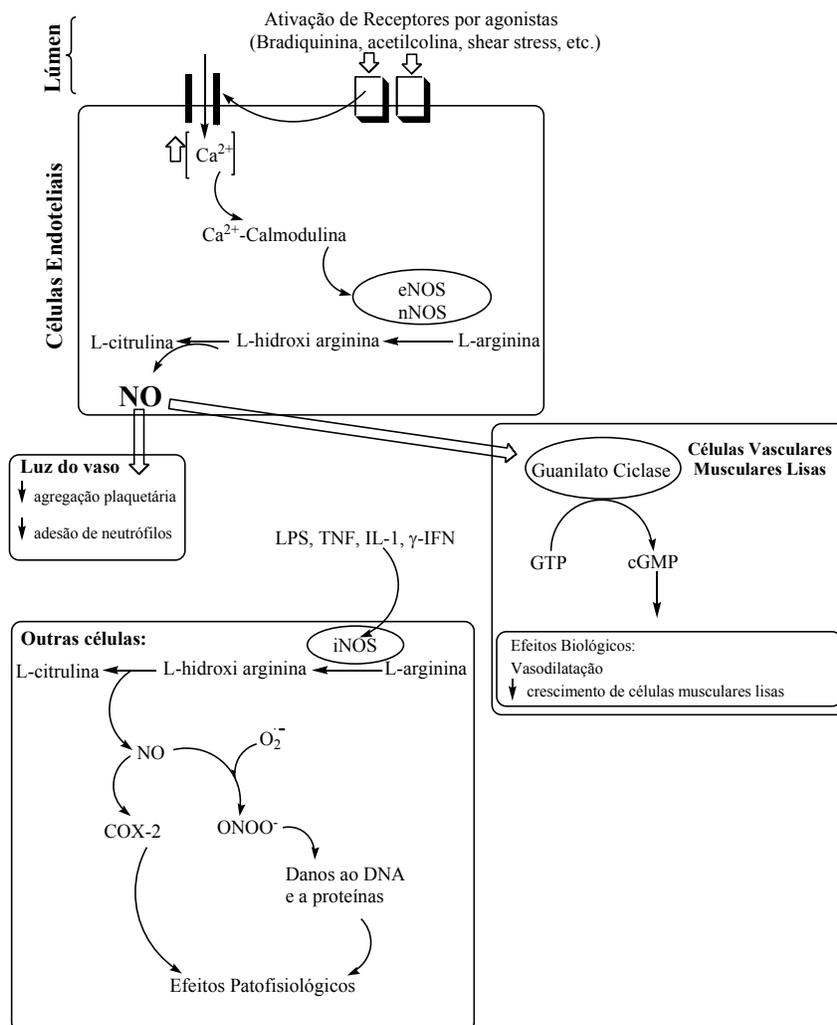


Figura 4. Mecanismo de ativação das diferentes isoformas de NOS, com os subsequentes efeitos gerados pelo NO. (Baseado em Al-Sa'doni, e cols. 2000).

O NO apresenta um efeito inibitório na ativação plaquetária (Vural, et al., 2001). As plaquetas estão envolvidas no primeiro mecanismo de defesa após a lesão vascular, iniciando a formação do coágulo. As plaquetas normalmente circulam individualmente e no estado inativo devido à presença de NO e outros inibidores da função plaquetária produzidos pelo endotélio (Voetsch, et al., 2004). O óxido nítrico difunde para as plaquetas e, da mesma maneira que nas células musculares lisas, ativa a guanilato ciclase solúvel estimulando a produção de cGMP. A concentração de Ca^{2+} nas plaquetas inativas é mantida entre 50 e 100nM, podendo atingir níveis de 1 mM nas plaquetas ativadas, levando à ativação de várias enzimas dependentes de Ca^{2+} e a cascata de reações que resultam em agregação plaquetária, mudanças morfológicas e liberação de granulócitos. O aumento dos níveis de Ca^{2+} também favorece a maior interação do fibrinogênio com a superfície das plaquetas. Esse efeito é dose-dependente e está correlacionada com a ativação da guanilato ciclase plaquetária e com o acúmulo da cGMP dependente do NO (Mendelsohn, et al., 1990).

O NO endógeno também participa na regulação fisiológica local de migração, crescimento e proliferação de células musculares vasculares lisas (VSMC) (Eberhardt, et al., 2000). A proliferação excessiva das células musculares lisas com alterações de fenótipo e aumento da fase de mitose é uma característica de aterosclerose (Voetsch, et al., 2004). O NO inibe a proliferação das células musculares vasculares lisas de modo dose-dependente e por mecanismos dependentes e independentes da cGMP (Walford, et al., 2003).

Além da regulação do tônus vascular, e das funções plaquetárias e das VSMC o NO controla as respostas leucocitárias limitando sua adesão ao endotélio (Voetsch, et al., 2004). O NO modula a quimiotaxia leucocitária, diminuindo o nível de expressão das moléculas de adesão e da secreção de proteínas quimioatrativas.

Outra propriedade do óxido nítrico bastante relevante para a sua utilização em aplicações médicas é a sua ação antimicrobiana contra vírus e bactérias (Benz, et al., 2002), parasitas (Dondji, et al., 2008) e fungos (Lazar, et al., 2008). Nosso grupo já demonstrou o efeito citotóxico dose-dependente de doadores de

NO, como S-nitroso-N-acetilcisteína e S-nitrosoglutationa, contra os patógenos *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* (de Souza, et al., 2006).

Em relação às aplicações tópicas, o NO tem um papel relevante na cicatrização de feridas cutâneas. A cicatrização é um processo bastante complexo e dinâmico de resposta ao trauma tecidual. Esse processo é basicamente composto por três fases – inflamatória, formação tecidual e remodelação da ferida – que têm o NO como regulador (Dadalti, 2008). O NO tem a capacidade de modular a produção de citocinas quimioatraentes, e controlar a deposição de colágeno, angiogênese, proliferação celular e apoptose.

Ainda, Generini e cols. (2005) relataram que o NO liberado pelo endotélio resulta em diminuição dos sintomas do fenômeno de Raynaud, devido às suas propriedades vasodilatadoras. O fenômeno de Raynaud decorre de problemas nos tecidos dos vasos que irrigam as extremidades do corpo e inclui três fases: a isquemia (Figura 5 A), que torna as extremidades dos dedos pálidas devido à vasoconstrição das artérias, pré-capilares e arteríolas cutâneas; hiperemia (Figura 5 B), que torna a extremidade dos dedos vermelha; e o retorno à coloração normal.

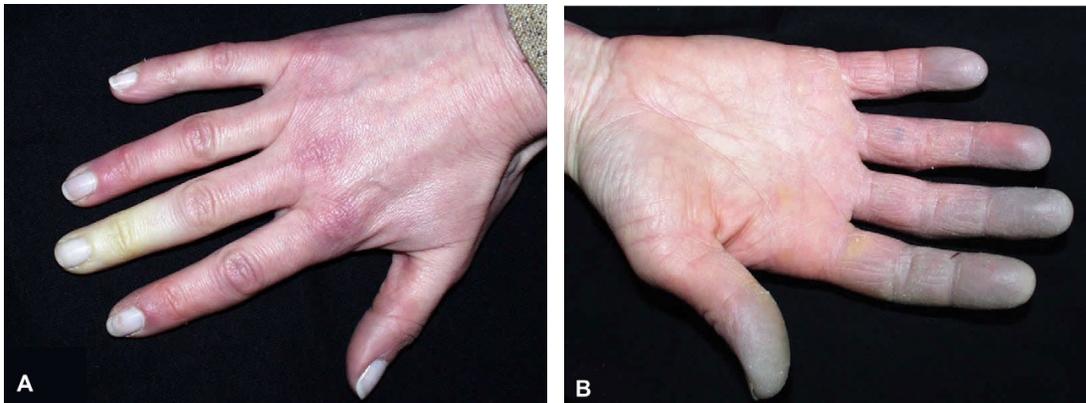


Figura 5. Fases isquêmica (A) e hiperêmica (b) do fenômeno de Raynaud (Gayraud, 2007). (Reprodução autorizada por Elsevier sob licença n° 2667760271591).

O conjunto de todas as ações apresentadas indica que a liberação local de NO tem grande potencial na cicatrização e tratamento de feridas cutâneas com possibilidade de diminuir a incidência de infecções e na aplicação de dispositivos médicos de contato sanguíneo reduzindo a formação de coágulos e inibindo a proliferação neointimal (e da restenose) após a angioplastia (Frost, et al., 2005). Portanto, materiais capazes de liberar NO localmente a fluxos iguais ou maiores do que o das células endoteliais normais, que é de $1 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2} \text{ min}^{-1}$ (Frost, et al., 2005), e por períodos de tempo prolongados podem proporcionar superfícies cicatrizantes e bactericidas para curativos e antitrombogênicas e anti-reestenóticas para dispositivos médicos de contato sanguíneo, com a possibilidade de reduzir os efeitos adversos decorrentes do uso de materiais sintéticos.

1.2. Doadores de NO

O plasma e o meio celular contêm espécies reativas capazes de inativar o NO livre, reduzindo a sua meia-vida para cerca de segundos (Frost, et al., 2005). Para que possa realizar sua ação *in vivo*, portanto, o NO é estabilizado por moléculas carregadoras que preservam sua atividade biológica (Oliveira, et al., 2002). Os S-nitrosotióis (RSNOs) são compostos que contêm um grupamento S-NO ligado à sua estrutura (Figura 6) e protegem o NO das espécies reativas de oxigênio, contribuindo para as respostas farmacológicas e fisiológicas do sistema vascular (Lipke, et al., 2005; Vural, et al., 2001). Ricardo e cols. (2002) já demonstraram o efeito hipotensor de RSNOs em ratos normais e hipertensos.



Figura 6. Estrutura química geral dos S-nitrosotióis.

Alguns S-nitrosotíóis como a S-nitrosoalbumina, a S-nitrosohemoglobina e a S-nitrosoglutationa ocorrem endogenamente nos mamíferos enquanto outros compostos como a S-nitroso-N-acetilpenicilamina, a S-nitrosocaptopril e a S-nitrosomercaptoetilamina são sintetizados quimicamente, não ocorrendo *in vivo*. A Figura 7 apresenta as estruturas químicas de alguns S-nitrosotíóis.

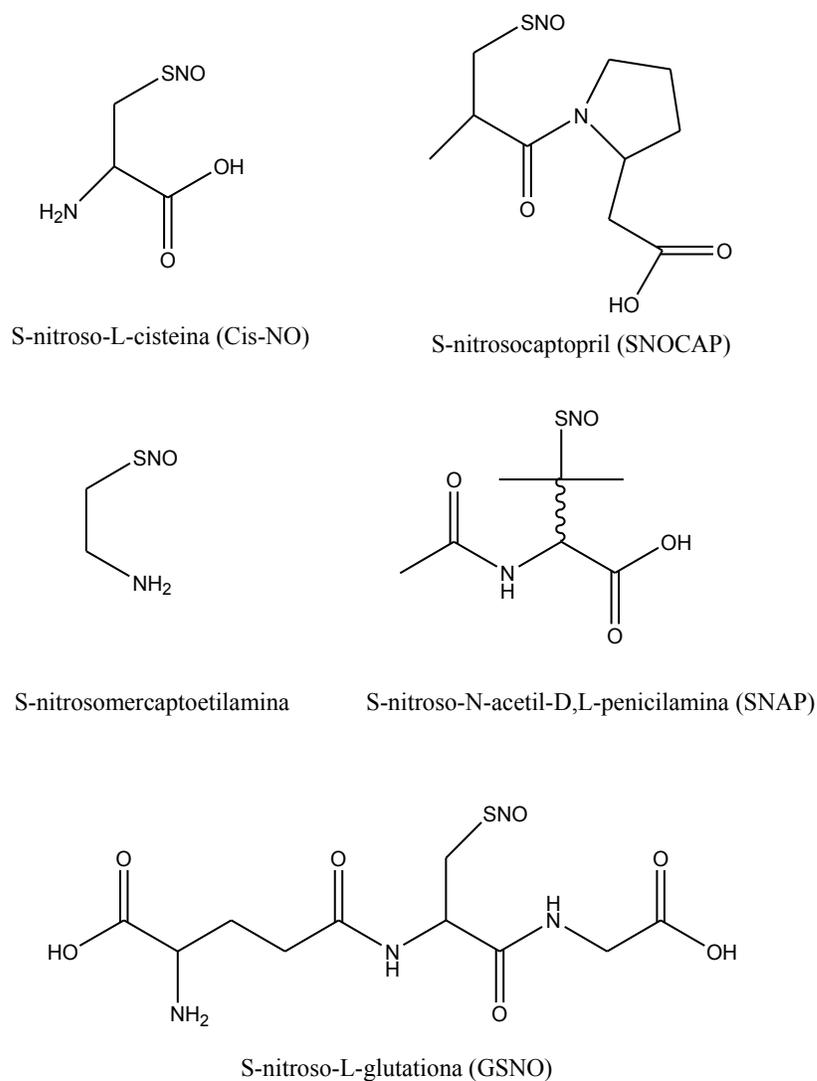


Figura 7. Estrutura química de alguns S-nitrosotíóis.

A síntese exógena desses compostos pode ser obtida pela reação de S-nitrosação dos tióis de baixo peso molecular ou pelo resíduo de cisteína em peptídeos com espécies nitrosantes (Leopold, et al., 2000; Lipke, et al., 2005).

Os RSNOs são susceptíveis a decomposição por vários mecanismos, que resultam na liberação do NO (Al-Sa'doni, et al., 2000). Uma breve descrição desses mecanismos é dada abaixo:

Decomposição por quebra homolítica da ligação S-N

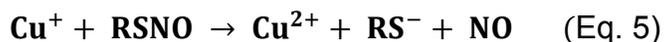
A absorção de radiação de comprimento de onda de 365 nm causa o rompimento fotoquímico da ligação S-N e a liberação do NO (Eq. 1). O radical tiila resultante dessa quebra pode reagir com outra molécula de S-nitrosotiol, gerando um composto dissulfeto (o tiol oxidado) e outra molécula de NO (Eq. 2) ou pode se combinar com outro radical tiila, formando um composto com ligação dissulfeto (Eq. 3) (Oliveira, et al., 2002; Shishido, et al., 2003; Singh, et al., 1996).

O mecanismo de decomposição térmica dos S-nitrosotióis é similar ao de decomposição fotoquímica, ocorrendo através da quebra homolítica da ligação S-NO, liberando NO e formando o composto com ligação dissulfeto. (Oliveira, et al., 2002; Shishido, et al., 2000; Shishido, et al., 2003).



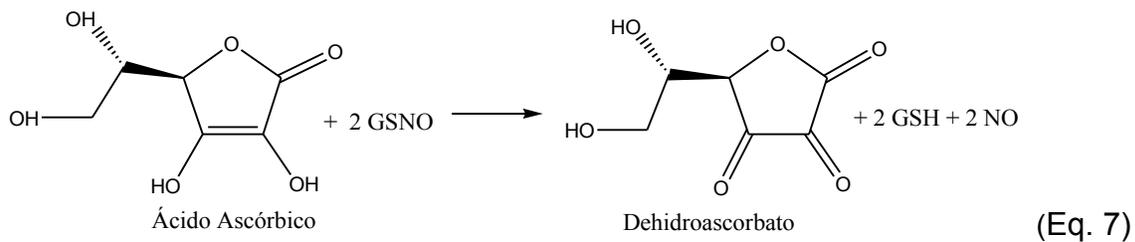
Decomposição por íons Cobre

A perda de NO pelos S-nitrosotióis mediada por íons Cu^{2+} requer a sua redução a Cu^+ , pelos ânions tiolatos (RS^-) com formação de radicais tilla (Eq. 4), seguida da redução do RSNO e oxidação do Cu^+ a Cu^{2+} (Eq. 5) (Al-Sa'doni, et al., 2000; Zhang, et al., 2000). Essa reação produz Cu^{2+} e RS^- , permitindo a regeneração do Cu^+ (Eq. 4). Outro destino dos radicais tilla é a formação do dímero RSSR (Eq. 6) (Frost, et al., 2005; Oliveira, et al., 2002).



Decomposição por íons ascorbato

Outra rota de decomposição dos RSNOs é a reação direta com ânions ascorbato, liberando NO e produzindo um tiol livre e dehidroascorbato (Frost, et al., 2005). A decomposição dos S-nitrosotióis pelo ascorbato pode ocorrer por dois mecanismos: a baixas concentrações, o ascorbato reduz o Cu^{2+} a Cu^+ , que catalisa a liberação de NO, conforme descrito acima; e altas concentrações, o ascorbato reage como um nucleófilo, aumentando a liberação de NO (Eq. 7). A princípio, os racêmicos L- e D-ascorbato deveriam exercer o mesmo efeito sobre os S-nitrosotióis; entretanto apenas o efeito da forma L- foi estudada (Al-Sa'doni, et al., 2000).



Decomposição enzimática

A enzima γ -glutamil transpeptidase que transfere os grupos funcionais gamma-glutamil da glutatona e é encontrada em muitos tecidos, especialmente no fígado, pode causar também decomposição de GSNO. Após a quebra enzimática, um S-nitrosotiol de menor estabilidade que o GSNO é formado, que pode liberar NO na presença de íons Cu^+ (Figura 8) (Al-Sa'doni, et al., 2000).

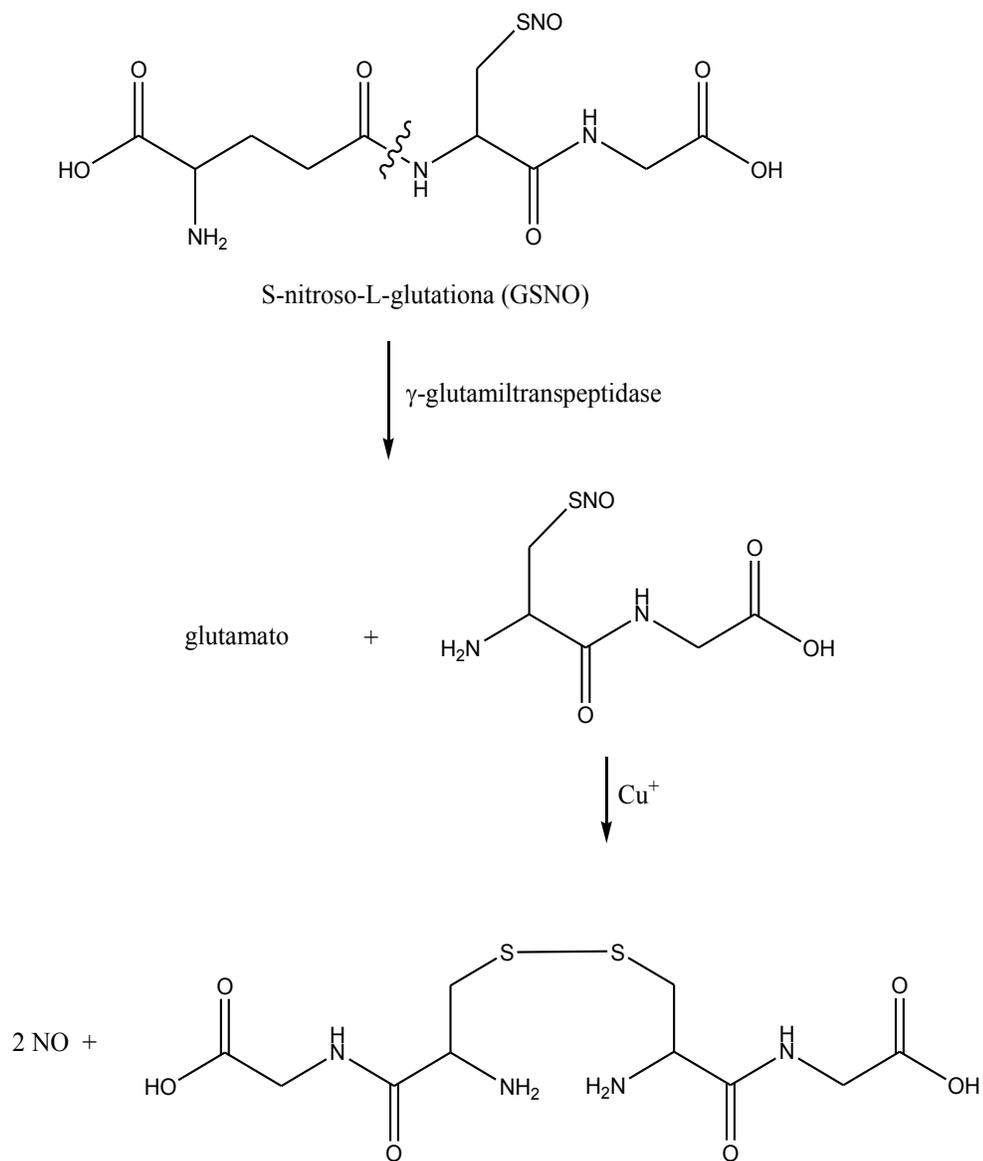
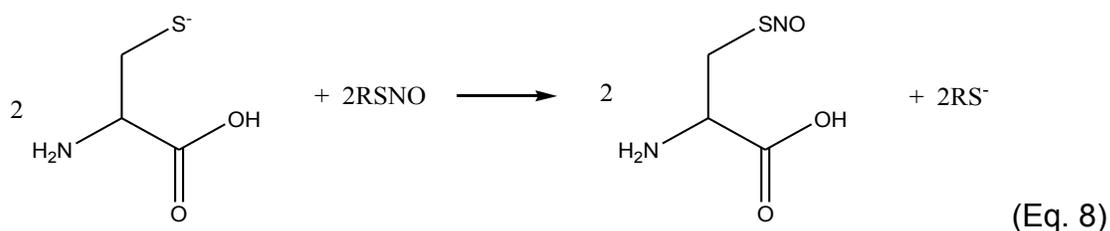


Figura 8. Decomposição enzimática da S-nitrosoglutathione

In vivo, após o NO ser liberado dos RSNOs, ele é transferido a receptores específicos como enzimas contendo ferro às quais o NO pode ser coordenado como ligante (reações de nitrosilação). Outro mecanismo importante de ação biológica dos RSNOs envolve as reações de transnitrosação onde ocorre a transferência do NO do RSNO para outros tiois. Nesse caso, o NO pode ser

transferido para ânions tiolato de resíduos de cisteína de outras proteínas como íon nitrosônio (NO^+) (Eq. 8) (Zhang, et al., 2005; Oliveira, et al., 2002).



A atividade antitrombogênica dos RSNOs e a sua eficiência na terapia antiplaquetária resultaram na síntese/preparação de novos materiais para liberação de NO. Esses materiais incluem polímeros contendo compostos doadores de NO dissolvidos ou contendo moléculas de NO covalentemente ligadas a sua cadeia (Frost, et al., 2005). Os doadores de NO podem pertencer a uma série de classes de compostos incluindo nitratos e nitritos orgânicos, complexos nitro ferrosos, S-nitrosotióis, polímeros com NO covalentemente ligado à cadeia carbônica, entre outros (Bauer, et al., 1995).

Os nitratos orgânicos, como a nitroglicerina e os ésteres de nitrito, são utilizados há mais de 100 anos no tratamento de isquemia cardíaca (Hyduke, et al., 2005). Sua principal ação é a vasorelaxação, mediada pela ativação da guanilato ciclase (Ignarro, et al., 2002). O NO é produzido enzimaticamente da nitroglicerina pela aldeído-desidrogenase mitocondrial (Chen, et al., 2002). Entretanto o uso de nitroglicerina leva a problemas de tolerância, além de falta de seletividade e baixa biodisponibilidade (Ignarro, et al., 2002).

O nitroprussiato de sódio (SNP) é um complexo nitroferroso amplamente utilizado em humanos em terapias antihipertensivas (Friederich, et al., 1995). No SNP o NO está coordenado ao ferro como um grupo nitrosila formando um complexo bipiramidal de base quadrada (Figura 9). O SNP é um potente vasodilatador, mas a liberação de NO a partir dele é bastante lenta, sendo

necessária a sua redução parcial. *In vivo*, os tióis podem realizar esse papel, o que é evidenciado pelo aumento da liberação de NO a partir do SNP pela reação com proteínas ligadas à membrana (Hyduke, et al., 2005). A meia-vida do SNP *in vivo* é de 1-2 min (Friederich, et al., 1995). Entretanto, o uso desse nitrovasodilatador é limitado já que no processo de produção de NO, o SNP também pode liberar ânions cianeto, que são capazes de induzir efeitos tóxicos (Hyduke, et al., 2005).

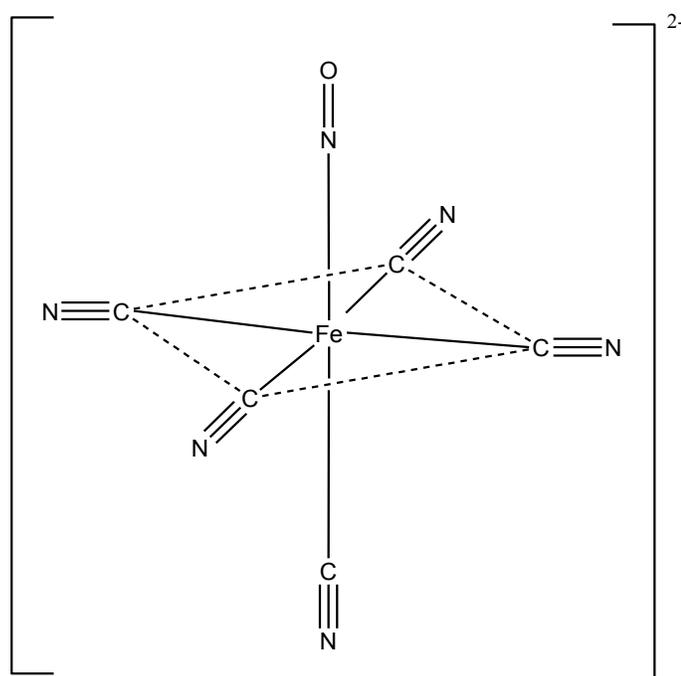


Figura 9. Estrutura do íon nitroprussiato.

Uma classe relativamente nova de compostos doadores de NO, conhecida como nonoatos (N(O)NO) ou diazeniodiolatos, tem sido investigada como fonte de NO. Nesses compostos o NO está covalentemente ligado a grupos nucleofílicos como dietilamina e dietilenotriamina, por exemplo (Hyduke, et al., 2005; Ignarro, et al., 2002). Os nonoatos são doadores de NO formados pela reação de aminas

secundárias com duas moléculas de NO sob alta pressão (Frost, et al., 2005). A Figura 10 apresenta a estrutura genérica dos nonoatos eletricamente neutralizados por contra-íons ou pela protonação de uma amina, formando um composto zwitteriônico. Nonoatos de baixo peso molecular podem ser dispersos em matrizes poliméricas ou podem estar covalentemente ligados às cadeias poliméricas hidrofóbicas. Polímeros contendo NONOatos em sua estrutura foram testados em circuitos extracorpóreos resultando em redução de adesão plaquetária e menor trombogenicidade comparados aos controles não liberadores de NO (Schoenfisch, et al., 2000; Smith, et al., 1996). Embora esses estudos demonstraram um grande potencial para liberação de NO a partir de dispositivos biomédicos, Mowery e cols (2000) verificaram que grupos diamina e polietilenoiminas dos compostos diazeniodiolatos desprendem-se das cadeias poliméricas e podem formar nitrosaminas, que são compostos conhecidos como carcinogênicos. A formação das nitrosaminas provavelmente ocorre devido à oxidação local de NO a um intermediário NO^+ que pode reagir com aminas formando espécies RN-NO .

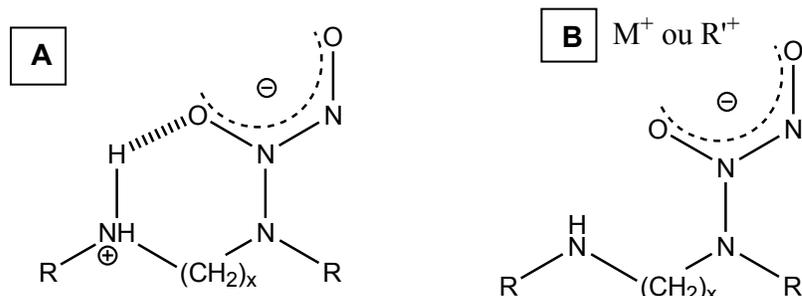


Figura 10. Estrutura química dos nonoatos. (A) Nonoato estabilizado pela reação com amina, formando composto zwitteriônico. (B) Nonoato estabilizado por interação com contra-íon.

Os S-nitrosotióis, por serem produzidos endogenamente conforme discutido anteriormente, apresentam vantagens em relação aos outros doadores de NO, já que não oferecem risco de tolerância e toxicidade, nem induzem o stress oxidativo nas células vasculares (Jaworski, e cols., 2001). A S-nitrosoglutationa (GSNO), formada da S-nitrosação da glutatona (GSH), é considerada um carregador endógeno de NO (Vilahur, e cols., 2004) e é um dos S-nitrosotióis mais abundantes no sangue, juntamente com a S-nitrosoalbumina. A GSNO foi detectada no plasma em concentrações de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ (Ignarro, 2000) e também é encontrada no interior das células.

1.3. Materiais poliméricos liberadores de RSNOs e NO

Vários materiais poliméricos foram desenvolvidos com S-nitrosotióis covalentemente ligados à estrutura do polímero. Bohl e West (2000) ligaram cisteína ao PEG e reagiram o copolímero resultante com nitrito de sódio para formar grupos S-nitrosocisteína. A proliferação de células musculares lisas foi inibida em soluções de culturas de células e a adesão plaquetária foi diminuída em lâminas revestidas com colágeno na presença desses hidrogéis liberadores de NO.

Seabra e cols. (2005) prepararam um poliéster a partir do PEG e do ácido mercaptosuccínico, e nitrosaram-no a fim de obter um polímero polinitrosado. O poliéster polinitrosado foi misturado com polimetacrilato de metila, produzindo filmes sólidos capazes de liberar NO por mais de 20h a temperatura de 37°C e inibir a adesão plaquetária sobre placas de acrílico revestidas com o material (Seabra, et al., 2008), além de apresentarem potencial bactericida contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa* (Seabra, et al., 2010). Entretanto, a necessidade de utilização de solventes orgânicos na preparação desses materiais pode ser limitante à sua aplicação, uma vez que resíduos dos solventes podem ser liberados no meio fisiológico após o implante.

Uma alternativa para evitar a utilização de solventes orgânicos na preparação de materiais para contato sanguíneo é a utilização de hidrogéis, que são redes tridimensionais de polímeros capazes de absorverem grande quantidade de água ou fluidos biológicos (Hassan, et al., 2000a). Essas redes tridimensionais tornam-se insolúveis devido à presença de ligações covalentes cruzadas inter- e intra-cadeias ou devido à presença de reticulações físicas, como cristalitos e entrelaçamento entre as cadeias. Como resultado, comparados a outros materiais sintéticos, as propriedades mecânicas dos hidrogéis se assemelham aos tecidos vivos naturais devido à alta quantidade de água e maciez, que contribuem para sua biocompatibilidade.

A fim de preparar hidrogéis liberadores de NO, S-nitrosoglutationa (GSNO) e S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) foram incorporados em matrizes de hidrogéis do copolímero tribloco de (Polióxido de etileno)₉₉-(Polióxido de Propileno)₆₅-(Polióxido de etileno)₉₉ (PEO-PPO-PEO), a partir dos quais o NO pode ser liberado térmica ou fotoquimicamente (Shishido, et al., 2003). Os autores observaram uma diminuição das taxas de liberação de NO a partir dos hidrogéis comparados às soluções aquosas dos doadores de NO. Seabra e cols. (Seabra, et al., 2007) utilizaram esses hidrogéis de PEO-PPO-PEO contendo GSNO para investigar a capacidade de vasodilatação e os possíveis efeitos adversos da aplicação tópica desses géis em ratos. Infelizmente, os hidrogéis estudados não têm a capacidade de formar filmes sólidos, o que torna a sua aplicação limitante para o revestimento de dispositivos médicos de contato sanguíneo.

1.4. Poli(álcool vinílico) como matriz para liberação de RSNOs

O poli (álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético que possui as propriedades de hidrofiliidade desejáveis para materiais hemocompatíveis e biocompatíveis (Hassan, et al., 2000a), além de boas propriedades mecânicas, como boa elasticidade e capacidade de formação de filmes (Hassan, et al., 2000).

O PVA é um polímero polihidroxilado que pode ser representado pela fórmula estrutural apresentada na Figura 11.

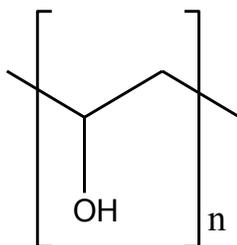


Figura 11. Estrutura do poli(álcool vinílico).

O PVA é um polímero neutro em pH fisiológico e tem sido amplamente utilizado em aplicações biomédicas devido a sua baixa toxicidade (Del Guerra, et al., 1994; Kelly, et al., 2003; DeMerlis, et al., 2003), boa biocompatibilidade (Noguchi, et al., 1991; Anil, et al., 2005) e não-mutagenicidade (DeMerlis, et al., 2003). O PVA é amplamente utilizado em comprimidos e em hidrogéis contendo fármacos bioativos, inclusive doadores de NO, em sistemas de liberação controlada (Seabra, et al., 2004). A facilidade de preparação de filmes, géis e membranas de PVA permitem a sua utilização em lentes de contato (Winterton, et al., 2007; Hyon, et al., 1994), em intestinos artificiais (Tamura, et al., 1988), curativos para feridas (Masters, et al., 2002), pâncreas artificiais (Young, et al., 1998), dispositivos cardiovasculares (Wan, et al., 2002) e como matriz para liberação de fármacos (Peppas, 1987; Horike, et al., 2002). Além disso, os géis de PVA exibem um alto grau de intumescimento em água ou fluidos biológicos, tornando-os semelhantes aos tecidos naturais (Hassan, et al., 2000a).

Outra vantagem da utilização de PVA em dispositivos médicos de contato sanguíneo é que sua estrutura polihidroxilada possui potencial de diminuição de adesão plaquetária. Sperling e cols. (Sperling, et al., 2005) verificaram que superfícies de monocamadas auto-organizadas de alcanotóis com grupos -OH

terminais resultaram em menor adesão plaquetária em comparação às monocamadas com grupos $-\text{COOH}$ e $-\text{CH}_3$ terminais, apesar da adesão leucocitárias (os leucócitos são conhecidos por atraírem substâncias pro-coagulantes e pro-inflamatórias) ter sido maior naquelas superfícies indicando a possibilidade do PVA proporcionar um ambiente para a propagação de bactérias e infecções (Gorbet, et al., 2001; Yang, et al., 2007).

O PVA pode ser reticulado a fim de torná-lo insolúvel em água e ampliar as possibilidades de sua utilização em aplicações biomédicas. Um dos métodos de reticulação do PVA é a aplicação de ciclos de congelamento (a temperaturas inferiores a 0°C) e descongelamento (a temperatura ambiente) (Stauffer, et al., 1992; Hassan, et al., 2000b). Esse método resulta na formação de hidrogéis fisicamente reticulados devido à densificação da fase amorfa e aumento do número de cristalitos dispersos na matriz (Willcox, et al., 1999). Além da insolubilidade em meio aquoso, este tratamento evita a liberação de componentes tóxicos, associada com a utilização de agentes de reticulação convencionais (Hassan, et al., 2000a). A possibilidade de preparação de filmes de hidrogéis de PVA também permite a utilização desse material para a oclusão de feridas cutâneas.

As propriedades benéficas da utilização dos S-nitrosotióis com o PVA podem ser obtidas através da mistura de soluções aquosas dos dois componentes, resultando em matrizes de PVA contendo doadores de NO. Seabra e cols (Seabra, et al., 2004) incorporaram S-nitrosoglutationa em filmes de PVA, PVP e blendas de PVA/PVP e verificaram um efeito estabilizador da matriz sobre a decomposição térmica de GSNO além de uma redução de 8 a 16 vezes nas constantes de velocidade de liberação de NO, comparado à uma solução aquosa de GSNO.

2. OBJETIVOS

Os principais objetivos deste trabalho foram a obtenção de filmes sólidos de PVA capazes de eluir GSNO localmente, que pudessem ser utilizados para o recobrimento de dispositivos médicos de contato sanguíneo e para aplicações tópicas na pele. Estes objetivos envolveram:

- A preparação de filmes fisicamente reticulados, contendo GSNO.
- A caracterização das propriedades térmicas, morfológicas e de difusão dos filmes de PVA/GSNO.
- A avaliação das propriedades biológicas dos filmes de PVA/GSNO para o aumento do fluxo sanguíneo dérmico em aplicações tópicas e para a obtenção de ação bactericida e inibição da adesão plaquetária, na superfície de dispositivos médicos de contato sanguíneo.

3. AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES DE DIFUSÃO IN VITRO DE FILMES DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) PREPARADOS POR CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO.

3.1. Hidrogéis de PVA produzidos por ciclos de congelamento/descongelamento

Hidrogéis de PVA fisicamente reticulados, também chamados de criogéis, são conhecidos desde 1970 (Hassan, et al., 2000a; Lozinsky, 1998) e são formados a partir do congelamento de soluções poliméricas homogêneas, seu armazenamento no estado vítreo e subsequente descongelamento (Finizia, et al., 2006). A gelificação criotrópica das soluções diluídas de PVA produz materiais heterogêneos com morfologia bastante diferente dos géis de PVA obtidos por técnicas mais convencionais (por exemplo, por reticulação com agentes químicos ou com raios gama) (Hassan, et al., 2000a; Lozinsky, 1998; Willcox, et al., 1999). O tratamento criotópico das soluções de PVA resulta em materiais cuja principal característica morfológica é a formação de uma rede de micro e macroporos interconectados (Finizia, et al., 2006; Lozinsky, 1998; Lozinsky, et al., 1998).

Soluções concentradas de PVA envelhecidas a temperatura ambiente também gelificam pela formação de uma rede tridimensional de ligações intermoleculares não covalentes, principalmente ligações de hidrogênio entre grupos OH de cadeias poliméricas vizinhas (Figura 12), formando nós de reticulação física (termoreversíveis), mas com baixa resistência térmica e mecânica (Lozinsky, et al., 1998). Por outro lado, quando soluções de PVA são congeladas, a mesma organização supramolecular é obtida, mas a resistência mecânica do gel obtido é muito maior (Willcox, et al., 1999). Finizzia e cols. (2006) relatam que os géis de PVA preparados por ciclos de congelamento/descongelamento são mais fortes e capazes de absorver até 90% de sua massa de água. Os géis fisicamente reticulados por ciclos de

congelamento/descongelamento também resultam em maior resistência mecânica sob tensão e sob variação da temperatura, além de maior elasticidade quando comparados aos géis preparados por outros métodos (Hassan, et al., 1998; Hassan, et al., 2000a; Lozinsky, et al., 1998). Isso ocorre porque os nós de reticulação ficam distribuídos homogeneamente ao longo da estrutura tridimensional do gel, o que permite a melhor distribuição da carga (Komatsu, et al., 1986).

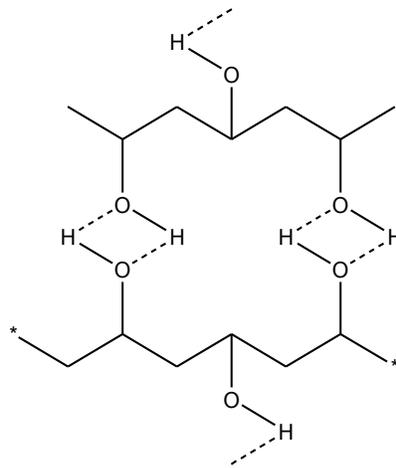


Figura 12. Ligações de hidrogênio entre cadeias de PVA.

A importância da formação dos cristalitos na estrutura dos hidrogéis de PVA fisicamente reticulados é bastante discutida na literatura. De acordo com Peppas (1975), pioneiro na tentativa de descrever o processo de congelamento/descongelamento em géis de PVA, a gelificação de soluções de PVA resulta do processo de cristalização parcial dos segmentos de cadeia polimérica (Hassan, et al., 2000a). Os cristalitos que se formam em polímeros semi-cristalinos 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 poliméricas que levam à formação de pequenas regiões altamente organizadas, denominadas cristalitos, em um domínio de alta concentração de polímero, a fase semicristalina, que se intercala com regiões desorganizadas da matriz, de menor concentração de polímero, denominada fase amorfa (Flory, 1953). A Figura 13 apresenta a estrutura da rede tridimensional de membranas semicristalinas (Chanda, 2000), mostrando a estrutura lamelar dos cristalitos.

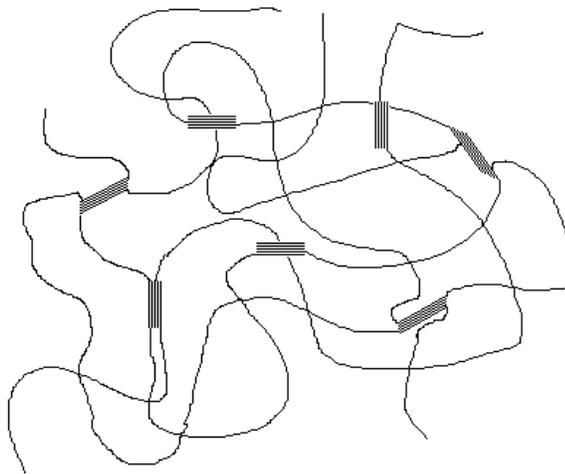


Figura 13. Esquema simplificado da estrutura do PVA reticulado fisicamente por formação de cristalitos.

A estrutura porosa dos criogéis é formada durante a primeira etapa de congelamento da solução homogênea de PVA. Durante o congelamento, a cristalização da água não é completa e o processo de gelificação é, dessa forma, favorecido pela formação de um sistema bifásico líquido-líquido: uma fase pobre em PVA e uma fase rica em PVA, mais concentrada em polímero do que a solução inicial e conhecida por microfase líquida, que existe na fase líquida até que temperaturas suficientemente baixas (menores que a temperatura de cristalização da água) sejam atingidas (Lozinsky, 1998). O aumento da

concentração de macromoléculas dissolvidas na microfase líquida ocorre devido à expansão do volume da água ao cristalizar, formando os primeiros cristais de gelo.

As cadeias de PVA dissolvidas na microfase líquida formam estruturas organizadas, os cristalitos, (Lozinsky, et al., 1998; Ricciardi, et al., 2005B), que constituem os nós de reticulação da rede macroscópica de PVA conectados por porções de cadeias intumescidas pelo solvente. Portanto, géis de PVA formados a temperaturas menores que a temperatura de cristalização da água são formados por poros grandes, devido à formação de cristais de gelo, mas também por microporos entre as cadeias poliméricas intumescidas da fase amorfa (Auriemma, et al., 2008). Assim, quando os cristais de gelo se fundem durante o descongelamento, formam-se macroporos preenchidos por solvente (Finizia, et al., 2006). A secagem dos filmes por sublimação permite a preservação do tamanho dos poros (Hatakeyema, et al., 2005). Por outro lado, durante a secagem por evaporação, as cadeias que formam a fase amorfa apresentam pequena mobilidade, que permite que os poros diminuam ou que a estrutura porosa desapareça. Macroscopicamente, isso resulta em matrizes mais homogêneas e translúcidas.

Ricciardi e cols. (2005B), através da técnica de SANS, propuseram a formação da estrutura bicontínua para hidrogéis de PVA obtidos por ciclos de congelamento/descongelamento, apresentada na Figura 14. 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. A região de alta concentração de cadeias poliméricas possui dimensão média da ordem de micrometros (Mangiapia, et al., 2007) e inclui cristalitos de PVA com tamanhos da ordem de 3-4 nm (Ricciardi, et al., 2004) e fase amorfa intumescida, sendo a distância entre os cristalitos da ordem de 10-20 nm (Ricciardi, et al., 2005B). As regiões com baixa concentração polimérica, por sua vez, permitem a difusão livre de moléculas grandes ou pequenas e tem

tamanho da ordem de centenas de nanômetros (Hassan, et al., 2000a; Lozinsky, 1998; Ricciardi, et al., 2005B).

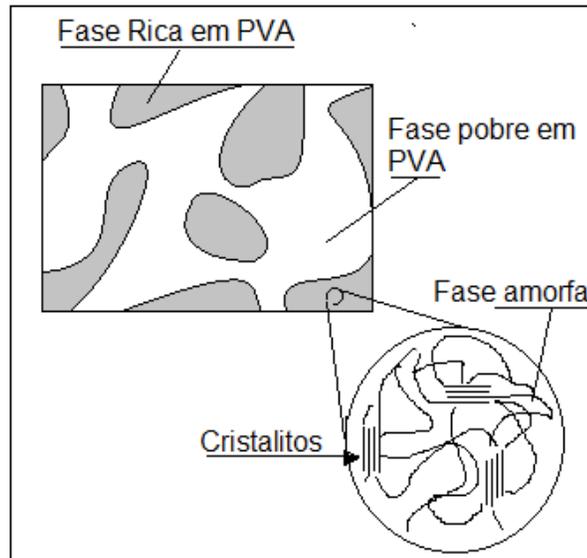


Figura 14. Estrutura bicontínua de hidrogel de PVA obtido por ciclos de congelamento/descongelamento (Baseado em Ricciardi e cols., 2005).

O número e tipos de processos que ocorrem durante a gelificação criotrópica das soluções de PVA/água ainda não estão completamente esclarecidos. Os cristalitos de PVA podem se formar a temperaturas negativas durante o primeiro ciclo de congelamento ou durante o descongelamento a temperatura ambiente. De acordo com Komatsu e cols. (1986), o diagrama de fases do sistema PVA-água, apresentado na Figura 15, mostra a curva de transição sol-gel e a curva espínodal, que dividem o diagrama em quatro regiões: em (i) a solução é homogênea; em (ii) ocorre a separação de fases por decomposição espínodal, sem formação de gel; em (iii) ocorre a gelificação e a decomposição espínodal, o que significa que a gelificação é acompanhada da separação de fases líquido-líquido; e em (iv) ocorre apenas a gelificação, sem

separação de fases. Como se observa, a gelificação ocorre acima e abaixo da curva espínodal, indicando que os géis podem ser formados junto com o processo de separação de fases líquido-líquido ou sem a decomposição espínodal.

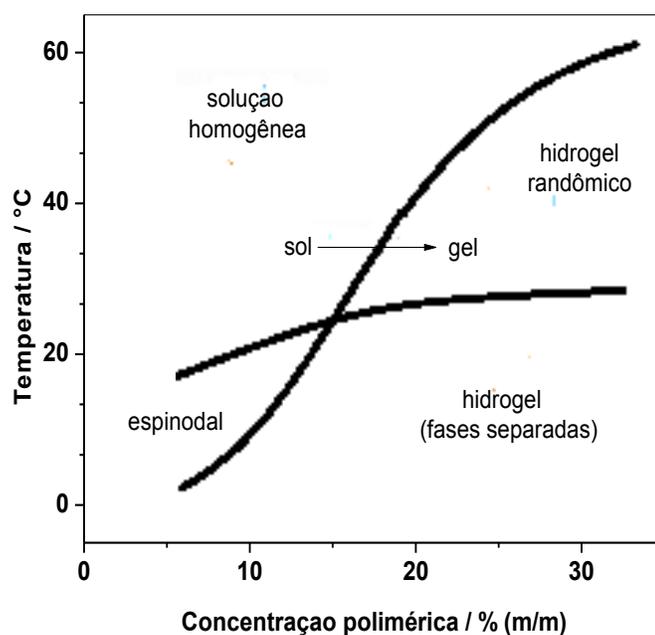


Figura 15. Curva de transição sol-gel espínodal do sistema binário PVA-água. Adaptado de Auriemma e cols. (2008) e Komatsu, e cols. (1986).

Um fator limitante na definição dos eventos que ocorrem no processo de gelificação criotrópica do PVA é o fato que, embora a temperatura de transição vítrea do PVA seco seja de cerca de 85°C e diminua significativamente na presença de água, as temperaturas usadas na preparação dos géis de PVA (< -10 °C) reduzem a mobilidade das cadeias de PVA.

3.1.1. Influência da estrutura do PVA nas propriedades dos Criogéis

Industrialmente o PVA é produzido através da metanólise do poli(acetato de vinila) (PVAc), de acordo com o esquema apresentado na Figura 16 (Ebewele, 1996). A alcoólise pode ser catalisada por ácidos ou bases fortes, sendo que em escala industrial a alcoólise alcalina é geralmente empregada. O grau de hidrólise do polímero resultante é dependente do tempo de reação, temperatura e aditivos. Essencialmente, o PVA é sempre um copolímero de PVA e PVAc que pode ser representado pela fórmula estrutural apresentada na Figura 16, onde x e y são os números das unidades de repetição de PVA e PVAc, respectivamente (Figura 16). 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 a capacidade de gelificação de soluções de PVA (Hassan, et al., 2000a). Os grupos acetato residuais, de natureza hidrofóbica, enfraquecem as ligações de hidrogênio intra e intermolecular dos grupos hidroxila adjacentes, necessárias para a formação dos cristalitos que agem como nós de reticulação dos géis de PVA. Portanto, para a preparação de géis rígidos de PVA é necessária a utilização de polímero com baixos graus de acetilação (ou altos graus de hidrólise) (Lozinsky, et al., 1998).

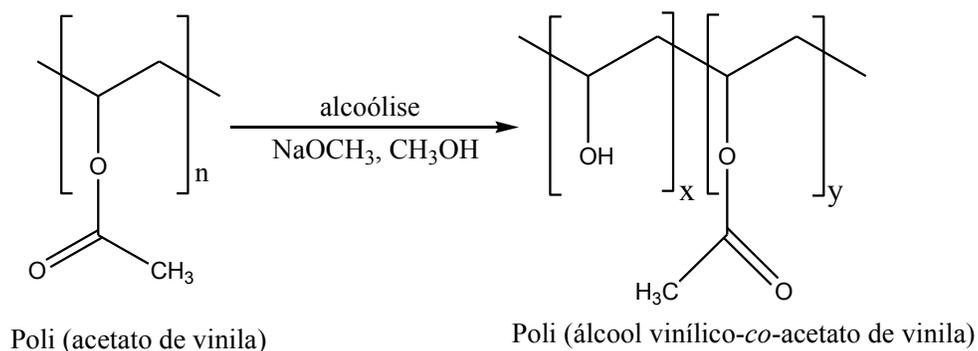


Figura 16. Esquema de reação de metanólise do poli(acetato de vinila) a poli(álcool vinílico)-co-poli(acetato de vinila).

A concentração da solução polimérica também é importante na definição das propriedades do gel resultante: Quanto maior a concentração de polímero, maior a força e a termoestabilidade do gel formado (Lozinsky, et al., 1998).

Geralmente, há um comprimento mínimo de cadeia do PVA para que ocorra a cristalização. Conforme a massa molar do PVA aumenta, o tamanho dos cristalitos também aumenta (Hassan, et al., 2000a). Entretanto, soluções muito concentradas de polímero com massa molar maior que 60000-70000 g/mol são muito viscosas, o que dificulta a formação dos cristalitos devido à diminuição da mobilidade das cadeias (Lozinsky, et al., 1998). A esteroregularidade do PVA também influencia a formação de géis de PVA. Cadeias de PVA atáticas cristalizam mais que cadeias de PVA isotáticas, enquanto cadeias de PVA sindiotáticas são menos cristalizáveis (Hassan, et al., 1998).

3.1.2. Influência da temperatura e velocidade de resfriamento nas características dos hidrogéis de PVA

O tratamento criogênico a que as cadeias de PVA são submetidas tem influência nas propriedades dos hidrogéis de PVA. A temperatura de congelamento das soluções aquosas de PVA é pouco menor que 0 °C (~ -1 °C), mas para que ocorra o congelamento do sistema, geralmente são utilizadas temperaturas de congelamento de -10°C (Lozinsky, 1998). Com relação à velocidade de congelamento, taxas elevadas de resfriamento (por exemplo, com a utilização de nitrogênio líquido) podem resultar em rachaduras no gel, devido ao excessivo cisalhamento a que o gelo é submetido ao congelar rapidamente em um meio viscoso. Entretanto, taxas de resfriamento entre 0,1 – 17 °C/min diminuem o efeito do cisalhamento durante a formação do gelo em um meio viscoso, resultando em géis sem rachaduras (Lozinsky, et al., 1998).

A temperatura de congelamento controla a composição das fases em equilíbrio de solvente congelado e não congelado, afetando a mobilidade dos segmentos de cadeia de PVA (Lozinsky, et al., 1998). Quanto menor a

temperatura de congelamento do sistema “PVA-água”, menor a quantidade de solvente não congelado na microfase líquida. Em temperaturas maiores (ainda negativas), a quantidade de água não congelada na microfase líquida aumenta, permitindo maior mobilidade dos segmentos de cadeia e, portanto, possibilitando maior formação de interação polímero-polímero. Assim, soluções de PVA mantidas a -10°C resultam em géis mais rígidos do que géis preparados a -20°C pelo mesmo período de tempo. Entretanto, o fator mais importante nas características dos géis de PVA é a condição de descongelamento. Quanto mais lento o processo de descongelamento, maior a força do gel formado (Hassan, et al., 2000b); isso porque baixas taxas de descongelamentos permitem que o sistema PVA-água mantenha-se por mais tempo nas temperaturas entre -5 e -1°C . Nessa temperatura, a quantidade de água na microfase líquida é suficiente para permitir alta mobilidade das cadeias de PVA, resultando em emaranhados de cadeias macromoleculares (Lozinsky, et al., 1998; Finizia, et al., 2006). Nessa temperatura a concentração de PVA na microfase líquida ainda é suficientemente alta para garantir a formação de géis com alta resistência mecânica.

3.1.3. Efeito dos ciclos de congelamento/descongelamento nas propriedades de difusão de géis de PVA

Os efeitos dos ciclos de C/D nas propriedades de difusão de filmes de PVA dependem da compreensão das modificações microestruturais obtidas durante o tratamento térmico. Vários trabalhos contribuíram para a elucidação desse processo: Kanaya e cols. (1994) investigaram a estrutura de géis de PVA formados em uma mistura de DMSO e D_2O usando espalhamento de nêutron a baixo ângulo para caracterizar a estrutura do gel e confirmaram que os pontos de reticulação são cristalitos; Ricciardi e cols. (2004) obtiveram, através de técnicas de espalhamento de nêutron a baixo ângulo (SANS) e espalhamento de raio-X convencional, informações estruturais de hidrogéis de PVA obtidos por ciclos de congelamento/descongelamento; Hatakeyema e cols. (2005) verificaram a

transição sol-gel de hidrogéis de PVA usando DSC e mostraram a morfologia de poros através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); Miyazaki e cols. (2006) mostraram as mudanças estruturais a que filmes de PVA preparados por ciclos de congelamento/descongelamento são submetidos durante estiramento uniaxial em água utilizando medidas simultâneas de SAXS e ensaios de tensão-deformação. Auriemma e cols. (2008) investigaram as transformações estruturais que ocorrem em soluções aquosas de PVA durante ciclos de C/D usando técnicas de SANS e observaram a formação de estrutura de duas fases bicontínuas que ocorre com processos em diferentes escalas de tempo e comprimento.

A correlação entre as propriedades de difusão das membranas de PVA e os ciclos de C/D está associada com o fenômeno de exclusão de tamanho devido à rede física de cristalitos formada durante os ciclos de C/D (Hickey, et al., 1995). A variação nas taxas de congelamento durante os ciclos de C/D foi utilizada para modular a liberação de ciprofloxacina a partir de filmes de PVA (Gutiérrez, et al., 2007).

Nesta parte do trabalho, a influência dos ciclos de congelamento/descongelamento no comportamento de difusão de S-nitrosoglutationa (GSNO) *in vitro* de filmes de PVA liberadores de GSNO foi analisada e correlacionada às mudanças na morfologia e cristalinidade dos filmes para a modulação da eluição de GSNO em aplicações biomédicas.

A influência do número de ciclos sobre o comportamento de difusão de GSNO *in vitro* a partir de filmes de PVA foi avaliada anteriormente (Simões, 2006). Os resultados de difusão foram agora correlacionados a características morfológicas observadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e espalhamento de raios-X a baixo ângulo (SAXS).

3.2. Parte experimental

3.2.1. Materiais e reagentes

Poli(álcool vinílico) (PVA 99% hidrolisado, Mw 85000-146000), glutationa (GSH), nitrito de Sódio (NaNO_2) e solução tampão fosfato (pH 7,4) foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA), acetona (Carlo Erba, Milão, Itália), ácido clorídrico (HCL, Synth, Diadema, SP, BR) foram utilizados sem purificação prévia. Todas as soluções aquosas foram preparadas com água desionizada obtida em um sistema de filtragem Milli-Q (Billerica, MA, EUA).

3.2.2. Síntese da S-nitrosoglutationa

A S-nitrosoglutationa (GSNO) foi sintetizada através da reação de S-nitrosação da GSH com NaNO_2 , em meio ácido, de acordo com o procedimento descrito em Oliveira e cols. (2002). A formação da GSNO foi constatada pelo desenvolvimento da coloração vermelho-alaranjada na solução. A GSNO foi precipitada com acetona e lavada com água gelada, antes de ser seca por liofilização. A GSNO recém-preparada foi armazenada a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ e protegida da luz até a utilização.

3.2.3. Preparação das soluções de PVA

Soluções aquosas de PVA (5 ou 2,5 % m/v) foram preparadas pela dissolução de PVA em água desionizada a $105\text{ }^\circ\text{C}$ sob refluxo e agitação por 3 h. Após a dissolução, as soluções foram resfriadas lentamente a $25\text{ }^\circ\text{C}$ e usadas imediatamente.

3.2.4. Preparação dos filmes de PVA e realização dos ciclos de congelamento/descongelamento (C/D)

Filmes circulares de PVA foram obtidos por moldagem através da adição de 2,0 mL de solução de PVA (2,5 %) em moldes de *Nylon* circulares com 2 cm de diâmetro e 0,5 cm de profundidade.

Os filmes foram submetidos a 1, 3 e 5 ciclos de congelamento/descongelamento (C/D) para aumento do grau de cristalinidade e para promover a reticulação física. Cada ciclo de C/D consistiu na manutenção dos filmes em congelador a -20°C durante 20 h seguido de uma etapa de descongelamento a 25°C durante 4 h. Filmes não submetidos aos ciclos foram removidos do freezer e liofilizados imediatamente. Estes filmes serão denominados como zero-C/D. Filmes submetidos a ciclos serão denominados por 1-C/D, 3-C/D e 5-C/D. Todos os filmes foram secos por liofilização durante 24h.

3.2.5. Calorimetria Diferencial por Varredura (*Differential Scanning Calorimetry* – DSC)

As medidas de calorimetria diferencial de varredura foram realizadas em um calorímetro (TA Instruments, modelo Q-100, New Castle, DE, USA) calibrado com Índio Metálico (Temperatura de fusão, $T_f = 156,6^{\circ}\text{C}$). Filmes secos de PVA com massa entre 3,0 e 6,0 mg foram colocadas em cadinhos de alumínio e aquecidos dentro do forno do equipamento a uma taxa de $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ de -20°C a 250°C , sob atmosfera de nitrogênio. O grau de cristalinidade, X_c (%), dos filmes de PVA foi determinado como a razão entre a entalpia de fusão (ΔH_f) da amostra de PVA (normalizada pela massa do filme) e a entalpia de fusão de uma amostra de PVA 100 % cristalina ($\Delta H_{100\% \text{ crist}}$), calculada como 150 J/g, [23, 33, 34] de acordo com a Eq. 9:

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100\%cryst}} \times 100 \quad (\text{Eq. 9})$$

3.2.6. Espalhamento de Raio-X de baixo ângulo (*Small Angle X-ray scattering* – SAXS)

Os experimentos de SAXS foram realizados pelo nosso grupo no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS, Campinas, São Paulo, Brasil) sob proposta de número D11A-SAXS # 5909/06. O comprimento de onda de raios-X utilizado foi de 1,488 Å e a distância entre a amostra e o detector foi 1295 mm. Um sistema de detecção por CCD com intensificador de imagens foi utilizado para permitir o escaneamento bidimensional dos padrões de SAXS das amostras. A intensidade do raio-X espalhado, $I(q)$ foi determinada experimentalmente em função do vetor de espalhamento “q”, cujo módulo é dado por

$$q = (4\pi/\lambda)\sin(\theta) \quad (\text{Eq. 10}),$$

onde λ é comprimento de onda do raio-X espalhado e θ é metade do ângulo de espalhamento. Todos os padrões de SAXS foram corrigidos pela variação da sensibilidade do feixe de síncrotron em função do tempo de análise. O comprimento de correlação (d) das amostras com o pico de correlação foi calculado pela equação de Bragg Eq. 11:

$$d = 2\pi/q_{\max} \quad (\text{Eq. 11})$$

A intensidade dos espectros foi normalizada, de modo a permitir a utilização de unidades arbitrárias e a comparação direta dos padrões de espalhamento obtido para cada amostra.

3.2.7. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras de filmes de PVA não submetidos a ciclos de C/D e submetidos a 1, 3 e 5 ciclos de C/D foram colocadas em porta-amostras e revestidas com ouro sob alto vácuo. As amostras foram examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6360 LV - Tokio, Japão), operando a 20 keV.

3.2.8. Grau de Intumescimento (*Swelling Degree* – SD)

A mudança no grau de intumescimento dos filmes de PVA foi monitorada durante 5 h, com intervalos entre as medidas variando de 20 a 120 min. Filmes com massas entre 10 e 15 mg foram pesados (m_1) e imersos em 10 mL de água desionizada, a 25 °C. Para a realização das medidas, as amostras foram removidas da água, o excesso de água foi removido com papel absorvente e a massa final (m_2) foi medida. Os valores de SD foram calculados como porcentagem de aumento da massa em relação à massa seca dos filmes, de acordo com

$$SD = \left(\frac{m_2 - m_1}{m_1} \right) \times 100 \quad (\text{Eq. 12})$$

Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.9. Difusão de GSNO

As medidas de difusão de GSNO através de filmes de PVA foram realizadas com um modelo adaptado de cela de difusão de Franz conforme descrito em Simões (2006). Resumidamente, filmes de PVA preparados a partir de solução 2.5% (m/v) tratados por até 5 ciclos C/D, e secos por sublimação foram colocados entre as flanges dos compartimentos receptor e doador da cela de difusão. As flanges foram fixadas com parafusos e um anel de silicone foi utilizado para evitar a passagem de solução entre as flanges. A cubeta contendo a solução receptora foi posicionada no compartimento de cubeta de um espectrofotômetro com arranjo de diodos (HP 8453, California, EUA). A concentração de GSNO foi monitorada pela obtenção da mudança na absorbância em $\lambda = 336$ nm, que é a posição da banda de absorção máxima característica da GSNO (Seabra, et al., 2004). Os espectros para acompanhamento da alteração na banda de absorção foram obtidos a cada 10 min, a 37 °C, sob agitação magnética (200 rpm).

3.2.10. Cálculo do coeficiente de difusão

O modelo utilizado para descrever o perfil de liberação de fármacos hidrofílicos em matrizes que intumescem quando em contato com a solução receptora é dado pela Eq. 13, derivada da lei de Fick:

$$\frac{VdC_2}{dt} = \frac{[DA(C_1 - C_2)]}{L} \quad (\text{Eq. 13})$$

onde C_1 e C_2 são as concentrações de fármaco nos compartimentos receptor e doador, respectivamente, A é a área de difusão da membrana, L é a espessura da membrana e V é o volume total da cela (soma dos volumes dos compartimentos receptor e doador). A Eq. 13 pode ser integrada, resultando em:

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

(Eq. 14)

onde Q é a quantidade de soluto que difunde durante o tempo t. A regressão linear da Eq. 14 resulta no coeficiente linear 2DA/LV, de onde o coeficiente de Difusão (D) da GSNO através dos filmes de PVA foram calculados. A espessura dos filmes de PVA usados nas medidas de difusão foi obtida com um micrômetro antes da realização das medidas. Os valores de D foram calculados para os filmes zero-, 1-, 3- e 5-C/D.

3.3. Resultados e Discussão

3.3.1. Propriedades Térmicas

A Figura 17 mostra os termogramas de DSC dos filmes de PVA não submetidas aos ciclos (curva a) e submetidos a 1, 3 e 5-C/D (curvas b, c e d, respectivamente). Todos os termogramas apresentam um pico endotérmico próximo a 220 °C, que pode ser atribuído à fusão dos cristalitos (Hassan, et al., 2000a; Hassan, et al., 2000b). As entalpias de fusão (ΔH_f) e os correspondentes graus de cristalinidade (X_c) dos filmes de PVA apresentados na Figura 17 estão apresentados na Tabela 1 juntamente com outros parâmetros.

O grau de cristalinidade obtido pela análise do termograma de DSC do PVA não tratado por ciclos foi 28 %. Esse 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% e massa molar de 124000 g mol⁻¹. Observa-se ainda que o grau de cristalinidade aumenta de 28 % no filme não submetido a ciclos de C/D para 41, 39 e 42 % após 1-, 3- 3 5-C/D, respectivamente. O aumento

na cristalinidade dos filmes de PVA como resultado dos ciclos de congelamento/descongelamento está de acordo com outros trabalhos (Stauffer, et al., 1992; Hatakeyema, et al., 2005; Hickey, et al., 1995).

Entretanto, os valores de grau de cristalinidade 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 o grau de cristalinidade de filmes preparados a partir de solução de PVA (2,5 % m/v). Observa-se sob as condições experimentais testadas, que a máxima cristalinidade do PVA é atingida após o primeiro C/D e que os ciclos subseqüentes não resultam em mudanças detectáveis na cristalinidade. Isso é uma evidência que as mudanças mais significativas produzidas na matriz polimérica são atingidas durante a formação dos primeiros cristais de água, que por expansão do volume, comprimem a matriz amorfa, aumenta sua densidade e induz a cristalização das cadeias de PVA.

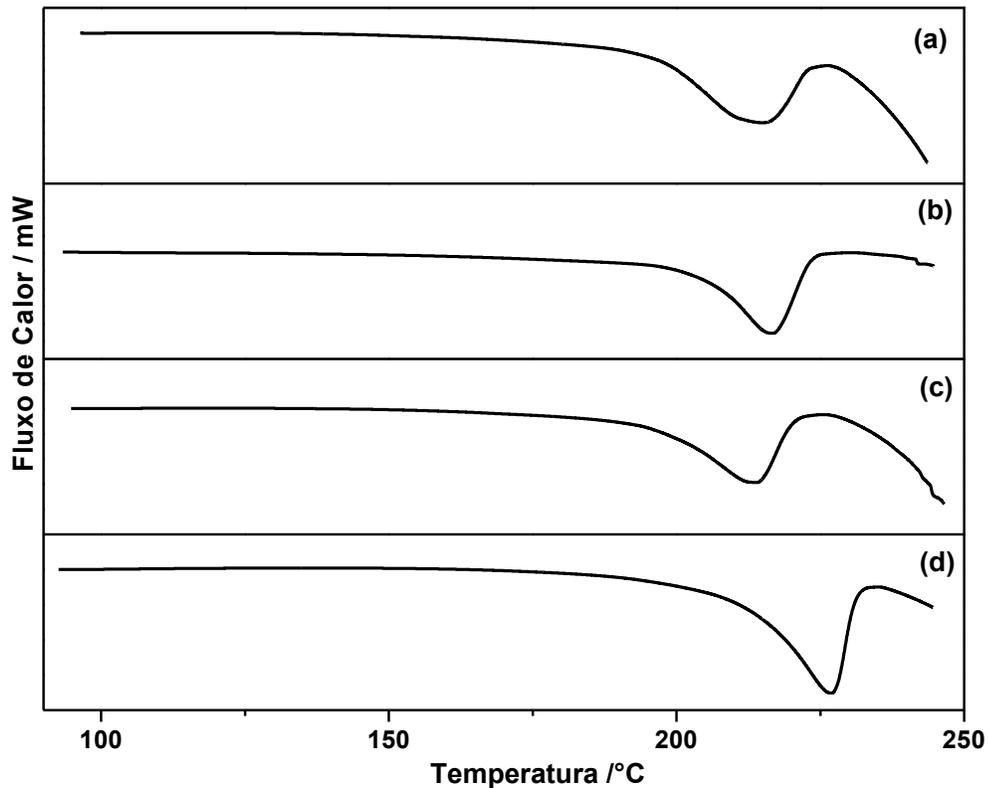


Figura 17. Termogramas de DSC de filmes de PVA não submetido a ciclos (a) e submetidos a 1(b), 3 (C) e 5 (d) ciclos de C/D.

3.3.2. Perfis de SAXS

O espalhamento de raio-X a baixo ângulo é uma técnica útil para estudar as características estruturais de materiais com tamanho da ordem de grandeza nanométrica (Glatter, et al., 1982).

O esquema de funcionamento do equipamento de Espalhamento de Raio-X a baixo ângulo está representado na Figura 18. Inicialmente, um feixe de raio-X é emitido pela fonte de raio-X. Ao atingir os colimadores, o feixe de raio-X é direcionado. As variações de densidade na amostra espalham os raios-X. A

radiação não espalhada é impedida de chegar ao detector pelo beamstop, a fim de evitar danos ao detector. Finalmente, a radiação espalhada atinge o detector.

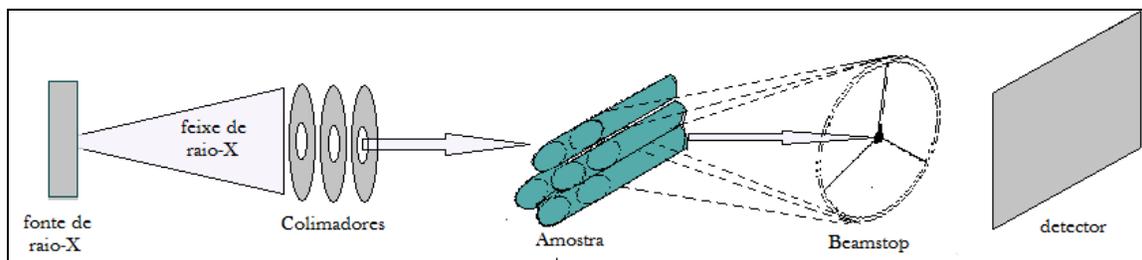


Figura 18. Esquema de funcionamento do SAXS. Baseado em Pauw (2007).

Os processos de espalhamento são caracterizados por uma lei de reciprocidade que resulta em uma relação inversa entre o tamanho da partícula e o ângulo de espalhamento (Glatter, et al., 1982). Estruturas com dimensões entre dezenas e milhares de angstroms (Å) são muito maiores do que o comprimento de onda dos raios-X, o que torna a faixa angular dos raios espalhados muito pequena. O espalhamento de raios-X é observado sempre que existem heterogeneidades na densidade eletrônica de materiais cuja estrutura microscópica apresenta entidades com tamanhos da ordem de nanômetros.

Os polímeros semicristalinos são, portanto, objetos ideais para serem estudados pela técnica de SAXS, já que apresentam variações de densidade eletrônica com comprimentos de correlação (ou seja, a distância entre densidades) entre 1 e 10 nm (Vonk, 1982). Além disso, pode-se assumir que as variações na densidade eletrônica ocorrem apenas em uma direção, o que permite o cálculo dos padrões de difração.

A intensidade de espalhamento do raio-X é determinada experimentalmente em função do vetor Q , definido por

$$Q = \left(\frac{4\pi}{\lambda} \right) \sin \theta \quad (\text{Eq. 15}),$$

onde λ é o comprimento de onda do raio-X e θ é metade do ângulo de espalhamento (ângulo formado entre as direções dos feixes espalhado e transmitido) (Craievich, 2002; Glatter, et al., 1982).

Em sistemas isotrópicos compostos de partículas idênticas e isoladas dispersas em uma matriz, a intensidade de espalhamento de SAXS pode ser definida como (Craievich, 2002):

$$I(q) = NI_1(q)S(q) \quad (\text{Eq. 16})$$

onde N é o número de partículas por unidade de volume, $I_1(q)$ é a função de espalhamento de uma partícula isolada e é dada por

$$I_1(q) = \int_0^{\infty} 4\pi r^2 \gamma(r) \frac{\sin qr}{qr} dr \quad (\text{Eq. 17})$$

sendo r a distância entre as partículas com densidade de flutuação e γ a função de correlação entre elas. $S(q)$ é a função de estrutura das partículas que descreve a correlação espacial entre elas. Se as partículas estão suficientemente distantes umas das outras, não há correlação espacial e $S(q) = 1$ ao longo de toda a faixa de q . Também, nos limites superiores de q , $S(q) = 1$ para qualquer sistema. Daí, a equação 1 se torna

$$I(q) = NI_1(q) \quad (\text{Eq. 18}).$$

No caso de partículas homogêneas, a forma da curva $I(q)$ corresponde à função de estrutura $S(q)$. Em um sistema anisotrópico de N partículas idênticas por unidade de volume e sem correlação entre si, o raio de giro (R_g) das partículas

pode ser definido através da equação de Guinier, válida apenas na região de baixos valores de q da curva de espalhamento (Craievich, 2002):

$$I(q) = I(0) \exp\left(\frac{-q^2 R_g^2}{3}\right) \quad (\text{Eq. 19})$$

Nessa equação, $I(0)$ depende da densidade eletrônica das partículas e da matriz, além do volume das partículas.

Considerando as unidades espalhadoras de raio-X como partículas homogêneas, a forma da curva $I(q)$ corresponde à função de estrutura $S(q)$ (Craievich, 2002)). Dessa forma, a informação obtida do difratograma produz um parâmetro estrutura d_s correspondente à distância média entre as partículas, dado por

$$d = 2\pi / q_{\max} \quad (\text{Eq. 11})$$

onde q_{\max} é o valor de q correspondente à máxima intensidade de espalhamento.

A Figura 19 mostra os perfis de SAXS e os gráficos de Guinier obtidos para os filmes de PVA não submetidos aos ciclos e submetidos a 1-, 3- e 5-C/D. Observa-se que o perfil de espalhamento do filme não submetido a ciclos (Figura 19, curva a) mostra um pico alargado, um halo, com máximo em $q \sim 0,06 \text{ \AA}^{-1}$, que corresponde a uma distância média entre os cristalitos dispersos na fase amorfa de 10,5 nm, dado por $2\pi/q$, valor que está de acordo com resultados prévios apresentados na literatura (Ricciardi, et al., 2005B; Miyazaki, et al., 2006). Entretanto, para os filmes submetidos a 1-, 3- e 5-C/D há a perda do pico de correlação, como se pode observar na Figura 19 (curvas b a d).

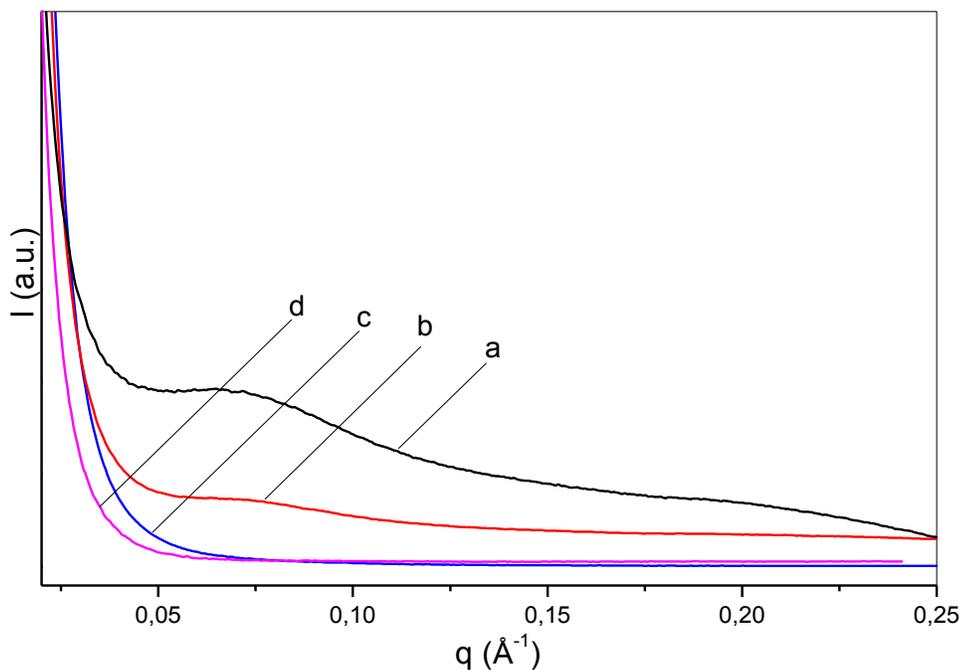


Figura 19. Perfis de SAXS de filmes de PVA não submetidos a ciclos (a) e submetidos a 1- (b), 3- (c) e 5-C/D (d).

A Figura 20 apresenta os gráficos de Guinier para os filmes de PVA zero-, 1-, 3- e 5-C/D (curvas a, b, c e d, respectivamente) na região de menor ângulo de espalhamento. A elaboração desses gráficos permitiu o cálculo do raio de giro (R_g) das entidades espalhadoras de raios-X em todas as amostras, através da utilização da equação de Guinier apresentada anteriormente (Eq. 19). Os valores de R_g obtidos para cada amostra estão apresentadas na Tabela 1.

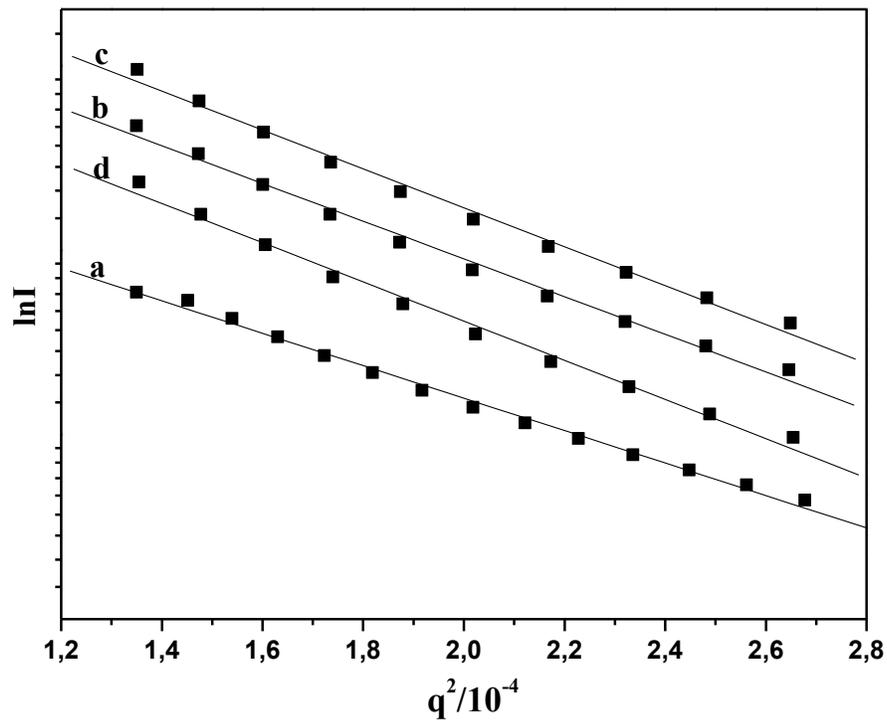


Figura 20. Gráficos de Guinier de filmes de PVA não submetidos a ciclos (a) e submetidos a 1- (b), 3- (c) e 5-C/D (d).

Observa-se que o R_g das unidades espalhadoras de Raios-X no filme não submetido a ciclos mede 155 nm e aumenta para 176-179 nm, para as amostras submetidas a 1-, 3- e 5-C/D. A ordem de grandeza dos valores de R_g das amostras analisadas sugere que as unidades espalhadoras de raio-X são as regiões de baixas concentrações poliméricas, já que essa dimensão está de acordo com o valor relatados por (Auriemma, et al., 2006).

3.3.3. Morfologia da Superfície

A morfologia da superfície dos filmes de PVA foi avaliada por MEV. As micrografias dos filmes não submetidos a ciclos e submetidos a 1-, 3- e 5-C/D e liofilizados estão apresentadas na Figura 21, em aumentos de 50, 500 e 5000 vezes.

Observa-se que todos os filmes apresentam uma superfície porosa, embora a superfície do filme não submetido aos ciclos seja principalmente revestido por uma membrana contínua. O filme submetido a 5-C/D apresenta uma morfologia com maior porosidade, com uma distribuição de tamanhos maior que os outros filmes. A Figura 21 ainda sugere que os poros nesse filme são interconectados em uma estrutura esponjosa.

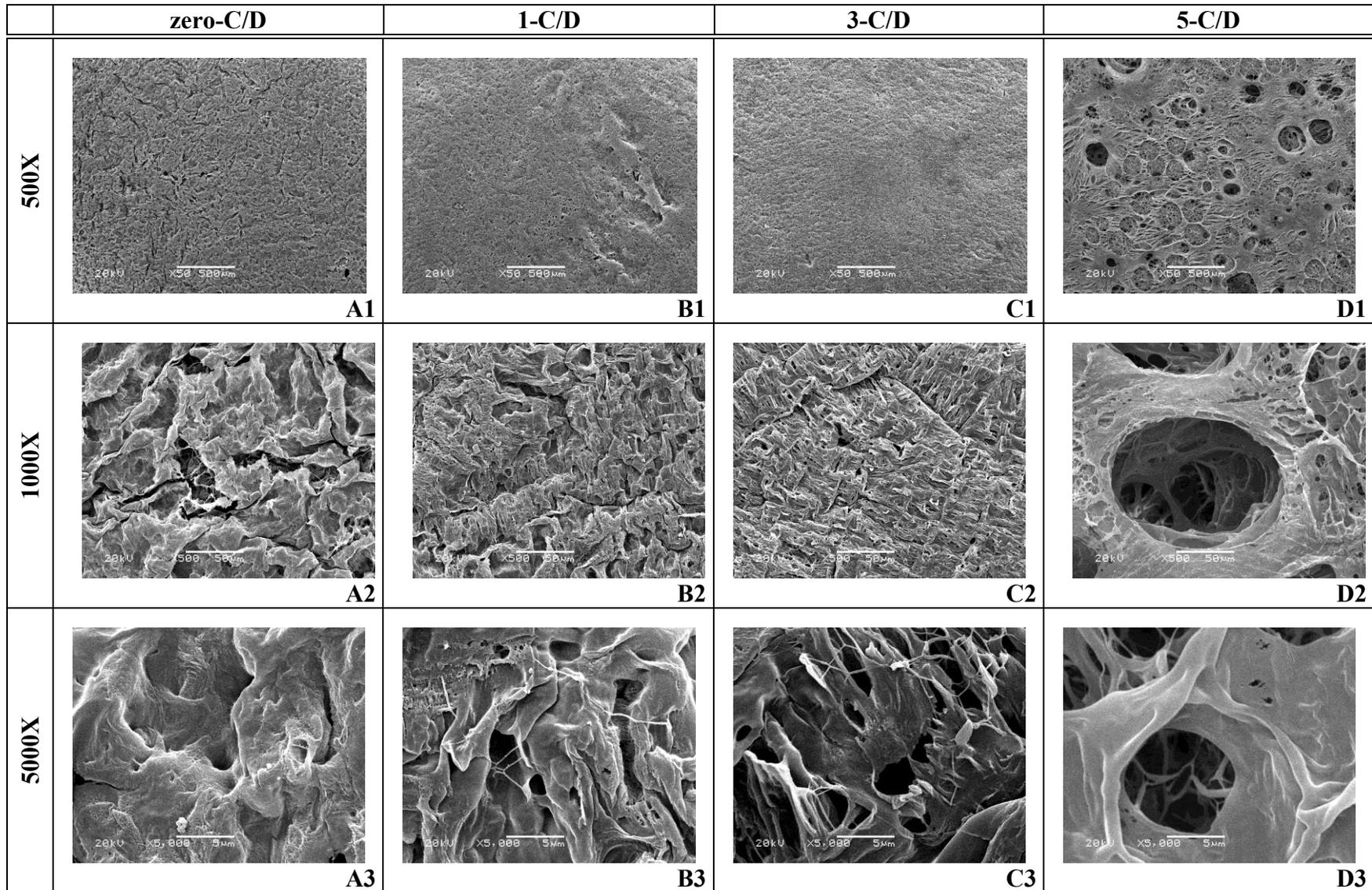


Figura 21. Micrografias de filmes de PVA zero-C/D, 1-C/D, 3-C/D e 5-C/D. As barras vermelhas no inferior de cada figura correspondem a 50, 10 e 5 μm nos aumentos de 500, 1000 e 5000 vezes, respectivamente.

A Figura 22 mostra um gráfico de barras dos diâmetros médios dos poros nos filmes zero-, 1-, 3- e 5-C/D.

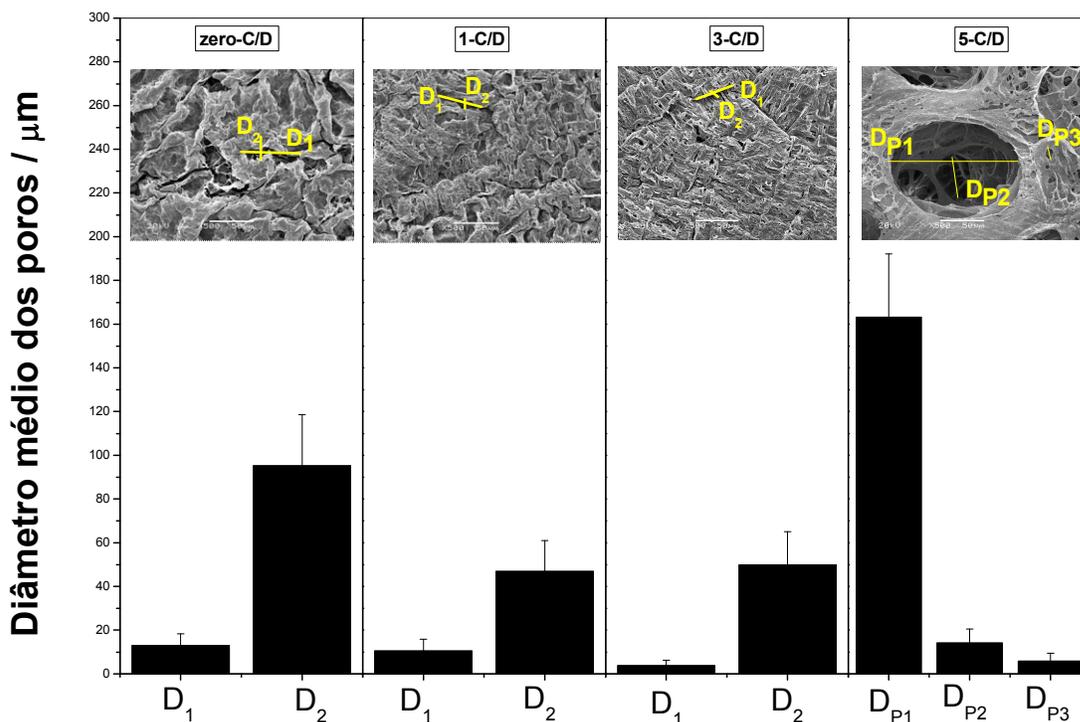


Figura 22. Tamanho médio de poros de filmes de PVA não submetido a ciclos (C/D) e submetidos a 1-, 3- e 5-C/D. Os “insets” mostram as dimensões consideradas em cada caso. Para o filme zero-C/D, 1- e 3-C/D os diâmetros D_1 e D_2 representam duas dimensões de poros alongados. Para o filme 5-C/D D_{P1} , D_{P2} e D_{P3} representam dimensões de diferentes populações de tamanhos de poros.

Há uma diminuição em D_1 para o filme 1-C/D ($46,9 \mu\text{m}$) comparado ao filme zero-C/D ($90 \mu\text{m}$), enquanto não há mudança em D_1 para o filme submetido a 3-C/D. O diâmetro D_2 possui dimensões semelhantes para os filmes zero-, 1- e 3-C/D (entre 5-15 nm). O filme 5-C/D mostra três populações principais de diâmetros

de poros onde a população de maior diâmetro de poro (D_{P1}) possui dimensões cerca de 2 vezes maior que os diâmetros maiores dos filmes zero-, 1- e 3-C/D. A população de poros D_{P2} e D_{P3} também tem dimensões similares aos diâmetros D_2 dos filmes zero-, 1- e 3-C/D.

A força diretora para a abertura dos poros com conseqüente compressão da matriz amorfa é a expansão da água durante o congelamento. Hatakeyema e cols. (2005) já descreveram que o aumento na dimensão do poro das membranas de PVA com os ciclos de C/D está associado com a densificação da matriz amorfa. Após a remoção dos cristais de gelo por sublimação no processo de liofilização, os volumes que eles ocupam são mantidos abertos e o resultado é a estrutura com poros parcialmente interconectados, observados principalmente nos filmes 5-C/D nas Figura 21 e Figura 22. A análise da morfologia da superfície não pode assegurar que a interconectividade dos poros ocorre ao longo de toda a espessura dos filmes zero-, 1- e 3-C/D. Entretanto, para o filme 5-C/D a morfologia da superfície sugere a formação de uma estrutura com poros esféricos interconectados, conforme as imagens apresentadas na Figura 22..

3.3.4. Grau de Intumescimento

A Figura 23 mostra a curva de grau de intumescimento (SD) (%) em função do tempo para os filmes zero-, 1-, 3- e 5-C/D.

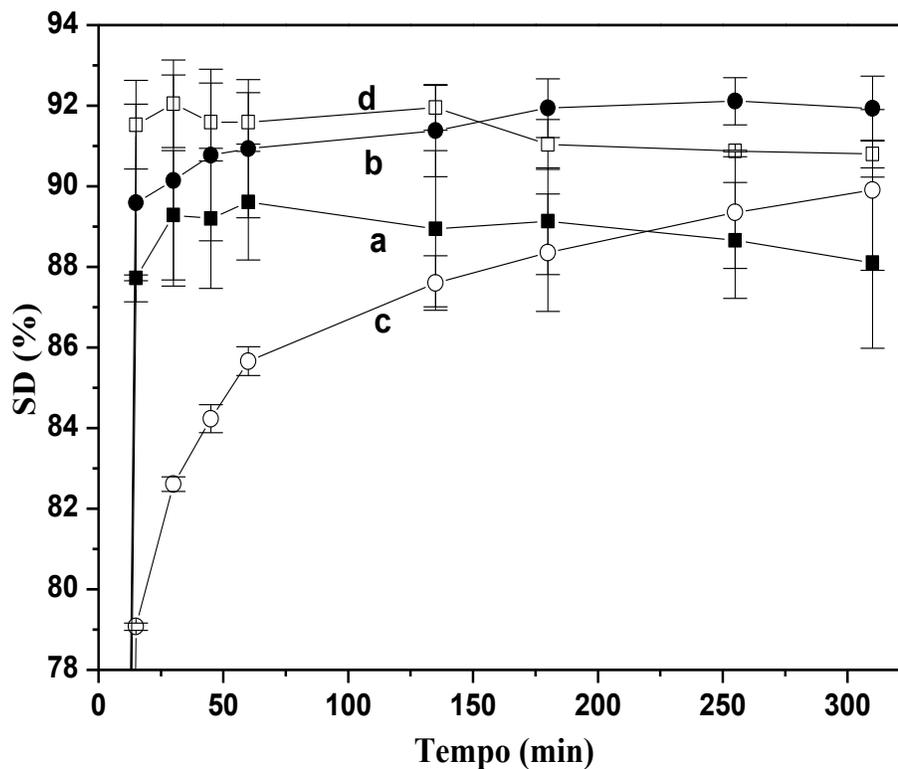


Figura 23. (A) Grau de intumescimento (%) em função do tempo (min) para filmes zero- (a), 1- (b), 3- (c) e 5-C/D (d). As barras de erros correspondem ao erro padrão das médias (n = 5).

Observa-se que os filmes zero-, 1- e 5-C/D alcançam o máximo de porcentagem em massa após 50 min. Entretanto, os filmes 1- e 5-C/D atingem o grau de intumescimento de 91-92 %, enquanto o filme zero-C/D atingiu o grau de intumescimento de 89 %. O filme 3-C/D apresentou uma taxa de aumento de massa mais lenta e não atingiu o máximo de intumescimento até 300 min.

Como o PVA é um polímero hidrofílico, a absorção de água pelos filmes leva à troca de interações entre os grupos hidroxila de cadeias de PVA por interações entre grupos hidroxila de PVA e água. Portanto, altos graus de intumescimento deveriam ser esperados para o filme zero-C/D uma vez que esse

filme possui o menor grau de cristalinidade (28 %). Entretanto, o baixo grau de intumescimento foi observado, que pode ser atribuído à perda de massa devido à contínua dissolução desse filme durante o experimento. No caso do filme 1-C/D o grau de cristalinidade aumentou para 41%, reduzindo a dissolução do filme e levando a um aumento na taxa de intumescimento. O filme 3-C/D resultou em menor absorção de água até 300 min enquanto para o filme 5-C/D a morfologia com poros grandes e interconectados, conforme sugerido pela Figura 21 e 22, resultou em um aumento do grau de intumescimento.

Os valores de grau de intumescimento encontrados são próximos aos resultados apresentados na literatura por Ricciardi e cols (Ricciardi, et al., 2005; Ricciardi, et al., 2004), em que a quantidade de água deuterada (D_2O) em géis de PVA (atático, M_w 115000; grau de hidrólise 98-99%) reidratados variou de 76,6 % a 86,6 %. A diferença no grau de intumescimento pode ser atribuída aos métodos de secagem dos géis antes da realização dos testes de intumescimento, já que nesse trabalho a secagem foi feita por liofilização, durante 24h, enquanto Ricciardi e cols. realizaram a secagem ao ar e a temperatura ambiente, até atingir massa constante.

3.3.5. Medidas de difusão

A Figura 24 mostra as curvas de logarítmo da quantidade de GSNO difundida por área ($-\ln Q$) versus tempo (em horas) para os filmes não submetidos a ciclos (curva a) e submetidos a 1-, 3- e 5-C/D (curvas b, c e d, respectivamente).

Os coeficientes de linearidade para as curvas de difusão estão próximos de 1,0. Isso confirma que o modelo de difusão utilizado pode ser considerado nessa faixa de tempo da análise. A tabela 1 mostra os valores de D obtidos a partir da inclinação das curvas da Figura 24.

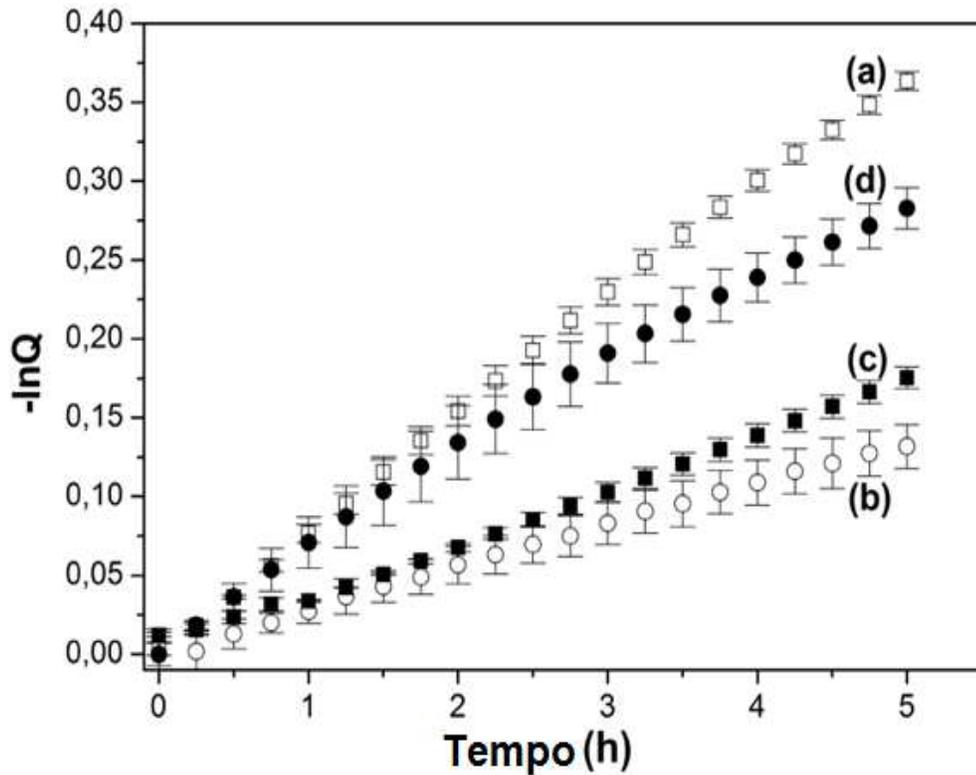


Figura 24. Curva de logaritmo da quantidade de GSNO ($-\ln Q$) difundida por unidade de área em função do tempo para filmes de PVA zero- (a), 1- (b), 3- (c) e 5-C/D (d). $[GSNO] = 12 \text{ mmol L}^{-1}$. Meio receptor: Tampão Fosfato ($\text{pH} = 7.4$). Temperatura = $37.0 \text{ }^\circ\text{C}$. As barras de erros correspondem ao erro padrão das médias de triplicatas.

Observa-se que os valores de D diminuem cerca de três vezes do filme zero-C/D para o filme submetido a 1-C/D. Comparando-se os filmes 1-C/D e 3-C/D ocorre um aumento em D . Para o filme 5-C/D o valor de D é duplicado comparando-se com o filme 1-C/D, atingindo o valor de $5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. A maior taxa de difusão de GSNO para o filme zero-C/D comparado aos filmes 1- e 3-C/D pode ser atribuída ao menor grau de cristalinidade, além da baixa densificação da fase amorfa no filme zero-C/D. Deve-se considerar que nos filmes hidratados a

GSNO pode difundir através dos poros interconectados e através das paredes dos poros da fase amorfa do polímero. A densificação da fase amorfa devido ao C/D deve resultar em uma diminuição da taxa de difusão, conforme observado para os filmes 1- e 3-C/D.

Para o filme 5-C/D, o aparecimento de uma população de macroporos com diâmetro médio de 160 μm , com interconectividade estendida entre as celas esféricas abertas pode ser a causa do aumento da difusão observada para esse filme.

Os resultados observados estão de acordo com o aumento do grau de cristalinidade observado por DSC que resulta em aumento da tortuosidade do caminho a ser percorrido pela GSNO, devido à presença dos cristalitos, 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. Ainda, os valores de taxa de difusão obtidos para os filmes zero-, 1-, 3 e 5-C/D são da mesma ordem de grandeza dos valores encontrados por Hickey e Peppas (1995) para a difusão de teofilina, um fármaco hidrofílico cujo volume hidrodinâmico é da mesma ordem de grandeza do volume relatado para a GSNO (Oliveira, et al., 2002). Os autores usaram uma cela de difusão monitorada espectrofotometricamente e observaram que um aumento no número de ciclos C/D resultou na diminuição de 3 para $1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ na taxa de difusão de teofilina de uma solução aquosa para um meio receptor de água desionizada, através de filme PVA preparados com soluções 15 % m/v e submetidos a C/D, mantidos a 25 °C.

Tabela 1. Entalpias de Fusão (ΔH_f), grau de cristalinidade (X_c), raio de giro (R_g) e coeficiente de difusão (D) da S-nitrosoglutationa em filmes de PVA não submetidos a C/D e submetidos a 1, 3 e 5 C/D.

Número de C/D	Entalpia de fusão (ΔH_f) ^a (Jg ⁻¹)	Grau de Cristalinidade (X_c) ^a (%)	Raio de Giro (R_g) ^b (nm)	Coefficiente de Difusão (D) ^c /10 ⁻⁷ ± Erro/10 ⁻⁷ (cm ² s ⁻¹)	Grau de intumescimento(%) ^d
0	43	28	155	5,7 ± 0,5	89
1	61	41	179	2,0 ± 0,5	92
3	58	39	178	2,5 ± 0,5	-
5	63	42	176	5,0 ± 0,5	91

^aCalculado a partir dos termogramas de DSC;

^bCalculado a partir das medidas de SAXS;

^cCalculado usando um cela de difusão vertical baseada no modelo da cela de Franz;

^dCalculada a partir de medidas gravimétricas.

3.4. Conclusões

O aumento do grau de cristalinidade de filmes de PVA submetidos a C/D em comparação ao filme não submetido a C/D está diretamente correlacionado à perda do pico de correlação observada por SAXS. Os filmes submetidos a C/D apresentam morfologia de poros interconectados.

As mudanças no grau de intumescimento e nas propriedades de difusão de GSNO com a aplicação de 1 a 5 C/D nos filmes de PVA estão associadas a um compromisso entre a densificação da fase amorfa do PVA e a abertura de poros interconectados.

4. APLICAÇÃO TÓPICA DE FILMES DE PVA/GSNO E AVALIAÇÃO DE SUA AÇÃO VASODILATADORA IN VIVO

4.1. Cicatrização de feridas e fenômeno de Raynaud

O objetivo principal no cuidado de feridas cutâneas é a promoção da rápida cicatrização da ferida. Esse é um processo bastante complexo, desencadeado por células inflamatórias, mas também pela interação entre mediadores solúveis de reparação tecidual e a matriz extracelular (Dadalti, 2008). O trauma tecidual é seguido por fases complementares e que se sobrepõem, que podem ser divididas entre fases inflamatória, fase proliferativa (de formação do tecido) e de remodelação da ferida (Amadeu, et al., 2008).

Baseados nos tipos de feridas e nos modos de cicatrização, vários materiais foram desenvolvidos para uso como curativos para feridas. Entre esses materiais, a utilização de hidrogéis parece ser promissora devido às suas características de fácil manuseio, prevenção da perda de fluidos corporais, barreira contra bactérias, permeabilidade a oxigênio, etc. (Kokabi, et al., 2007). Os hidrogéis de PVA são bastante utilizados como curativos para feridas devido à variedade de métodos que podem ser utilizados para sua reticulação (Stauffer, et al., 1992), boa biocompatibilidade e possibilidade de incorporação de carga a fim de melhorar suas propriedades mecânicas (Kokabi, et al., 2007). Ainda, os materiais utilizados como curativos para feridas podem ser funcionalizados com agentes que estimulem os estágios da cicatrização proporcionando melhores condições para que a reparação tecidual ocorra (Kokabi, et al., 2007). Nesse caso, a GSNO, considerada um reservatório de NO in vivo, pode ser incorporada em matrizes de PVA de forma que as propriedades benéficas do NO na cicatrização de feridas sejam aproveitadas.

O NO é considerado um agente regulador de todas as fases de cicatrização de feridas (Amadeu, et al., 2008), sendo responsável pelo controle da deposição de colágeno, angiogênese e proliferação celular. Géis de PEO-PPO-PEO

contendo GSNO foram aplicados em feridas na pele de ratos e mostraram aceleração da contração da ferida, melhora na reepitelização e na organização do tecido granular durante os primeiros 5 dias após a lesão (Amadeu, et al., 2007). Em um trabalho posterior o grupo também observou que os hidrogéis contendo GSNO resultaram em um aumento no fluxo sanguíneo comparado ao hidrogel sem GSNO aplicados sobre a pele de ratos diabéticos e sadios. Além disso, não foi observado aumento de nitrotirosina, um possível efeito colateral resultante da aplicação de GSNO, nem foi observado efeito sobre a pressão arterial dos ratos submetidos aos testes com hidrogel contendo GSNO (Amadeu e cols. (2008). O mesmo gel contendo GSNO foi aplicado na pele sadia do antebraço de humanos e resultou em um aumento do fluxo sanguíneo devido à liberação de NO (Seabra, et al., 2004).

Os resultados que relatam o aumento de fluxo sanguíneo através da administração de géis doadores de NO estimula o estudo da aplicação de curativos baseados em filmes de hidrogéis de PVA contendo GSNO para o tratamento da síndrome de Raynaud. O Fenômeno de raynaud e as úlceras digitais são resultantes do aumento de produção de vasoconstritores, diminuição da produção de vasodilatadores, ativação de plaquetas e proliferação da neointima das artérias digitais que podem levar à lesão isquêmica nos dedos e outras extremidades corporais (Wasserman, et al., 2010). A exposição ao frio parece estar relacionada ao aparecimento dos sintomas, e a vasoconstrição em resposta ao frio é um mecanismo de proteção do organismo para impedir a perda de calor (Wigley, 2002). Atualmente, as opções terapêuticas para o fenômeno de Raynaud e as úlceras digitais incluem a utilização de géis contendo nitroglicerina, bloqueadores de canais de cálcio, inibidores da fosfodiesterase-5 (Pope, 2008; Gayraud, 2007) e se não tratada corretamente, pode progredir para gangrena e amputação do membro (Wasserman, et al., 2010). Generini e cols. (2005) relataram que a administração de L-arginina aumenta a produção de NO e resulta em melhora do fenômeno de Raynaud.

Nessa etapa, a ação vasodilatadora de filmes de hidrogéis de PVA/GSNO fisicamente reticulados foi avaliada *in vivo* e correlacionadas às mudanças

morfológicas de cristalinidade apresentadas anteriormente, a fim de verificar a capacidade desse material ser utilizado como alternativa ao tratamento da síndrome de Raynaud e para o tratamento de feridas cutâneas.

4.2. Procedimento Experimental

Os materiais e reagentes, a síntese da S-nitrosoglutationa, a preparação dos filmes de PVA contendo GSNO e a realização dos ciclos de C/D estão descritos na seção 3.2 desse trabalho.

4.2.1. Medidas de perfusão sanguínea microvascular por laser Doppler

Todas as medidas foram realizadas em uma sala termostaticada a 25°C. Discos de filmes de PVA de 2,5 cm de diâmetro, submetidos a 1 e 5 ciclos C/D contendo GSNO foram aplicados sobre o antebraço de voluntários e as sondas de laser Doppler (Trasonic systems Inc.) foram fixadas junto à borda do filme. O fluxo sanguíneo dérmico basal foi medido simultaneamente no mesmo antebraço do voluntário com o uso de uma segunda sonda posicionada ao lado da primeira sonda a uma distância de ca. 1 cm da borda do filme de PVA/GSNO. As sondas foram fixadas à pele com adesivo. Os fluxos sanguíneos dérmicos nas duas sondas foram registrados em tempo real por ca. 95 min. Todos os valores apresentados representam médias de sete repetições \pm erro padrão da média.

A Figura 25 apresenta a infra-estrutura disponível no IQ/Unicamp, para a execução das medidas de vasodilatação na pele de voluntários.



Figura 25. Foto ilustrativa da infra-estrutura disponível no IQ/Unicamp, para a execução das medidas de vasodilatação na pele de voluntários. Sistema de medição “Transonic Systems Inc.” de dois canais, que permite o monitoramento simultâneo da região tratada (PVA com GSNO) e de uma região controle (eletrodo na pele do voluntário).

Filmes de PVA submetidos a 1 e 5-C/D foram cortados na forma de discos de 2,5 cm de diâmetro externo. Soluções de GSNO 50 mM foram preparadas pela dissolução de GSNO em tampão fosfato pH 7,4, contendo 1 mM de EDTA. Os discos de PVA foram imersos separadamente em 5 mL da solução de GSNO contida em frascos de polipropileno por 30 min, a temperatura ambiente e protegidos da luz. Após o período de carregamento os filmes foram removidos do frasco, o excesso de solução foi delicadamente retirado por um lenço de papel, e os filmes foram aplicados imediatamente na pele do antebraço dos voluntários para a realização das medidas de fluxo sanguíneo. A quantidade média de GSNO absorvida pelos filmes foi de $2,2 \pm 0,6 \mu\text{g}$ ($6,3 \pm 0,8 \mu\text{mol}$) a partir de medidas gravimétricas das quantidades de solução de GSNO absorvidas.

Três homens (20-26 anos) e quatro mulheres (24-41 anos) foram recrutados para o estudo. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética da

Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (PARECER CEP: N° 73612007). Antes da realização do teste, cada voluntário assinou um termo de consentimento de participação no estudo conforme estabelecido pela Declaração de Helsinki. Todos os participantes estavam saudáveis, declararam-se não fumantes, e não apresentaram histórico de diabetes ou doenças cardiovascular ou de pele.

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Fluxometria por Laser Doppler

A Fluxometria por Laser Doppler (FLD) é uma técnica não invasiva para a avaliação da perfusão microvascular sanguínea de tecidos vivos em tempo real (Fredrikson, et al., 2007). O efeito Doppler foi descrito pelo físico austríaco J. C. Doppler, em 1842 que observou a variação da frequência de ondas acústicas quando a fonte se encontra em movimento em relação ao observador. Na técnica de fluxometria por laser Doppler são utilizadas duas fibras óticas. O desvio na frequência da luz é detectado quando uma fibra óptica transmite a radiação monocromática diretamente no tecido alvo. O feixe de luz penetra a derme e é espalhado dentro do tecido. Os fótons incidem sobre células sanguíneas em movimento (principalmente as hemácias), que espalham a radiação com uma frequência diferente do incidente (efeito Doppler), e esta diferença é proporcional à velocidade da hemácia. A luz refletida, com nova frequência, é registrada no fotodetector da segunda fibra óptica. A Figura 26 mostra a representação da determinação da perfusão sanguínea por laser Doppler, através do corte transversal da pele.

A perfusão é definida pelo produto da concentração pela velocidade média das hemácias no volume avaliado pelo laser (Fredrikson, et al., 2007). Dessa forma, quanto maior for a vasodilatação sofrida por um vaso sanguíneo, maior

será a concentração de células vermelhas do sangue percorrendo o volume analisado pelo laser Doppler e maior será a modificação na frequência da luz do laser registrada no fotodetector da fibra óptica. Esse não é um valor absoluto, pois o volume analisado pelo laser Doppler depende de características da fibra ótica emissora e coletora, da distância entre elas, da potência e comprimento de onda do laser, das características óticas do tecido, da sensibilidade do instrumento, etc (Leite, 2007). Assim, o fluxo medido é calibrado em unidades arbitrárias (u.a.) e é uma quantidade proporcional ao fluxo.

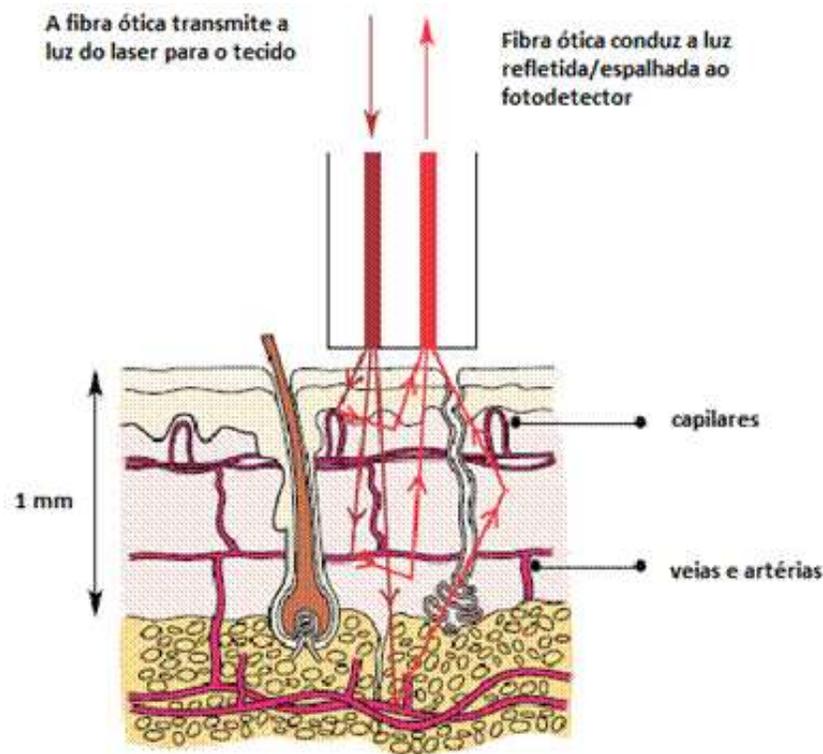


Figura 26. Representação do funcionamento do laser Doppler na pele de humanos (Moor Instruments, Inc.).

A FLD normalmente usa radiação gerada por um laser de HeNe com comprimento de onda em 632,8 nm (radiação visível) ou lasers de diodo, emitindo entre 780 nm a 820 nm (infravermelho próximo), com potências entre 1 mW a 3

mW (Moor Instruments, Inc.). Os fluxômetros convencionais são sensíveis (em tecidos moles) a uma distância de aproximadamente 1 mm e volume de 1 mm³, monitorando o fluxo sanguíneo em vasos de pequeno calibre (capilares) na superfície da pele e o fluxo das arteríolas e vênulas da camada inferior da pele.

As vantagens da utilização da FLD incluem a possibilidade de monitoramento do fluxo continuamente, em tempo real, e o registro instantâneo das variações de fluxo (Seabra, 2006). Além disso, é não-invasiva e não oferece riscos aos tecidos biológicos, podendo ser seguramente usada em humanos. Por outro lado, a fixação da sonda no tecido a ser avaliado é crítica, uma vez que as velocidades medidas pelo laser Doppler são baixas (da ordem de 0,01 a 10 mm/s) e portanto, pequenos movimentos perturbam a análise. Além disso, a variação de fluxo entre indivíduos causada, por exemplo, por diferenças na cor da pele, estado emocional, características óticas do tecido, volume e forma do tecido avaliado, etc. também é um fator limitante da técnica.

A liberação tópica de GSNO na pele de voluntários saudáveis resultou no aumento da perfusão da microcirculação sanguínea local, medida por laser Doppler, conforme apresentado na Figura 27.

Observa-se que a liberação de GSNO a partir do filme 5-C/D resultou em um aumento maior e mais rápido na perfusão sanguínea, com retorno aos níveis basais após 30 min, enquanto o filme 1-C/D resultou em aumento menor e mais lento da perfusão sanguínea, com uma ação sustentada por mais de 110 min.

A maior perfusão sanguínea observada para o filme 5-C/D comparado ao filme 1-C/D está correlacionada com o maior coeficiente de difusão e a maior taxa de intumescimento do filme 5-C/D devido à morfologia de poros interconectados observada nas imagens de MEV. Nos experimento de perfusão, os poros interconectados estão completamente preenchidos com solução de GSNO, que pode, dessa forma, difundir através de um meio contínuo, sem a necessidade de atravessar as regiões amorfas das paredes dos poros. No filme 1-C/D, a difusão de GSNO é limitada pela aparente ausência de poros interconectados. Além disso, deve-se observar que a máxima perfusão obtida para o filme 5-C/D está associada com um rápido retorno ao nível basal, enquanto o filme 1-C/D promoveu um

aumento sustentado da perfusão sanguínea a níveis mais baixos por mais de 100 min.

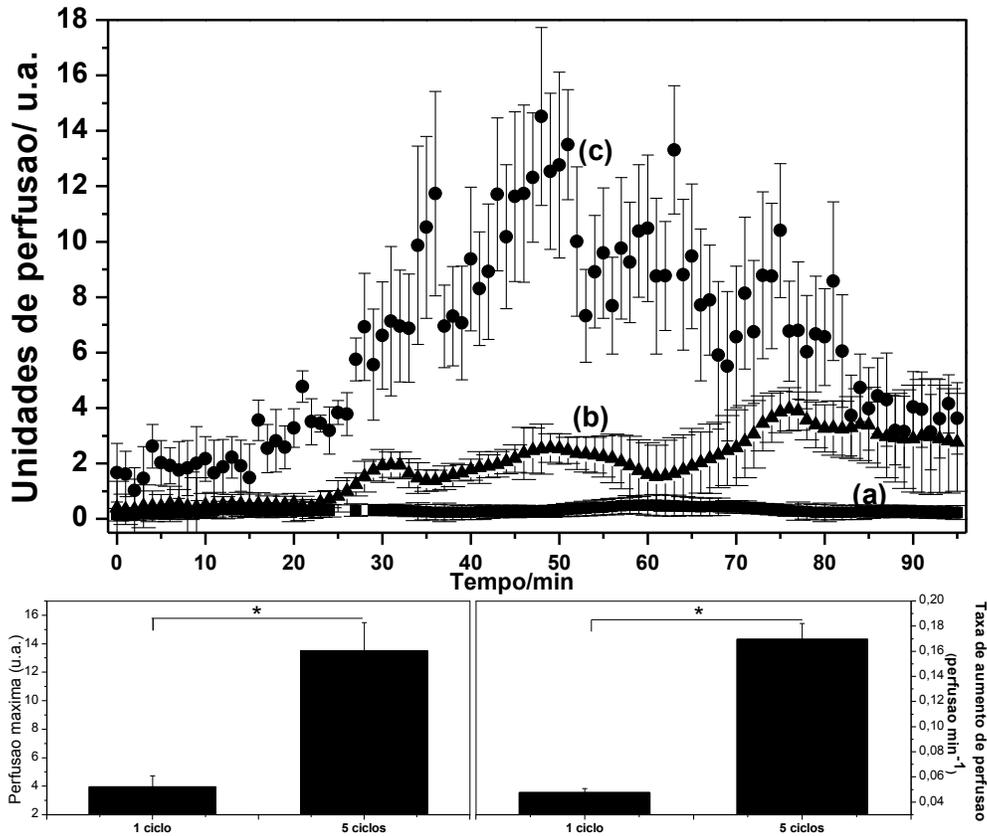


Figura 27. (A) Perfusão sanguínea em função do tempo após a aplicação de filmes de PVA contendo GSNO no antebraço de voluntários saudáveis (a) controle de perfusão sanguínea. (b) 1-C/D filme de PVA/GSNO e (c) 5-C/D filme de PVA/GSNO. (B) Máxima perfusão obtida após a aplicação tópica de filmes de PVA/GSNO submetidos a 1- e 5-C/D. (C) Taxa de aumento de perfusão sanguínea após a aplicação tópica de filmes de PVA/GSNO submetidos a 1- e 5-C/D, obtido da inclinação das curvas em (A) no tempo de 42 min. As barras de erros corresponde ao erro médio padrão das medidas (n=7, *=p<0,01).

Os resultados encontrados são semelhantes aos de trabalhos previamente publicados. Seabra e cols. (Seabra, et al., 2004) monitoraram por fluxometria por laser Doppler o efeito vasodilatador de géis de PEO-PPO-PEO contendo GSNO ou SNAC (0,3mol e 0,6 mol g⁻¹ de hidrogel, respectivamente) aplicados na pele do antebraço de voluntários saudáveis e observaram a perfusão sanguínea média de 250 (u.a.), com ação sustentada por mais de 3 h. Em outro trabalho, Seabra e cols. (2007) aplicaram o mesmo gel contendo GSNO na sola do pé de ratos Wistar e verificaram a perfusão sanguínea através de laser Doppler. Foram testados grupos de animais saudáveis e animais com diabetes mellitus induzida com streptozotocina e açúcar. Os autores relataram que géis contendo 0,23 mol g⁻¹ de GSNO resultaram em aumento na vasodilatação com ação sustentada por mais de 30 min. O efeito foi presente nos dois grupos de ratos avaliados. Ainda, os autores verificaram que a aplicação tópica de GSNO não resultou em nitração de resíduos de tirosina de proteínas da pele, nem alterou a taxa cardíaca ou os valores de pressão arterial durante a aplicação dos géis na pele dos ratos avaliados.

Os resultados encontrados para os géis de PVA contendo GSNO mostra que as mudanças na morfologia de poros dos filmes ou membranas de PVA podem ser usadas para modular suas propriedades de liberação em aplicações tópicas. Essa propriedade, aliada ao fato de que o tratamento por C/D resulta em filmes e membranas insolúveis, pode permitir o uso desses materiais como curativos para feridas, a fim de utilizar as propriedades de cicatrização do óxido nítrico (Amadeu, et al., 2007) ou para a promoção de vasodilatação local em tecidos isquêmicos.

4.4. Conclusões

A liberação tópica de GSNO dos filmes de PVA na pele de voluntários saudáveis leva ao aumento da perfusão sanguínea.

O número de ciclos de congelamento/descongelamento pode ser usado como uma ferramenta para controlar a difusão de GSNO a partir de filmes de PVA, permitindo a alteração dos perfis de perfusão sanguínea obtidos em aplicação tópica.

5. AÇÃO BACTERICIDA DE FILMES DE PVA ELUIDORES DE GSNO

5.1. Introdução

As infecções em feridas cutâneas estão entre os tipos mais comuns no ambiente hospitalar e freqüentemente estão associadas ao uso de dispositivos médicos contaminados, como por exemplo, cateteres intravasculares, utilizados nos procedimentos de angioplastia (Hetrick, et al., 2007). As bactérias causadoras desse tipo de infecção geralmente são resistentes aos antibióticos sistêmicos convencionais e a persistência da infecção freqüentemente resulta na remoção do dispositivo. Dois dos principais agentes de infecções hospitalares são as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) – gram positiva – e a *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) – gram negativa. A emergência de cepas multi-resistentes dessas bactérias, como as *S. aureus* resistentes a meticilina (MRSA) ou a vancomicina (VRSA) (World Health Organization (WHO)) e a *P. aeruginosa* resistente ao antibiótico imipenen (Ong, et al., 2004) apontam a necessidade do desenvolvimento de terapias alternativas capazes de conter essas bactérias multi-resistentes.

A classificação das bactérias em gram-positivas e gram-negativas é feita com base em uma técnica de coloração desenvolvida por Hans Christian Gram (Tauro, et al., 1986). As bactérias gram-positivas são bactérias que possuem parede celular externa com uma única e espessa camada de peptidoglicanos, enquanto as bactérias gram-negativas possuem uma parede celular de peptidoglicanos mais fina e uma segunda membrana, mais externa, composta de lipopolissacarídeos.

As infecções em dispositivos médicos são resultado da adesão bacteriana à superfície do material. Inicialmente, a adesão bacteriana é mediada por interações reversíveis, enquanto após períodos mais longos, ocorrem interações irreversíveis

entre as bactérias e a superfície dos dispositivos (Hetrick, et al., 2007; An, et al., 1998).

Após a adesão, algumas bactérias são capazes de formar um biofilme protetor através da secreção de uma matriz de exopolissacarídeo que retêm nutrientes e protege a bactéria das respostas imunes naturais. Além disso, esses biofilmes são importantes mecanismos de defesa para a bactéria e proporciona resistência às terapias com antibióticos tradicionais (Smith, 2005). Como a formação de biofilmes é atribuída à adesão inicial de bactérias a superfície do biomaterial, os estudos atuais que objetivam o desenvolvimento de superfícies antibacterianas visam o desenvolvimento de superfícies com propriedades físico-químicas que diminuam a adesão bacteriana ou que sejam liberadores de agentes antibacterianos ativos (Hetrick, et al., 2006).

Uma das estratégias propostas para conter infecções causadas por bactérias multi-resistentes é a utilização de terapias baseadas na liberação de NO (Seabra, et al., 2010). O NO é uma molécula pequena, bastante lipofílica e muito permeável à membrana celular, podendo se difundir através de paredes celulares de bactérias gram-positivas e gram-negativas. Além disso, as infecções em humanos geralmente estão associadas com um aumento da produção de NO (Ghaffari, et al., 2006) e sua habilidade em suprimir a proliferação microbiana e conter a infecção. Entre os mecanismos possíveis de atividade antimicrobiana de NO está a reação desse radical livre com o ânion superóxido (O_2^-) formando o peroxinitrito ($^{\cdot}OONO$), que pode levar à desintegração da membrana celular bacteriana (Wink, et al., 1998). Além disso, na presença de oxigênio, o NO forma espécies intermediárias reativas (como NO_2 , N_2O_3 e N_2O_4) que são capazes de nitrosar resíduos de aminoácidos, levando à alteração da função das proteínas e danos oxidativos ao DNA (Miranda, et al., 2000).

O conjunto de todas as ações apresentadas indica que a liberação local de NO pode ser útil no tratamento de infecções cutâneas causadas por bactérias multi-resistentes gram-positivas e gram-negativas.

O NO livre e doadores de NO já foram usados como agentes bactericidas em várias aplicações *in vivo* e *in vitro*. Alguns exemplos incluem a utilização de

nonoatos (Chen, et al., 2006), geração de NO através da redução de nitrito pelo ácido ascórbico (Ghaffari, et al., 2006), NO gasoso exógeno (Ghaffari, et al., 2007), RSNOs (Cariello, et al., 2010) além de biomateriais liberadores de NO que incluem materiais poliméricos (Seabra, et al., 2010), xerogéis (Hetrick, et al., 2007), géis (Nablo, et al., 2005; Hetrick, et al., 2007) e nanopartículas de sílica (Hetrick, et al., 2008).

No caso de lesões cutâneas infectadas com bactérias multi-resistentes, pode-se considerar o tratamento local das lesões através da sua oclusão com biomaterias que liberem NO ou doadores de NO. A oclusão de feridas é utilizada para melhorar as condições de cicatrização, diminuindo o tempo de fechamento da lesão (Kokabi, et al., 2007).

O PVA é um polímero com boas propriedades para utilização como curativo para feridas (Kokabi, et al., 2007), já que pode ser utilizado na forma de filmes de hidrogéis reticulados por diversos métodos, como irradiação por feixes de elétrons ou irradiação por raios gama (Alexander, et al., 1957; Peppas, et al., 1977) mistura com agentes reticulantes químicos como o glutaraldeído (Peppas, 1987), e ciclos de congelamento/descongelamento (Peppas, et al., 1977; Hassan, et al., 2000a; Lozinsky, 1998).

Géis de PVA em blendas com alginato de sódio preparados por ciclos de congelamento/descongelamento já foram utilizados como matrizes liberadoras de nitrofurazona para a oclusão de feridas e mostraram-se efetivos em aumentar a velocidade de cicatrização de feridas no dorso de ratos (Kimb, et al., 2008). Filmes de PVA/beta-glucano reticulados por ciclos de congelamento/descongelamento também resultaram em menor tempo de cicatrização de feridas na pele de ratos comparados a curativos feitos com gaze de algodão (Huang, et al., 2008). Ainda, Kokabi e cols. (2007) prepararam um nanocompósito para ser utilizado como curativo de feridas baseado em hidrogéis de PVA fisicamente reticulados e reforçados com argila e obtiveram um material com boa capacidade de intumescimento, taxa de transmissão de vapor, boa propriedade de barreira contra penetração microbiana e boas propriedades mecânicas.

Portanto, a utilização de filmes de hidrogéis de PVA liberadores de GSNO no local de lesões cutâneas tem potencial para ser usado na prevenção/tratamento de infecções hospitalares com bactérias resistentes. Nessa parte do trabalho, a atividade antibacteriana de filmes de PVA fisicamente reticulados e liberadores de GSNO foi avaliada contra cepas de bactérias gram-positivas – *S. aureus* – e gram-negativas – *P. aeruginosa*.

5.2. Parte experimental

5.2.1. Materiais e reagentes

Os materiais e reagentes, bem como preparação das soluções de PVA e a síntese de GSNO já foram descritos anteriormente (itens 3.2.2 e 3.2.3). Além desses materiais, a atividade antibacteriana dos filmes foi determinada em meio de Mueller-Hinton (MH) (Difco, Detroit, MI, USA), conforme descrito na ref. (CLSI, 2003) 2003). A solução de cloreto de sódio e o meio de Mueller Hinton foram esterilizadas a 120 °C por 20 min antes da utilização.

5.2.2. Incorporação de GSNO na solução de PVA

Soluções de GSNO foram preparadas em água desionizada, protegidas da luz e foram adicionadas em seguida em solução de PVA, previamente preparada, de forma a se obter soluções com concentrações finais de 2,5 % m/v de PVA. As concentrações finais de GSNO nas soluções de PVA foram de 5, 10, 12,5, 15, 18,5, 22,5 e 25 mM.

5.2.3. Revestimento dos poços de placas de cultura com filmes de PVA e PVA/GSNO

Os filmes de PVA e PVA/GSNO foram depositados no fundo de poços de placas de culturas de células de 24 poços, de poliestireno livre de pirogênio (Corning Costar, Cambridge, MA, EUA). Os fundos dos poços (diâmetro interno: 1,5 cm; área = 1,8 cm²) foram cobertos completamente com 500 µL de solução de PVA ou solução de PVA/GSNO. As placas contendo as soluções foram mantidas a -20 °C por 24h e submetidas a três ciclos C/D* (25 °C por 4h seguido de 24h a -20 °C, cada ciclo), a fim de obter filmes de hidrogéis de PVA fisicamente reticulados. A massa de PVA seco depositada no fundo dos poços individuais foi calculada como 5 mg. Com base nesta massa e nas concentrações de GSNO utilizadas calculou-se que as concentrações finais de GSNO nos filmes de hidrogéis submetidos à incubação com bactérias foram 0, 0,2, 0,4, 0,5, 0,6, 0,74, 0,9 e 1,0 mmol g⁻¹ PVA.

*Veja descrição dos ciclos C/D no item 3.2.4. acima.

5.2.4. Liberação de GSNO a partir dos filmes de PVA/GSNO

As placas de cultura de células com poços revestidos com filmes de hidrogéis de PVA foram preenchidas com 1 mL de solução tampão de fosfato (pH 7,4) e incubadas a 37 °C protegidas da luz. Em intervalos de tempo fixos, alíquotas de 100 µL foram coletadas dos poços e inseridas em um béquer de 20 mL contendo um sensor eletroquímico de NO imerso em 1 mL de solução saturada de cloreto de cobre I em água desaerada, mantida a 25 °C, sob agitação constante.

A quantidade de GSNO liberada do hidrogel foi monitorada através de medidas amperométricas realizadas com um eletrodo seletivo para NO (*Apollo 4000 free radical analyser, World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL, USA*) conectado a um computador convencional. O sensor de NO utilizado consistiu de

um fio de platina de 2 mm (ISSO-NOP, WPI) como eletrodo de trabalho e um eletrodo de referência de Ag/AgCl (Michael, et al., 2007). Os dois eletrodos são mantidos dentro um cilindro de aço inoxidável. A ponta do cilindro é coberta com uma membrana permeável a gás e seletiva a NO. O esquema abaixo (Figura 28) apresenta os componentes do eletrodo utilizado.

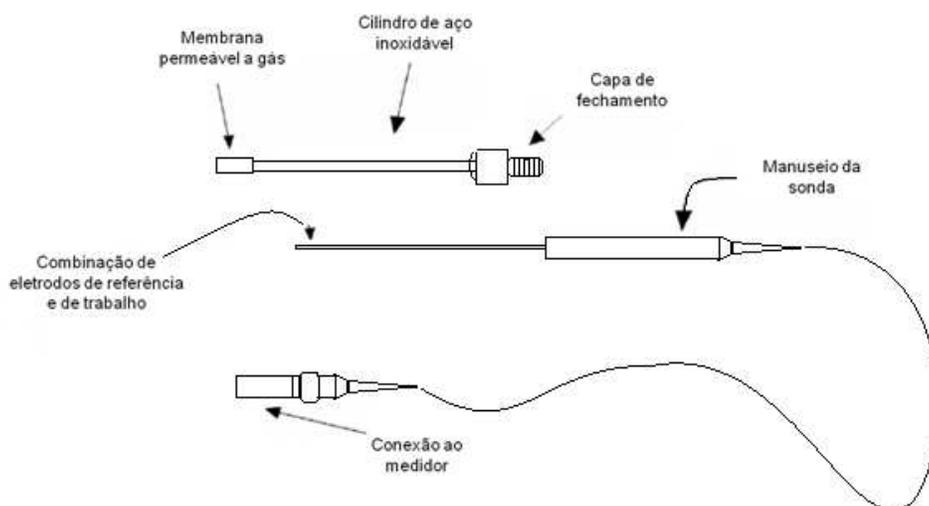
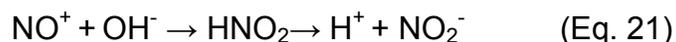


Figura 28. Componentes do eletrodo Seletivo para óxido nítrico. Baseado em (Zhang, 2004).

Para a detecção de NO pelo eletrodo, o sensor deve estar imerso em solução e um potencial positivo é aplicado no eletrodo de trabalho (~860 mV em relação ao eletrodo de referência). O NO dissolvido em solução se difunde através da membrana permeável a gás e seletiva a NO. O NO é, então oxidado na superfície do eletrodo de trabalho, uma corrente é produzida e o sinal registrado. Essa oxidação ocorre via reação eletroquímica, com a transferência de um elétron da molécula de NO para o eletrodo, resultando na formação o cátion nitrosônio:



O cátion nitrosônio é um ácido de Lewis e, na presença de OH^- , é convertido a nitrito (NO_2^-), de acordo com a reação abaixo:



O nitrito pode ser posteriormente oxidado a nitrato. A quantidade de NO oxidado é proporcional a corrente entre os eletrodos de referência e de trabalho.

5.2.5. Linhagem de bactérias

S. aureus ATCC 25923 foi usada conforme descrito em Grare e cols. (Grare, et al., 2007). *P. aeruginosa* foi obtida de uma linhagem multi-resistente (amicacina, gentamicina, netilmicina, imipenem, cloranfenicol, ampicilina, ciprofloxacina, cefotaxima). As cepas foram mantidas a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ em suspensão de glicerol (2,5 M) até a utilização.

5.2.6. Atividade bactericida de filmes de PVA/GSNO

Os experimentos envolvendo testes para avaliação da atividade bactericida dos filmes de PVA/GSNO foram realizados no Instituto de Biologia da Unicamp, pelo aluno de mestrado Dorival Martins, orientando do professor Dr. Marcelo Brocchi, docente do mesmo instituto.

Para os testes, a atividade bactericida foi avaliada contra três grupos diferentes: controle de crescimento positivo (poços sem revestimento), placas com poços revestidos com PVA e placas com poços revestidos com PVA/GSNO. Cepas de *S. aureus* e de *P. aeruginosa* cresceram em meio de Mueller-Hinton e colônias individuais foram suspensas em solução de NaCl 0,9%. A suspensão foi

diluída com meio de Mueller Hinton até a densidade de 10^5 unidades formadoras de colônia (ufc) por mL. Em seguida, 1 mL da suspensão foi adicionado a cada poço das placas e a placa foi incubada a 37°C . Após tempos de incubação de 2, 4, 6 e 12 h, as suspensões de bactérias de cada um dos poços foram removidas, transferidas para tubos eppendorf, vortexadas, diluídas em solução salina estéril 0,85% e plaqueadas por espalhamento em placas de MH. A contagem de ufc foi realizada, imediatamente após o plaqueamento e após 2, 4, 6 e 12 h de incubação. Foram realizados ensaios de dose-resposta em função da concentração de GSNO nos filmes hidrogéis de PVA/GSNO. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

5.2.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando-se o teste de Student e $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5.3. Resultados e Discussão

5.3.1. Liberação de GSNO a partir de filmes de hidrogéis de PVA/GSNO

A Figura 29 mostra as curvas de quantidade de GSNO acumulada na solução de PBS (pH 7,4, 37°C) adicionada aos poços das placas de cultura em função do tempo. A curva A refere-se à eluição de GSNO do hidrogel com concentração de GSNO de 1 mmol g^{-1} PVA e a curva B ao hidrogel com concentração de GSNO $0,4 \text{ mmol g}^{-1}$ PVA. A GSNO liberada foi quantificada pelo método eletroquímico.

O perfil de liberação apresentado na figura 29 mostra um aumento linear na quantidade de GSNO nas primeiras horas seguida da diminuição da quantidade de GSNO após 3,5 h para o hidrogel de concentração 1 mmol g^{-1} PVA e após 4,5

h para o hidrogel de 0,4 mmol de GSNO g⁻¹ PVA. A taxa de liberação de GSNO nas 3,5 h iniciais para o hidrogel mais concentrado (1 mmol g⁻¹ PVA) é de 0,82 ± 0,04 μmol h⁻¹. Após esse período, a quantidade de GSNO diminui a uma taxa de 0,32 ± 0,03 μmol h⁻¹. Para o filme de hidrogel menos concentrado a taxa de liberação nas 4,5 h iniciais é de 0,42 ± 0,02 μmol h⁻¹ e é seguida de um período de diminuição de concentração de GSNO a uma taxa de 0,17 ± 0,03 μmol h⁻¹. Aproximadamente 64 % do total de GSNO presente no hidrogel de maior concentração, equivalente a 3,2 μmol GSNO, foi detectado na solução de PBS nas 3,5 h iniciais do experimento. Para o hidrogel de menor concentração, após as 4,5 h de liberação aproximadamente 95 % do total de GSNO presente no gel foi detectado, o equivalente a 1,9 μmol GSNO. Sabe-se que a GSNO decompõe-se a uma taxa cerca de 8 vezes maior em solução aquosa do que nos filmes de PVA (Seabra, et al., 2004). Portanto, após a liberação de GSNO da matriz polimérica para a solução tampão, a decomposição da GSNO é acelerada. O eletrodo seletivo para NO não detecta a fração de NO₂ e NO₃ formada na solução. Assim, nas primeiras horas de avaliação, a liberação de NO a partir da GSNO é maior que a taxa de decomposição. Entretanto, após 3,5 h para o hidrogel mais concentrado e após 4,5 h para o hidrogel menos concentrado, a taxa de decomposição de NO é maior que a taxa de liberação de GSNO a partir do filme de hidrogel de PVA, resultando na queda da curva de eluição, conforme observado na Figura 29.

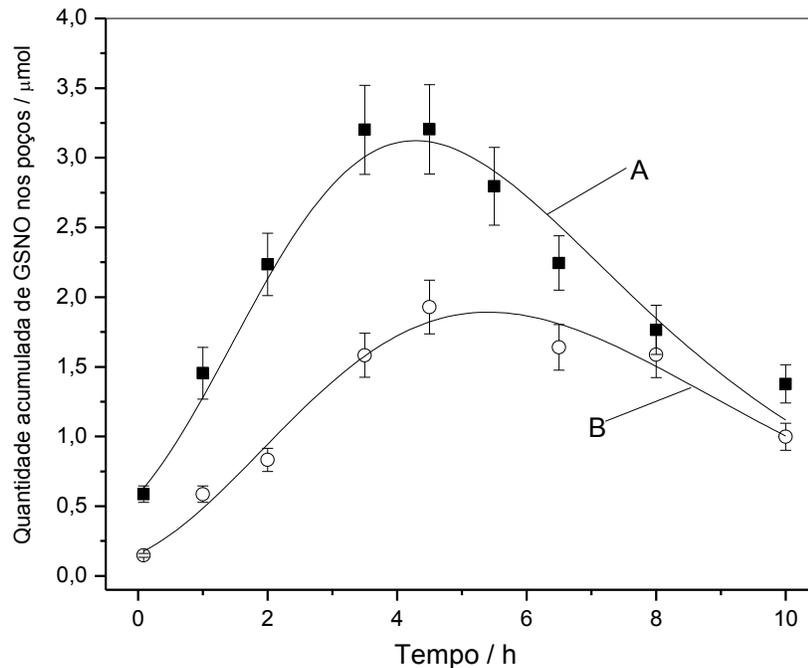


Figura 29. Quantidade de GSNO acumulada na solução de PBS (pH 7,4, 37 °C) adicionada aos poços das placas de cultura de célula contendo filmes de PVA/GSNO em função do tempo. Hidrogéis com concentração de GSNO de 1 (A) e 0,4 mmol g⁻¹ PVA (B). A barra de erros refere-se ao erro padrão de quadruplicatas.

As taxas de liberação de GSNO calculadas podem ser normalizadas pela área dos filmes depositados no fundo dos poços das placas de cultura de células, a fim de se obter o valor de fluxo de GSNO liberado dos filmes. Nesse caso, o fluxo de GSNO a partir do filme de hidrogel mais concentrado é de 450 nmol h⁻¹ cm⁻² e para o filme de hidrogel de menor concentração é de 230 nmol h⁻¹ cm⁻². Considerando-se que a GSNO dos hidrogéis testados libera NO livre, o fluxo de NO gerado será cerca de 100 vezes maior que o fluxo de NO relatado para materiais liberadores de NO livre com ação antibacteriana, que é da ordem de nmol h⁻¹ cm⁻² (Hetrick, et al., 2007; Seabra, et al., 2010; Nablo, et al., 2005).

As concentrações máximas de GSNO atingidas nos poços das placas de cultura de células foram de 3,2 mmol L⁻¹ para o hidrogel mais concentrado e de 1,9 mmol L⁻¹ para o filme de hidrogel menos concentrado. Essas concentrações são consideradas citotóxicas, justificando sua utilização na avaliação bactericida de hidrogéis de PVA/GSNO fisicamente reticulados (de Souza, et al., 2006; Barraud, et al., 2006).

5.3.2. Atividade bactericida

A Figura 30 (a e b) mostra a atividade bactericida de filmes de PVA eluidores de GSNO contra cepas de *S. aureus* (barras negras) e *P. aeruginosa* (barras brancas) após 2 e 4h de incubação. Pode-se observar uma resposta dependente do tempo e da concentração de GSNO nos filmes, contra as duas cepas avaliadas. Observa-se uma tendência de menor porcentagem de unidades formadoras de colônias (ufc) sobreviventes para *P. aeruginosa* em relação a *S. aureus* em todas as concentrações analisadas embora não existam diferenças estatisticamente significativas entre as susceptibilidades destas duas cepas à GSNO. A Figura 30b mostra que após 4 h de incubação a suscetibilidade da *P. aeruginosa* à GSNO é maior que a da *S. aureus*, a partir da concentração de 0,5 mmol de GSNO g⁻¹ de PVA.

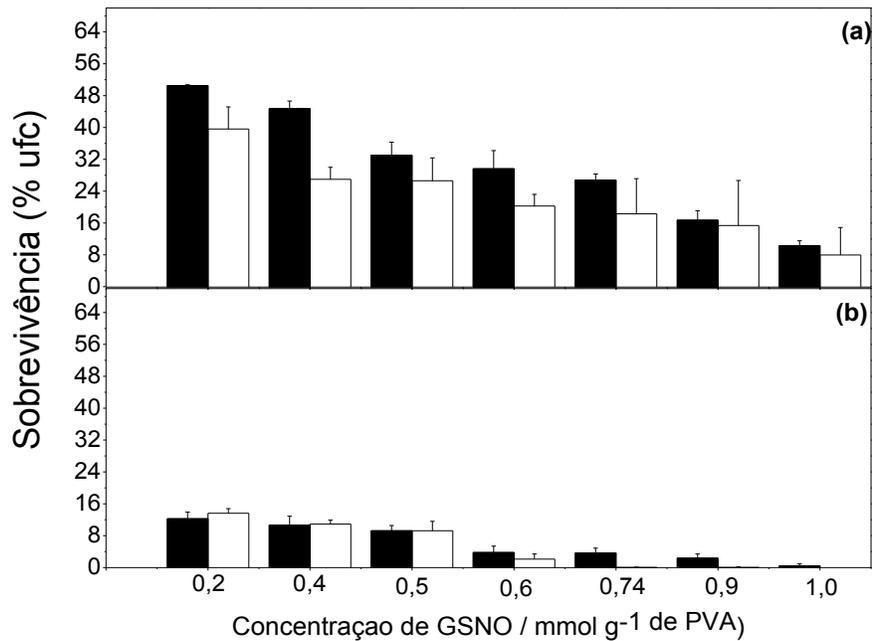


Figura 30. Porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* (barras negras) e *P. aeruginosa* (barras brancas) após incubação com filmes de hidrogéis de PVA eluidores de GSNO nas concentrações de 0,2; 0,4; 0,5; 0,6; 0,74; 0,9 e 1,0 mmol GSNO g⁻¹ de PVA durante 2 h (a) e 4h (b).

A Figura 31 mostra as curvas de sobrevivência das ufc de *S. aureus* e *P. Aeruginosa* incubadas por 12 h com filmes de PVA (usados como controle) e de PVA/GSNO na concentração de 0,4 mmol g⁻¹ de PVA.

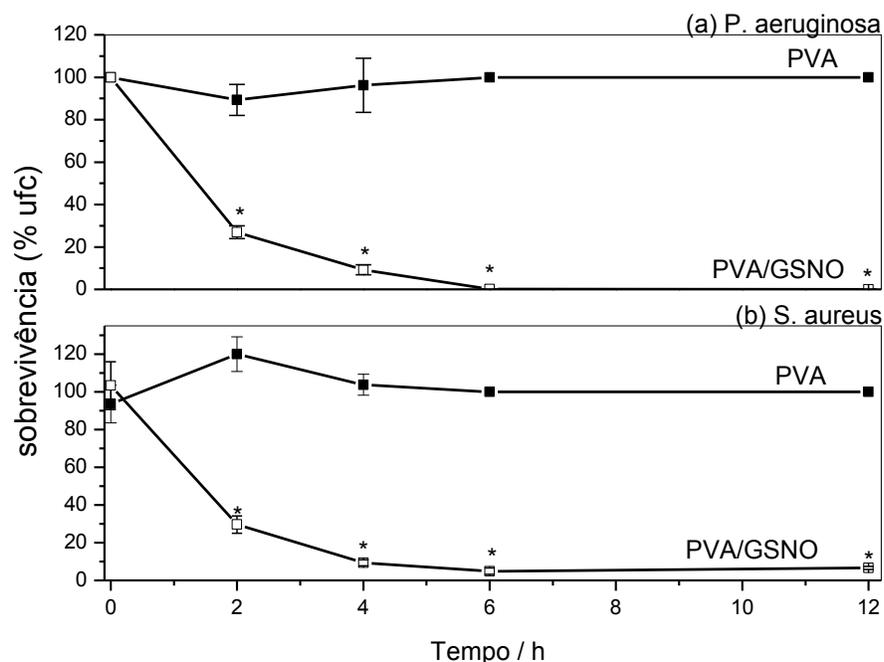


Figura 31. Porcentagem de sobrevivência das unidades formadoras de colônia (ufc) de *S. aureus* e *P. aeruginosa* incubadas por 12 h com filmes de PVA (usados como controle) e de PVA/GSNO na concentração de $0,4 \text{ mmol g}^{-1}$ de PVA.

Observa-se que o filme de PVA não reduziu a porcentagem de sobrevivência de nenhuma das bactérias com que foi incubado. Por outro lado, a presença de GSNO dos filmes de PVA levou a redução significativa das unidades formadoras de colônia. No caso das cepas de *P. aeruginosa*, observa-se que após 6h de incubação com filmes de PVA/GSNO na concentração de $0,4 \text{ mmol g}^{-1}$ de filme o meio de cultura foi completamente esterilizado (Figura 31(a)). Entretanto, para as cepas de *S. aureus* (Figura 31(b)), durante as 6h iniciais de incubação houve diminuição da porcentagem de ufc até próximo de zero, mas não houve a eliminação total das cepas, o que sugere que a quantidade remanescente de ufc pode se proliferar nas horas subsequentes. Ainda que o aumento nas ufc de *S. aureus* não tenha sido significativo, a permanência de unidades formadoras de colônias pode levar à reincidência de uma infecção *in vivo*. Para evitar a

permanência dessas unidades formadoras de colônias, realizou-se a incubação de filmes de PVA/GSNO na concentração de 1 mmol g^{-1} PVA com cepas de *S. aureus*. A porcentagem de sobrevivência de *S. aureus* neste caso está apresentada na Figura 32. Observa-se que, nessa concentração, após 4h de incubação, todas as ufc foram eliminadas.

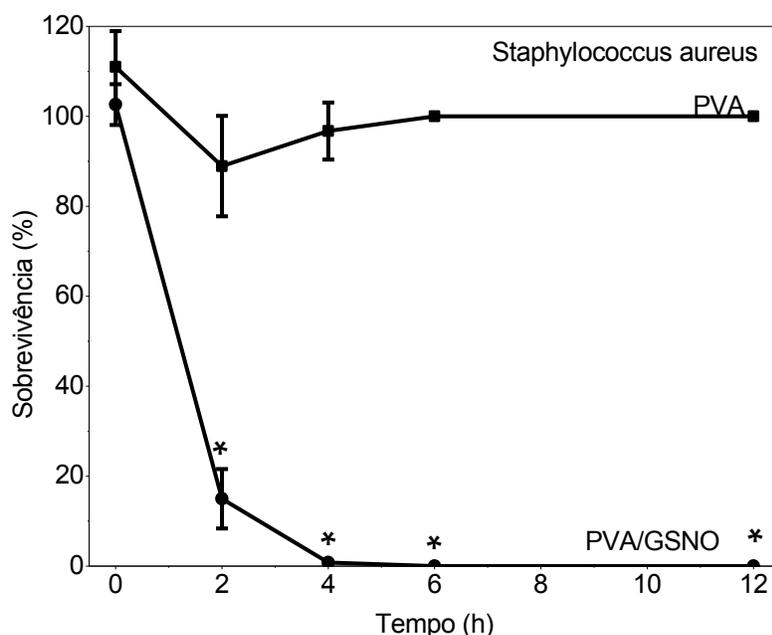


Figura 32. Porcentagem de sobrevivência das unidades formadoras de colônia (ufc) de *S. aureus* e *P. aeruginosa* incubadas por 12 h com filmes de hidrogéis PVA (usados como controle) e de hidrogéis de PVA/GSNO na concentração de $0,9 \text{ mmol g}^{-1}$ de PVA.

Sabe-se que a *P. aeruginosa* tem a habilidade de formar biofilmes capazes de protegê-la de ataques externos, aumentando sua resistência a antibióticos (Indian River State College, 2010; Jones, et al., 2010). Barraud, e cols., (2006) relataram que o doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) em concentrações

não tóxicas (25-500 nM) causou a dispersão do biofilme e a redução da adesão bacteriana na superfície de placas de cultura de células. Ainda, a incubação de meio de cultura com GSNO (1 μ M) e SNAP (1 μ M), apesar de menos eficientes que o NPS, também resultou na dispersão dos biofilmes. Embora os mecanismos envolvidos na ação microbicida mediada pelo NO não tenham sido investigados, pode-se considerar que os alvos intracelulares podem estar envolvidos, uma vez que o NO livre pode se difundir livremente através das membranas bacterianas. Conforme apresentado anteriormente, sabe-se também que a GSNO é uma molécula que pode realizar reações de transnitrosação com proteínas contendo grupos sulfidríla (Zhang, et al., 2005), ou pode sofrer a quebra homolítica da ligação S-NO, liberando o NO livremente (Oliveira, et al., 2002; Frost, et al., 2005; Shishido, et al., 2003). O NO livre pode promover reações com ânion superóxido levando à formação de peroxinitrito (Al-Sa'doni, et al., 2000). O peroxinitrito é bastante conhecido por promover danos às células, como a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares, ataque ao DNA afetando o metabolismo e o crescimento bacteriano (Seabra, et al., 2010; Barraud, et al., 2009). O aumento da concentração de ONOO⁻ em microcolônias de bactérias juntamente com um aumento da sensibilidade das células expostas a produção endógena de NO pode levar à indução da lise celular e morte bacteriana (Barraud, et al., 2006).

Desta forma, a ação bactericida da GSNO contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* poderia envolver tanto a ação direta da GSNO através de mecanismos de transnitrosação como a ação via liberação de NO e formação de ONOO⁻. Em qualquer um dos casos, as características de permeabilidade de membrana dos organismos gram-positivos e gram-negativos não parecem ser fatores limitantes da ação microbicida da GSNO. Portanto, filmes de hidrogéis de PVA/GSNO são de grande potencial para o tratamento de feridas cutâneas infeccionadas por bactérias multi-resistentes.

5.4. Conclusões

Filmes de PVA eluidores de GSNO apresentaram ação bactericida contra cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, podendo reduzir significativamente a viabilidade destas bactérias.

A ação bactericida de filmes de PVA/GSNO sugere um potencial de utilização desse material para o revestimento de dispositivos de contato sanguíneo, para evitar a sua colonização com bactérias gram-positivas e gram-negativas.

6. PROPRIEDADES ANTIPLAQUETÁRIAS DE FILMES DE PVA ELUIDORES DE GSNO

6.1. Problemas associados ao uso de dispositivos médicos de contato sanguíneo

Atualmente uma enorme quantidade de materiais poliméricos é utilizada na produção de vários dispositivos médicos de contato sanguíneo como stents, cateteres, balões de angioplastia, válvulas cardíacas artificiais, dispositivos de suporte circulatório, etc. A Figura 33 apresenta fotografias digitalizadas de um um cateter, um stent sobre um balão de angioplastia e de um stent expandido sobre o cateter balão.



Figura 33. (A) Fotografia digital de catéter intravenoso periférico.(B) Fotografia digital de stent montado sobre catéter balão, utilizado em procedimentos de angioplastia (Foto cedida por Vasquez, P. A. M.) (C) Micrografia obtida em microscópio óptico de stent expandido montado sobre cateter balão.

Após várias décadas de pesquisa, esses materiais apresentam excelentes propriedades mecânicas necessárias à sua aplicação; entretanto, a natureza

trombogênica desses materiais pode causar ativação e agregação plaquetária, formação de trombos, infecções e outras sérias complicações, responsáveis pelo insucesso desses dispositivos médicos (Ratner, 2007; Baier, 2006; Wu, et al., 2008).

Para evitar essas complicações, a administração sistêmica de anticoagulantes exógenos geralmente é necessária para reduzir o risco de formação de trombos (Frost, et al., 2005). Entretanto, em longo prazo o uso de anticoagulantes pode causar outros efeitos adversos, especialmente a possibilidade de hemorragia, trombocitopenia (redução do número de plaquetas no sangue) e sangramentos.

As reações na interface entre um material e o ambiente biológico têm um papel importante para a biocompatibilidade do mesmo. No caso do implante de stents podem ocorrer danos ao endotélio, causados pelo *stress* mecânico a que as paredes dos vasos sanguíneos são submetidas durante a expansão da plataforma do dispositivo médico, levando à formação de trombos e à proliferação de células musculares lisas, que resulta na reestenose causada pelo espessamento da neointima (Frost, et al., 2005), conforme apresentado na Figura 34. A abordagem mais tradicional para evitar esse problema é o revestimento dos dispositivos médicos com polímeros eluidores de fármacos capazes de inibir a proliferação celular.

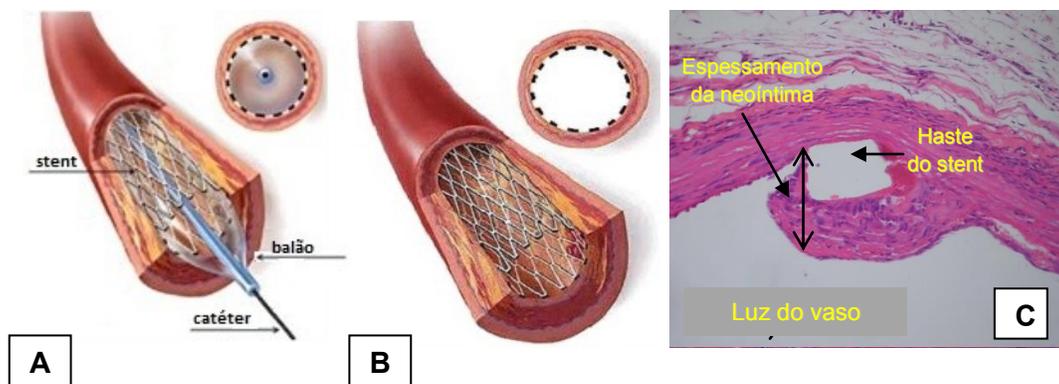


Figura 34. Representação de corte longitudinal de artéria submetida ao procedimento de angioplastia com stent (fonte: <http://www.sitechmed.com>). (A) Stent sobre catéter-balão insuflado, posicionado no local da lesão com fio-guia. (B) Stent implantado na artéria. (C) Microscopia óptica de corte longitudinal de artéria femoral de rato 7 dias após inserção de stent. (Imagem cedida por de Oliveira, F. Ganzarolli).

Entre os fármacos mais amplamente utilizados no revestimento de stents podem ser citados a rapamicina e o paclitaxel. A rapamicina, também conhecido por sirolimus, é uma lactona macrocíclica natural (Figura 35 A) com potente ação imunossupressora (Pan, et al., 2007). Ao se ligar ao receptor citosólico, conhecido como a proteína de ligação FK506, a rapamicina regula a citocina mTOR (alvo da rapamicina dos mamíferos) dependente da quinase, que bloqueia a progressão do ciclo celular na transição G_1/S (Ghatta, et al., 2007; Pan, et al., 2007). O paclitaxel (Figura 35 B) é um agente antineoplásico cujos mecanismos de ação incluem interrupção da mitose celular, retardo da migração celular e imunomodulação (Lin, et al., 2004).

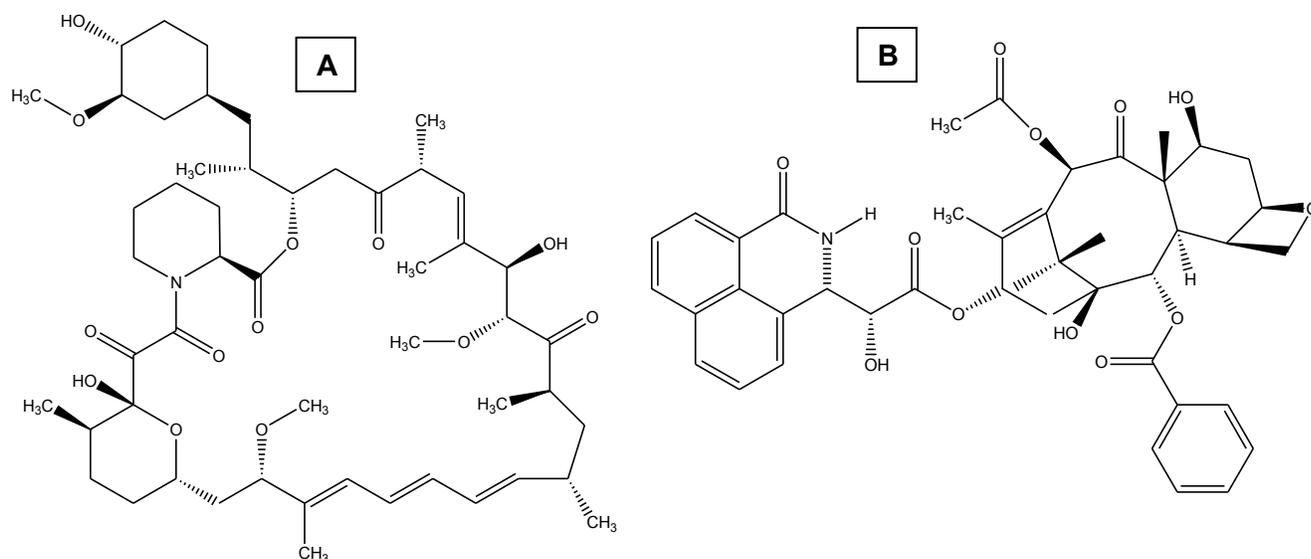


Figura 35. Estruturas química da rapamicina (A) e do paclitaxel (B).

Através da redução da hiperplasia da neointima após a lesão vascular, os stents coronários eluidores de fármacos diminuem a incidência da reestenose comparado ao stents não revestidos (*bare-metal*). Entretanto, outras respostas adversas podem ocorrer como a demora na endotelização, a sensibilidade ao revestimento polimérico sobre o stent, a trombose tardia e uma redução na revascularização no local da lesão (Stone, et al., 2007). Por esses motivos, vários estudos atuais têm por finalidade o desenvolvimento de materiais poliméricos com maior compatibilidade com sangue. Portanto, o conhecimento dos eventos que ocorrem na cascata de coagulação pode ajudar a direcionar o desenvolvimento desses biomateriais.

6.1.1. Processos Fisiológicos envolvidos na cascata de coagulação

O primeiro evento que ocorre quando um material entra em contato com o sangue é a adsorção competitiva e seletiva de proteínas (Klee, et al., 1999). As

proteínas podem se ligar à superfície através de interações eletrostáticas entre grupos carregados na superfície da proteína e domínios de cargas opostas na superfície do material, através de interações de hidrogênio e através de interações hidrofóbicas. O padrão de adsorção de proteínas é um evento extremamente complexo, influenciado por processos de deslocamento em que proteínas pequenas e mais abundantes no plasma são mais rapidamente adsorvidas, seguidas do deslocamento por proteínas maiores. Este efeito é conhecido por efeito Vroman (Werner, et al., 2007; Huangfua, et al., 2009; Wu, et al., 2008).

As interações necessárias para a ocorrência de adsorção de proteínas são determinadas, além do tamanho e quantidade das proteínas, por fatores termodinâmicos que orientam a adsorção na interface sangue-material como caráter de hidrofiliidade, polaridade, cargas na superfície e rugosidade do material (Klee, et al., 1999).

A adsorção de proteínas é favorecida por interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a superfície do material sintético e as proteínas nele adsorvidas e pelo aumento na entropia resultante da liberação de moléculas de água e contra-íons das camadas mais superficiais do material (Jordan, et al., 2007). Além disso, a diminuição da rugosidade da superfície do material aumenta a hemocompatibilidade, pois diminui a perturbação no fluxo laminar sanguíneo que influencia o efeito de adsorção de proteínas, levando à formação do coágulo (Klee, et al., 1999; Werner, et al., 2007).

A ausência de cargas na superfície dos materiais extracorpóreos geralmente leva à diminuição da interação com as proteínas e componentes do sangue. Superfícies carregadas negativamente ativam o sistema de coagulação plasmática enquanto superfícies carregadas positivamente estimulam a adesão e ativação plaquetária (Klee, et al., 1999).

A hidrofiliidade da superfície também implica na diminuição da formação de trombos. Isso porque nas superfícies hidrofílicas ocorre a solvatação de moléculas de água na superfície resultando na formação de um filme líquido, com alta mobilidade molecular que dificulta a adesão celular e de proteínas na superfície do material (Jordan, et al., 2007).

Após a adsorção da camada de proteínas, as mesmas passam por mudanças estruturais que levam à alteração de sua função e propriedades imunológicas. Subsequentemente ocorre a adesão de células do sangue na superfície do material. Nessa etapa, as plaquetas desempenham o papel mais importante na interação de um material com o sangue, uma vez que sua adesão tem sido atribuída à formação de complexos entre componentes da membrana da plaqueta e as proteínas. Sabe-se que a adesão plaquetária é menor quando ocorre a adsorção predominante de albumina na superfície do material. Entretanto, a adsorção de fibrinogênio, fibronectina e imunoglobulina causam um aumento na adesão plaquetária (Werner, et al., 2007; Wu, et al., 2008; Huangfua, et al., 2009). Após a adesão, as plaquetas ativadas iniciam a liberação de granulócitos.

Durante a etapa de adesão de células do sangue na superfície do material ocorre também a adesão de enzimas como a trombina, essencial para a síntese de fibrina. A fibrina, por sua vez, inicia um processo de polimerização e reticulação, formando uma complexa rede com outras células do sangue, como as hemácias, resultando na formação do trombo (Werner, et al., 2007; Wu, et al., 2008; Huangfua, et al., 2009).

6.1.2. Materiais hemocompatíveis

Materiais hemocompatíveis devem preservar as células e proteínas do plasma que mantêm contato com sua superfície (Klee, et al., 1999). As duas abordagens mais comuns para o desenvolvimento de materiais com maior compatibilidade com sangue consistem em: (a) materiais que imitam a superfície não trombogênica das células endoteliais que revestem a parede interna de todos os vasos sanguíneos e (b): materiais que inibem etapas da cascata de coagulação e respostas plaquetárias através da imobilização ou liberação controlada de agentes bioativos (Frost, et al., 2005).

Materiais sintéticos e naturais têm sido estudados no desenvolvimento de superfícies capazes de reduzir ou eliminar a adesão celular de proteínas e células do sangue através do controle entálpico e entrópico que ocorre em nível molecular na interface sangue-material (Jordan, et al., 2007). A otimização das propriedades físicas e químicas da superfície dos materiais a serem desenvolvidos representa o mecanismo passivo de hemocompatibilidade da superfície.

Um dos materiais mais estudados com o intuito de reduzir a adesão de plaquetas e trombina é o poli (óxido de etileno) (PEO). O PEO resulta em índices muito baixos de adesão de proteínas e adesão celular o que pode ser atribuído ao seu caráter hidrofílico devido à presença do oxigênio do grupo éter em sua unidade de repetição, conforme apresentado na Figura 36, capaz de ser solvatado por moléculas de água formando um filme que impede a interação das células e proteínas do sangue à superfície do material (Gombotz, et al., 1991; Jordan, et al., 2007). Devido a essas propriedades, PEO ou moléculas similares como o éter dimetílico de tetraetilenoglicol (tetraglime) têm sido amplamente utilizados como modificadores de superfícies para melhorar a hemocompatibilidade (Chen, et al., 2005; Gorbet, et al., 2001; Seabra, et al., 2005).

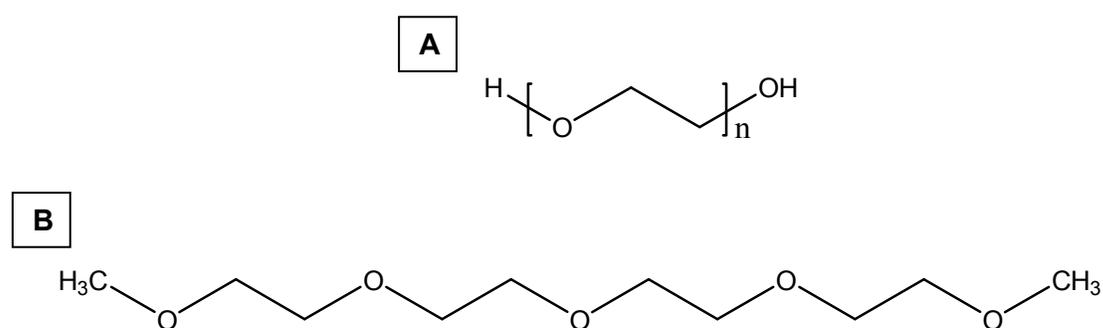


Figura 36. Estrutura química do Polióxido de etileno (A) e do éter dimetílico de tetraetilenoglicol (tetraglime) (B).

A utilização de superfícies revestidas com albumina tem sido estudadas desde a descoberta de que a adsorção de albumina induz menor adesão plaquetária comparada a outras proteínas do plasma (Jordan, et al., 2007). O revestimento de superfícies com albumina mascara o dispositivo extracorpóreo do sistema imune diminuindo o potencial de coagulação (Werner, et al., 2007).

Nas veias e artérias sadias de humanos o próprio endotélio proporciona uma superfície tromboresistente pela liberação de compostos anticoagulantes e inibidores de ativação plaquetária (Werner, et al., 2007). Compostos que contribuem para a atividade antiplaquetária e antitrombogênica das células endoteliais incluem a trombomodulina, as prostaciclina, as heparinas e o óxido nítrico. Portanto, os materiais poliméricos podem ser preparados de maneira a serem capazes de liberar essas moléculas ou podem contê-las imobilizadas em suas cadeias, aumentando o potencial de antitrombogenicidade desses materiais (Jordan, et al., 2007).

Conforme apresentado anteriormente, o NO sintetizado endogenamente em mamíferos impede a adesão e a ativação plaquetárias, reduz a proliferação de células musculares lisas, estimula a proliferação de células endoteliais e a gênese de novos vasos. Portanto, a liberação local de NO a partir da superfície de stents revestidos é promissora na prevenção da trombose e pode reduzir a reestenose pós-angioplastia (Mowery, et al., 2000).

Stents endovasculares com diferentes revestimentos capazes de liberar NO foram investigados e demonstraram efeitos variáveis. Microesferas de polietilenoimina contendo grupos $[N(O)NO]^-$ foram incorporadas em poros de plataformas de stents e liberaram NO com uma meia-vida de 51h (Pulffer, et al., 1997). Grupos $[N(O)NO]^-$ foram incorporados em matrizes poliméricas para modular a liberação de NO e mostraram atividade antiplaquetária em stents endovasculares (Smith, et al., 1996). Em outro estudo, Albumina bovina S-nitrosada (S-nitrosoalbumina) foi aplicada no local da lesão vascular de artérias coronárias de coelhos e mostrou redução do processo de reestenose (Marks, et al., 1995).

Yoon e cols (2002) avaliaram o efeito de um stent doador de NO no espessamento da neointima em lesões de artérias coronárias de porcos através da incorporação de nitroprussiato de sódio (NPS) em uma matriz de poliuretano utilizada para revestir o stent. Os autores observaram que o stent revestido com o polímero exerceu um efeito biológico local na parede da artéria com aumento sustentado dos níveis de cGMP (Guanosina monofosfato cíclica). Embora a liberação local de NO a partir desse stent não reduziu a hiperplasia da neointima, o stent revestido com polímero mostrou-se uma alternativa promissora para a administração de outros agente capazes de reduzir a reestenose. Em outro estudo, microesferas de um polímero biodegradável (poli ácido láctico-co-ácido glicólico-poli etilenoglicol) contendo NO foram colocadas na plataforma de stents (Do, et al., 2004). Os autores mostraram que a liberação controlada de NO diminuiu significativamente a reestenose *intra-stent* (dentro do segmento aórtico contendo o stent) e foi associada com um aumento nos níveis de cGMP e com a supressão da proliferação de células musculares lisas.

Nesse trabalho, stents metálicos foram revestidos com filmes de PVA eluidores de S-nitrosoglutathione (GSNO). O objetivo foi a avaliação da morfologia dos filmes depositados sobre os stents, o perfil de eluição e o comportamento de adesão plaquetária de sangue sobre esses filmes, a fim de verificar o potencial de utilização desse material como revestimento de dispositivos médicos de contato sanguíneo.

6.2. Procedimento Experimental

6.2.1. Materiais e reagentes

Os reagentes descritos na sessão Materiais e Reagentes do capítulo 3 também foram utilizados nessa sessão. Além desses reagentes, colágeno bovino

Tipo I, mepacrina, ácido acético e nitrato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), foram utilizados sem purificação prévia.

6.2.2. Preparação das soluções de PVA contendo GSNO

A síntese da GSNO e a preparação das soluções de PVA foram realizadas de acordo com os procedimentos descritos anteriormente (itens 3.3.2 e 3.3.3).

Volumes iguais de solução de PVA (5% m/m) e de GSNO foram misturados a fim de obter soluções com concentração final de 2,5 % de PVA e 1 mM de GSNO.

6.2.3. Revestimento de stents metálicos com soluções de PVA/GSNO

Os stents foram previamente lavados com água quente e imersos em hexano para remoção de possíveis resíduos de gordura e secos na estufa por 2h. Após a secagem, os stents metálicos foram fixados na extremidade de pinças e então imersos nas soluções de PVA ou PVA-GSNO. O excesso de solução foi retirado delicadamente com o auxílio de um papel de filtro. O stent revestido foi mantido a -20°C por 24h e então submetido a 3 C/D. Após o ciclo C/D os stents foram liofilizados e mantidos protegidos da luz até uso.

6.2.4. Eluição de NO dos stents revestidos com PVA-GSNO

Os stents revestidos com PVA-GSNO foram individualmente imersos em frascos âmbar contendo 5 mL de meio receptor e mantidos a 37°C. Em tempos definidos, variando de 0 a 24 h, os stents foram removidos dos frascos e transferidos para novos frascos contendo solução de tampão fosfato (pH 7,4).

As quantidades de NO liberadas dos stents revestidos com PVA/GSNO em cada frasco foram analisadas por quimiluminescência, utilizando-se um analisador de NO Sievers 280i (*Sievers Instruments*, Boulder, CO). A detecção é baseada na reação de quimiluminescência entre o NO e ozônio (O_3), que forma o dióxido de nitrogênio em um estado excitado (NO_2^*) e oxigênio molecular. O NO_2^* decai liberando radiação infravermelha com comprimento de onda acima de 600 nm. A Figura 37 apresenta um esquema resumido de funcionamento do NO Analyser.

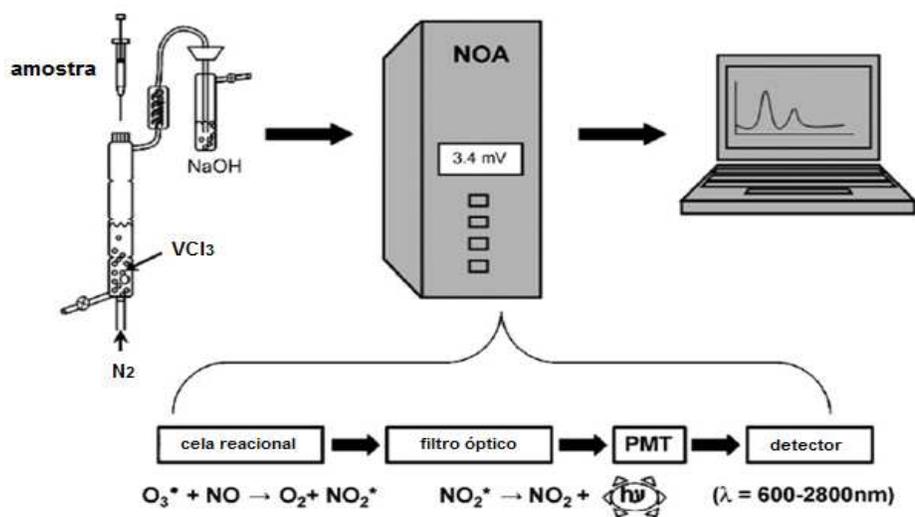


Figura 37. Esquema simplificado de funcionamento do NO Analyser (Adaptado de MacArthur e cols. (2007)). (Imagem reproduzida com autorização da Elsevier sob n. 1982084).

O frasco de reação do equipamento foi preenchido com solução saturada de cloreto de Vanádio III (VCl_3) como solução redutora. A solução de VCl_3 foi preparada pela dissolução do sal puro em HCl (1M) e mantida a $95\text{ }^\circ C$ por uma camisa de aquecimento. A fim de evitar a passagem de ácido para a câmara de reação do equipamento, foi utilizado um frasco contendo solução de $NaOH$ (1M)

antes da câmara de reação quimiluminescente e o frasco de reação foi acoplado a um condensador mantido a 5 °C por um fluxo contínuo de água fria controlado por um banho termostaticado. Gás nitrogênio foi usado como gás carregador de NO para a câmara de reação do equipamento. Foi utilizado um sistema de aquisição de dados do próprio equipamento para coletar as informações de área da curva resposta referente a intensidade de radiação detectada em cada análise.

O sinal gerado foi normalizado com uma curva de calibração (obtida pela injeção de solução de nitrato de sódio no frasco de reação nas mesmas condições do experimento) e a quantidade de NO liberada em cada tempo foi calculada. Para o cálculo das velocidades de NO liberada, obteve-se o gráfico de quantidade de NO acumulada em função do tempo. A quantidade de NO₂ e NO₃ na água desionizada antes da imersão dos stents foi medida e utilizada como branco para a análise.

No caso da eluição a partir de recobrimento de PVA/GSNO o meio receptor usado foi uma solução tampão de fosfato, pH 7,4. Alíquotas 100 µL da solução tampão receptora foram injetadas diretamente no analisador de NO.

6.2.5. Microscopia eletrônica de Varredura (MEV)

Stents não revestidos e revestidos com PVA ou PVA/GSNO foram montados em porta-amostras e revestidos com ouro sob alto vácuo usando um sistema de revestimento sob alto vácuo. As amostras foram analisadas com um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM 6330 LV – Tóquio, Japão), operando em 20 keV.

6.2.6. Testes de adesão plaquetária

Filmes de PVA e PVA-GSNO foram preparados em lâminas de microscópio (2,0 x 5,0 cm²). Solução de colágeno bovino tipo I (2.5 mg/mL) foi preparada em

ácido acético glacial 3% e depositada sobre lâminas de microscópio para servir como controle positivo. Sangue de um voluntário saudável foi coletado em tubo com citrato de sódio (BD Vacutainer® CPT™) e misturado com solução de mepacrina (10 μ M) para tornar as plaquetas fluorescentes. Após a adição de mepacrina o tubo foi mantido sob agitação rotatória por 30 min. Os filmes foram incubados com sangue marcado com mepacrina por 30 min a 37°C em um ambiente umidificado e então lavados com PBS. O número de plaquetas aderidas por campo de visualização em aumentos de 400X foi determinado para quatro campos randômicos de 65x50 μ m por lâmina, utilizando-se um microscópio de fluorescência Nikon Eclipse 50i (Tokio, Japão). O comprimento de onda da fonte de excitação selecionado foi 488 nm. As imagens foram obtidas com resolução de 1280 X 1024 . Os resultados apresentados referem-se a três experimentos independentes (n = 12).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Perfil de liberação de NO

O perfil de liberação de NO a partir de stents revestidos com PVA/GSNO está apresentado na Figura 38.

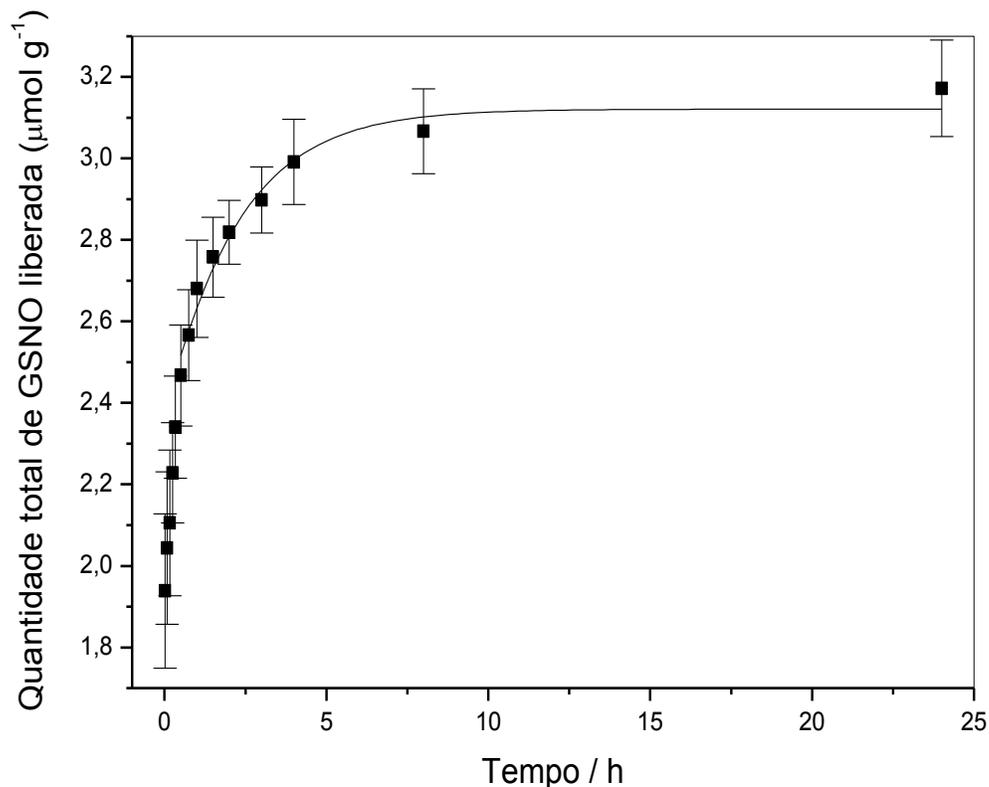


Figura 38. Quantidade total de GSNO liberada a partir de stents revestidos com PVA/GSNO em função do tempo. As barras de erros referem-se ao erro padrão da média de triplicatas.

A Figura 38 mostra uma rápida liberação de NO durante a primeira hora avaliada. A liberação na 1^o hora mostrou um comportamento linear, em que a taxa de liberação de NO foi de $1.25 \pm 0.06 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

A taxa inicial de liberação foi seguida por uma liberação não linear, cuja taxa de liberação diminuiu com o tempo. Para as três horas subseqüentes (após as 4 primeiras horas de liberação) a taxa de liberação diminuiu para $0,0974 \pm 0,007 \mu\text{mol g}^{-1} \text{h}^{-1}$. Nas 20 h subseqüentes, a taxa de liberação caiu para valores da ordem de poucos $\text{nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ($8,4 \pm 2,2 \text{ nmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$).

Esse comportamento indica que as moléculas de GSNO localizadas próximas à interface formada pelo filme de PVA e a solução tampão difundem rapidamente, conforme o comportamento esperado para moléculas hidrofílicas. Entretanto, os filmes de PVA fisicamente reticulados são muito menos solúveis em água do que os filmes não reticulados; assim, quanto maior o tempo de imersão do filme de PVA na solução tampão, maior será o intumescimento do filme e assim, as moléculas de GSNO localizadas em regiões mais profundas do filme também difundirão, mas em um processo mais lento, dentro do meio gelificado do filme de PVA. Esse processo é responsável pela cinética de liberação mais lenta observada após 1h.

A Figura 38 também mostra que a quantidade total de NO liberada após 24 h a 37°C foi cerca de $3,3 \mu\text{mol mg}^{-1}$ de GSNO. Se essa quantidade for diluída na quantidade média total de sangue de uma pessoa adulta (cerca de 4,5 L de sangue), a quantidade de NO sistêmico liberado dos stents estará na faixa de 700 nanomolar, que é a quantidade de NO endógena capaz de exercer uma ação sinalizadora (Koesling, et al., 2000). Então, os stents revestidos com GSNO na concentração usada neste trabalho possuem potencial para produzir uma ação sinalizadora na inibição da proliferação de células musculares lisas e agregação plaquetária.

6.3.2. Morfologia da Superfície de stents revestidos

A Figura 39 mostra a micrografias obtidas por MEV de um stent não revestido e de um stent revestido com PVA e outro revestido com PVA/GSNO. Comparando a morfologia do stent não revestido com a dos stents revestidos, observa-se que o revestimento resultou em um bom recobrimento, sem quebras ou dobras sobre as hastes do stent. Além disso, a formação de um filme liso entre as hastes subjacentes é observada, o que é indicativo da deposição do filme e da existência de um reservatório de fármaco ao longo do corpo do stent.

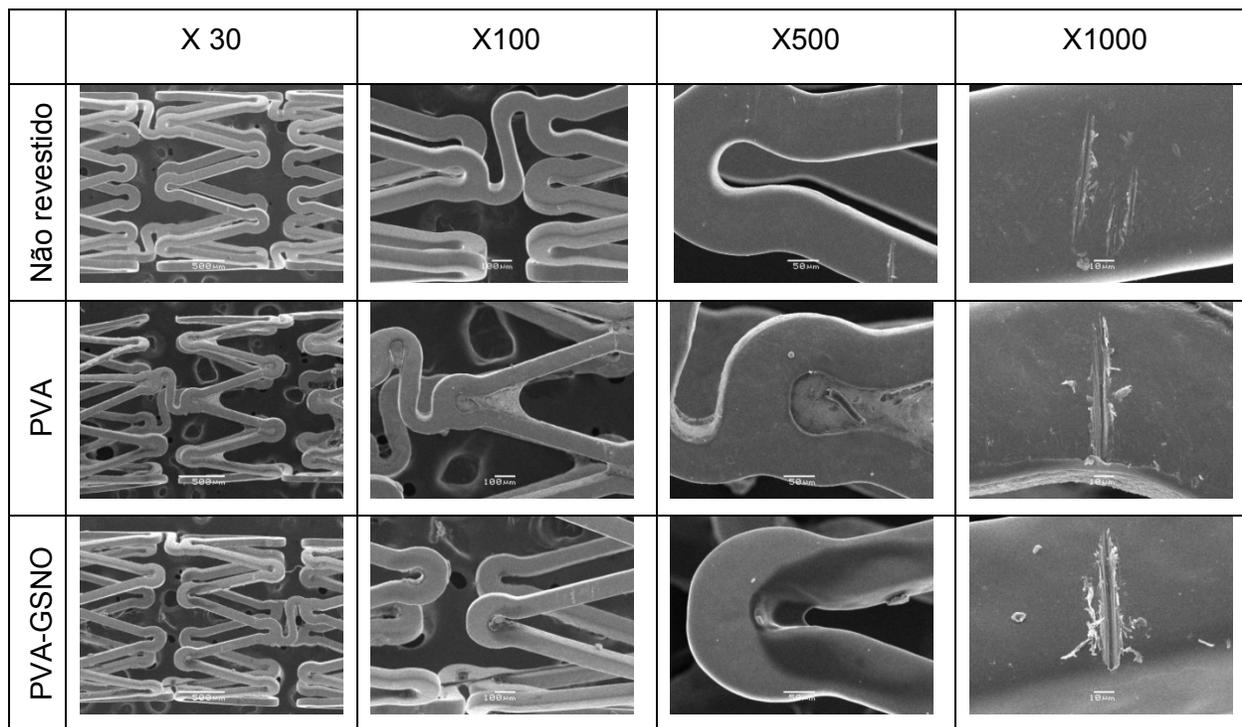


Figura 39. Micrografias obtidas por MEV de um stent não revestido e de um stent revestido com PVA e outro revestido com PVA/GSNO. As barras brancas na parte inferior das imagens referem-se a 500, 100 50 e 10 μm para as imagens obtidas em aumentos de 30, 100, 500 e 1000X de aumento, respectivamente.

Além do comportamento farmacocinético, o stent eluidor de fármaco deve ter um revestimento polimérico capaz de se manter aderido e sem danos durante o implante dos stents. Portanto, a topografia da superfície possui um papel importante no desempenho dos stents. O revestimento da superfície com um filme polimérico sem rugosidade e contínuo reduz a tensão de cisalhamento no fluxo sanguíneo na superfície do stent o que pode reduzir a adesão plaquetária após o

procedimento de angioplastia (Seabra, et al., 2008). Além disso, a formação de trombos e a proliferação de células musculares lisas pode ocorrer em locais de dobras ou quebra do filme sobre o corpo do stent (Werner, et al., 2007).

A morfologia dos revestimentos de stents com filmes de PVA e PVA/GSNO, observadas por MEV, associada com a capacidade de liberação local de NO a partir dos revestimento podem reduzir o cisalhamento no fluxo sanguíneo na superfície do stent. Portanto, os stents revestidos com PVA/GSNO podem ser capazes de inibir a adesão plaquetária e evitar a trombose após o implante de stents, melhorando a eficácia clínica da angioplastia coronária.

6.3.3. Avaliação de adesão plaquetária

A ativação e agregação plaquetárias no local do implante implica em restenose e trombose tardia. O NO é um potente agente antitrombogênico, servindo, entre outras funções, para prevenir a ativação e agregação plaquetária (Frost, et al., 2005).

A Figura 40 apresenta imagens representativas de micrografias de fluorescência obtidas após a incubação de filmes de colágeno (controle positivo), PVA e PVA-GSNO, após a incubação com sangue contendo plaquetas marcadas com mepacrina.

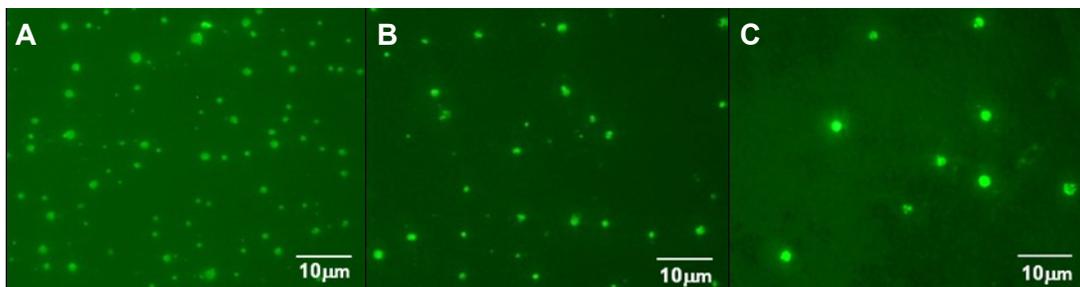


Figura 40. Imagens representativas de plaquetas aderidas na superfície de filmes de colágeno (A) (controle positivo), PVA (B) e PVA-GSNO (C) após a incubação com sangue corado com mepacrina.

As plaquetas aderidas estão espalhadas sobre toda a superfície do filme de colágeno (Figura 40 A). Na superfície do filme de PVA (Figura 40 B), há uma diminuição da quantidade de plaquetas aderidas e sobre as superfícies de PVA-GSNO (Figura 40 C) a adesão plaquetária é menor.

A Figura 41 mostra o gráfico de barras referente a contagem de plaquetas obtida para cada amostra analisada.

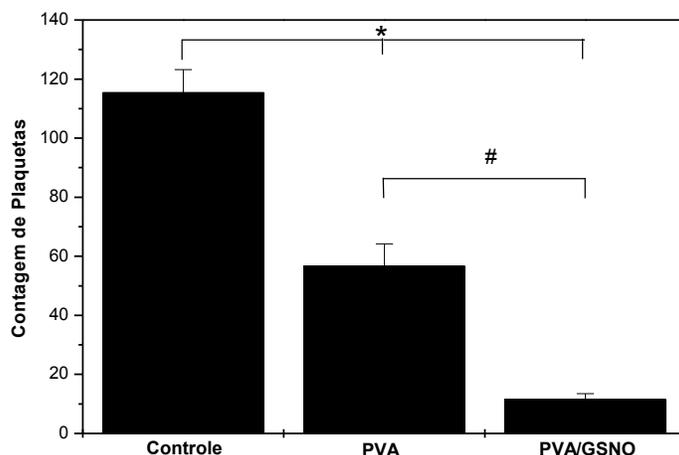


Figura 41. Gráfico de barras referente a contagem de plaquetas sobre filmes de Colágeno, PVA e PVA/GSNO (n = 12, * = # = p < 0,05).

A contagem de plaquetas nos filmes de colágeno, o controle positivo, foi 115 ± 8 plaquetas por campo. Para os filmes de PVA esse valor reduziu para 56 ± 7 plaquetas por campo e para os filmes de PVA/GSNO para 12 ± 2 plaquetas por campo. Houve, portanto, uma redução significativa ($p < 0,05$) de cerca de 50 % na adesão plaquetária nos filmes de PVA e de 90% para os filmes de PVA/GSNO comparados ao controle positivo de colágeno. A contagem de plaquetas no filme

de PVA/GSNO foi 80 % menor que a contagem de plaquetas no filme de PVA. Essa redução também foi significativa com $p < 0,05$.

Os valores de redução na contagem de plaquetas devido à presença de NO foi previamente avaliada por Taite e cols (2008) em copolímeros de Poliuretana-Poli Etilenoglicol (PEG) contendo grupos Nonoatos. Os autores verificaram a que a adesão plaquetária foi reduzida em 90 % na poliuretana-PEG sem doador de NO e foi de 95 % na presença do NONOato quando comparados ao controle positivo de colágeno tipo I. A diferença na adesão plaquetária entre o polímero com e sem NONOato foi de 50 %. Portanto, a redução na contagem de plaquetas em relação ao controle positivo de colágeno tipo I devido a liberação de GSNO é similar ao resultado relatado para redução na contagem de plaquetas devido à presença de NONOato em copolímeros de Poliuretana-PEG. Vale ressaltar que os autores relataram uma liberação de NO de aproximadamente 0,14 μmol de NO em 60 dias, menor do que a liberação de 3 μmol de NO g^{-1} de filme liberada em 24 h relatada nesse trabalho.

Esse resultado mostra que superfícies revestidas com PVA/GSNO têm potencial para inibir a adesão plaquetária, e podem ser uma opção de biomaterial antitrombogênico para o revestimento de dispositivos médicos de contato sanguíneo. Esse material pode ainda agir como fonte exógena de NO na interface dispositivo-sangue, o que pode contribuir na limitação da trombose tardia associada ao implante de stents.

O controle de processos como a ativação, a agregação e a adesão plaquetárias, da proliferação e migração de células musculares lisas e o estímulo da reendotelização é um mecanismo importante para impedir a casacata de eventos que resulta na reestenose (Lipke, et al., 2005). A GSNO tem a capacidade de inibir a agregação plaquetária, principalmente através de mecanismos independentes da GMP-cíclica (Gordge, et al., 1998). Nesse caso, a liberação de NO dentro das células ocorre via reações de transnitrosação, que envolvem a transferência de NO^+ de um nitrosotiol para um tiol (Zai, et al., 1999). Existem tióis livres disponíveis na superfície das plaquetas (Essex, et al., 2000) e a S-nitrosação desses tióis pode resultar na atividade antiplaquetária. Entretanto a

velocidade de reação de transnitrosação é lenta, sendo incompatível com o rápido metabolismo de GSNO pelas plaquetas, observado por Shah e cols (Shah, et al., 2003), o que sugere que o processo é mediado por enzimas, a fim de permitir que os eventos de sinalização ocorram suficientemente rápido. Para moléculas impermeáveis a membranas como a GSNO, uma enzima na superfície da células, como a γ -glutamil transpeptidase (γ -GT) ou a proteína dissulfeto isomerase (PDI), podem agir como receptor ou como um ponto de entrada para a transdução do sinal do NO (Ramachandran, et al., 2001).

Os resultados encontrados para a atividade antiplaquetária de filmes de PVA eluidores de GSNO estão de acordo com resultados previamente apresentados por Shah e cols. (Shah, et al., 2007) que objetivaram a compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade antiplaquetária de RSNOs. Neste estudo, os autores relataram que os S-nitrosotióis apresentam atividade anti-agregante plaquetária tanto pela liberação de NO e estímulo da guanilato ciclase quanto por mecanismos independentes da GMP-cíclica, sendo, portanto, úteis como agentes antitrombogênicos. Em um trabalho anterior, os autores também demonstraram a modificação de tíois de superfície das células e identificaram a PDI como uma proteína-alvo, capaz de exercer uma atividade de S-desnitrosação da GSNO, de acordo com o esquema apresentado na Figura 42 abaixo.

Nesse mecanismo, um dos tíois vicinais (Figura 42, I) no sítio ativo do PDI sofre a reação de transnitrosação com um substrato RSNO (Figura 42, II). O segundo sítio ativo da cisteína da PDI ataca o nitrogênio do S-N=O produzindo um intermediário nitroxila dissulfeto (Figura 42, III). A formação desse intermediário é facilitada pela deslocalização de elétrons no N=O para formar N-O⁻, que pode ser estabilizado pela cadeia lateral carregada positivamente, vizinha ao sítio ativo, como um domínio His¹⁶⁰. Uma oxidação de um elétron resulta na formação de um radical nitroxila dissulfeto (Figura 42, IV), que pode se rearranjar para formar o sítio ativo PDI oxidado (-S-S-) mais o radical NO^{*} (Figura 42, V e VI).

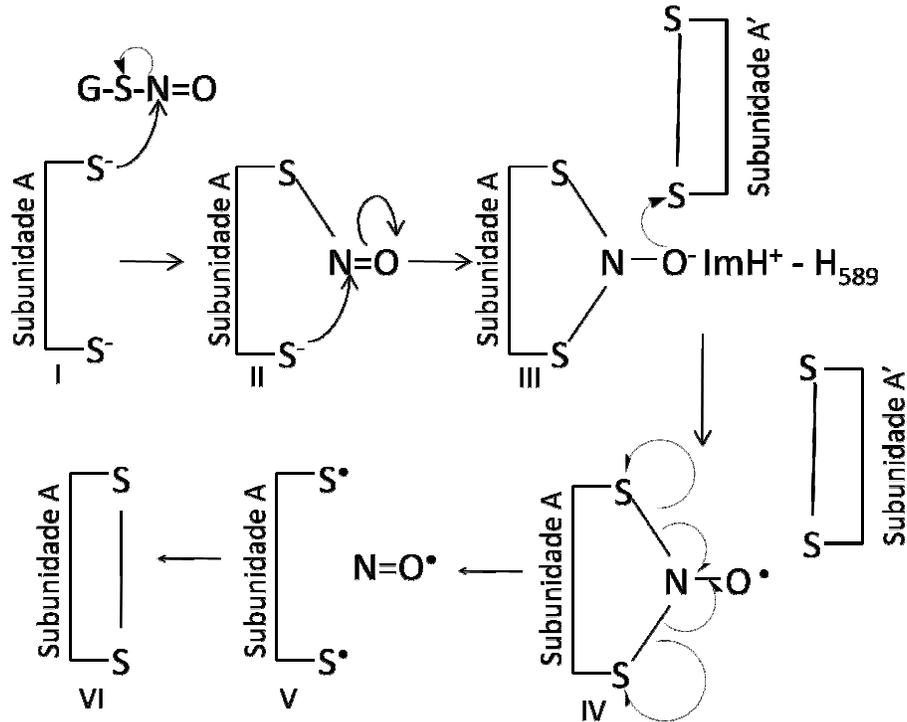
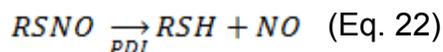


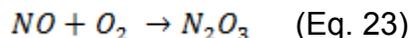
Figura 42. Mecanismo de Desnitrosação da GSNO pela PDI (adaptado de Sliskovic, e cols.,(2005)).

Ramachandran e cols. (2001) também mostraram que o NO liberado de RSNOs impermeáveis à membrana celular, podem atravessar a membrana via PDI e reagir com oxigênio dentro da membrana lipídica para produzir N_2O_3 , que nitrosa outras moléculas intracelulares contendo tióis de acordo com as equações 22-24:

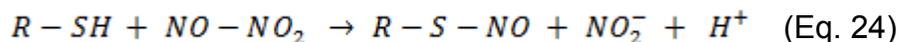
Meio extra-celular:



Membrana:



Citosol:



Esse pode ser o mecanismo envolvido na liberação de NO a partir da GSNO para o grupo heme da guanilato ciclase solúvel, de forma a estimular a produção de cGMP.

Outros trabalhos também mostraram que a utilização de materiais liberadores de NO é capaz de inibir a proliferação de células musculares lisas, evitando o espessamento da neoíntima, que resulta no quadro de reestenose. Lipke e cols. (2005) que utilizaram um hidrogel nitrosado do copolímero de polietileno glicol e cisteína em vasos sanguíneos de rato submetidos a lesão com cateter-balão verificaram a diminuição significativa de formação da neoíntima, além da reendotelização da parede do vaso, diminuição da proliferação de células musculares lisas e da produção de matriz extracelular. Outros materiais poliméricos também foram avaliados para estudos de liberação local de NO. Microesferas de polietilenoimina liberadoras de NO foram incorporadas em dispositivos vasculares para liberação local de NO (Pulffer, et al., 1997). Nonoatos foram incorporados em poliuretana e poli (cloreto de vinila) a fim de diminuir sua trombogenicidade para uso em aplicações biomédicas (Mowery, et al., 2000). Stents coronários revestidos com poliuretana e policaprolactona liberadores de NO foram avaliados em modelo de lesão coronária em porcos e resultaram em resposta inflamatória por causa do material polimérico de revestimento do stent (Yoon, et al., 2002); Seabra e cols. (2008) verificaram a diminuição da agregação plaquetária em comparação a um controle positivo pela utilização de um poliéster S-nitrosado capaz de liberar NO por mais de 24 horas.

A avaliação da diminuição do espessamento da neoíntima através da utilização de filmes de PVA/GSNO como revestimento de stents deverá ser avaliada. Entretanto, os filmes de PVA/GSNO utilizados nesse trabalho oferecem vantagens em relação aos materiais previamente estudados. O PVA é um dos polímeros de maior biocompatibilidade. A hidrofiliabilidade e a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio resultam em menor adesão de proteínas, células e adesão bacteriana. A preparação dos filmes é simples, não utiliza agentes reticulantes tóxicos que possam ser liberados ao longo da utilização do dispositivo e, apesar de hidrofílicos, tornam-se cineticamente insolúveis em água ou meio fisiológico devido à reticulação física, permitindo a obtenção de revestimentos estáveis e com boa compatibilidade com os tecidos humanos.

6.4. Conclusões

Filmes de PVA/GSNO com 3 C/D proporcionam um revestimento aderente e uniforme sobre a superfície de stents de aço inox e são capazes de promover uma eluição contínua de GSNO ao longo de até 6 h.

A eluição de GSNO leva a uma redução significativa da adesão plaquetária na superfície deste material.

Filmes de PVA eluidores de GSNO apresentam potencial de uso para o revestimento de stents a fim de diminuir as chances de formação de trombos após o implante.

7. FILMES DE PVA ELUIDORES DE RAPAMICINA

7.1. Stents eluidores de Rapamicina e o risco de trombose tardia

Os stents eluidores de Rapamicina (ou Sirolimus) (Cypher®, Cordis, Johnson & Johnson) ou de Paclitaxel (Taxus®, The Boston Scientific) representaram um grande avanço tecnológico no tratamento da doença arterial coronária, resultando em diminuição expressiva da hiperplasia da neoíntima (Maisel, 2007). Os stents Cypher® são revestidos com uma fina camada de copolímero de poli-metacrilato de n-butila/ poli etileno-co-acetato de vinila, (Virmani, et al., 2004). Já os stents Taxus® são revestidos com um filme do elastômero tribloco poli (estireno-isobutileno-estireno) (SIBS) (Deshpande, et al., 2008).

Apesar dos benefícios, stents eluidores de drogas podem produzir respostas arteriais adversas, incluindo retardo na reendotelização, trombose tardia como consequência da hipersensibilidade ao revestimento polimérico (Virmani, et al., 2004; Maisel, 2007). Virmani e cols. (2004) consideraram que a hipersensibilidade ao revestimento polimérico, observada 8 meses após a realização do procedimento de angioplastia com stent Cypher, não pode ser atribuída à presença de Rapamicina no stent, uma vez que os estudos farmacocinéticos realizados em cachorros mostraram que o fármaco não é detectável nas paredes das artérias 60 dias após o implante (Takeshi Suzuki, et al.).

Por outro lado, polímeros similares aos utilizados em luvas vinílicas e de látex resultam em reações de hipersensibilidade em muitos indivíduos. Em estudos não relacionados a stents, o polimetacrilato de n-butila promoveu dano do tecido e fibrose acompanhada de aumento do número de macrófagos quando implantado subcutaneamente (Revel, et al., 1998). Já o Poliacetato de vinila, quando usado como matriz de liberação antigênica, resultou em inflamação em 25% dos coelhos testados (Niemi SM, 1985). Já a inflamação em stents não

revestidos é geralmente muito menos pronunciada do que nos stents revestidos (Virmani, et al., 2004). A inflamação nesses casos geralmente é acompanhada de espessamento excessivo da neoíntima e a trombose é freqüente.

Os resultados apresentados nesse trabalho indicam que o PVA é um polímero hemocompatível, sendo capaz de reduzir a adesão plaquetária quando comparado ao stent não revestido. Ainda, quando carregados com GSNO, além da ação antiplaquetária, o polímero induziu a vasodilatação local quando aplicado sobre a pele do antebraço de voluntários saudáveis e mostrou atividade bactericida contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Assim, os efeitos adversos da utilização do copolímero poli-metacrilato de n-butila/poli etileno-co-acetato de vinila nos stents eluidores de Rapamicina podem ser eliminadas caso um polímero mais amigável, como o PVA, seja utilizado como matriz para liberação.

Nessa etapa do trabalho, stents foram revestidos com filmes de PVA contendo Rapamicina e a eluição de fármaco foi acompanhada por HPLC, a fim de verificar o potencial de utilização de PVA como matriz para liberação de um fármaco de baixa hidrofiliçidade.

7.2. Procedimento experimental

A solução de PVA foi preparada de acordo com o procedimento descrito no item 3.2.3. A acetonitrila e o diclorometano utilizados nessa etapa do trabalho eram de alta pureza (TEDIA Brasil S.A., grau HPLC).

7.2.1. Preparação da solução de PVA/Rapamicina

Preparou-se uma solução de Rapamicina em acetonitrila /água (40:60 v:v). Essa solução foi adicionada ao mesmo volume de solução aquosa de PVA 5,0 % (m/v). A proporção final da mistura de acetonitrila/água foi de 20:80 e a

concentração final de Rapamicina no filme seco foi de 100 µg/mg de PVA. A concentração final de PVA na solução foi 2,5% (m/v).

7.2.2. Revestimento de stents com filmes de PVA/Rapamicina

O revestimento de stents com filmes PVA/Rapamicina foi obtido através da imersão dos stents na solução preparada de acordo com o procedimento descrito acima. Os stents foram previamente lavados com água quente e imersos em 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. Os stents foram removidos lentamente da solução e o excesso de solução escorrida para a extremidade inferior do stent foi removido com papel absorvente. Em seguida, a pinça que prendia os stents foi acoplada, na posição horizontal, a um agitador mecânico rotatório, e os stents foram mantidos durante 1h sob rotação a 200 rpm para secagem. 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.

7.2.3. Acompanhamento da eluição de Rapamicina por Cromatografia líquida de Alta Eficiência (HPLC)

Stents revestidos com filmes de PVA contendo Rapamicina, com massa de ca. 1,0 mg foram colocados em tubos de ensaio com tampa contendo 5 mL de solução tampão fosfato (PBS, pH 7,4). A quantidade total de PBS foi substituída a cada 24 h e transferida para um funil de separação contendo 2 mL de diclorometano. Extraiu-se o agente imunossupressor utilizando-se 2 mL de diclorometano em cada etapa (4 vezes). Evaporou-se o diclorometano com gás nitrogênio (ca. 10 min) e adicionou-se 1,5 mL de acetonitrila ao sólido

remanescente. A solução em acetonitrila foi filtrada e injetada na coluna de HPLC (Waters 600). A vazão da coluna utilizada foi de 1,5 mL/min e a fase móvel foi acetonitrila:água (70:30). A eluição de Rapamicina a partir de stents Cypher® (comprimento: 28 mm, quantidade nominal de Rapamicina: 268 µg) foi acompanhada e utilizada como referência. As análises foram realizadas em duplicata.

7.2.4. Avaliação morfológica

A morfologia da superfície dos stents revestidos com PVA contendo Rapamicina foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM). As amostras foram montadas em suportes de alumínio, metalizadas com ouro por 2 min sob alto vácuo (Balt-Tec MED 020) e examinadas com um microscópio eletrônico de varredura (Jeol JSM T-300).

7.3. Resultados e discussão

7.3.1. Acompanhamento da eluição de agente imunossupressor para solução fisiológica a partir de matriz de PVA por HPLC.

A Figura 43 mostra a curva de eluição de Rapamicina para solução tampão fosfato pH 7,4, a partir de stents comerciais (Cypher, Cordis Corporation – Johnson & Johnson) e stents revestidos com filme de PVA/Rapamicina. Observa-se que a liberação de Rapamicina é dependente do tempo e que a quantidade de Rapamicina liberada a partir do stent Cypher é maior do que a quantidade liberada a partir do stent revestido com PVA/Rapamicina.

Para o stent Cypher, após 25 dias, ca. 215 µg de Rapamicina foi liberada, o que representa aproximadamente 80% da quantidade total de Rapamicina

relatada para stent. Este resultado está de acordo com informações obtidas no site do stent Cypher® (<http://www.cypherstent.com/cypher-stent/specifications/pages/index.aspx>), que relatam que após 30 dias cerca de 80 % da quantidade total de Rapamicina foi eluída. Assim, o acompanhamento da eluição de Rapamicina a partir do stent Cypher permitiu verificar que o método utilizado responde de maneira similar aos resultados apresentados na literatura.

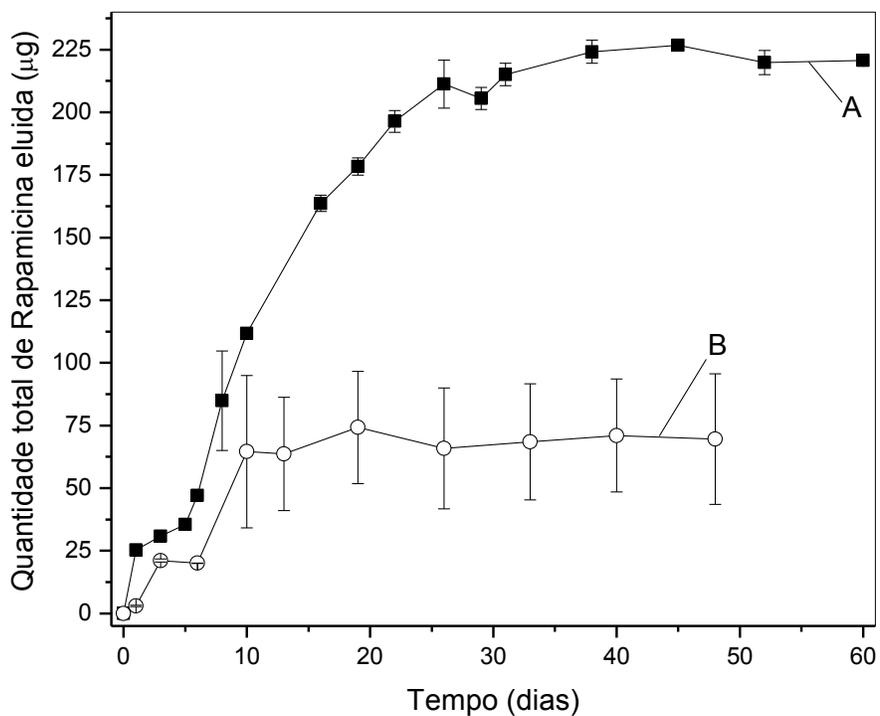


Figura 43. Curva de eluição de Rapamicina a partir de stents Cypher (A) e revestidos com PVA/Rapamicina (B). As barras de erros representam o erro padrão da média de duplicatas.

Para comparar as taxas de liberação de rapamicina a partir do stent Cypher e do stent revestido com PVA, o gráfico de liberação foi representado em

porcentagem de Rapamicina liberada em relação a quantidade total nos stents em função do tempo (Figura 44).

Para o stent revestido com PVA, sabe-se que a concentração de Rapamicina no filme é de aproximadamente 100 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de filme. A massa média de filme de PVA/Rapamicina depositada sobre o stent foi de 0,8 mg, o que resulta em cerca de 80 μg de Rapamicina no corpo do stent. Portanto, a partir do dia 10, aproximadamente 100 % do total de Rapamicina depositada no filme foi liberada.

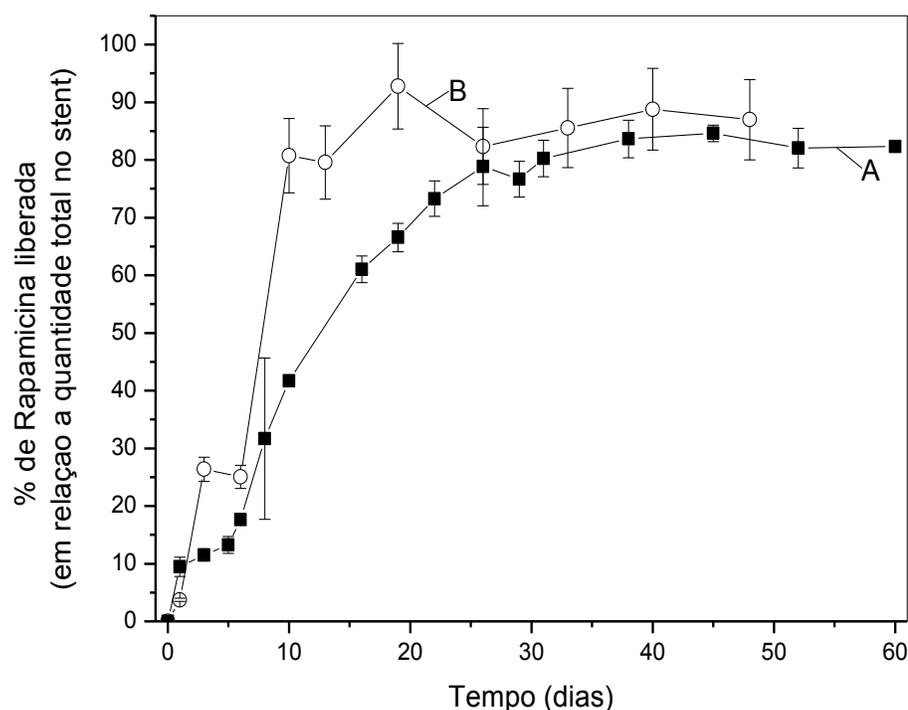


Figura 44. Curva de Porcentagem de rapamicina eluída em função do tempo a partir de stents Cypher (A) e revestidos com PVA/Rapamicina (B). As barras de erros representam o erro padrão da média de duplicatas.

A taxa de liberação de rapamicina a partir do stent Cypher nos 16 dias iniciais foi de 3,78 % rapamicina /dia. Nos próximos 10 dias de liberação, a taxa de

eluição de rapamicina diminuiu para 1,88 %/dia e nos próximos 34 dias, a taxa de eluição diminuiu para 0,14 %/dia. Para o stent revestido com PVA/Rapamicina a taxa de liberação nos 13 dias iniciais foi de 5,33 %/dia. Nos 35 dias posteriores a taxa de liberação de rapamicina a partir dos stents revestidos com PVA diminuiu para 0,8%/dia. Observa-se, portanto, que a taxa de liberação de Rapamicina a partir do stent revestido com PVA é maior do que a taxa de liberação a partir do stent Cypher.

Deve-se considerar também que a carga de rapamicina do stent revestido com PVA (comprimento: 23mm, diâmetro interno: 2,5 mm) é menor do que a carga de rapamicina do stent Cypher. Ainda assim, a taxa de liberação a partir do revestimento de PVA foi maior que a do stent Cypher. Esse resultado sugere que a liberação de rapamicina a partir dos stents revestidos é determinada pela solubilidade do fármaco na solução tampão, mas também pela hidrofiliicidade do material polimérico utilizado no revestimento. No stent Cypher, os cristais de rapamicina estão menos disponíveis para o contato com o meio aquoso, enquanto que no stent com PVA/Rapamicina a estrutura hidrofílica do PVA permite o maior contato da superfície dos cristais de rapamicina com o meio aquoso, aumentando as taxas de eluição. Essa característica indica que os filmes de PVA podem ser usados para o revestimento de stents eluidores de rapamicina com a vantagem de permitir a diminuição da concentração de fármaco com a manutenção da sua biodisponibilidade. Ainda, a possibilidade de reticulação dos filmes de PVA pode permitir a modulação da liberação de rapamicina a partir da superfície dos stents.

A comparação dos resultados de eluição de GSNO a partir de stents revestidos com PVA (Figura 38) com os resultados de eluição de rapamicina mostra perfis bastante distintos já que a eluição de praticamente toda a GSNO ocorre nas 4 h iniciais enquanto a rapamicina demora ca. 13 dias para ser liberada. Essa diferença no comportamento de eluição pode ser atribuída à diferença de hidrofiliicidade entre a rapamicina e a GSNO. A rapamicina é um fármaco de baixa hidrofiliicidade e, portanto, a sua solubilidade em tampão fosfato é menor do que a solubilidade da GSNO, de caráter altamente hidrofílico. Assim, a

taxa de liberação da Rapamicina a partir do filme de PVA para tampão fosfato deve ser mais lenta do que a de GSNO.

Outro ponto importante a ser ressaltado é que os mecanismos de ação da GSNO e da rapamicina são diferentes. Conforme discutido anteriormente, a GSNO transfere o NO para proteínas das membranas de plaquetas (processo mediado por enzimas) (Zai, et al., 1999; Essex, et al., 2000; Shah, et al., 2003). A nitroação dos tióis de superfície das plaquetas pode resultar na atividade antiplaquetária. Já o mecanismo de ação da Rapamicina envolve o bloqueio do ciclo celular, resultando em atividade imunossupressora. Portanto, a liberação de GSNO é de maior importância no início da lesão, logo após o procedimento de angioplastia, enquanto a ação de rapamicina é importante em um estágio posterior da lesão, após a fase inflamatória.

7.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

A Figura 45 apresenta as microscopias eletrônicas de varredura de stents revestidos com filmes de PVA contendo rapamicina. A superfície texturizada observada nas micrografias da Fig, 47, indicam a ocorrência de separação de fases a partir da secagem do solvente com formação de cristais de rapamicina expostos na superfície. Esse resultado era esperado devido ao caráter de baixa hidrofiliabilidade da rapamicina, que resulta em pouca miscibilidade com o PVA, ocorrendo a separação de fases entre os cristais de rapamicina e o polímero durante a secagem do solvente. As microscopias dos stents revestidos com filmes de PVA contendo o Rapamicina ainda mostram a formação de um filme contínuo sobre todo o corpo do stent, sem dobras ou quebras no filme.

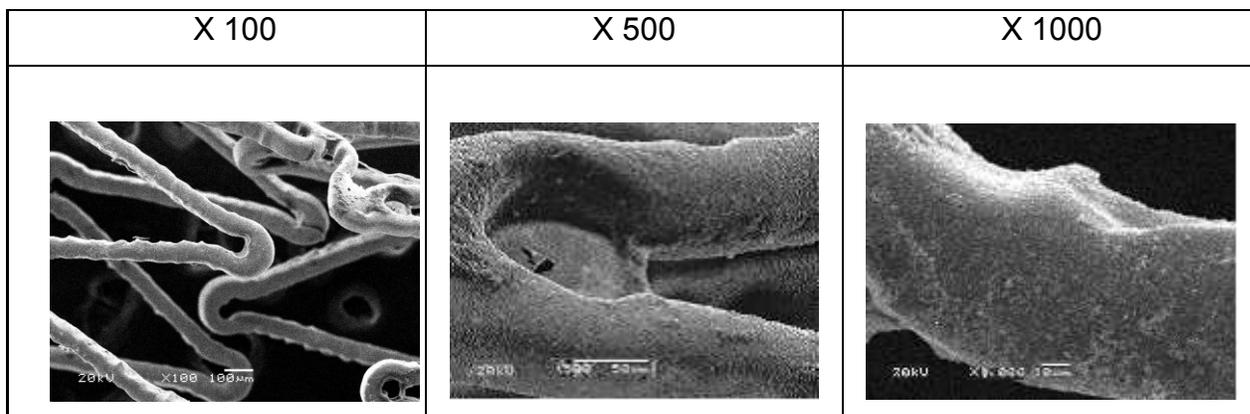


Figura 45. Microscopia Eletrônica de Varredura de stent revestido com PVA contendo Rapamicina em ampliações de 100, 500 e 1000 vezes.

7.4. Conclusões

Filmes de PVA permitem a incorporação de cristais de rapamicina para sua eluição em meio aquoso.

A matriz hidrofílica de PVA resulta em um contato mais extenso do meio aquoso com os cristais de rapamicina, permitindo o uso de cargas menores de fármaco com perfil de eluição similar ao da rapamicina incorporada em matriz de menor hidrofílicidade.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

As potenciais aplicações dos filmes de PVA eluidores de GSNO permitem sugerir a continuidade desses estudos com os seguintes objetivos:

- Avaliar a ação microbicida dos filmes de PVA eluidores de GSNO contra outros microorganismos *in vitro*.
- Avaliar a ação bactericida de filmes de PVA eluidores de GSNO no tratamento de feridas infectadas com microorganismos multi-resistentes.
- Avaliar a ação cicatrizante de filmes de PVA eluidores de GSNO no recobrimento de lesões.
- Caracterizar a capacidade de inibição da reestenose em stents revestidos com filmes de PVA eluidores de GSNO em modelos animais.
- Caracterizar a capacidade de inibição da trombose tardia em stents revestidos com filmes de PVA eluidores de GSNO em modelos animais.

9. REFERÊNCIAS

Alexander, P. e Charlesby, A. 1957. Effect of x-rays on synthetic polymers in aqueous solution. *Journal of Polymer Science*. 23, 1957, Vol. 103, pp. 355-375.

Al-Sa'doni, Haitham e Ferro, A. 2000. S-Nitrosothiols: a class of nitric oxide-donor drugs. *Clinical Science*. 2000, Vol. 98, pp. 507-520.

Amadeu, T. P., et al. 2008. Nitric oxide donor improves healing if applied on inflammatory and proliferative phase. *Journal of Surgical Research*. 2008, Vol. 149, 1, pp. 84-93.

Amadeu, T. P., et al. 2007. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel accelerates rat cutaneous wound repair. *Journal of European Academy of Dermatology and Venereology*. 2007, Vol. 21.

An, Y. H. e Friedman, R. J. 1998. Concise review of mechanisms of bacterial adhesion to biomaterial surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1998, Vol. 43, pp. 338-348.

Anil, B. e Rajesh, S. 2005. Preparation and characterization of spongy cryogels of poly(vinyl alcohol)-casein system: water sorption and blood compatibility study. *Polymer International*. 2005, Vol. 54, pp. 796-806.

Auriemma, F., De Rosa, C. e Triolo, R. 2006. Slow Crystallization Kinetics of Poly(vinyl alcohol) in Confined Environment during Cryotropic Gelation of Aqueous Solutions. *Macromolecules*. 39, 2006, pp. 9429-9434.

Auriemma, F., et al. 2008. Time-Resolving Analysis of Cryotropic Gelation of Water/Poly(vinyl alcohol) Solutions via Small Neutron X-ray scattering. *Journal of Physical Chemistry B*. 112, 2008, pp. 816-823.

Baier, R.E. 2006. Surface behaviour of biomaterials: The theta surface for biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2006, Vol. 17, pp. 1057-1062.

Barraud, N., et al. 2006. Involvement of nitric oxide in biofilm dispersal of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*. 188, 2006, pp. 7344-7353.

Barraud, N., et al. 2009. Nitric Oxide Signaling in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms mediates phosphodiesterase activity, decreased cyclic Di-GMP Levels, and enhanced Dispersal. *Journal of Bacteriology*. 191, 2009, pp. 7333-7342.

Bauer, J. A., Booth, B. P. e Fung, H. L. 1995. Nitric oxide donors: biochemical pharmacology and therapeutics. *Advanced Pharmacology*. 1995, Vol. 34, pp. 361-381.

Belissari, F. I., et al. 2003. Mechanisms of nitrate tolerance: potential roles of folate. *European Journal of Clinical Investigation*. 2003, Vol. 33, pp. 933-940.

Benz, D., et al. 2002. Tonal nitric oxide and health: anti-bacterial and -viral actions and implications for HIV. *Medicinal Science Monitor*. 2002, Vol. 8(2), pp. RA27–31.

Bohl, K. S. e West, J. L. 2000. Nitric Oxide-generating polymers reduce platelet adhesion and smooth muscle cell proliferation. *Biomaterials*. 2000, Vol. 21, pp. 2273-2278.

Brieger, D. e Topol, E. 1997. Local drug delivery systems and prevention of restenosis. *Cardiovascular research*. 35, 1997, Vol. 3, pp. 405-413.

Butler, A. R. e Williams, D. L. H. 1993. The Physiological Role of Nitric Oxide. *Chemical Society Reviews*. 1993, Vol. 22, pp. 233-241.

Cariello, Angelino Julio, et al. 2010. In vitro amoebicidal activity of S-nitrosoglutathione and S-nitroso-N-acetylcysteine against trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 65, 2010, Vol. 3, pp. 588-591.

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

Chanda, M. 2000. *Advanced polymer chemistry: a problem solving guide*. Nova York : Marcel Dekker, 2000.

Chen, C., et al. 2006. Delivery of nitric oxide released from beta-galactosidase and its activity against *Escherichia coli*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29, 2006, pp. 1239-1241.

Chen, H., et al. 2005. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, p. 2391.

Chen, Z., Zhang, J. e Stamler, J. S. 2002. Identification of the enzymatic mechanism of nitroglycerin bioactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002, Vol. 99, pp. 8306-8311.

Chu, B. e Hsiao, B. S. 2001. Small-angle X-ray scattering of polymers. *Chemical Reviews*. 2001, Vol. 101, pp. 1727-1761.

CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute -. 2003. Methods for dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. Wayne, PA : CLSI, 2003. 6th.

Cook, J. A., et al. 1996. Convenient Colorimetric and fluorimetric assays for S-nitrosothiols. *Analytical Biochemistry*. 1996, Vol. 238, pp. 150-158.

Craievich, A. F. 2002. Synchrotron SAXS Studies of Nanostructured Materials and Colloidal Solutions. A Review. *Materials Research*. 2002, Vol. 5, 1, pp. 1-11.

Dadalti, P. e Pinto J. M. N. 2008. Assuntos de interesse em Dermatologia - Fisiologia da reparação tecidual. [A. do livro] R. D. Azulay. *Dermatologia*. 5ed revista e atualizada. Rio de Janeiro : Guanabara, 2008.

de Souza, G. F. P., et al. 2006. Leishmanicidal activity of primary S-nitrosothiols against *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*: implications for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Nitric Oxide*. 2006, Vol. 15, pp. 209-216.

Dean, J. A. 1995. *The Analytical Chemistry Handbook*. New York : McGraw Hill, Inc., 1995. pp. 15.1-15.5.

Del Guerra, R.S., et al. 1994. Biological characterization of hydrogels of poly(vinyl alcohol) and hyaluronic acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1994, Vol. 5, pp. 613-616.

DeMerlis, C.C. e Schoneker, D.R. 2003. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). *Food and Chemical Toxicology*. 2003, Vol. 41, pp. 319-326.

Deshpande, D., Devalapally, H. e Amiji, M. 2008. Enhancement in Anti-proliferative Effects of Paclitaxel in Aortic Smooth Muscle Cells upon Co-administration with Ceramide using Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Pharmaceutical Research*. 2008, Vol. 25, 8, pp. 1936-1947.

Deux, Jean-François, et al. 2002. Low Molecular Weight Fucoidan Prevents Neointimal Hyperplasia in Rabbit Iliac Artery In-Stent Restenosis Model. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 22, 2002, pp. 1604-1609.

Dicks, A. P., et al. 1998. The reaction of S-nitrosothiols with thiols at high thiol concentration. *Canadian Journal of Chemistry*. 1998, Vol. 76, pp. 789-794.

Do, Y. S., et al. 2004. In stent restenosis limitation with stent-based controlled release nitric oxide: Initial results in rabbits. *Radiology*. 230, 2004, pp. 377-382.

Dondji, B., et al. 2008. Role for nitric oxide in hookworm-associated immune suppression. *Infection and Immunity* 2008;76(6):2560–7. 2008, Vol. 76(6), pp. 2560–2567.

Eberhardt, R. T. e Loscalzo, J. 2000. Nitric Oxide in atherosclerosis. [ed.] J. Loscalzo e J. A. Vita. *Nitric Oxide and the cardiovascular system*. Totowa : s.n., 2000, pp. 273-295.

Ebewele, R. O. 1996. *Polymer Science and Technology*. Boca Raton : CRC Press LLC, 1996.

Essex, D. W., et al. 2000. Protein disulfide isomerase and sulfhydryl-dependent pathways in platelet activation. *Biochemistry*. 40, 2000, pp. 6070-6075.

etal, Auriemma. 2006. *Macromolecules*. 2006.

Fingerle, J., et al. 1990. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis*. 10, 1990, pp. 1082-1087.

Finizia, A., De Rosa, C. e Triolo, R. 2006. Slow Crystallization Kinetics of Poly(vinyl alcohol) in Confined Environment during Cryotropic Gelation of Aqueous Solutions. *Macromolecules*. 2006, Vol. 39, pp. 9429-9434.

Flory, P. J. 1953. *Principles of Polymer Chemistry*. Nova York : Cornell University Press, 1953.

Franz, T.J. 1975. Percutaneous Absorption. On the relevance of in vitro data. *Journal of Investigative Dermatology*. 64, 1975, pp. 190-195.

Fredrikson, I., Fors, C. e Johansson, J. 2007. Laser Doppler Flowmetry - a theoretical framework. *Department of Biomedical engineering*. [Online] 2007. www.imt.liu.se/bit/ldf/ldfmain.html.

Friederich, J. A. e Butterworth, J. F. 1995. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. *Anesthesia & Analgesia*. 1995, Vol. 81, pp. 152-162.

Frost, M. C., Reynolds, M. M. e Meyerhoff, M. E. 2005. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 1685-1693.

Fukuto, M. J., Cho, J. Y. e Switzer, C. H. 2000. The chemical properties of nitric oxide and related nitrogen oxides. *Nitric Oxide*. s.l. : Academic Press, 2000, 2, pp. 23-40.

Gayraud, M. 2007. Raynaud's phenomenon. *Joint Bone Spine*. 74, 2007, pp. e1-e8.

Generini, S., Seibold, J. R. e Matucci-Cerinic, M. 2005. Estrogens and neuropeptides in Raynaud's phenomenon. *Rheumatic Disease Clinics of North America*. 2005, Vol. 31, pp. 177-186.

Ghaffari, A., et al. 2007. Efficacy of gaseous nitric oxide in the treatment of skin and soft tissue infections. *Wound Repair and Regeneration*. 2007, Vol. 15, pp. 368-377.

Ghaffari, A., et al. 2006. Potential application of gaseous nitric oxide as topical antimicrobial agent. *Nitric Oxide*. 2006, Vol. 14, pp. 21-29.

Ghatta, S., et al. 2007. Sirolimus causes relaxation of Human Vascular Smooth Muscle: A novel action of Sirolimus mediated via ATP-sensitive Potassium Channels. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2007, Vol. 320, pp. 1204-1208.

Glatter, O. e Kratky, O. 1982. *Small Angle X-Ray Scattering*. Londres : Academic Press Inc., 1982.

Gombotz, W. R., Guanghui, W. e Horbett, T. A. 1991. Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research*. 1991, Vol. 25, pp. 1547-1562.

Gorbet, M. B. e Sefton, M. V. 2001. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 2001, Vol. 137, p. 345.

Gordge, M. P., Hothersall, J.S e Noronha-Dutra, A.A. 1998. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of Snitrosogluthione. *British Journal of Pharmacology*. 124, 1998, pp. 141-148.

Grare, M., et al. 2007. In vitro activity paraganidinoethylcalix[4]arene against susceptible and antibiotic resistant Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 60, 2007, pp. 575-581.

Gruentzig, A. P., Senning, A. e Siengenthaler, W. E. 1979. Non-operative dilation of coronary-artery stenosis: Percutaneous Transluminal Coronary Angioplasty. *New England Journal of Medicine*. 301, 1979, pp. 61-68.

Gutiérrez, M. C., et al. 2007. Poly(vinyl alcohol) Scaffolds with Tailored Morphologies for Drug Delivery and Controlled Release. *Advanced Functional Materials*. 17, 2007, pp. 3505–3513.

Hassan, C. M. e Peppas, N. A. 2000a. Structure and application of Poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing and thawing methods. *Advances in Polymer Sciences*. 2000a, Vol. 153, pp. 37-65.

Hassan, C. M. e Peppas, N. A. 2000b. Structure and Morphology of Freeze/Thawed PVA Hydrogels. *Macromolecules*. 2000b, Vol. 33, pp. 2472-2479.

Hassan, C. M., J.H., Ward e Peppas, N. A. 2000. Modeling of crystal dissolution of poly(vinyl alcohol) gels produced by freezing/thawing processes. *Polymer International*. 2000, Vol. 41, pp. 6729-6739.

Hassan, C. M., Trakarnpan, P. e Peppas, N. A. 1998. Water solubility characteristics of PVA and gels prepared by freezing and thawing processes. [A. do livro] Zahid Amjad. *Water soluble polymers*. Nova York : Plenum Press, 1998, pp. 31-40.

Hatakeyema, T., et al. 2005. Gel-sol transition of poly(vinyl alcohol) hydrogels formed by freezing and thawing. *Thermochimica Acta*. 2005, Vol. 431, pp. 144-148.

Hetrick, E. M. e Schoenfisch, M. H. 2007. Antibacterial nitric oxide-releasing xerogels: Cell viability and parallel plate flow cell adhesion studies. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28, pp. 1948-1956.

Hetrick, E. M. e Schoenfisch, M. H. 2006. Reducing implante-related infections: active release strategies. *Chemical Society Reviews*. 2006, Vol. 35, pp. 780-789.

Hetrick, E. M., et al. 2008. Bactericidal Efficacy of Nitric Oxide-Releasing Silica Nanoparticles. *ACS Nano*. 2, 2008, Vol. 2, pp. 235-246.

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

Hohne, G. W. H., Hemminger, W. F. e Flammersheim, H.-J. 2003. *Differential Scanning Calorimetry: an introduction for practitioners*. 2nd. s.l. : Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2003.

Horike, S., Matsuzawa, S. e Yamaura, K. 2002. Preparation of chemically crosslinked gels with maleate-denatured poly(vinyl alcohol) and its application to drug release. *Journal of Applied Polymer Science*. 84, 2002, Vol. 6, pp. 1178-1184.

<http://catalogohospitalar.com.br/cateter-intravenoso-angiocath-20g.html>. [Online]

<http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit1/prostruct/gncw.html#gncw>
THE PROKARYOTIC CELL: BACTERIA. *Biol 230 Lecture Guide*. [Online] The
Community College of Baltimore County.

http://www.cortexmed.com.br/conteudo_neurovascular_carotida.htm. [Online]

<http://www.cypherstent.com/cypher-stent/specifications/pages/index.aspx>.

<http://www.med-chem.com/procedures/GRAMSTAIN.pdf>. *Indian River State
College*. [Online].

<http://www.scitechmed.com.br>. [Online]

<http://www.scientificamerican.com/article.cfm>. [Online]

Huang, M.-H. e Yang, M.-C. 2008. Evaluations of glucan/poly(vinyl alcohol) blend
wound dressing using rat models. *International Journal of Pharmaceutics*. 346,
2008, Vols. 1-2, pp. 38-46.

Huangfua, , P., et al. 2009. Cell outer membrane mimetic modification of a cross-
linked chitosan. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2009, Vol. 71, pp. 268–
274.

Hyduke, D. R. e Liao, J. C. 2005. Analysis of nitric oxide donor effectiveness in
resistance vessels. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory
Physiology*. 2005, Vol. 288, pp. 2390-2399.

Hyon, S. H., et al. 1994. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact-lens material.
Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition. 5, 1994, Vol. 5, pp. 397-406.

Ignarro, L. J. 2000. Introduction and overview in nitric oxide: biology and
pathobiology. s.l. : Academic Press, 2000, pp. 3-19.

Ignarro, L. J., Napoli, C. and Loscalzo, J. 2002. Nitric Oxide donors and
cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide: an overview.
Circulation Research. 2002, Vol. 11, pp. 21-28.

Indian River State College. 2010. Medial chemical Corporation. [Online] 2010.
[Citado em: 10 de 01 de 2011.]
<http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/micro%20resources.htm>.

Jaworski, K., et al. 2001. S-nitrosothiols do not include oxidative stress, contrary to
other nitric oxide donors, in cultures of vascular endothelial or smooth muscle cells.
European Journal of Pharmacology. 2001, Vol. 425, pp. 11-19.

- Jones, M. L., et al. 2010. Antimicrobial properties of nitric oxide and its application in antimicrobial formulations and medical devices. *Application in Microbiology and Biotechnology*. 88, 2010, pp. 401-407.
- Jordan, S. W. e Chaikof, E. L. 2007. Novel thromboresistant materials. *Journal of vascular surgery*. 2007, Vol. 45, pp. 104A-115A.
- Kanaya, T., Ohkura, M. e Kaji, K. 1994. Structure of Poly (vinyl alcohol) gel studied by wide- and small-angle Neutron Scattering. *Macromolecules*. 27, 1994, pp. 5609-5615.
- Kaul, S., et al. 2000. Polymeric-based perivascular delivery of a nitric oxide donor inhibits intimal thickening after balloon denudation arterial injury: Role of Nuclear factor-kappa B. *Journal of American College of Cardiology*. 2000, Vol. 35, pp. 493-501.
- Kelly, C.M., et al. 2003. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. *Food and Chemical Toxicology*. 2003, Vol. 41, pp. 719-727.
- Kimb, J. O., et al. 2008. Development of polyvinyl alcohol–sodium alginate gel-matrix-based wound dressing system containing nitrofurazone. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008, Vol. 359, 1-2, pp. 79-86.
- Kim-Shapiro, D. B., Sretcher, A. N. e Gladwin, M. T. 2006. Unraveling the Reactions of Nitric Oxide, Nitrite, and Hemoglobin in Physiology and therapeutics. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*. 2006, Vol. 26, pp. 697-705.
- Klee, D. e Hocker, H. 1999. Polymer for biomedical application: Improvements of the interface compatibility. *Advances in Polymer Science*. 1999, Vol. 149, pp. 1-57.
- Koesling, D. e Friebe, A. 2000. Structure-function relationships in NO-sensitive guanylyl cyclase. [A. do livro] Louis Ignarro. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. California : Academic Press, 2000.
- Kokabi, M., Sirousazar, M. e Hassan, Z. M. 2007. PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing. *European Polymer Journal*. 43, 2007, pp. 773–781.
- Komatsu, M., Inoue, T. e Miyasaka, K. 1986. Light-scattering studies on the sol-gel transition in aqueous solutions of Poly(vinyl alcohol). *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*. 1986, Vol. 24, pp. 303-311.
- Lancaster, J. R. Jr. 1997. A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide*. 1997, Vol. 1, pp. 18-30.

Langeveld, B., et al. 2004. Rat Abdominal Aorta Stenting: A reliable Small Animal Model for In stent Reestenosis. *Journal of Vascular Research*. 41, 2004, pp. 377-386.

Lazar, E. E., et al. 2008. Antifungal effect of gaseous nitric oxide on mycelium growth, sporulation and spore germination of the postharvest horticulture pathogens, *Aspergillus niger*, *Monilinia fructicola* and *Penicillium italicum*. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, Vol. 46, pp. 688-692.

Leite, Paula Silvestrini Anarelli. 2007. Avaliação de dois métodos de análise da microcirculação gengival via fluxometria laser doppler. Faculdade de odontologia, Universidade de São Paulo. São Paulo : Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2007. Dissertação de Mestrado.

Leopold, J. e Loscalzo, J. 2000. S-nitrosothiols. [ed.] Loscalzo J. e J. A. Vita. *Nitric Oxide and cardiovascular system*. Totowa : Humana Press, 2000, 23, pp. 411-429.

Lin, C.-E., et al. 2004. Combination of paclitaxel and nitric oxide as a novel treatment for the reduction of restenosis. *Journal of Medicinal Chemistry*. 2004, Vol. 47, pp. 2276-2282.

Lipke, E. A. e West, J. 2005. Localized delivery of nitric oxide from hydrogels inhibits neointima formation in a rat carotid balloon injury model . *Acta Biomaterialia*. 2005.

Lozinsky, V. I. 1998. Cryotropic gelation of poly(vinyl alcohol) solutions. *Russian Chemical reviews*. 1998, Vol. 67, pp. 573-586.

Lozinsky, V. I. e Plieva, F. M. 1998. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed. *Enzyme and Microbial Technology*. 1998, Vol. 23, pp. 227-242.

MacArthur, P. H., Shiva, S. e Gladwin, M. T. 2007. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *Journal of Chromatography B*. 851, 2007, pp. 93-105.

Maisel, W. H. 2007. Unanswered questions - Drug eluting stents and the risk of late stent thrombosis. *The New England Journal of Medicine*. 356, 2007, Vol. 10, pp. 981-984.

Maliska, A. M. 2003. Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise. [Online] 2003. http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_Apostila.pdf.

Mangiapia, G., et al. 2007. Mesoscopic and Microscopic Investigation on Poly(vinyl alcohol) Hydrogels in the Presence of Sodium Decylsulfate. *Journal of Physical Chemistry B*. 2007, Vol. 111, pp. 2166-2173.

Mark, J. E., [ed.]. 2007. *Physical Properties of Polymer Handbook*. 2a. . Nova York : Springer Science & Business Media, LLC, 2007.

Marks, D. S., et al. 1995. Inhibitions of neointimal proliferation in rabbits after a single treatment with a protein adduct of nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation*. 96, 1995, pp. 2630-2638.

Masters, K. S., et al. 2002. The effects of nitric oxide releasing poly(vinyl alcohol) hydrogel dressings on dermal wound healing in diabetic mice. . *Wound Repair Regenerations*. 10, 2002, pp. 286-294.

Matsumoto, A. e Gow, A. J. 2011. Membrane transfer of S-nitrosothiols. *Nitric Oxide*. 2011.

Mendelsohn, M. E., et al. 1990. Inhibition of fibrinogen binding to human platelets by S-nitroso-N-acetylcysteine. *Journal of Biological Chemistry*. 1990, Vol. 265, pp. 19028-19034.

Merril, E. W. e Salzman, E. W. 1983. Polyethylene Oxide as a biomaterial. *American Society of Artificial Internal Organs Journal*. 1983, Vol. 6.

Michael, J. S. e Zhang, X. 2007. The Principles, Development and Application of Microelectrodes for the In Vivo Determination of Nitric Oxide. [ed.] A. C. Michael e L. M. Borland. *Electrochemical Methods for Neuroscience*. Boca Raton : CRC Press, 2007.

Miranda, K. M., et al. 2000. The chemical biology of nitric oxide. [ed.] L. J. Ignarro. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. New York : Academic Press, 2000, pp. 41-55.

Mishra, S., et al. 2006. Preparation and characterization of Polyvinyl Alcohol based biomaterials: Water sorption and In Vitro Blood Compatibility study. *Journal of Applied Polymer Science*. 2006, Vol. 100, pp. 2402-2408.

Miyazaki, T., et al. 2006. SAXS studies on structural changes in a poly(vinyl alcohol) film during uniaxial stretching in water. *Macromolecules*. 39, 2006, Vol. 8, pp. 2921-2929.

Moor Instruments, Inc. Tissue blood flow and temperature monitoring with Moor VMS-LDF. *Moor Instruments Laser Doppler blood flow assesment*. [Online] [Citado

em: 10 de 07 de 2010.] http://www.moor.co.uk/files/moorVMS-LDF/874a821/USA_moorVMS-LDF_Issue_1.pdf.

Mowery, K. A., Schoenfisch, M. H. e Saavedra, J. E. 2000. Preparation and characterization of hydrophobic polymeric films that are thromboresistant via nitric oxide release. *Biomaterials*. 2000, Vol. 21, pp. 9-21.

Nablo, B. J., et al. 2005. Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release. *Biomaterials*. 26, 2005, pp. 6984-6990.

Nablo, B. J., Rothrock, A. R. e Schoenfisch, M. H. 2005. Nitric oxide-releasing sol-gel as antibacterials coatings for orthopedic implants. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 917-924.

Nablo, J. B., et al. 2005. Inhibition of implant-associated infections via nitric oxide release. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 6984-6990.

Niemi SM, Fox JG, Brown LR, et al. 1985. Evaluation of ethylene-vinyl acetate as a non-inflammatory alternative to Freund's complete adjuvant in rabbits. *Laboratory Animal Science*. 35, 1985, pp. 609-612.

Noguchi, T., et al. 1991. Poly (vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage - evaluation of biocompatibility. *Journal of Applied Biomaterials*. 1991, Vol. 2, pp. 101-107.

Oliveira, M. G., et al. 2002. Thermal stability of primary S-nitrosothiols: Roles of autocatalysis and structural effects on the rate of nitric oxide release. *Journal of Physical Chemistry A*. 2002, Vol. 106, pp. 8963-8970.

Ong, C. T., et al. 2004. Emerging *Pseudomonas aeruginosa* resistance: implications in clinical practice. *Connecticut Medicine*. 68, 2004, Vol. 1, pp. 11-15.

Pan, C. J., et al. 2007. Preparation and characterization of rapamycin-loaded PLGA coating stent. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2007, Vol. 18, pp. 2193-2198.

Pauw, B. R. 2007. A Short Introduction to Small-Angle X-Ray Scattering. [Online] 10 de 08 de 2007. [Citado em: 18 de 07 de 2009.] <http://www.youtube.com/watch?v=ejqleVj4pIE>.

Peppas, N. A. e Merrill, E. W. 1977. Development of semicrystalline poly(vinyl alcohol) hydrogels for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research*. 11, 1977, Vol. 3, pp. 423-434.

Peppas, N. A. 1987. Hydrogels in medicine and pharmacy. [A. do livro] N. A. (ed) Peppas. *Polymer*. Boca Raton : CRC, 1987, Vol. 2, pp. 1-48.

Peppas, N. A. 1975. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing. *Die Makromolekulare Chemie*. 1975, Vol. 176, pp. 3433-4337.

Pope, J. E. 2008. Raynaud's phenomenon (primary). *Clinical Evidence (Online)*. [Online] 2008. <http://clinicalevidence.bmj.com/ceweb/index.jsp>.

Pulffer, S. K., Ott, D. e Smith, D. J. 1997. Incorporation of Nitric Oxide-releasing crosslinked polyethyleneimine microspheres into vascular grafts. *Journal of Biomedical Materials Research*. 37, 1997, pp. 182-189.

Queiroz, S. 1999. Funções biológicas do óxido nítrico. *Química Nova*. 1999, Vol. 22, pp. 584-590.

Ramachandran, N., et al. 2001. Mechanism of transfer of NO from extracellular S-nitrosothiols into the cytosol by cell-surface protein disulfide isomerase. *Proceedures of National Academy of Sciences*. 98, 2001, pp. 9539-9544.

Ratner, B. D. 2007. The catastrophe revisited: Blood compatibility in the 21st Century. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28, pp. 5144-5147.

Revel, P.A., M., Braden e M.A., Freeman. 1998. Review of the biological response to a novel bone cement containing poly(ethyl methacrylate) and n-butyl methacrylate. *Biomaterials*. 19, 1998, pp. 1579-1586.

Ricardo, K. F. S., et al. 2002. Characterization of the hypotensive effect of S-nitroso-N-acetylcysteine in normotensive and hypertensive conscious rats. *Nitric Oxide*. 2002, Vol. 7, pp. 57-66.

Ricciardi, R., Auriemma, F. e DeRosa, C. 2005. Structure and properties of Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freeze/thaw techniques. *Macromolecular Symposia*. 222, 2005, Vol. 1, pp. 49-63.

Ricciardi, R., et al. 2004. Investigation of the Crystallinity of Freeze/Thaw Poly(vinyl alcohol). *Macromolecules*. 37, 2004, pp. 9510-9516.

Ricciardi, R., et al. 2005B. Structural organization of Poly(vinyl alcohol) hydrogels obtained byfreezing and thawing techniques: a SANS study. *Chemistry of Materials*. 2005B, Vol. 17, pp. 1183-1189.

Schoenfisch, M. H., et al. 2000. Improving the thromboresistivity of chemical sensors via itric oxide release: fabrication and in vivo evaluation of NO-releasing oxygen sensing catheter. *Analytical Chemistry*. 2000, Vol. 72, pp. 1119-1126.

Seabra, A. B. and de Oliveira, M. G. 2004. Poly (vinyl alcohol) and Poly (vinyl pyrrolidone) blended fims for local nitric oxide release. *Biomaterials*. ooctober 09, 2004, Vol. 25, pp. 3773-3782.

Seabra, A. B. 2006. *Preparação, caracterização e aplicações de biomateriais liberadores de óxido nítrico*. Instituto de Química - Departamento de Físico Química, Universidade Estadual de Campinas. Campinas : Universidade Estadual de Campinas, 2006. Tese de Doutorado.

Seabra, A. B., da Silva, R. e de Oliveira, M. G. 2005. Polynitrosated Polyesters: Preparation, Characterization, and Potential Use for Topical Nitric Oxide Release. *Biomacromolecules*. 2005, Vol. 6, pp. 2512-2520.

Seabra, A. B., et al. 2010. Antibacterial Nitric Oxide-Releasing Polyester for the Coating of Blood-Contacting Artificial Materials. *Artificial Organs*. 2010, Vol. 34, pp. E204-E214.

Seabra, A. B., et al. 2008. Antithrombogenic Polynitrosated Polyester/Poly(methylmethacrylate) Blend for the Coating of Blood-Contacting Surfaces. *Artificial Organs*. 2008, Vol. 32, pp. 262-267.

Seabra, A. B., et al. 2004B. S-nitrosoglutathione incorporated in poly(ethylene glycol) matrix: potential use for topical nitric oxide delivery. *Nitric Oxide - Biology and chemistry*. 11, 2004B, pp. 263-272.

Seabra, A. B., et al. 2007. S-nitrosoglutathione-containing hydrogel increases dermal blood flow in streptozotocin-induced diabetc rats. *British Journal of Dermatology*. 156, 2007, Vol. 5, pp. 814-818.

Seabra, A. B., et al. 2004. Topically applied S-nitrosothiol-containing hydrogels as experimental and pharmacological nitric oxide donors in human skin. *British Journal of Dermatology*. 151, 2004, pp. 977-983.

Shah, C. M., et al. 2003. Rapid S-nitrosothiol metabolism by platelets and megakaryocytes,. *Biochem. Soc. Trans*. 31, 2003, pp. 1450-1452.

Shah, C.M., et al. 2007. Interactions between cell surface protein disulphide isomerase. *Nitric Oxide*. 16, 2007, pp. 135-142.

Shishido, S. M. e de Oliveira, M. G. 2000. Polyethylene Glycol Matrix reduces the rates os photochemical and thermal release of nitric oxide from S-nitroso-N-acetylcysteines. *Photochemistry and Photobiology*. 2000, Vol. 71, pp. 273-280.

Shishido, S. M., et al. 2002. *Journal of Physical Chemistry A*. 106, 2002, Vol. 8, pp. 8963-8970.

Shishido, S. M., et al. 2003. Thermal and photochemical nitric oxide release form S-nitrosothiols incorporated in Pluronic F127 gel: potential uses for local and controlled nitric oxide release. *Biomaterials*. 2003, Vol. 24, pp. 3543-3553.

Simões, M. M. S. G. 2006. *Revestimento de stents com filmes de poli (álcool vinílico) eluidores de S-nitrosoglutationa*. Campinas : Universidade Estadual de Campinas, 2006. Dissertação de mestrado.

Singh, R. J., et al. 1996. Mechanism of nitric oxide release from S-nitrosothiols. *Journal of Biological Chemistry*. 1996, Vol. 271, pp. 18596-18603.

Skoog, D. A., Holler, F. J. e Nieman, T. 1998. *Principles of Instrumental Analysis*. New York : s.n., 1998.

Sliskovic, I, Raturi, A. e Mutus, B. 2005. Characterization of the S-Denitrosation Activity of Protein Disulfide Isomerase*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. 280, 2005, Vol. 10, pp. 8733-8741.

Smith, A. W. 2005. Biofilms and antibiotics therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2005, Vol. 57, pp. 1539-1550.

Smith, D. J., et al. 1996. Nitric Oxide releasing polymes containing the [N(O)NO]-Group. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1996, Vol. 39, pp. 1148-1156.

Sperling, C., et al. 2005. In vitro hemocompatibility of self-assembled monolayers displaying various functional groups. *Biomaterials*. 2005, Vol. 26, pp. 6547-6557.

Sperling, C.,, et al. 2007. In vitro blood reactivity to hydroxylated and non-hydroxylated polymer surfaces. *Biomaterials*. 2007, Vol. 28, pp. 3617-3625.

Stauffer, S. R. e Peppas, N. A. 1992. Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing and thawing cyclic processing. *Polymer*. 1992, Vol. 33, pp. 3932-3936.

Stone, G. W., et al. 2007. Safety and efficacy of Sirolimus- and Paclitaxel-eluting cprpnary stents. *The New England Journal of Medicine*. 2007, Vol. 356, pp. 998-1008.

Taite, L. J., et al. 2008. Nitric Oxide-Releasing Polyurethane–PEG Copolymer Containing the YIGSR Peptide Promotes Endothelialization With Decreased Platelet Adhesion. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 84B,, 2008, pp. 108–116.

Takeshi Suzuki, Greg Kopia, Shin-ichiro Hayashi, Lynn R. Bailey, Gerard Llanos e Robert Wilensky, Bruce D. Klugherz, George Papandreou, Pallassana Narayan, Martin B. Leon, Alan C. Yeung, Fermin Tio, Philip S. Tsao, Robert Falotico and Andrew J. Carter. Stent-Based Delivery of Sirolimus Reduces Neointimal Formation in a Porcine Coronary Model. *Circulation* 2001;104;1188-1193.

Tamura, K., et al. 1988. New hydrogel from PVA and its fundamental study for medical application - changes of properties after implantation and application as non-adhesive membrane for intestines. *Artificial Organs*. 12, 1988, Vol. 5, pp. 462-465.

Tauro, P., Kapoor, K. K. e Yadav, K. S. 1986. *An introduction to microbiology*. s.l. : New Age International, 1986.

Varu, V. N., Tsihlis, N. D. e Kibbe, M. 2009. Nitric oxide-releasing prosthetic materials. *Vascular and Endovascular Surgery*. 2009, Vol. 43, pp. 121-131.

Vilahur, G., et al. 2004. Inhibition of thrombosis by a novel platelet selective S-nitrosothiol compound without hemodynamic side effects. *Cardiovascular Research*. 2004, Vol. 61, pp. 806-816.

Virmani, R., et al. 2004. Localized Hypersensitivity and Late Coronary Thrombosis Secondary to a Sirolimus-Eluting Stent. Should We Be Cautious? *Circulation*. 2004, Vol. 109, pp. 701-705.

Voetsch, B., Jin, R. C. e Loscalzo, J. 2004. Nitric Oxide insufficiency and atherothrombosis. *Histochemistry and Cell Biology*. 2004, Vol. 122, pp. 353-367.

Vonk, C. G. 1982. Synthetic Polymers in the solid State. [A. do livro] O. and Kratky, O. Glatter. *Small Angle X-ray Scattering*. Londres : Academic Press Inc., 1982.

Vural, K. M. e Bayazit, M. 2001. Nitric Oxide: Implications for vascular and endovascular surgery. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2001, Vol. 22, pp. 285-293.

Walford, G. e Loscalzo, J. 2003. Nitric Oxide in vascular biology. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. 2003, Vol. 1, pp. 2112-2118.

Wan, W. K., et al. 2002. Optimizing the tensile properties of poly(vinyl alcohol) hydrogel for the construction of a bioprosthetic heart valve. *Journal of Biomedical Material Research A*. 63, 2002, Vol. 3, pp. 854-861.

Wasserman, A. e Brahn, E. 2010. Systemic Sclerosis: Bilateral Improvement of Raynaud's Phenomenon with Unilateral Digital Sympathectomy. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 40, 2010, pp. 137-146.

Werner, C., Maitz, M. F. e Sperling, C. 2007. Current strategies toward hemocompatible coatings. *Journal of Materials Chemistry*. 2007, Vol. 17, pp. 3376-3384.

Wigley, F. M. 2002. Clinical practice. Raynaud's Phenomenon. *New England Journal of Medicine* 2002;347(13):1001-8. 347, 2002, Vol. 13, pp. 1001-1008.

Willcox, J. P., et al. 1999. Microstructure of Poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling. *Journal of Polymer Science, Part B: Polymer Physics*. 1999, Vol. 37, pp. 3438-3454.

Willcox, P. J., et al. 1999. Microstructure of Poly (vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling. *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*. 1999, Vol. 37, pp. 3438-3454.

Wink, D. e Mitchell, J. B. 1998. Chemical Biology of Nitric Oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and citoprotective mechanism of nitric oxide. *Free radical biology and medicine*. 1998, Vol. 25, pp. 434-456.

Winterton, L. C., et al. 2007. The elution of Poly(vinyl alcohol) from contact lenses: the realization of a time moisturizing agent/artificial tear. *Journal of biomedical materials Research B: Applied Biomaterials*. 80B, 2007, pp. 424-432.

World Health Organization (WHO). [Online] [Citado em: 28 de outubro de 2008.] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>.

World Precision Instruments. [Online]

Wu, B., et al. 2008. Polymeric coatings that mimic the endothelium: Combining nitric oxide release with surface-bound active thrombomodulin and heparin. *Biomaterials*. 2008, Vol. 28, pp. 4047-4055.

Wu, Y. e Meyerhoff, M. E. 2008. Nitric oxide-releasing/generating polymers for the development of. *Talanta*. 2008, Vol. 75, pp. 642-650.

Yang, S.-H, et al. 2007. Chitosan/poly(vinyl alcohol) blending hydrogel coating improves the surface characteristics of segmented polyurethane urethral catheters. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2007, Vol. 83B, pp. 304-313.

Yoon, J., et al. 2002. Local delivery of nitric oxide from an eluting stent to inhibit neointimal thickening in a porcine coronary injury model. *Yonsei Medical Journal*. 2002, Vol. 43, pp. 242-251.

Young, T. H., et al. 1998. Use of a diffusion model for assessing the performance of poly(vinyl alcohol) bioartificial pancreases. *Journal of Biomedical Materials Research A*. 40, 1998, Vol. 3, pp. 385-392.

Zai, A., et al. 1999. Cell-surface protein disulfide isomerase catalyzes transnitrosation and regulates intracellular transfer of nitric oxide. *Journal of Clinical Investigation*. 103, 1999, pp. 393–399.

Zhang, X. 2004. Real time and *in vivo* monitoring of nitric oxide by electrochemical sensors – from dream to reality. *Frontiers in Bioscience* . 9, 2004, pp. 3434-3446.

Zhang, X., et al. 2000. Novel Calibration Method for Nitric OXide Microsensor by Stoichiometrical generation of Nitric OXide from SNAP . *Electroanalysis*. 2000, Vol. 12, pp. 425-428.

Zhang, Y. e Hogg, N. 2005. S-nitrosothiols: cellular formation and transport. *Free Radical Biology & Medicine*. 2005, Vol. 38, pp. 831–838.