

EDSON GOLEMBIEVSKI CRISPIM

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) MODIFICADO
COM METACRILATO DE GLICIDILA (PVA-Ma) E DE PVA-Ma ASSOCIADO COM SULFATO DE
CONDROITINA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti
Muniz

MARINGÁ
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

À minha esposa Eliane, aos meus filhos, Isabela e Raul, aos meus pais, José e Bernarda, aos meu irmão e irmãs Edna, Elizabeth, Elizete e Ézio.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela determinação que deu ao homem, que nos faz seguir em frente mesmo nas mais adversas dificuldades.

A toda minha família e de minha esposa, pela paciência e apoio.

Ao Prof. Dr. Edvani Curti Muniz pela orientação e paciência com que me ajudou a concluir este trabalho.

Aos professores Adley Forti Rubira e Gentil J. Vidotti e Osvaldo A. Cavalcante pela ajuda, discussão e presteza.

Aos responsáveis técnicos dos equipamentos de RMN e Infravermelho, Ivânia e Ana pela ajuda e obtenção dos espectros.

Ao Gilsinei e à Silvia pelas medidas de propriedades mecânicas e obtenção das micrografias.

Aos professores Celso V. Nakamura e Tânia U. Nakamura e à pós-graduanda Érika Ravazi pelas medidas de citotoxicidade.

Aos professores e funcionários do DQI, graduação e pós-graduação, que contribuíram direta ou indiretamente para a minha formação.

Aos colegas de laboratório do bloco 18, pós-graduandos, Adonilson, Adriano, Marcos, e aos alunos e alunas de iniciação científica pela amizade e convivência.

Às alunas de iniciação científica Elaine e Juliana, pela ajuda e participação no trabalho.

À Cristina e ao Claudemir, da secretaria da Pós Graduação em Química, pela presteza, simpatia e amizade.

Trabalhos Publicados Desta Tese

1. Crispim, E. G.; Piai, J. F.; Schuquel, I. T. A.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C., Functionalization of poly(vinyl alcohol) by addition of methacryloil groups: characterization by FTIR and NMR and optimization of reaction conditions by RSM, e-Polymers, aceito para publicação.
2. Crispim, E. G.; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C., Addition of methacryloil groups to poly(vinyl alcohol) in DMSO catalyzed by

TEMED: Optimization through response surface methodology, *Polymer Testing*, 2006, 25, 377-383.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES	VII
LISTA DE SÍMBOLOS.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
1 RELEVÂNCIA DO TEMA ESTUDADO.....	1
2 OBJETIVOS.....	7
3 MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)	8
3.1 INTRODUÇÃO	8
3.2 EXPERIMENTAL.....	12
3.2.1 Materiais e Equipamentos	12
3.2.2 Procedimentos Experimentais	12
3.2.2.1 Reação de Modificação do PVA.....	12
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	14
4 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DO PVA COM GMA EM DMSO, CATALISADA POR TEMED.....	23
4.1 INTRODUÇÃO	23
4.2 EXPERIMENTAL.....	30
4.2.1 Materiais e Equipamentos	30
4.2.2 Procedimento Experimental.....	31
4.2.2.1 Planejamento Fatorial	31
4.2.2.2 Planejamento Composto Central	33
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.3.1 Análise Fatorial	34
4.3.2 Superfície de Resposta.....	38
5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE PVA-MA E DE HIDROGÉIS DE PVA-MA ASSOCIADOS COM SULFATO DE CONDROITINA (PVA-MA/SC).....	46
5.1 INTRODUÇÃO	46
5.1.1 Propriedades Mecânicas dos Hidrogéis	47
5.1.1.1 Medidas de Tensão/Deformação	48
5.1.1.2 Teoria da Elasticidade da Borracha	50
5.1.2 Grau de Intumescimento e Cinética de Intumescimento de Hidrogéis	57
5.1.3 Testes de Citotoxicidade.....	60
5.2 EXPERIMENTAL.....	62
5.2.1 Materiais e Equipamentos	62
5.2.2 Procedimentos Experimentais	63

5.2.2.1	Modificação do PVA	64
5.2.2.2	Síntese dos Hidrogéis de PVA-Ma	64
5.2.2.3	Síntese dos Hidrogéis de PVA-Ma com Sulfato de Condroitina (SC).....	65
5.2.2.4	Determinação do Grau de Intumescimento	65
5.2.2.5	Medidas de Cinética de Intumescimento em Fluido de Simulação Gástrica (FSG) e em Fluido de Simulação Intestinal (FSI).	66
5.2.2.6	Determinação das Propriedades Mecânicas dos Hidrogéis e da Massa Molar ente Retículos.....	67
5.2.2.7	Propriedades morfológicas dos hidrogéis	68
5.2.2.8	Avaliação da Citotoxicidade	69
5.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.3.1	Caracterização dos Hidrogéis.....	71
5.3.1.1	Graus de Intumescimento	71
5.3.1.2	Propriedades Mecânicas dos Hidrogéis.....	74
5.3.1.3	Cinética de Intumescimento	80
5.3.1.4	Análise Morfológica dos Hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).	86
5.3.1.5	Avaliação da Citotoxicidade	89
6	CONCLUSÕES.....	92
7	SUGESTÕES DE ESTUDOS FUTUROS.....	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA	análise de variância.
DAEMAE	2- {[2(dimetil-amino)etil]metilamino}etanol.
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.
DMAP	4-dimetilaminopiridina.
DMSO	dimetilsulfóxido.
DMSO-D₆	dimetilsulfóxido deuterado.
FSG	fluido de simulação gástrica.
FSI	fluido de simulação intestinal.
GMA	metacrilato de glicidila.
GS	Grau de substituição.
HETCOR	Heteronuclear Correlation.
IPN	redes interpenetradas.
LD₅₀	dose de substância (g/kg de massa corporal) que causa morte de 50% em testes com cobaias.
OH/GMA	razão molar entre hidroxilas do poli(álcool vinílico) e metacrilato de glicidila na reação de modificação do PVA.
PEO	poli(óxido de etileno).
PHEMA	poli(metacrilato de 2-hidroxietila).
PNIPAm	poli(acrilamida N-isopropila).
PVA	poli(álcool vinílico).
PVA-Ma	poli(álcool vinílico) modificado com metacilato de glicidila.
PVA-Ma/SC	hidrogel de PVA-Ma com adição de sulfato de condroitina.
PVAc	poli(acetato de vinila).
RSM	metodologia de superfície de resposta.
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina.
SC	sulfato de condroitina.
semi-IPN	redes semi-interpenetradas.
valor P	probabilidade da hipótese nula ser verdadeira.

LISTA DE SÍMBOLOS

$A(H')$ $A(H'')$	áreas dos hidrogênios vinílicos dos grupamentos metacrilóila no espectro de RMN ^1H .
$A(OH)$	área dos hidrogênios hidroxílicos do PVA no espectro de RMN ^1H .
a	constante exponencial na equação de Mark-Houwink-Sakurada.
A_0	área transversal de uma amostra não tensionada.
α	deformação relativa ou razão de deformação.
$C_{2,r}$	concentração inicial do polímero na solução de reticulação em g/mL.
ε	deformação.
E	módulo de elasticidade.
F	força aplicada no teste de compressão ou estiramento.
G	módulo de cisalhamento.
$[\eta]$	viscosidade intrínseca.
$\varphi_{2,s}$	fração volumétrica do polímero intumescido ao equilíbrio.
$\varphi_{2,r}$	fração volumétrica do polímero após a reticulação e antes de intumescido (relaxado).
K	módulo de compressão.
k	número de fatores (variáveis dependente) estudado na análise fatorial.
k	constante da equação de Mark-Houwink-Sakurada.
k	constante de Boltzmann.
l_0	comprimento inicial da amostra antes da aplicação de uma força no teste de compressão ou estiramento.
l	comprimento da amostra após a aplicação de uma força no teste de compressão ou estiramento.
μ	Razão de Poisson.
M_c	massa molar entre retículos.
\overline{M}_n	massa molar média numérica.

\overline{M}_V	massa molar média viscosimérica.
\overline{M}_w	massa molar média mássica.
M_t	massa de água absorvida ou soluto liberado no tempo t.
M_∞	massa de água absorvida ou soluto liberado no equilíbrio.
$[M_i]$	concentração molar das cadeias da rede polimérica.
N_i	número de cadeias.
N_L	constante de Avogadro.
ν_e	densidade de reticulação.
Q_V	grau de intumescimento com relação ao volume.
Q_W	grau de intumescimento com relação massa.
R	constante dos gases reais.
ρ_2	densidade do polímero.
S	entropia.
S_w	índice de intumescimento.
σ	tensão aplicada no este de compressão ou etiramento.
T	temperatura.
t	tempo.
V_0	volume inicial da amostra no teste de compressão ou estiramento.
V_0	volume do hidrogel seco.
V_2	volume do polímero.
V_r	volume do gel após a síntese (volume relaxado).
V_I	volume do hidrogel intumescido.
W_I	massa do hidrogel intumescido.
W_0	massa do hidrogel seco.
W_R	massa do hidrogel seco.
x_k	fator (variável dependente)
y	resposta, variável dependente na análise fatorial.

- 1 nível inferior de um fator (variável dependente) na análise fatorial.
- +1 nível superior de um fator (variável dependente) na análise fatorial.
- 0 nível médio de um fator (variável dependente) na análise fatorial.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.1. UNIDADE DISSACARÍDICA REPETITIVA DO SULFATO DE CONDRITINA, $R = SO_3^-$ NA POSIÇÃO 4 OU 6.....	5
FIGURA 1.2. MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE UMA PROTEOGLICANA DE CARTILAGEM. REPRODUZIDO DE STRYER L. ²⁷	6
FIGURA 3.1. REAÇÃO DE HIDRÓLISE DO PVAc EM MEIO ALCOÓLICO/ALCALINO (ALCOÓLISE).....	8
FIGURA 3.2. TAUTOMERIA ENTRE O ÁLCOOL VINÍLICO E ACETALDEÍDO.	8
FIGURA 3.3. REAÇÃO DE ETERIFICAÇÃO DO PVA COM ÓXIDOS DE ALQUILENOS.....	9
FIGURA 3.4. REAÇÃO DO PVA COM ACRILATO DE GLICIDILA EM MEIO AQUOSO, SEGUNDO MARTENS, P. E ANSETH, K. S. ¹³ 10	
FIGURA 3.5. ESPECTROS DE FTIR DE FILMES DE PVA DE PARTIDA, E PVA-MA MODIFICADOS COM RAZÕES MOLARES (1/0,05), (1/0,10) E (1/0,30) DE [-OH(PVA)/GMA].....	15
FIGURA 3.6. PROVÁVEIS REAÇÕES DO PVA COM GMA: (1) POR TRANSESTERIFICAÇÃO; (2) POR ABERTURA DO ANEL EPÓXIDO.....	16
FIGURA 3.7. ESPECTROS DE RMN ¹³ C, ¹ H DO GMA EM DMSO-D ₆	17
FIGURA 3.8. ESPECTRO HETCOR DO GMA EM DMSO-D ₆	18
FIGURA 3.9. ESPECTROS DE RMN ¹³ C DO PVA NÃO MODIFICADO, DO GMA E DOS PVA-MA'S OBTIDOS EM DIFERENTES RAZÕES MOLARES [-OH(PVA)/GMA], EM DMSO-D ₆	19
FIGURA 3.10. ESPECTROS DEPT DO PVA-MA NA RAZÃO 1/0,30 DE [-OH(PVA)/GMA], EM DMSO-D ₆	19
FIGURA 3.11. ESPECTROS DE RMN ¹ H DO PVA NÃO MODIFICADO, DO GMA E DO PVA-MA EM DIFERENTES RAZÕES [-OH(PVA)/GMA], EM DMSO-D ₆	20
FIGURA 3.12. ESPECTRO HETCOR DO PVA-MA NA RAZÃO 1/0,30 [-OH(PVA)/GMA], EM DMSO-D ₆	21
FIGURA 4.1. REPRESENTAÇÃO EM COORDENADAS CARTESIANA DA CONVERSÃO DA CODIFICAÇÃO DAS VARIÁVEIS EM UM PLANEJAMENTO 2 ³ . (ADAPTADO DE NETO, B. B. ET ALL ³⁷)	26
FIGURA 4.2. GRÁFICO DE CONTORNO DO RENDIMENTO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA E TEMPO DE REAÇÃO, ILUSTRANDO UM PROCESSO DE OTIMIZAÇÃO DE UMA REAÇÃO QUÍMICA. (ADAPTADO E REPRODUZIDO DE MONTGOMERY, D. C. ³⁸).....	29
FIGURA 4.3. GRÁFICO NORMAL DOS EFEITOS PARA O FATORIAL 2 ³	37
FIGURA 4.4. GRÁFICO NORMAL DOS RESÍDUOS PARA O AJUSTE AO MODELO QUADRÁTICO BASEADO NO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL.	41
FIGURA 4.5. SUPERFÍCIE DE RESPOSTA OBTIDA PARA O AJUSTE DO MODELO QUADRÁTICO AOS DADOS DA TABELA 4.6.	42
FIGURA 4.6. GRÁFICO DE CONTORNO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA PARA O MODELO OBTIDO AJUSTADO PELA EQUAÇÃO 4.2.....	42
FIGURA 4.7. GRÁFICO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO OBTIDO GS A 62°C E 6 HORAS DE REAÇÃO EM FUNÇÃO DO GS TEÓRICO.	44
FIGURA 5.1 GRÁFICOS DE INTUMESCIMENTO, Q, EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA E PVA-MA/SC COM VALORES DE GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO NOMINAL DO PVA-MA DE 2,5%, 3,5% E 5,0% COM 0, 10, 20 E 33% DE SC, MEDIDOS A PARTIR DO HIDROGEL RELAXADO EM ÁGUA DEIONIZADA A 25C.	71

FIGURA 5.2. GRAUS DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO NOMINAL DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA COM 0, 10, 20 E 33 % DE SC, REFERENTES AO DADOS TA TABELA 5.4.	73
FIGURA 5.3. GRÁFICO DE TENSÃO EM FUNÇÃO DE $(\alpha - \alpha^{-2})$ DAS MEMBRANAS DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA SEM ADIÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA.	75
FIGURA 5.4. GRÁFICO DE TENSÃO EM FUNÇÃO DE $(\alpha - \alpha^{-2})$ DAS MEMBRANAS DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM ADIÇÃO 10% DE SULFATO DE CONDRITINA.	75
FIGURA 5.5. GRÁFICO DE TENSÃO EM FUNÇÃO DE $(\alpha - \alpha^{-2})$ DAS MEMBRANAS DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM ADIÇÃO 20% DE SULFATO DE CONDRITINA.	76
FIGURA 5.6. GRÁFICO DO MÓDULO DE ELASTICIDADE E EM FUNÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO NPMINAL PARA AS MEMBRANAS DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA E PVA-MA/SC, REFERENTES AOS DADOS DA TABELA 5.5.....	77
FIGURA 5.7. GRÁFICO DA DENSIDADE DE RETICULAÇÃO, ν_e , EM FUNÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO D PVA-MA PARA MEMBRANAS DOS HIDROGÉIS SEM ADIÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA.....	80
FIGURA 5.8 GRÁFICO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO TEMPO EM HORAS PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM GRAU DE SUBSTITUIÇÃO DE 2,5% COM 0, 10 E 20% DE SULFATO DE CONDRITINA, EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO GÁSTRICA.....	81
FIGURA 5.9 GRÁFICO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO TEMPO EM HORAS PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM GRAU DE SUBSTITUIÇÃO NOMINAL DE 3,5% COM 0, 10 E 20% DE SULFATO DE CONDRITINA, EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO GÁSTRICA.	81
FIGURA 5.10 GRÁFICO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO TEMPO EM HORAS PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM GRAU DE SUBSTITUIÇÃO DE 5,0% COM 0, 10 E 20% DE SULFATO DE CONDRITINA, EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO GÁSTRICA.	82
FIGURA 5.11 GRÁFICO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO TEMPO EM HORAS PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM GRAU DE SUBSTITUIÇÃO DE 2,5% COM 0, 10 E 20% DE SULFATO DE CONDRITINA, EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO INTESTINAL.	83
FIGURA 5.12 GRÁFICO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO TEMPO EM HORAS PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM GRAU DE SUBSTITUIÇÃO DE 3,5% COM 0, 10 E 20% DE SULFATO DE CONDRITINA, EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO INTESTINAL.	84
FIGURA 5.13 GRÁFICO DO GRAU DE INTUMESCIMENTO Q EM FUNÇÃO DO TEMPO EM HORAS PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA/SC COM GRAU DE SUBSTITUIÇÃO DE 5,0% COM 0, 10 E 20% DE SULFATO DE CONDRITINA, EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO INTESTINAL.	84
FIGURA 5.14. MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA COM GS 2,5% COM 0, 10 E 20% DE SC, AUMENTO DE 10.000X.....	88
FIGURA 5.15.MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA COM GS 3,5% COM 0, 10 E 20% DE SC, AUMENTO DE 10.000X.....	88
FIGURA 5.16.MICROSCOPIAS ELETRÔNICAS DE VARREDURA DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA COM GS 5,5% COM 0, 10 E 20% DE SC, AUMENTO DE 10.000X.....	88
FIGURA 5.17.GRÁFICO DE PERCENTUAL DE INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO CELULAR, AVALIADO POR CONTAGEM DE CÉLULAS NÃO VIÁVEIS NO SOBRENADANTE DO MEIO DE CULTURA DE CÉLULAS TIPO VERO.	90

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 3.1. RAZÕES MOLARES [-OH(PVA)/GMA] USADAS NAS REAÇÕES E GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO (GS) CORRESPONDENTES, CALCULADOS DOS ESPECTROS DE RMN ¹ H DA FIGURA 3.11, CONFORME EQUAÇÃO 3.1.	22
TABELA 4.1. REPRESENTAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³	25
TABELA 4.2. REPRESENTAÇÃO DE UM PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ , COM PONTO CENTRAL.	26
TABELA 4.3. FATORES E NÍVEIS DOS FATORES UTILIZADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2 ³ COMPLETO PARA A MODIFICAÇÃO DO PVA COM GMA NA RAZÃO [MOLAR -OH(PVA)/GMA] IGUAL A (1/0,05).....	31
TABELA 4.4. PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³ , EM DUPLICATA, COM PONTO CENTRAL.	32
TABELA 4.5. PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL, SEM DUPLICATAS DOS EXPERIMENTOS 21, 22, 23 E 24..	33
TABELA 4.6. GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO OBTIDOS NOS EXPERIMENTOS DO PLANEJAMENTO FATORIAL COMPLETO 2 ³	34
TABELA 4.7. TABELA DE RESULTADOS ANOVA PARA O FATORIAL 2 ³	35
TABELA 4.8. VALORES DOS EFEITOS PRINCIPAIS E DE INTERAÇÃO PARA O FATORIAL COMPLETO 2 ³ APRESENTADOS NA TABELA 4.7.....	36
TABELA 4.9. GRAU DE SUBSTITUIÇÃO OBTIDO NOS EXPERIMENTOS RELATIVOS AO PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL PARA OBTENÇÃO DA SUPERFÍCIE DE RESPOSTA, NAS CONDIÇÕES DESCRITAS NA TABELA 4.5.	39
TABELA 4.10. ANOVA OBTIDA PARA O PLANEJAMENTO COMPOSTO CENTRAL DA TABELA 4.9 COM UM AJUSTE PARA O MODELO QUADRÁTICO.	40
TABELA 4.11. GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO DO PVA OBTIDOS NAS CONDIÇÕES OTIMIZADAS, 62°C E 6H, EM DIFERENTES RAZÕES MOLARES [-OH(PVA)/GMA].	44
TABELA 5.1. CLASSIFICAÇÃO DO MÓDULO DE ACORDO COM TIPO DE FORÇA APLICADA.	48
TABELA 5.2 MÓDULOS DE ELASTICIDADE PARA DIFERENTES MATERIAIS A TEMPERATURA AMBIENTE.	50
TABELA 5.3. DEPENDÊNCIA DO EXPOENTE DIFUSIONAL N E DO MECANISMO DIFUSIONAL COM A GEOMETRIA. .	59
TABELA 5.4. VALORES DE GRAUS DE INTUMESCIMENTO, Q NO EQUILÍBRIO (48H), PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA COM GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO NOMINAL DE 2,5% , 3,5% E 5,0% COM 0, 10, 20 E 33% DE SULFATO DE CONDROITINA (SC), MEDIDOS EM ÁGUA DEIONIZADA A 25°C.	72
TABELA 5.5. VALORES DOS MÓDULOS DE ELASTICIDADE DAS MEMBRANAS DOS HIDROGÉIS DE PVA-MA COM GRAUS DE SUBSTITUIÇÃO NOMINAL DE 2,5, 3,5 E 5,0% E PVA-MA/SC COM ADIÇÃO DE 10 E 20% DE SULFATO DE CONDROITINA.	77

TABELA 5.6. VALORES DE DENSIDADE DE RETICULAÇÃO, ν_e , MASSA MOLAR ENTRE RETÍCULOS, M_c , MÓDULO G E FRAÇÕES VOLUMÉTRICAS, $\phi_{2,r}$ E $\phi_{2,s}$, EM FUNÇÃO DO GRAU DE SUBSTITUIÇÃO NOMINAL DO PVA-MA PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA SEM ADIÇÃO DE SULFATO DE CONDRITINA.	79
TABELA 5.7. VALORES DE K E N DAS MEDIDAS DE CINÉTICA DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA E PVA-MA/SC, OBTIDOS EM FLUÍDO DE SIMULAÇÃO GÁSTRICA.	85
TABELA 5.8. VALORES DE K E N DAS MEDIDAS DE CINÉTICA DE INTUMESCIMENTO PARA OS HIDROGÉIS DE PVA-MA E PVA-MA/SC, OBTIDOS EM FLUIDO DE SIMULAÇÃO INTESTINAL.	86
TABELA 5.9. CONTAGEM DE CÉLULAS NÃO VIÁVEIS NOS EXPERIMENTO DE CITOTOXICIDADE POR CONTATO DIRETO DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS TIPO VERO.	89

RESUMO

Poli(álcool vinílico), PVA, foi modificado pela adição de grupos metacrilóila, utilizando metacrilato de glicidila (GMA) em diferentes razões molares de $[-OH(PVA)/GMA]$ em DMSO como solvente e TEMED como catalisador. Os PVA-Mas obtidos foram caracterizados por FTIR e RMN (1H e ^{13}C). Foi verificado que a reação ocorre por transesterificação. Para cada PVA-Ma, o grau de substituição, GS, foi determinado a partir dos respectivos espectros de 1H RMN. Por meio de planejamento fatorial 2^3 , fixando-se a razão molar $[-OH(PVA)/GMA]$ em 1/0,05, foram avaliadas as influências dos fatores Tempo (t, em horas), Temperatura (T, em °C) e Atmosfera (com N_2 e sem N_2) no rendimento da reação. Foi verificado que o fator Atmosfera não influencia significativamente no rendimento da reação. As condições de reação foram otimizadas por meio de planejamento fatorial composto central. Foi obtido um modelo quadrático que descreve satisfatoriamente a dependência de GS com o tempo de reação e com a temperatura. Nas condições otimizadas, 6 h e 62 °C, obteve-se, experimentalmente, valor para GS igual a 4,63 % enquanto que o valor previsto pelo modelo é 4,85 %. Nessas condições, GS varia linearmente com a razão molar $[-OH(PVA)/GMA]$ até 1/0,25. De soluções aquosas a 10 % de PVA-Ma com GS 2,5, 3,5 e 5,0 % foram obtidos hidrogéis de PVA-Ma e de PVA-Ma com 10, 20 e 33 % (em massa) da glicosaminoglicana sulfato de condroitina (SC). As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram caracterizadas por medidas de tensão versus deformação das quais foram calculados os módulos de elasticidade. Ainda, foram medidos os graus de intumescimento em água e investigada a cinética de intumescimento em fluídos de simulação gástrica e intestinal, pH 1,2 e 7,5, respectivamente. A citotoxicidade dos hidrogéis foi

investigada por meio de crescimento de células tipo VERO. Os hidrogéis apresentaram boas propriedades mecânicas, com exceção dos hidrogéis contendo 33 % de SC (em massa). Os valores de módulo de elasticidade situam-se entre 63 e 126 kPa, são diretamente proporcionais aos valores de GS do PVA-Mas precursores e diminuem com o conteúdo de SC. Foi verificado que os hidrogéis apresentam mecanismo de instumescimento anômalo, com contribuições da difusão do solvente e do relaxamento das cadeias poliméricas. São resistentes à degradação em pH estomacal (1,2) e intestinal (7,5). Os hidrogéis apresentaram boa citocompatibilidade. Os padrões utilizados nos testes citotóxicológicos foram fragmentos de placas de polietileno e filmes de silicone, controles negativo e positivo, respectivamente. Os hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC desenvolvidos nesta tese apresentam potencial para serem aplicados na área farmacêutica como carreador para liberação modificada de fármacos.

ABSTRACT

Poly(vinyl alcohol), PVA, was modified by insertion of methacryloil groups using glycidyl methacrylate (GMA), at different molar $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$ ratio. The modified polymers, PVA-Mas, were characterized through FTIR and NMR (^1H and ^{13}C). In the studied conditions, the reaction occurs by transesterification pathway. From the respective ^1H NMR spectrum the degree of substitution, DS, for each PVA-Ma was determined. The effect of temperature, reaction time and atmosphere (air or N_2 bubbling) inputs on the reaction DS were evaluated through a factorial design as the ratio $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$ was kept in 1/0.05. The atmosphere input does not affect the DS. The reaction conditions were optimized using a central composite factorial design. The quadratic model satisfactorily describes the dependence of DS to the reaction time and temperature. Using the optimized conditions, 62 °C and 6 h, the DS achieved is 4.63 % while the expected would be 4.85 %. In these optimized conditions, DS changes linearly to the ratio $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$ up to 1/0.25. Using 10 % conc. aqueous solution, hydrogels from PVA-Ma with GS 2.5, 3.5 and 5.0 % and from these same PVA-Mas but containing 10, 20 and 33 % (in mass) of chondroitin sulfate (SC) were obtained. The elastic modulus, E , of these hydrogels were evaluated by analysis of stress strain curves. Swelling degrees of PVA-Ma and PVA-Ma/SC in distilled water and in gastrointestinal fluids (FSG and FSI) were performed as well. The cytotoxicity of hydrogels was evaluated through VERO cell growth. The hydrogels presented good mechanical properties except the hydrogels from PVA-Ma/SC with 33 % of SC. The values of E fall in the range of 63 to 126 kPa and are proportional to the DS of precursor PVA-Ma. The hydrogels presented anomalous mechanism of water uptake, so the swelling process of these hy-

drogels is governed by Fickian diffusion and also by the polymer chain relaxation. The PVA-Ma and PVA-Ma/SC hydrogels are resistant to the stomach (pH 1.2) and intestinal one (pH 7.5). Compared to the used negative (polyethylene) and positive (silicon) controls, the cytotoxicity of hydrogels is enhanced by the presence of SC. Hydrogels of PVA-Ma and PVA-Mas/SC developed in this thesis presented potential as a drug carrier to be used in the pharmaceutical field.

1 RELEVÂNCIA DO TEMA ESTUDADO

O aumento dos custos e complicações envolvidos na comercialização de novos fármacos e o concomitante reconhecimento das vantagens terapêuticas de liberação controlada de fármacos têm proporcionado maior atenção no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada ou prolongada.¹ Há várias razões para a atratividade desses sistemas. Para muitas doenças, é conhecido um número significativo de compostos terapeuticamente efetivos. Porém, como fármacos, a eficiência desses compostos está frequentemente limitada por efeitos colaterais ou à necessidade de administração em uma posologia adequada.

As metas no planejamento de sistemas de entrega controlada ou prolongada são reduzir a frequência de administração ou aumentar a eficiência do fármaco por meio da entrega no local de ação, reduzindo a dose requerida ou possibilitando uma liberação uniforme no local de ação.¹

Pelo motivo de apresentarem grande conteúdo de água e assemelha-rem-se à textura dos tecidos naturais, os hidrogéis apresentam, em muitos casos, biocompatibilidade, tendo um grande potencial para aplicações biomédicas, como em sistemas de liberação prolongada ou controlada de fármacos, lentes de contato, biosenso-

res, cateteres e na engenharia de tecidos para reparo e regeneração de tecidos e órgãos.²⁻⁴

Hidrogéis podem ser obtidos por reticulação física ou química, ou por entrelaçamento das cadeias de polímeros hidrofílicos naturais ou sintéticos. Como exemplos de polímeros naturais têm-se galactomanana, dextrana, alginato, pectina e sulfato de condroitina. Entre os sintéticos utilizados neste tipo de aplicação estão o PVA, HEMA, PEO e PNIPAm.^{5,6}

A combinação de polímeros sintéticos e/ou naturais, por meio de redes interpenetradas (IPN) ou redes semi-interpenetradas (semi-IPN) pode melhorar as propriedades físicas e de biocompatibilidade dos hidrogéis obtidos⁷ ou dar a eles propriedades específicas, como responder a variações de pH e/ou temperatura.

O poli(álcool vinílico), PVA, é um polímero hidrofílico sintético usado desde o início da década de 1930 em uma gama de aplicações industriais, comerciais, médicas e alimentícias,⁸ incluindo vernizes, fios cirúrgicos, materiais em contato com alimentos, cosméticos,^{9,10} e na indústria farmacêutica como agente de revestimento de fármacos.¹¹

O PVA pode ser usado para uso como agente de revestimento para produtos farmacêuticos e suplementos dietéticos. A segurança do uso via oral do PVA está baseada na sua toxicidade oral aguda muito baixa, com DL₅₀ na ordem de 15 - 20 g/kg de massa corpo-

ral, por ser muito pouco absorvido no trato gastrintestinal e não se acumular no corpo quando administrado oralmente. O PVA não é mutagênico nem clastrogênico e quando administrado oralmente por noventa dias em duas gerações de ratos machos e fêmeas, não apresentou efeitos adversos observáveis até 5000 mg/kg de massa corporal/dia.¹¹

PVA pode ser reticulado quimicamente com vários tipos de agentes de reticulação. Como regra, compostos multi-funcionais que são capazes de reagir com o grupo hidroxila do PVA podem ser usados para obter redes tridimensionais de PVA.¹² Por exemplo, PVA pode ser quimicamente reticulado com glutaraldeído usando HCl como catalisador.¹³ Limitações existem com respeito à uniformidade da reticulação, e a toxidez do glutaraldeído.

O PVA também pode ser fisicamente reticulado por meio de ciclos repetidos de congelamento/descongelamento do PVA em solução aquosa, formando regiões cristalinas que atuam como retículos.^{14,15} A vantagem da reticulação física é a ausência da adição de compostos que poderiam comprometer a biocompatibilidade. Porém, de uma perspectiva mecânica e térmica, os hidrogéis assim obtidos não são tão resistentes e estáveis como os obtidos por reticulação química. Em adição, géis físicos não podem ser reticulados *in situ*.

A modificação de polímeros hidrofílicos, sintéticos ou naturais, com a adição de grupos contendo insaturações tem sido uma estratégia de obtenção de hidrogéis estudada por diferentes pesquisadores.^{12,16-20} A presença de insaturações em polímeros permite reticulação por meio de metodologia adequada, podendo a reação ser conduzida via radicalar pela adição de um iniciador ou por uso de luz UV.

PVA e diversos polissacarídeos têm sido modificados com acrilatos ou metacrilatos,^{13,21} por diferentes meios. Neste sentido, tem sido estudados hidrogéis de polissacarídeos como inulina,^{22,23} galactomanana, dextrana²⁴ e o glicosaminoglicano sulfato de condroitina²⁵. Devido ao fato desses polissacarídeos serem degradados por enzimas liberadas por bactérias presentes na região do colo, esses hidrogéis têm potencial para uso de liberação de fármacos nessa região. Porém, a modificação química do polissacarídeo pode reduzir sua degradação enzimática.^{25,26}

O sulfato de condroitina é um glicosaminoglicano composto de unidades repetitivas de dissacarídeos geralmente composto estruturalmente de ácido D-glicopiranosilurônico ligado por uma ligação glicosídica a um resíduo de 2-acetamino-2-desoxy-D-galactopiranosose, sulfatado na posição 4 ou 6,^{26,27} como mostrado na Figura 1.1.

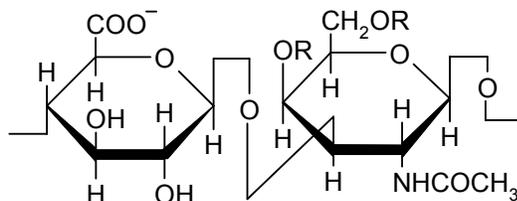


Figura 1.1. Unidade dissacarídica repetitiva do sulfato de condroitina, R = SO₃⁻ na posição 4 ou 6.

O sulfato de condroitina é um dos principais constituintes das proteoglicanas. Proteoglicanas são complexos protéicos de proteínas ligadas covalentemente a cadeias de glicosaminoglicanos, unidas não covalentemente por uma pequena proteína de ligação a uma cadeia de hialuronato, estando presentes principalmente na matriz extracelular dos tecidos conjuntivos animais. O complexo inteiro tem uma massa molecular de aproximadamente 10⁶ Da. Uma de suas principais características é a grande capacidade de hidratação, devido à presença dos glicosaminoglicanos.^{27, 28} Na figura é apresentada a micrografia eletrônica de uma proteoglicana de cartilagem.

Por ser um composto de origem biológica, o sulfato de condroitina tem grande potencial em aplicações biológicas, sendo empregado como fármaco para tratamento de artroses, pó exemplo na forma do fármaco Condrofléx® da Rodiac, em pesquisas para tratamento de doença de inflamação crônica da bexiga²⁹ e obtenção de hidrogéis para liberação controlada de proteína,³⁰ de fármacos²⁵ e para curativo de ferimentos.³¹

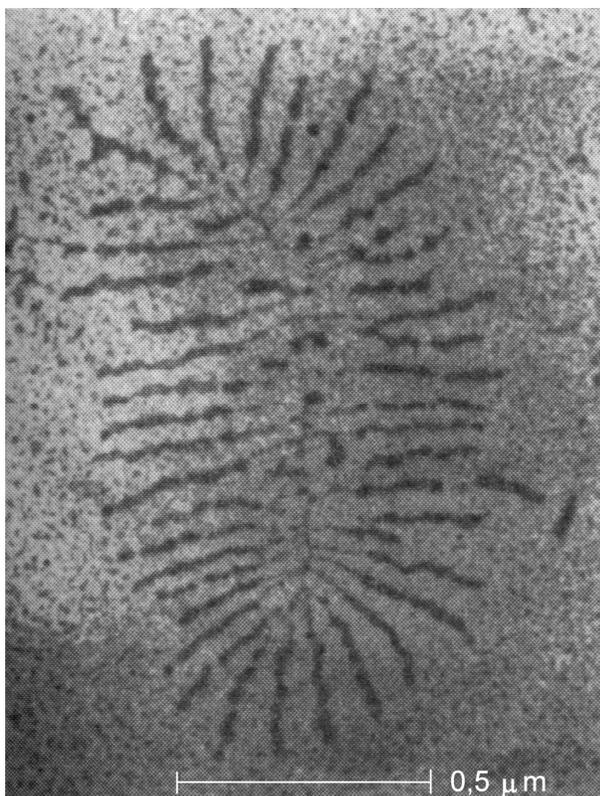


Figura 1.2. Micrografia eletrônica de uma proteoglicana de cartilagem. Reproduzido de Stryer L.²⁷

2 OBJETIVOS

Os objetivos desse trabalho são:

- i) obter e caracterizar o poli(álcool vinílico) (PVA) modificado pela adição de grupos metacrilato, pela reação com metacrilato de glicidila (GMA);
- ii) otimizar as condições da reação por análise fatorial e metodologia de superfície de resposta, RSM;
- iii) obter e caracterizar hidrogéis de poli(álcool vinílico) modificado (PVA-Ma) e de PVA-Ma associado ao sulfato de condroitina (SC) por redes semi-interpenetradas (semi-IPN), para possível aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos.

3 MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)

3.1 INTRODUÇÃO

A modificação química de polímeros é de grande interesse científico e comercial. A modificação química de polímeros, particularmente nos casos em que o monômero não existe ou a polimerização é difícil ou não ocorre totalmente, é uma estratégia bastante usada para se obter polímeros com propriedades específicas para determinadas aplicações.³²

Um exemplo clássico da modificação química de polímeros é a obtenção comercial do poli(álcool vinílico) (PVA) pela hidrólise dos grupos acetato do poli(acetato de vinila) (PVAc), Figura 3.1. O monômero álcool vinílico é a forma tautomérica do acetaldeído e ocorre em pequenas quantidades no equilíbrio tautomérico, como visto na Figura 3.2.

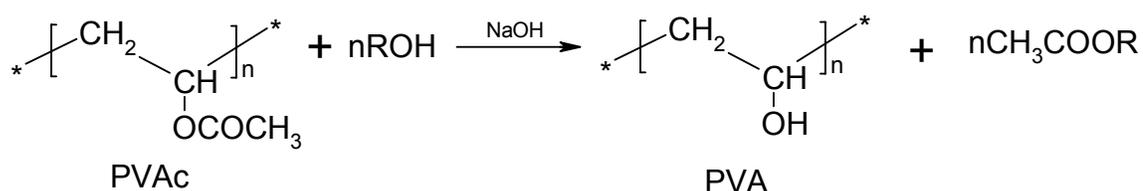


Figura 3.1. Reação de hidrólise do PVAc em meio alcoólico/alcalino (alcoólise).

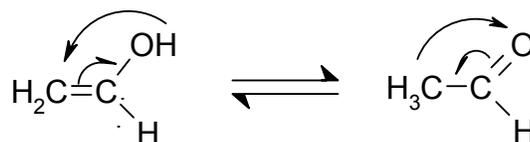


Figura 3.2. Tautomeria entre o álcool vinílico e acetaldeído.

Outros processos industrialmente importantes se relacionam à conversão de compostos macromoleculares relativamente baratos em novos materiais comercialmente mais interessantes como, por exemplo, a modificação da celulose em acetato de celulose e nitrato de celulose.

A manufatura de PVA modificado se dá basicamente por duas formas: por hidrólise de copolímeros constituídos de acetato de vinila e de outros monômeros ou por reação secundária dos grupos hidroxila do PVA.

As duas principais reações secundárias do PVA são a eterificação e a esterificação. Muitos compostos têm sido utilizados para a modificação do PVA sendo um dos mais importantes na eterificação os grupos formados de óxidos de alquilenos, como pode ser visto na Figura 3.3.

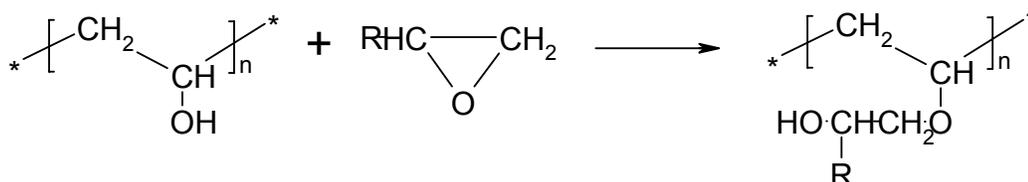


Figura 3.3. Reação de eterificação do PVA com óxidos de alquilenos.

São relatados na literatura diversos compostos orgânicos ou inorgânicos para a reação de esterificação do poli(álcool vinílico). Martens, P. e Anseth, K. S. modificaram poli(álcool vinílico) em meio aquoso com excesso de acrilato de glicidila, em

pH 1,5. Sugeriram que a reação ocorre por abertura do anel epóxico, conforme Figura 3.4.

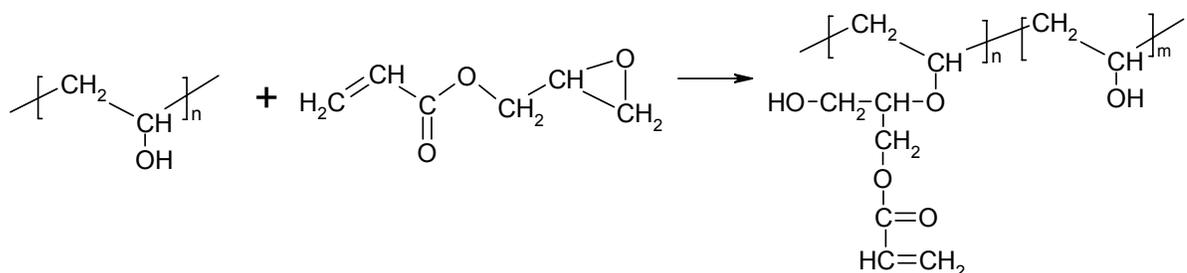


Figura 3.4. Reação do PVA com acrilato de glicidila em meio aquoso, segundo Martens, P. e Anseth, K. S.

Van Dijk-Wolthuis e colaboradores estudaram a modificação de dextrana com GMA em DMSO, usando 4-dimetilaminopiridina, DMAP, como catalisador. Sugeriram que a adição do GMA ocorreria por abertura do anel epóxico. No entanto, em estudo posterior, os mesmos autores demonstraram que a adição do grupo metacrilato ocorre por transesterificação e não pela abertura do anel epóxico, pois encontraram presença de glicidol entre os produtos da reação. Assim, postularam que a transesterificação seria favorecida por ser o glicidol um bom grupo abandonador.

Findlay P. H. e Sherrington, D. C. estudaram a reação de GMA com 2-[[2(dimetil-amino)etil]metilamino]etanol (DAEMAE) e verificaram que a reação ocorre também por transesterificação com o grupo hidroxila do DAEMAE, sem o uso de catalisador específico. Sugeriram que a reação era catalisada pelo próprio DAEMAE através de interações intramoleculares.³³

Ferreira L. e colaboradores obtiveram sacarose esterificada com GMA em DMSO e catalisada por DMAP, como descrito anteriormente por van Dijk-Wolthuis e colaboradores para a modificação de dextrana.¹⁹ Assim, postularam que a reação da sacarose, nessas condições, também ocorre por transesterificação.

Li, Q. e colaboradores observaram que três principais etapas constituem a reação de sulfato de condroitina com metacrilato de glicidila em meio aquoso heterogêneo, partindo de pH tamponado em 7,4: inicialmente ocorre a transesterificação reversível do sulfato de condroitina, que mostrou ser dependente do pH, sendo favorecida por meio básico; posteriormente ocorre a hidrólise do grupamento metacrilato, produzindo ácido metacrílico, com a concomitante redução do pH; e por fim ocorre a reação irreversível do metacrilato de glicidila com o sulfato de condroitina por abertura do anel epóxido, favorecida em pH ácido.³⁴

Nesta etapa de nosso trabalho foi estudada a reação do poli(álcool vinílico) com metacrilato de glicidila (GMA) em dimetilsulóxido e N,N,N',N',tetrametiletlenodiamina (TEMED) foi usado como catalisador da reação. Foram utilizadas diversas razões de PVA/GMA. Os materiais de partida e os produtos da reação foram caracterizados por FTIR, RMN ¹H e RMN ¹³C.

3.2 EXPERIMENTAL

3.2.1 Materiais e Equipamentos

Poli(álcool vinílico), PVA, M_w nominal 13-23 kg Mol⁻¹, Aldrich: 34840-6; metacrilato de glicidila, GMA, Acros: 16589; N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, TEMED, Aldrich: 2,250-0; álcool etílico PA, Synth; acetona PA, Synth; dimetilsulfóxido PA, DMSO, Synth; dimetilsulfóxido deuterado, DMSO-D₆, 99,96 atom %, Acros: 16902;

Bomba de alto vácuo Edwards RV5; banho termostatzado Julabo VL4; Estufa a vácuo Fanem modelo 099EV; espectrômetro RMN Varian, mod. Mercury plus BB, 300 MHz; espectrofotômetro FTIR Bomem, mod. MB-100.

3.2.2 Procedimentos Experimentais

3.2.2.1 Reação de Modificação do PVA

Inicialmente, foram realizadas reações de modificação do PVA em soluções a 10% (m/v) em DMSO com percentagens molares (2,5, 5,0, 7,0, 10,0 e 30,0 %), de GMA em relação aos grupos hidroxilas do PVA. Estas reações foram realizadas a 30°C, sob atmosfera de N₂ e agitando por 24 horas. TEMED foi usado como catalisador, a 1 mol% em relação ao teor de hidroxila (-OH) do PVA. Após as 24 horas, os PVAs modificados, PVA-Mas, foram precipitados em álcool ou água destilada, dependendo da solubilidade.

Os PVA-Mas modificados usando as razões $[-OH(PVA)/GMA]$ (1/0,025), (1/0,05), (1/0,07), (1/0,1) foram precipitados em álcool etílico; quando a razão foi (1/0,30), o PVA-Ma foi precipitado em água. Os PVA-Mas modificados nas razões (1/0,025), (1/0,05), (1/0,07) e (1/0,10) foram então re-dissolvidos em água e precipitados novamente em álcool. O PVA-Ma modificado na razão (1/0,30) foi re-dissolvido em uma mistura álcool/acetona 1:1 e novamente precipitado em água. Todos PVA-Mas foram secos inicialmente em estufa a 40°C e pressão reduzida por bomba de alto vácuo por 48 horas e mantidos em dessecador sob vácuo por uma semana. Após secos, os materiais modificados foram caracterizados usando espectroscopias infravermelha (FTIR) e de RMN (1H , ^{13}C , DEPT e HETCOR). A partir dos espectros de RMN 1H foi calculado o grau de substituição (GS) de cada PVA-Ma pela razão da média aritmética das áreas dos hidrogênios vinílicos, do grupamentos metacrilóila, pela área total, dada pela soma da média das áreas dos hidrogênios vinílicos e da área dos hidrogênios hidroxílicos, multiplicando o resultado por 100, como mostrado na Equação 3.1

$$\text{Equação 3.1} \quad GS = \left[\frac{\left(\frac{A(H') + A(H'')}{2} \right)}{\left(\frac{A(H') + A(H'')}{2} \right) + A(OH)} \times 100 \right]$$

onde $A(H')$ e $A(H'')$ são as áreas dos hidrogênios vinílicos dos grupamentos metacrilóila e $A(OH)$ é a área dos hidrogênios hidroxílicos do PVA no espectro de RMN 1H .

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 3.5 são apresentados os espectros de FTIR de filme de PVA não modificado (obtidos por evaporação de solvente) e do GMA (obtido em cela líquida de KBr).

Na análise dos espectros de FTIR na região de 600 a 2000 cm^{-1} de filmes de poli(álcool vinílico) modificados, apresentados na Figura 3.6, verifica-se o aparecimento de algumas bandas características das unidades metacrilóila do metacrilato de glicidila.

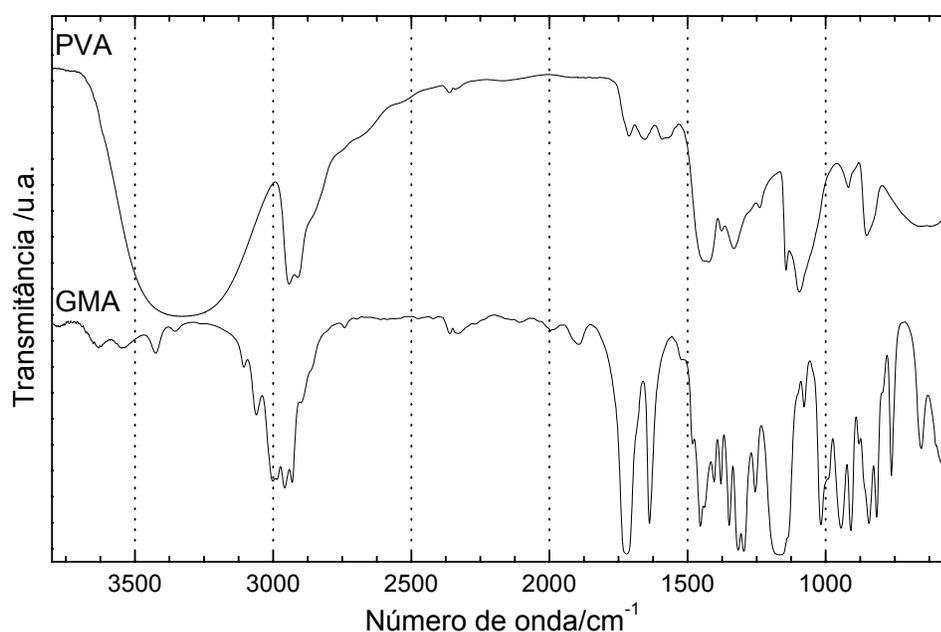


Figura 3.5. Espectros de FTIR de filme de PVA e de GMA obtido em cela líquida.

No espectro do metacrilato de glicidila podem ser assinaladas as bandas: estiramento da carbonila C=O (1719 cm^{-1}), estiramento C=C (1637 cm^{-1}), respiração do anel epóxido (1255 cm^{-1}), deformação assimétrica do anel epóxido (908 cm^{-1}), deformação simétrica do anel epóxido (845 cm^{-1}),³⁵ deformação fora do plano $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ (946 cm^{-1}) e estiramento C-O de éster (1170 cm^{-1}).³⁶ No espectro do PVA pode-se assinalar a banda característica de estiramento C-O de álcool em (1093 cm^{-1}).

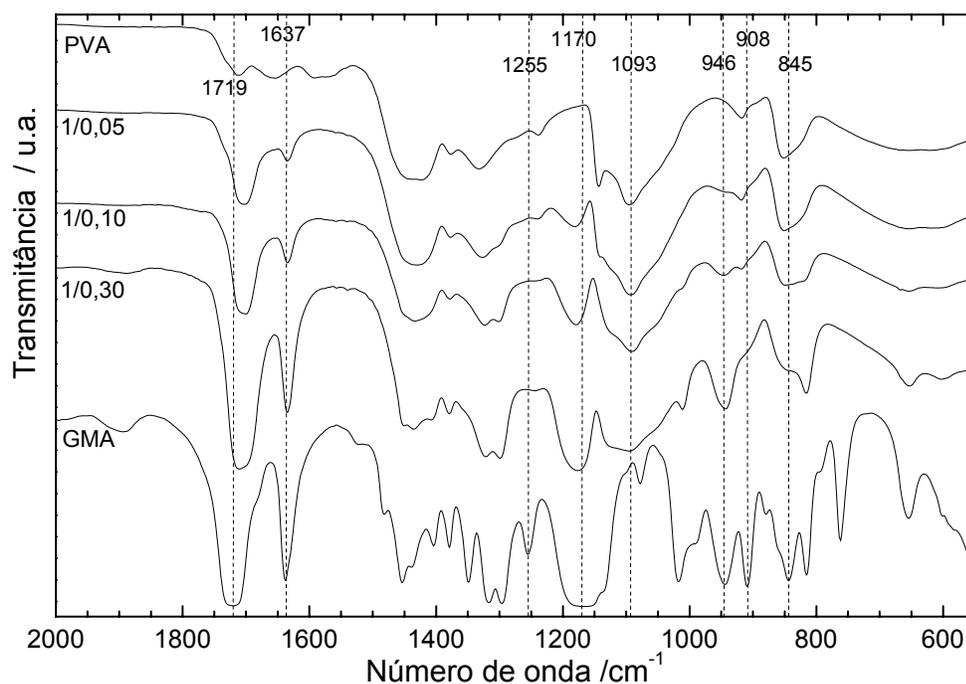


Figura 3.6. Espectros de FTIR de filmes de PVA de partida, e PVA-Ma modificados com razões molares (1/0,05), (1/0,10) e (1/0,30) de [-OH(PVA)/GMA].

Nos espectros FTIR dos filmes de PVA-Ma há a presença das bandas: estiramento da carbonila C=O (1705 cm^{-1}), estiramento C=C (1637 cm^{-1}) deformação fora do plano $\text{R}_2\text{C}=\text{CH}_2$ (946 cm^{-1}) e estiramento C-O de éster (1180 cm^{-1}) que aumentam de intensidade com

o aumento da quantidade de GMA adicionado na solução para a reação de modificação, confirmando a modificação do PVA com a introdução de grupamentos metacrililo às hidroxilas do PVA. Em contrapartida, não são observadas nos espectros de FTIR dos PVA-Mas as bandas características do anel epóxido: respiração do anel epóxido (1255 cm^{-1}), deformação assimétrica do anel epóxido (908 cm^{-1}), deformação simétrica do anel epóxido (845 cm^{-1}). Isto sugere que ocorreu a modificação. No entanto, devido a sensibilidade da técnica, os dados de FTIR dos PVA-Mas não confirmam a possibilidade da reação ocorrer somente por transesterificação ou seja, ainda permanece a possibilidade de que a reação possa também ocorrer, nestas condições, por abertura do anel epóxido, conforme esquemas apresentados na Figura 3.7.

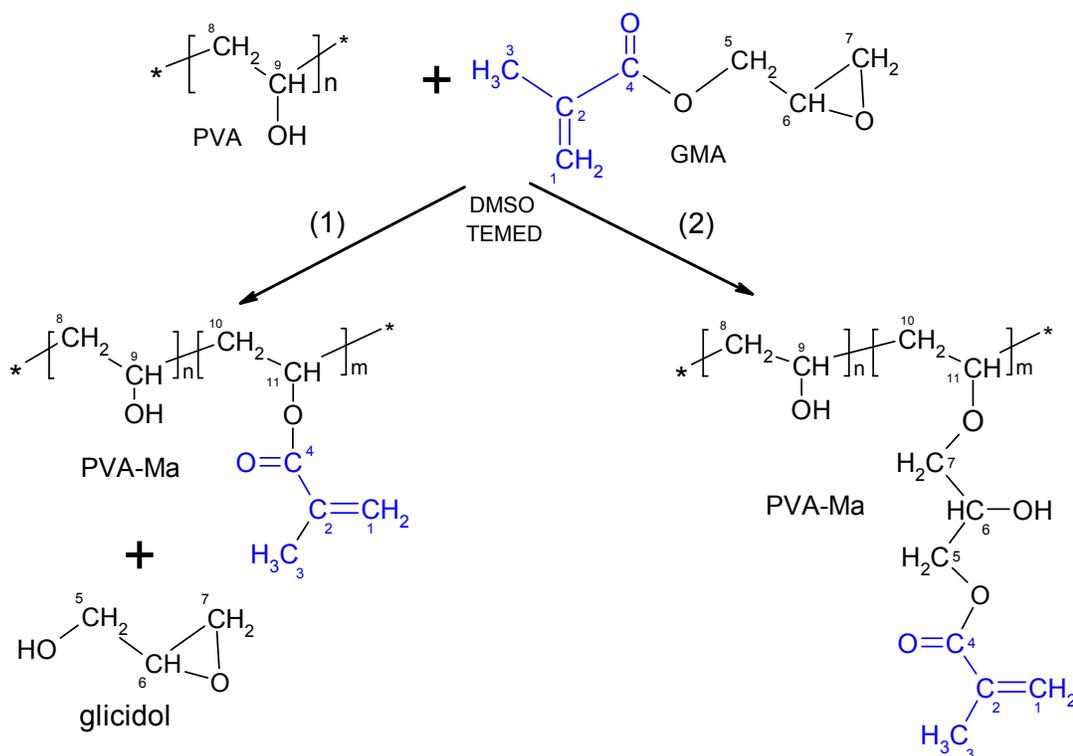


Figura 3.7. Prováveis reações do PVA com GMA: (1) por transesterificação; (2) por abertura do anel epóxido.

Neste contexto, técnicas de RMN são mais adequadas para caracterizar as modificações estruturais do PVA feitas nesta tese, tornando possível identificar, com mais detalhes, quais grupos foram efetivamente adicionados à cadeia principal do PVA.

Na Figura 3.8 são apresentados os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C do metacrilato de glicidila. As atribuições dos deslocamentos químicos foram feitas com auxílio do espectro HETCOR apresentado na Figura 3.9.

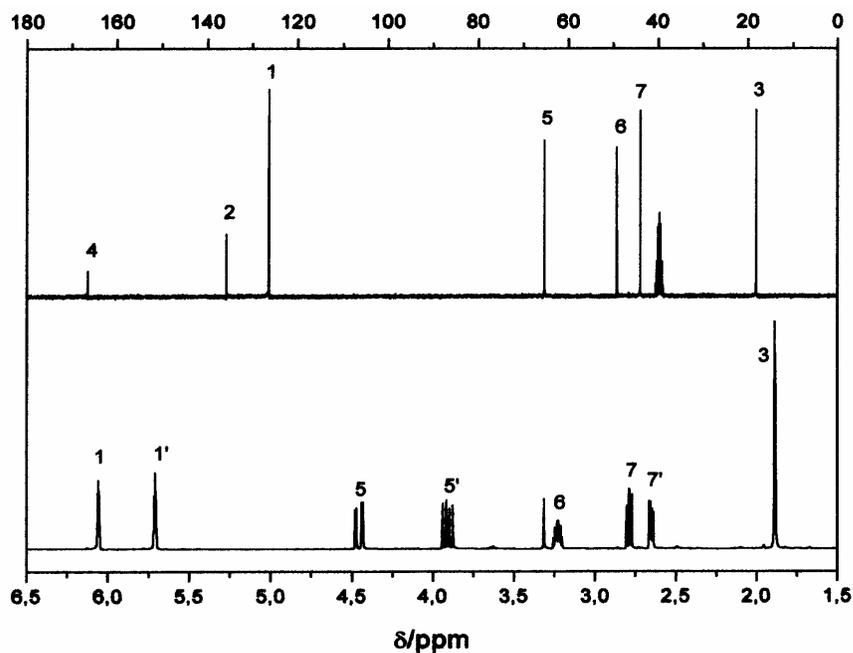


Figura 3.8. Espectros de RMN ^{13}C , ^1H do GMA em DMSO-D₆.

Os espectros de RMN ^{13}C do PVA-Ma, Figura 3.10, apresentaram sinais característicos do grupamento metacrilato do metacrilato de glicidila, referentes aos carbonos 1, 2, 3 e 4, como assinalados na Figura 3.7.

Nesses espectros também são observados o surgimento de sinais em $\delta 42,6\text{ppm}$ e $\delta 70,1\text{ppm}$ referentes aos carbonos metilênicos e metínicos, respectivamente, como pode ser observado no espectro DEPT apresentado na Figura 3.11. Isso sugere que a reação de modificação do PVA ocorre por transesterificação conforme reação (1) da Figura 3.7.

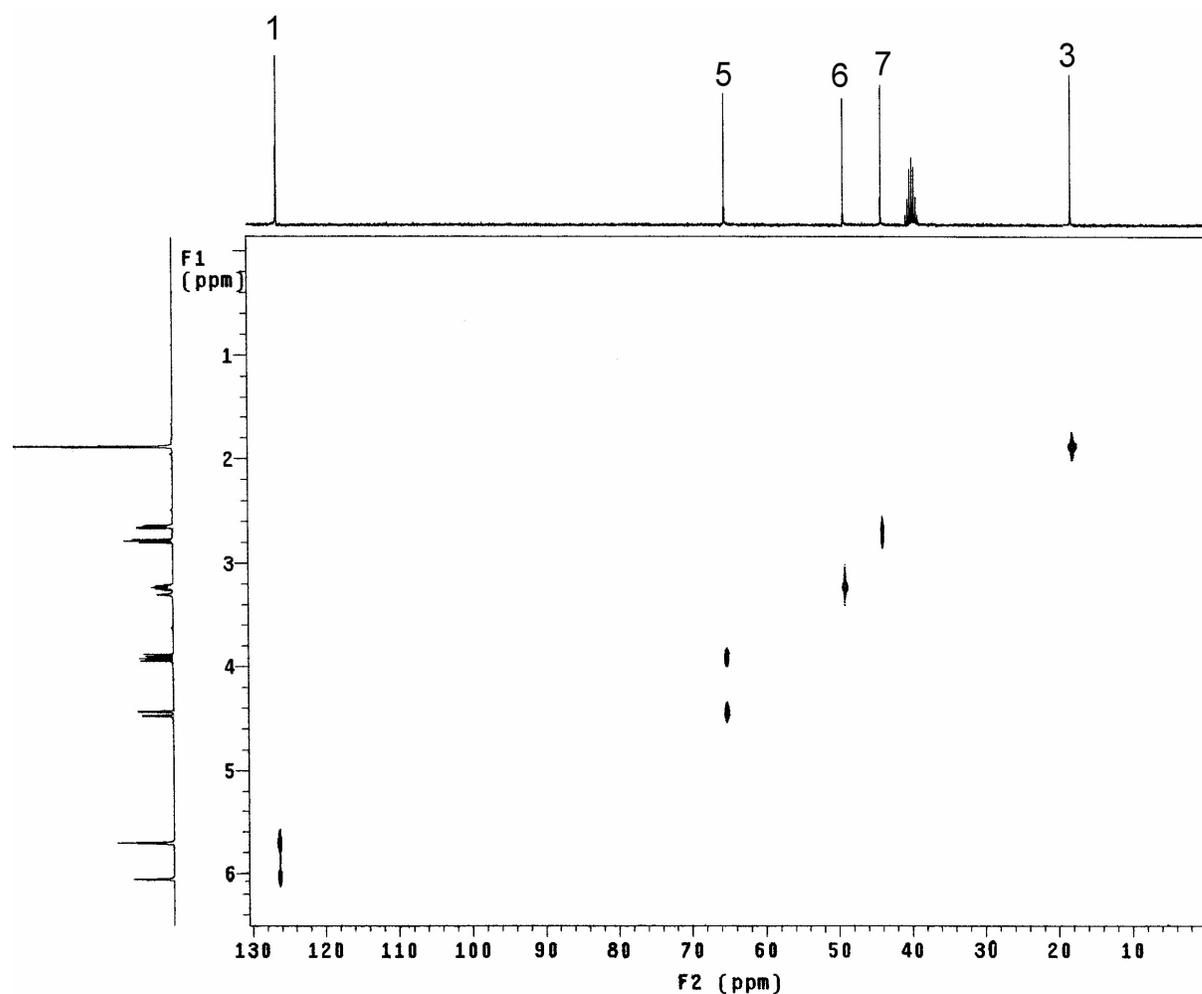


Figura 3.9. Espectro HETCOR do GMA em DMSO-D₆.

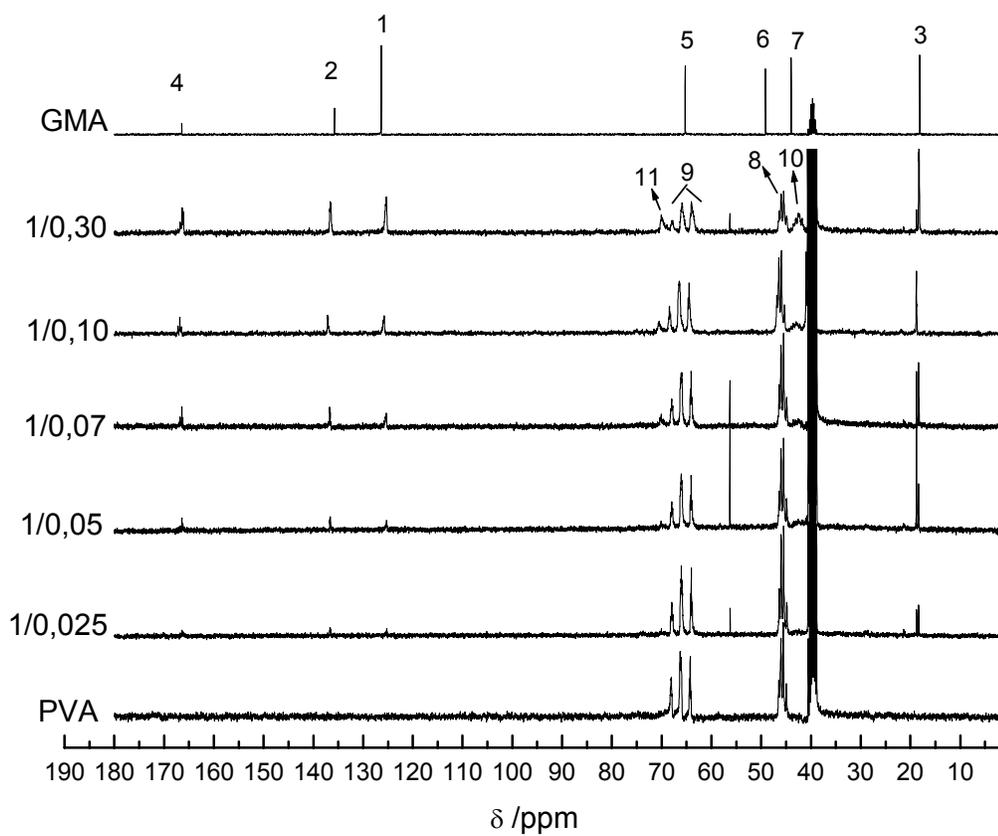


Figura 3.10. Espectros de RMN ^{13}C do PVA não modificado, do GMA e dos PVA-Mas obtidos em diferentes razões molares $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$, em DMSO-D_6 .

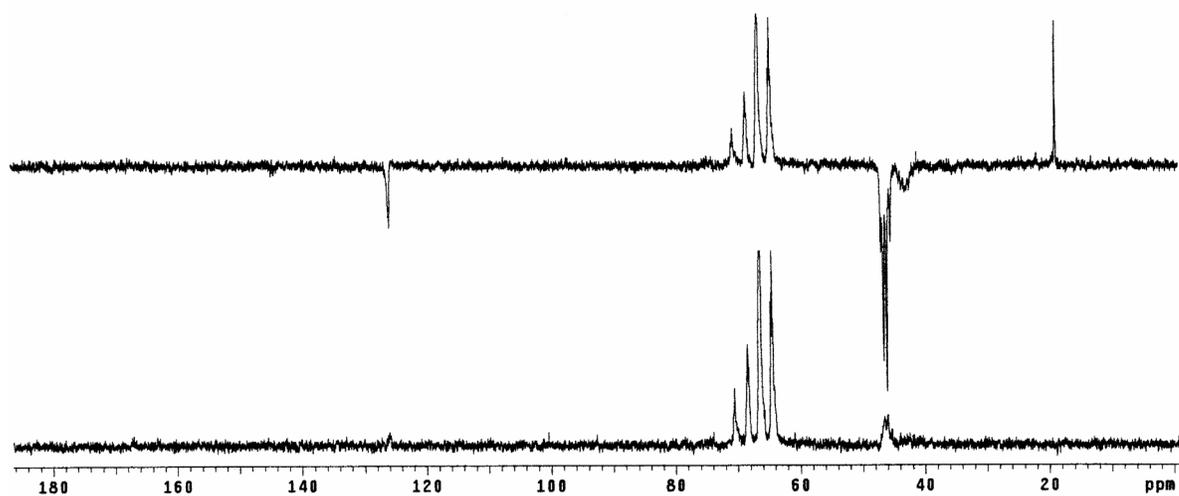


Figura 3.11. Espectros DEPT do PVA-Ma na razão 1/0,30 de $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$, em DMSO-D_6 .

Nos espectros de RMN ^1H , apresentados na Figura 3.12, também é possível verificar a presença de sinais característicos do grupamento metacrililoila do GMA, referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 1 e 3. Também foi verificado que os sinais referentes aos hidrogênios do grupamento epóxido, hidrogênios ligados aos carbonos 5, 6 e 7, não aparecem nos espectros do PVA-Ma e novos sinais são observados em $\delta 1,6\text{ppm}$ e $\delta 3,6\text{ppm}$ e $\delta 5,15\text{ppm}$.

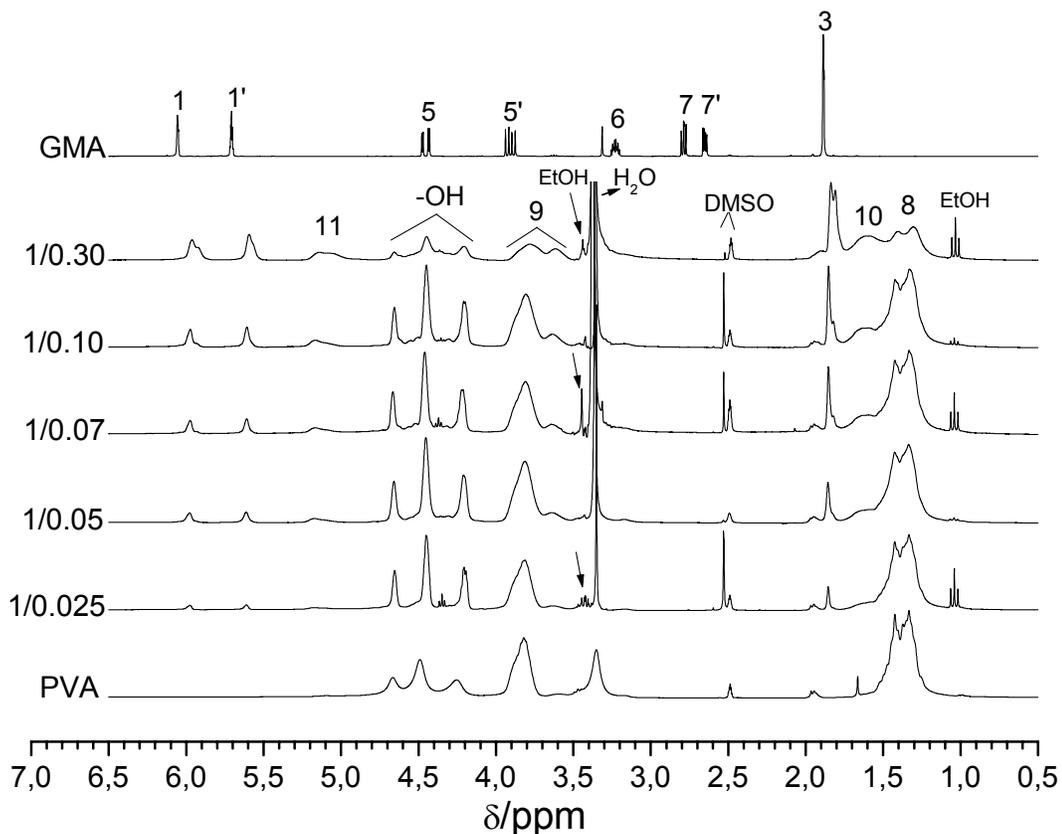


Figura 3.12. Espectros de RMN ^1H do PVA não modificado, do GMA e do PVA-Ma em diferentes razões $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$, em $\text{DMSO-}D_6$.

Pela análise do espectro HETCOR apresentado na Figura 3.13 foi possível identificar os sinais dos carbonos e seus respectivos

hidrogênios conforme indicado na reação (1), Figura 3.7. Isto confirma que a reação do PVA com GMA, dissolvidos em DMSO e catalisada por TEMED, ocorre somente por transesterificação.

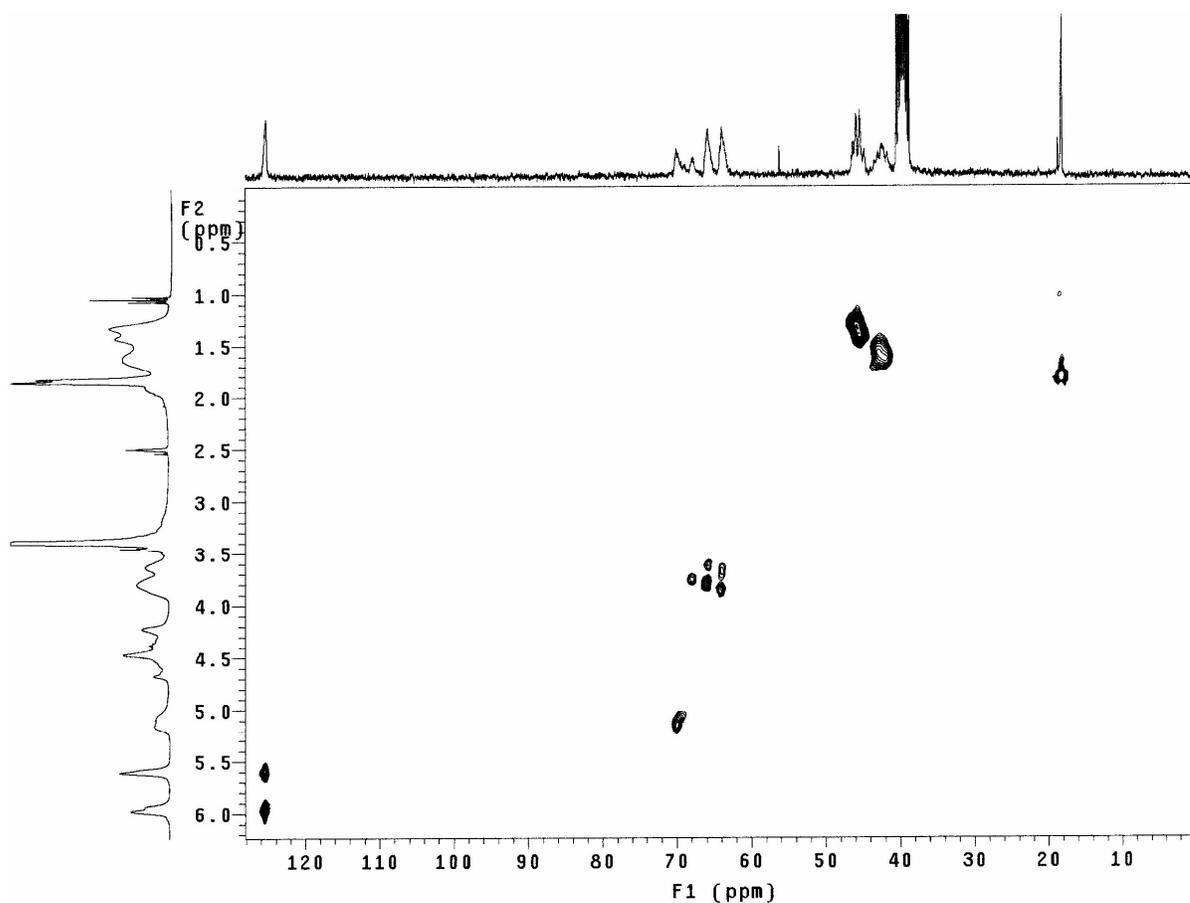


Figura 3.13. Espectro HETCOR do PVA-Ma na razão 1/0,30 [-OH(PVA)/GMA], em DMSO-D₆.

Na Tabela 3.1 são apresentados os graus de substituição, GS, das reações realizadas nas diferentes razões de [-OH(PVA)/GMA], calculados da integração dos sinais dos espectros de RMN ¹H, apresentados na Figura 3.12 e do uso da Equação 3.1. Verifica-

se que, nas razões $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$ em que as reações foram realizadas, a modificação ocorre com alto grau de substituição.

Tabela 3.1. Razões molares $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$ usadas nas reações e graus de substituição (GS) correspondentes, calculados dos espectros de RMN ^1H da Figura 3.12, conforme Equação 3.1.

$[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$	1/0,025	1/0,05	1/0,07	1/0,10	1/0,30
GS (%)	2,3	4,8	6,5	9,6	26
Extensão (%)	92	96	93	96	87

Para cada PVA-Ma, a extensão da reação foi calculada tendo como referência a quantidade de GMA adicionada à solução na qual foi realizada a modificação. A extensão foi definida como a razão entre o valor de GS obtido experimentalmente (calculado por meio dos espectros de RMN ^1H) pelo valor do GS esperado (se 100% do GMA reagisse), vezes 100.

4 OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO DE MODIFICAÇÃO DO PVA COM GMA EM DMSO, CATALISADA POR TEMED.

4.1 INTRODUÇÃO

Ferramentas estatísticas têm sido usadas nas mais diversas áreas da ciência no planejamento, coleta, análise e interpretação de dados.³⁷

A fixação de uma ou mais variáveis (fatores) para estudar o comportamento de uma ou mais respostas, com relação a uma única variável escolhida, não é uma boa estratégia de experimentação quando se deseja estudar um sistema multivariado. Esta metodologia não permite obter informações de como as variáveis se influenciam mutuamente, ou seja, de como os fatores interagem entre si, de forma sinérgica ou antagônica, contribuindo para a resposta.^{37,38}

Usando planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, tais como planejamentos fatoriais, pode-se extrair de um sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos.

Em certos casos, o fenômeno em estudo é bem compreendido e é possível, a partir de considerações teóricas, chegar a um modelo funcional plausível, ou seja, um modelo mecanístico. Mas, freqüentemente o mecanismo que descreve um processo não é suficientemente bem compreendido, ou é muito complicado, para per-

mitir postular um modelo teórico exato. Em tais circunstâncias, um modelo experimental (modelo empírico) pode ser útil, particularmente se o que se deseja prever a resposta dentro de intervalos limitados das variáveis.^{39,40}

Se o que se deseja é avaliar como k variáveis [(fatores), $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$] influenciam a resposta y (variável dependente) de um sistema em estudo, pode-se estudar o comportamento dessa resposta em função dos fatores fixando-os em apenas dois níveis. Assim, o número de experimentos necessários será 2^k e diz-se que é um fatorial tipo 2^k . Portanto, se o número de fatores for 3 ter-se-á um fatorial 2^3 com $2 \times 2 \times 2 = 8$ experimentos.

Nos algoritmos usados para calcular os efeitos dos fatores sobre uma resposta, os níveis dos fatores são codificados como -1 (nível inferior) e +1 (nível superior). Para uma variável quantitativa, ex. temperatura, subtrai-se o valor de cada nível de sua média e divide-se pela metade de seu intervalo. Assim, se um fator x_1 (temperatura) variar de um nível inferior de $x_{-1} = 30$ °C a um nível superior $x_{+1} = 60$ °C, algebricamente tem-se:

$$x_{-1} = \frac{30 - 45}{\frac{60 - 30}{2}} = \frac{-15}{15} = -1 \quad \text{e} \quad x_{+1} = \frac{60 - 45}{\frac{60 - 30}{2}} = \frac{15}{15} = +1$$

Sendo a variável qualitativa (categórica), por exemplo, tipo de catalisador usado numa reação, atribui-se a cada tipo de catalisador um nível +1 ou -1.

Na Tabela 4.1 é apresentado uma matriz planejamento fatorial completo 2^3 , com as combinações possíveis entre os níveis dos fatores e suas respectivas respostas em y .

Tabela 4.1. Representação de um planejamento fatorial 2^3 .

Ensaio	Fatores			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	-1	-1	-1	y_1
2	+1	-1	-1	y_2
3	-1	+1	-1	y_3
4	+1	+1	-1	y_4
5	-1	-1	+1	y_5
6	+1	-1	+1	y_6
7	-1	+1	+1	y_7
8	+1	+1	+1	y_8

As respostas em y_i podem ser medidas individuais ou médias de replicatas dos ensaios, de onde podem ser calculados os respectivos erros que são usados para determinar a significância dos efeitos. Na Figura 4.1 estão representadas em coordenadas cartesianas a transformação das variáveis em variáveis codificadas. Após a transformação, a média das variáveis situa-se na origem das coordenadas, sendo representada pelo valor 0, que

também pode ser obtida pelo método algébrico citado anteriormente. Se forem realizados experimentos na média dos fatores tem-se um ponto central no fatorial (ensaio 9) como representado na Tabela 4.2.

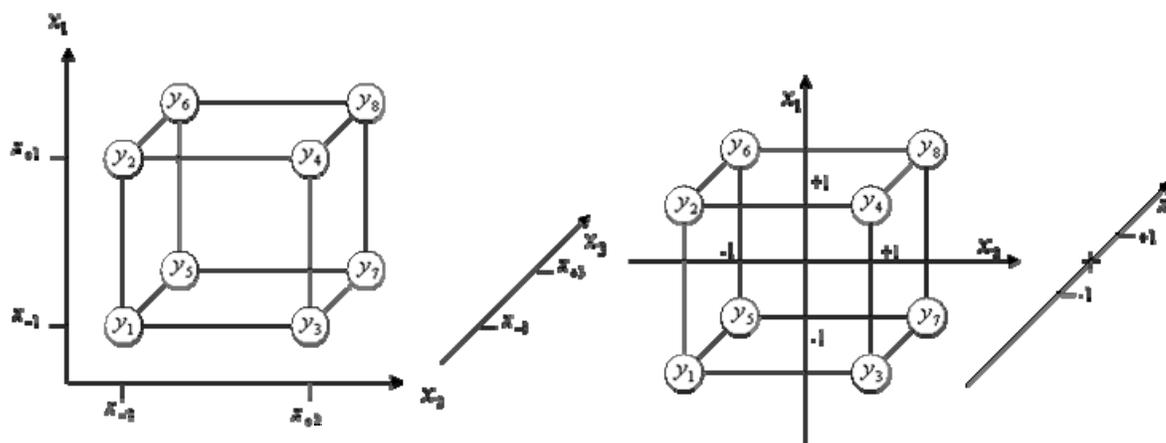


Figura 4.1. Representação em coordenadas cartesianas da conversão da codificação das variáveis em um planejamento 2^3 . (Adaptado de Neto, B. B. et al)

Tabela 4.2. Representação de um planejamento fatorial 2^3 , com ponto central.

Ensaio	Fatores			Resposta
	x_1	x_2	x_3	y
1	-1	-1	-1	y_1
2	+1	-1	-1	y_2
3	-1	+1	-1	y_3
4	+1	+1	-1	y_4
5	-1	-1	+1	y_5
6	+1	-1	+1	y_6
7	-1	+1	+1	y_7
8	+1	+1	+1	y_8
9	0	0	0	y_9

Deve-se observar que um novo valor de y é obtido para o ponto central e este não necessariamente será a média dos valores de y_i obtidos nos níveis superiores e inferiores dos fatores ou do valor médio previsto por um modelo linear ajustado. Assim, a diferença entre o valor da resposta obtido no ponto central e o valor estimado por um modelo linear ajustado pode indicar se no intervalo estudado há uma curvatura significativa, indicando se um ajuste por um modelo não linear é mais adequado.

Quando se deseja estudar um número muito grande de variáveis pode-se fazer uma triagem dessas variáveis por uso de um planejamento fracionário, no qual se reduz o número de experimentos, como por exemplo, um fatorial fracionário 2^{5-2} onde se tem 5 variáveis com dois níveis cada e um total de 2^3 experimentos.³⁷⁻³⁹

Com auxílio de programas computacionais estatísticos como Design-Expert®, Estatistic® e Minitab®, entre outros, pode-se calcular os valores dos efeitos associados aos fatores e assim quantificar os efeitos dos fatores a uma determinada resposta e ainda como esses efeitos interagem entre si. Esses programas utilizam regressão por mínimos quadrados, para, no caso de planejamentos fatoriais de dois níveis, 2^k , ajustarem modelos lineares que descrevem o comportamento da resposta frente a variação dos fatores entre intervalos previamente selecionados. Os modelos assim obtidos são ditos empíricos e descrevem o com-

portamento do sistema apenas no intervalo estudado. Após a escolha dos fatores que influenciam significativamente na resposta do sistema em estudo, pode-se "caminhar" em direção às melhores respostas. Quando a mudança dos níveis dos fatores deixa de influenciar significativamente na resposta, indicando as condições estar próximas, podem-se ampliar os níveis dos fatores, por exemplo, para um planejamento composto central, 3^k . Com um planejamento composto central, utilizando ajustes por mínimos quadrados, é possível se obter uma superfície de resposta que pode descrever o sistema, o que permite, muitas vezes, chegarem as melhores condições desejadas. Esse método de otimização é conhecido como metodologia de superfície de resposta (ou RSM).³⁷⁻⁴⁰

Um esquema de otimização de uma reação química³⁹, considerando os fatores tempo e temperatura, está representado na Figura 4.2. Embora o exemplo leve em consideração apenas os fatores tempo e temperatura, um número maior de fatores poderia ser analisado. Inicialmente se tem um planejamento fatorial 2^2 com ponto central, esse planejamento inicial, por meio de um modelo linear ajustado, indica qual a direção em que se obtêm os maiores rendimentos. Realizam-se então experimentos nessa direção, até que a resposta, no caso rendimento da reação, apresente um decréscimo (passando por um máximo) com o a variação dos fato-

res. Chegar a essa condição envolve, muitas vezes, várias etapas.

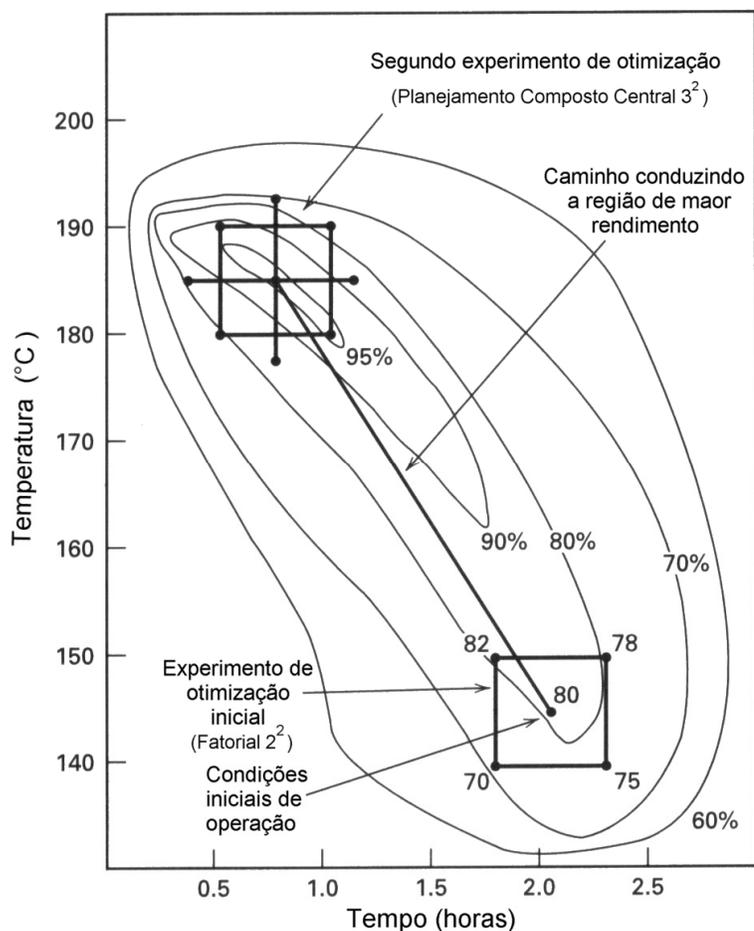


Figura 4.2. Gráfico de contorno do rendimento em função da temperatura e tempo de reação, ilustrando um processo de otimização de uma reação química. (Adaptado e reproduzido de Montgomery, D. C.³⁹)

O segundo experimento representado na Figura 4.2 é um exemplo de um planejamento composto central, e nesse caso um modelo quadrático pode ser ajustado para a obtenção da superfície de resposta, podendo-se então chegar às condições de maiores rendimentos. Deve-se observar que, se o planejamento fatorial inicial fosse realizado próximo a essas condições, pela análise da diferença do valor do ponto central obtido, com o valor previs-

to pelo modelo linear ajustado, uma curvatura significativa seria obtida, indicando estar essa região próxima às condições de máximo rendimento.

Nesta parte deste trabalho foram otimizadas as condições de reação do PVA com GMA em DMSO e catalisada por TEMED, já caracterizada no capítulo anterior, fixando-se a razão molar [-OH(PVA)/GMA] em (1/0,05). Para a otimização foi utilizada a Metodologia de Superfície de Resposta. Foram investigados os efeitos das variáveis: tempo de reação, temperatura e atmosfera (com e sem borbulhamento de N₂).

4.2 EXPERIMENTAL

4.2.1 Materiais e Equipamentos

Poli(álcool vinílico), PVA, Mw nominal 13-23 kg Mol⁻¹, Aldrich: 34840-6; metacrilato de glicidila, GMA, Acros: 16589; N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, TEMED, Aldrich: 2,250-0; álcool etílico PA, Synth; acetona PA, Synth; dimetilsulfóxido PA, DMSO, Synth; dimetilsulfóxido deuterado, DMSO-D₆, 99,96 atom%, Acros: 16902;

Bomba de alto vácuo Edwards RV5; banho termostaticado Julabo modelo VL4; Estufa a vácuo Fanem modelo 099EV; espectrômetro RMN Varian, mod. Mercury plus BB, 300 MHz.

4.2.2 Procedimento Experimental

4.2.2.1 Planejamento Fatorial

Após a caracterização da reação de modificação do poli(álcool vinílico) com metacrilato de glicidila, seção 3.3, foi realizado um planejamento fatorial completo 2^3 com ponto central, variando-se os níveis de temperatura, tempo de reação e atmosfera (com ou sem N_2), para avaliar a influência e a interação desses fatores na reação de modificação do PVA com GMA. A razão de $[-OH(PVA)/GMA]$ foi fixada em (1/0,05) e foi mantida a concentração de TEMED em 1 mol % molar em relação à quantidade de OH do PVA. Foram mantidos os procedimentos de agitação, precipitação e secagem, já citados na seção 3.2.2.1. Os dados estatísticos foram analisados usando o programa de computador Design-Expert[®]. Na Tabela 4.3 são apresentados os níveis inferiores (-1) e superiores (+1) e os pontos centrais (0) das variáveis temperatura (A), tempo de reação (B) e tipo de atmosfera (C).

Tabela 4.3. Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 completo para a modificação do PVA com GMA na razão [molar -OH(PVA)/GMA] igual a (1/0,05).

Fator	Nome	Unidade	Tipo	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
A	Temperatura	°C	Numérica	40,0	50,0	60,0
B	Tempo	Horas	Numérica	4,0	6,0	8,0
C	Atmosfera	-	Categórica	com N_2	-	- sem N_2

Todos os experimentos foram realizados em duplicata e em ordem aleatória, o que gerou um total de 20 experimentos, como mostrado na Tabela 4.4. Nesta tabela são também apresentadas as condições utilizadas para cada experimento. Como pode ser verificado, devido o fator atmosfera ser qualitativo, o ponto central para esse fator foi realizado nos níveis (-1) e (+1), gerando quatro experimentos.

Tabela 4.4. Planejamento fatorial completo 2^3 , em duplicata, com ponto central.

Amostras	Fatores				
	A		B		C
	Temperatura/°C		Tempo/horas		Atmosfera
1 e 2	(-1) 40,0		(-1) 4,0		(-1) com N ₂
3 e 4	(+1) 60,0		(-1) 4,0		(-1) com N ₂
5 e 6	(-1) 40,0		(+1) 8,0		(-1) com N ₂
7 e 8	(+1) 60,0		(+1) 8,0		(-1) com N ₂
9 e 10	(-1) 40,0		(-1) 4,0		(+1) sem N ₂
11 e 12	(+1) 60,0		(-1) 4,0		(+1) sem N ₂
13 e 14	(-1) 40,0		(+1) 8,0		(+1) sem N ₂
15 e 16	(+1) 60,0		(+1) 8,0		(+1) sem N ₂
17 e 18	(0) 50,0		(0) 6,0		(-1) com N ₂
19 e 20	(0) 50,0		(0) 6,0		(+1) sem N ₂

4.2.2.2 Planejamento Composto Central

Após a avaliação dos efeitos principais e de interação, optou-se pela construção de um modelo empírico através da Metodologia de Superfície de Respostas (RSM), utilizando-se apenas os fatores significativos (tempo e temperatura), como será mostrado nas seções a seguir, discutidas nesse trabalho. Aproveitando-se os experimentos 9 a 16, 19 e 20 da Tabela 4.4 e acrescentando 4 novos pontos $(-\sqrt{2};0)$, $(0;-\sqrt{2})$, $(+\sqrt{2};0)$, $(0;+\sqrt{2})$, foi obtido o planejamento composto central, com um total de 14 pontos, como apresentado na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Planejamento composto central, sem duplicatas dos experimentos 21, 22, 23 e 24.

Ensaio	Fatores			
	A Temperatura/°C		B Tempo/horas	
9 e 10	(-1)	40,0	(-1)	4,0
11 e 12	(+1)	60,0	(-1)	4,0
13 e 14	(-1)	40,0	(+1)	8,0
15 e 16	(+1)	60,0	(+1)	8,0
19 e 20	(0)	50,0	(0)	6,0
21	$(-\sqrt{2})$	36,0	(0)	6,0
22	$(+\sqrt{2})$	64,0	(0)	6,0
23	(0)	50,0	$(-\sqrt{2})$	3,2
24	(0)	50,0	$(+\sqrt{2})$	8,8

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Análise Fatorial

Na Tabela 4.6 são apresentados os valores dos graus de substituição (GS) obtidos para os experimentos realizados usando o planejamento fatorial completo 2^3 , com ponto central, apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.6. Graus de substituição obtidos nos experimentos do planejamento fatorial completo 2^3 .

AMOSTRAS	FATORES			RESPOSTA
	A Temperatura/°C	B Tempo/h	C Atmosfera	GS / %
1	40,0 (-)	4,0 (-)	c/ N2 (-)	2,15
2	40,0 (-)	4,0 (-)	c/ N2 (-)	1,79
3	60,0 (+)	4,0 (-)	c/ N2 (-)	4,19
4	60,0 (+)	4,0 (-)	c/ N2 (-)	4,16
5	40,0 (-)	8,0 (+)	c/ N2 (-)	4,26
6	40,0 (-)	8,0 (+)	c/ N2 (-)	3,75
7	60,0 (+)	8,0 (+)	c/ N2 (-)	4,63
8	60,0 (+)	8,0 (+)	c/ N2 (-)	4,65
9	40,0 (-)	4,0 (-)	s/ N2 (+)	1,59
10	40,0 (-)	4,0 (-)	s/ N2 (+)	1,86
11	60,0 (+)	4,0 (-)	s/ N2 (+)	4,52
12	60,0 (+)	4,0 (-)	s/ N2 (+)	4,59
13	40,0 (-)	8,0 (+)	s/ N2 (+)	3,80
14	40,0 (-)	8,0 (+)	s/ N2 (+)	3,51
15	60,0 (+)	8,0 (+)	s/ N2 (+)	4,60
16	60,0 (+)	8,0 (+)	s/ N2 (+)	4,78
17	50,0 (0)	6,0 (0)	c/ N2 (-)	3,96
18	50,0 (0)	6,0 (0)	c/ N2 (-)	4,60
19	50,0 (0)	6,0 (0)	s/ N2 (+)	4,28
20	50,0 (0)	6,0 (0)	s/ N2 (+)	4,33

Os valores de GS foram obtidos a partir dos sinais presentes nos espectros de RMN ^1H dos diferentes PVA-MAs, utilizando a Equação 3.1.

Com os valores da Tabela 4.6 e utilizando o programa de computador Design-expert[®] obteve-se os valores dos efeitos principais, de interação e a análise de variância (ANOVA). Pela análise de variância (ANOVA) do fatorial 2^3 , Tabela 4.7, pode-se observar que apenas os efeitos principais A (Temperatura), B (Tempo) e os efeitos de interação AB e AC são estatisticamente significativos. Estes apresentaram valor P (teste F) menores que 0,05, o que significa que existe uma probabilidade menor que 5% de que a hipótese nula seja verdadeira, isto é, que o valor de F_0 seja tão grande quanto o valor de F obtido. No entanto, o efeito principal C (Atmosfera) e suas interações BC e ABC não são estatisticamente significativos para o modelo, pois pelo teste F apresentaram valores P muito maiores que 0,05. Os valores dos efeitos principais e de interação estão descritos na Tabela 4.8.

A análise de significância pode ser confirmada pelo gráfico normal, apresentado na Figura 3.1, onde os efeitos considerados significativos estão distantes da reta normal, não se distribuindo normalmente, como ocorre com os erros aleatórios.^{37,38}

Tabela 4.7. Tabela de resultados ANOVA para o fatorial 2³.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor P
Modelo	19,61	7	2,80	61,58	< 0,0001
<i>A</i> (<i>Temperatura</i>)	11,25	1	11,25	247,31	< 0,0001
<i>B</i> (<i>Tempo</i>)	5,21	1	5,21	114,50	< 0,0001
<i>C</i> (<i>Atmosfera</i>)	3,468E-3	1	3,468E-3	0,076	0,7876
<i>AB</i>	2,82	1	2,82	62,09	< 0,0001
<i>AC</i>	0,26	1	0,26	5,73	0,0356
<i>BC</i>	0,048	1	0,048	1,05	0,3285
<i>ABC</i>	0,014	1	0,014	0,30	0,5955
Curvatura	1,22	1	1,22	26,92	0,0003
Resíduo	0,50	11	0,045		
Falta de ajuste	2,982E-3	1	2,982E-3	0,060	0,8115
<i>Erro Puro</i>	0,50	10	0,050		
Total	21,33	19			

Tabela 4.8. Valores dos efeitos principais e de interação para o fatorial completo 2³ apresentados na Tabela 4.7.

A	B	C	AB	AC	BC	ABC
1,68	1,14	-0,03	-0,84	0,26	-0,11	-0,06

Como foram realizados experimentos em duplicata nos pontos centrais das variáveis quantitativas tempo e temperatura, foi possível verificar a curvatura da superfície de resposta.

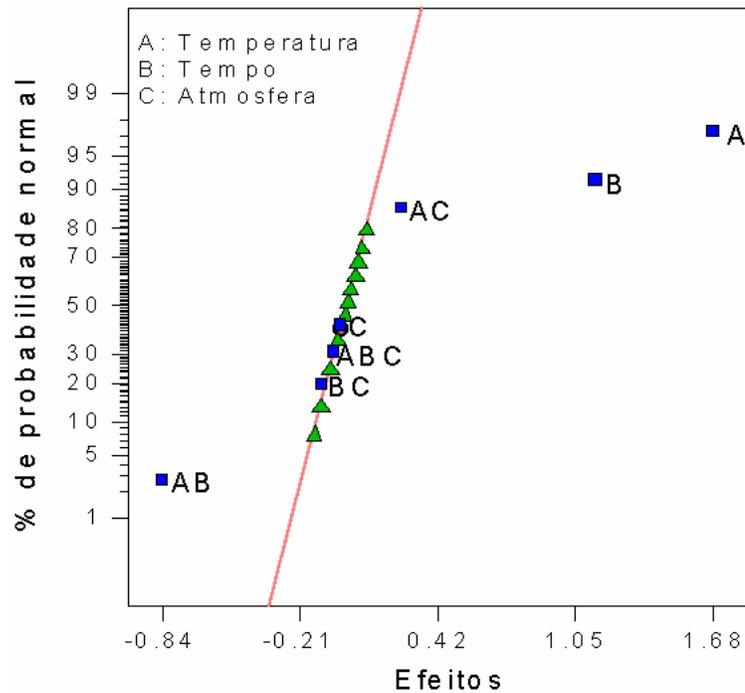


Figura 4.3. Gráfico normal dos efeitos para o fatorial 2^3 .

Pelo valor P obtido para a curvatura, $P = 0,0003$, foi verificado que a curvatura é estatisticamente significativa, indicando que a superfície é curva e não plana. No entanto, esse fato não desabilita o modelo linear em prever quais efeitos são estatisticamente significativos.

Considerando que, pelo valor obtido para a curvatura, um ajuste por um modelo quadrático é mais indicado que o ajuste por modelo linear, e que o efeito principal de atmosfera não foi significativo, optou-se por desprezar o fator atmosfera e ampliar os níveis dos fatores temperatura e tempo, por meio de um planejamento composto central. A ampliação dos níveis desses fatores é

necessária, uma vez que, um ajuste quadrático não pode ser feito utilizando-se apenas os experimentos descritos na Tabela 4.6, pois o número de parâmetros necessários para o ajuste e obtenção da respectiva superfície de resposta, é maior que o número de níveis dos experimentos no planejamento.

4.3.2 Superfície de Resposta

Como já citado anteriormente, após a avaliação dos efeitos principais e de interação entre os fatores temperatura, tempo e atmosfera, optou-se pela construção de um modelo empírico por meio de Metodologia de Superfície de Respostas (RSM).

Na Tabela 4.9 são apresentados os valores dos graus de substituição obtidos nas reações, cujas condições são apresentadas na Tabela 4.5, e os respectivos níveis dos fatores. Na Tabela 4.10 são apresentados os dados obtidos da análise de variância para um ajuste quadrático dos dados da Tabela 4.9.

Observa-se pela análise de variância, Tabela 4.10, que o modelo quadrático ajusta-se bem aos dados experimentais, não apresentando falta de ajuste significativa, com valor P igual a 0,361.

Tabela 4.9. Grau de substituição obtido nos experimentos relativos ao planejamento composto central para obtenção da superfície de resposta, nas condições descritas na Tabela 4.5.

AMOSTRAS	FATORES		RESPOSTA
	A Temperatura/°C	B Tempo/h	GS / %
9	40,0 (-)	4,00 (-)	1,76
10	40,0 (-)	4,00 (-)	1,86
11	60,0 (+)	4,00 (-)	4,52
12	60,0 (+)	4,00 (-)	4,59
13	40,0 (-)	8,00 (+)	3,80
14	40,0 (-)	8,00 (+)	3,51
15	60,0 (+)	8,00 (+)	4,60
16	60,0 (+)	8,00 (+)	4,78
19	50,0 (0)	6,00 (0)	4,28
20	50,0 (0)	6,00 (0)	4,33
21	$(-\sqrt{2})$ 36,0	6,00 (0)	2,39
22	$(+\sqrt{2})$ 64,0	6,00 (0)	4,83
23	(0) 50,0	3,17 $(-\sqrt{2})$	3,36
24	(0) 50,0	8,83 $(+\sqrt{2})$	4,54

Isto pode ser confirmado pela análise do gráfico normal dos resíduos apresentado na Figura 4.4, o qual também não apresenta indícios de falta de ajuste, com os resíduos se distribuindo normalmente, na forma de uma reta, não apresentando nenhum padrão diferente do linear.

O modelo explica 99,20 % da variação total, que comparado com a porcentagem de variação explicável, 99,55 %, indica que o

modelo quadrático pode ser usado para prever resultados dentro do intervalo estudado.

Tabela 4.10. ANOVA obtida para o planejamento composto central da Tabela 4.9 com um ajuste para o modelo quadrático.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Media dos quadrados	Valor F	Valor P
Regressão	14,93	5	2,99	197,64	< 0,0001
A (Temperatura)	10,10	1	10,10	668,78	< 0,0001
B (Tempo)	2,64	1	2,64	174,56	< 0,0001
A ²	0,71	1	0,71	46,82	0,0001
B ²	0,21	1	0,21	13,85	0,0059
AB	1,46	1	1,46	96,84	< 0,0001
Resíduo	0,12	8	0,015		
Falta de ajuste	0,054	3	0,018	1,34	0,3614
Erro Puro	0,067	5	0,013		
Total	15,05	13			

% de variação explicada: 99,20 %
% de variação explicável: 99,55 %

Equação obtida em termos de variáveis codificadas:

$$\text{Equação 4.1} \quad GS = 4,308 + 0,921A + 0,469B - 0,389A^2 - 0,208B^2 - 0,428AB$$

(0,087)
(0,036)
(0,035)
(0,057)
(0,056)
(0,043)

Equação obtida em termos de variáveis reais:

$$\text{Equação 4.2} \quad GS = -19,70 + 6,09 \times 10^{-1} T + 1,93 t - 3,89 \times 10^{-3} T^2 - 5,21 \times 10^{-2} t^2 - 2,14 \times 10^{-2} T * t$$

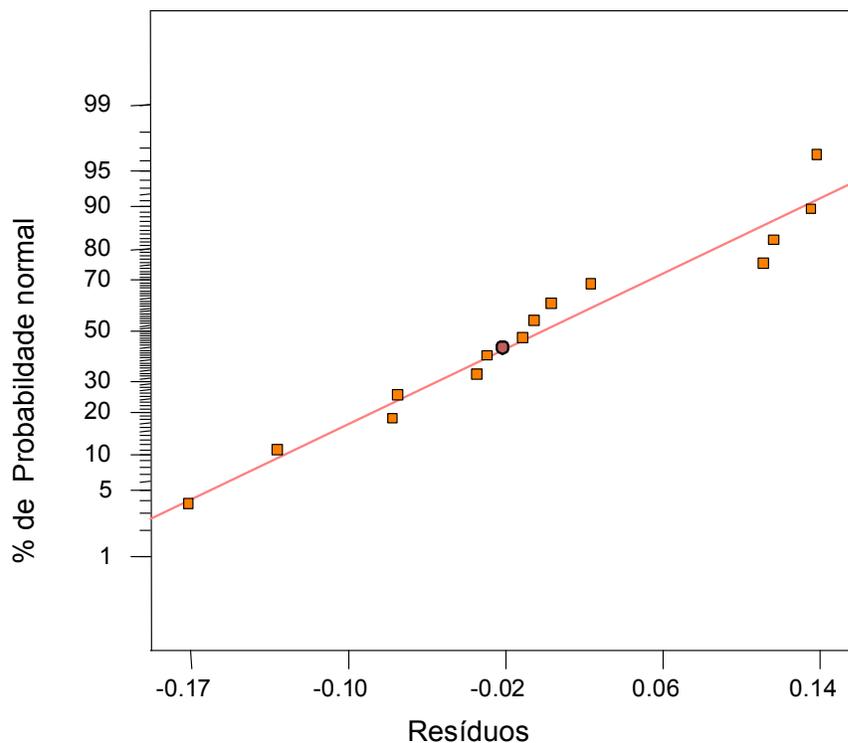


Figura 4.4. Gráfico normal dos resíduos para o ajuste ao modelo quadrático baseado no planejamento composto central.

Na Figura 4.5 é apresentada a superfície de resposta obtida quando o modelo quadrático é ajustado, Equação 4.2. Pode-se observar que as melhores condições de reação, isto é, onde os rendimentos são maiores, estão na região próxima à temperatura de 62 °C e em torno de 6 horas de reação. Isto pode ser melhor observado no gráfico de contorno, apresentado na Figura 4.6, onde são apresentadas somente as curvas de níveis relativas ao modelo.

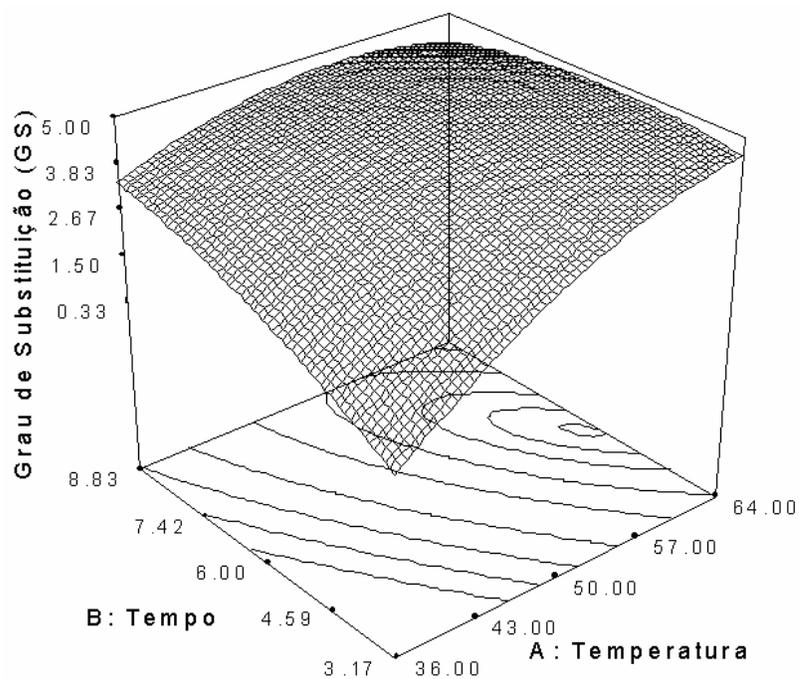


Figura 4.5. Superfície de resposta obtida para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 4.6.

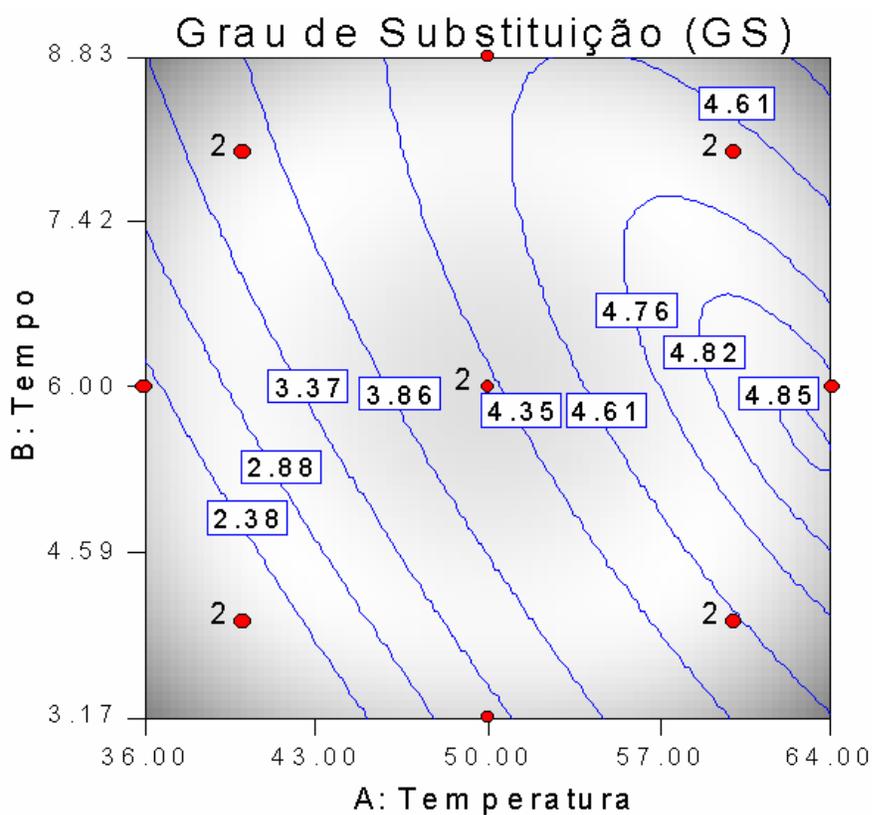


Figura 4.6. Gráfico de contorno da superfície de resposta para o modelo obtido ajustado pela Equação 4.2.

A fim de testar a robustez do modelo ajustado pela Equação 4.2, para previsão de graus de substituição no intervalo estudado, foi realizada a reação de modificação nas condições otimizadas, isto é, 62 °C e 6 horas de reação mantendo em 5 mol-% a concentração do modificador GMA em relação à quantidade de grupos OH do PVA. O grau de substituição obtido foi 4,63%, sendo que o valor previsto pelo modelo foi de 4,85%. Pelo modelo, uma única determinação teria erro de 0,14%, tendo um desvio, com 95% de nível de confiança, de $\pm 0,33\%$. Assim, resultado pode estar no intervalo de 4,52% a 5,18%. Como o grau de substituição obtido situa-se neste intervalo, conclui-se que o valor obtido é muito próximo do valor ótimo.

Considerando que para a obtenção da superfície de resposta a concentração de metacrilato de glicidila foi fixada em 5 mol-% (em relação à quantidade de grupos OH do PVA), ponderou-se se essa mesma superfície seria obtida caso outras concentrações de metacrilato de glicidila fossem utilizadas, nas mesmas condições de temperatura e tempo de reação aqui estudadas. Neste contexto, foram realizadas reações de modificação do poli(álcool vinílico) em diferentes razões molares $[-OH(PVA)/GMA]$ a 62 °C e 6 horas de reação, próximo à região de máximo da superfície de resposta, cujos resultados são apresentados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11. Graus de substituição do PVA obtidos nas condições otimizadas, 62°C e 6h, em diferentes razões molares [-OH(PVA)/GMA].

[-OH(PVA)/GMA]	1/0,05	1/0,10	1/0,25	1/0,50	1/0,75	1/1
GS _{Teórico} /%	5,0	10,0	25,0	50,0	75,0	100,0
GS _{Experimental} /%	4,63	9,21	22,80	39,25	49,65	57,59

Na Figura 4.7 é apresentada a dependência do grau de substituição obtido experimentalmente (GS/%), nas condições otimizadas de reação, 62 °C e 6 horas de reação, em função do grau de substituição esperado (GS teórico/%), relativo à razão molar de metacrilato de glicidila usada na reação, conforme dados apresentados na Tabela 4.11. Pode-se observar uma linearidade até as condições de modificação de GS teórico de aproximadamente 25%.

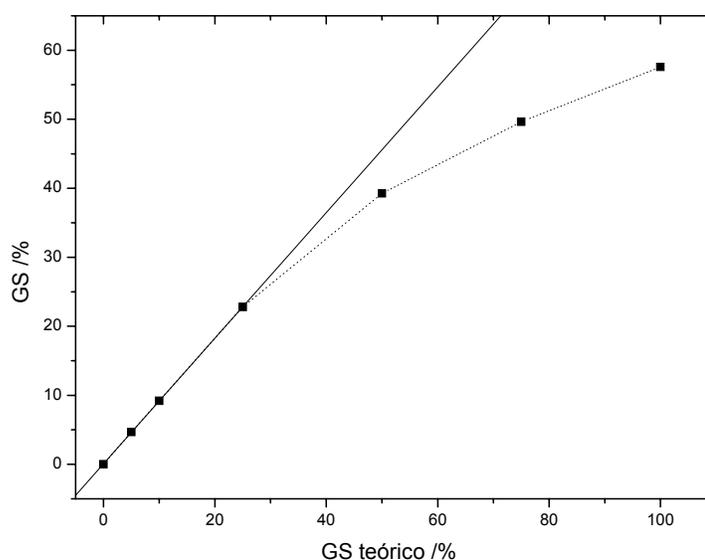


Figura 4.7. Gráfico do grau de substituição obtido GS a 62°C e 6 horas de reação em função do GS teórico.

Assim, pode-se esperar que superfícies de resposta obtidas utilizando outras concentrações de GMA até um limite de grau de substituição teórico próximo a 25%, em relação às hidroxilas do PVA, sigam o mesmo comportamento de máximo que a obtida usando a concentração de GMA fixada em 5 mol-%.

O fato de que em graus de substituição teóricos maiores que 25 mol-% ocorre o desvio da linearidade da curva GS versus GS teórico (Figura 4.7), não significa, necessariamente, que essas não são as melhores condições de reação. Pode ocorrer que o aumento do grau de substituição intensifique o impedimento estérico, devido ao volume do grupamento metacrilato adicionado, dificultando a entrada de novos grupamentos e/ou é uma indicação de que a reação de transesterificação possa estar próxima das condições de equilíbrio.

5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE PVA-MA E DE HIDROGÉIS DE PVA-MA ASSOCIADOS COM SULFATO DE CONDROITINA (PVA-MA/SC).

5.1 INTRODUÇÃO

Hidrogéis são redes poliméricas hidrofílicas capazes de absorver uma quantidade relativamente grande de água ou fluidos biológicos.^{4,41,42} As propriedades físico-químicas de hidrogéis são extremamente importantes na seleção de um hidrogel específico para uma dada aplicação. Muitas vezes, tais propriedades são altamente dependentes das condições-ambiente às quais o hidrogel será exposto, sendo imperativo que as medidas das propriedades do hidrogel sejam determinadas o mais próximo quanto possível das condições *in situ*.⁴³

As propriedades mecânicas dos hidrogéis são dependentes da estrutura do polímero, especialmente da densidade de reticulação e do grau de intumescimento. Entre os parâmetros importantes na caracterização de hidrogéis estão: módulo de elasticidade (E) ou cisalhamento (G); densidade de reticulação (ν_e); a massa molar entre retículos (M_c); o grau de intumescimento no equilíbrio (Q); a cinética de intumescimento a partir do hidrogel seco (xerogel); sendo também importante a avaliação da citotoxicidade, quando se objetiva o uso como biomaterial.

O conhecimento desses parâmetros, e de como eles variam um em relação aos outros e com as condições ambiente, é muito importante para a aplicação do hidrogel na finalidade que se objetivava.

5.1.1 Propriedades Mecânicas dos Hidrogéis

A teoria da elasticidade da borracha (Elastic Rubber Theory) pode ser aplicada às propriedades mecânicas de hidrogéis.⁴³

Borrachas são materiais que respondem à tensão com total e quase instantânea deformação reversível. São formadas por redes poliméricas pouco reticuladas com um grande volume livre que permite responder às tensões externas com um rápido rearranjo dos segmentos poliméricos.

Em seu estado intumescido, muitos hidrogéis satisfazem esse critério e quando estão na região em que se comportam semelhante à borracha (Rubber-like) suas propriedades mecânicas são dependentes principalmente da arquitetura das cadeias poliméricas.

Pelo uso da teoria da elasticidade da borracha pode-se descrever as propriedades mecânicas de hidrogéis e é possível analisar a estrutura polimérica e ainda determinar, por exemplo, a massa molecular entre retículos.⁴⁴

5.1.1.1 Medidas de Tensão/Deformação

A lei de Hooke descreve a força elástica de um corpo sobre tensão/deformação conforme equação:

Equação 5.1
$$\sigma = E\varepsilon$$

Onde a tensão $\sigma = \frac{F}{A_0}$ é a força F aplicada sobre a área transversal da amostra não tensionada, A_0 .

A deformação por tensão ε

é dada por $\varepsilon = \frac{\Delta l}{l_0}$, onde l_0 é o comprimento inicial da amostra na

direção da força aplicada e $\Delta l = l - l_0$ é a variação do comprimento

na direção da força aplicada após a amostra ser deformada para

o comprimento l . A constante de proporcionalidade E é conhecida

como módulo de elasticidade. A deformação pode ser estiramento,

cisalhamento, torção ou dobramento, e o módulo é classificado

de acordo com o tipo de força aplicada, Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Classificação do Módulo de acordo com tipo de força aplicada.

Força	Deformação	Módulo
Tração	estiramento	Módulo de elasticidade (E)
Tangencial	cisalhamento	Módulo de cisalhamento (G)
Torque	torção	Módulo torsional
Compressão	contração	Módulo de elasticidade ou, se for aplicada forças de todos os lados, módulo de compressão (K).

Reproduzido de Macromolecules.

Existe uma relação de similaridade entre os módulos de corpos elásticos. Essa relação é dada pelo número ou Razão de Poisson, μ , o qual é a razão entre a contração lateral relativa, $(\Delta d/d_0)$, e a extensão axial ou deformação axial, $(\Delta l/l_0)$:

Equação 5.2
$$\mu = \frac{(\Delta d/d_0)}{(\Delta l/l_0)}$$

Para compostos geometricamente simples, a relação entre os módulos de elasticidade E , de cisalhamento G e de compressão K é dada por:

Equação 5.3
$$E = 2G(1 + \mu) = 3K(1 - 2\mu)$$

O valor de μ geralmente varia entre 0 e 0,5, valores obtidos para deformação sem contração lateral e com contração lateral a volume constante, respectivamente. Com base nesse limite teórico da regra de Poisson o módulo de cisalhamento G varia entre 1/3 e 1/2 do valor do módulo de elasticidade E .

Na Tabela 5.2 são apresentados os módulos de elasticidade para diferentes materiais.

Tabela 5.2 Módulos de elasticidade para diferentes materiais a temperatura ambiente.

Material	E/GPa
Borracha vulcanizada	0,001-0,01
Borracha cristalizada	0,1
Polímeros parcialmente cristalinos não orientados	0,1-10
Fibras e plásticos reforçados	10-100
Vidros inorgânicos	100-1000
Cristais	1000-10.000

Reproduzido de Macromolecules.

5.1.1.2 Teoria da Elasticidade da Borracha

A temperatura de um elastômero é aumentada durante o processo de estiramento. Também, há aumento no módulo de elasticidade quando, sob tensão, a temperatura de um elastômero é aumentada. Assim, elastômeros exibem expansividade térmica positiva para amostras não tensionadas e negativa para amostras tensionadas. Em termos mecânicos simples, o módulo de elasticidade é uma medida da resistência ao desenovelamento de cadeias que passam a ser orientadas no processo de tensionamento. A aplicação de uma tensão tende a desenovelar as cadeias e alinha-las na direção da tensão aplicada, mas um aumento na temperatura, aumenta o movimento térmico das cadeias dificultando a orientação, conduzindo assim a um aumento do módulo de elasticidade.⁴⁵

A mudança de temperatura em um elastômero no processo de estiramento, em termos de processo termodinâmico, pode ser tratada de modo semelhante à mudança de temperatura de um gás sujeito a uma rápida mudança de volume. Um gás ideal só pode armazenar energia na forma de energia cinética ou calor, causando assim aumento de temperatura. De forma semelhante, a extensão de um elastômero resulta em evolução de calor.

Partindo da equação termodinâmica:

Equação 5.4
$$dU = -PdV + TdS$$

Chegamos à dependência de P com U , V e T :

Equação 5.5
$$P = -\left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T + \left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T$$

Considerando a relação termodinâmica:

Equação 5.6
$$\left(\frac{\partial S}{\partial V}\right)_T = \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V$$

A equação 5.5 torna-se:

Equação 5.7
$$P = -\left(\frac{\partial U}{\partial V}\right)_T + \left(\frac{\partial P}{\partial T}\right)_V$$

Em substituição a mudança de volume dV , a mudança no comprimento dl pode ser considerada na aplicação de uma força de estiramento F sob uma amostra de borracha. Uma vez que F e P têm sinais opostos, a equação 5.7 pode ser reescrita na forma:

Equação 5.8
$$F = \left(\frac{\partial U}{\partial l} \right)_T + \left(\frac{\partial F}{\partial T} \right)_V$$

Considerando agora como uma extensão adiabática reversível sem variação de volume na amostra de borracha, podemos derivar a segunda lei da termodinâmica $A = U - TS$, em relação ao comprimento l .

Equação 5.9
$$\left(\frac{\partial A}{\partial l} \right)_T = \left(\frac{\partial U}{\partial l} \right)_T - T \left(\frac{\partial S}{\partial l} \right)_T$$

Em analogia a equação 5.6, considerando que F é proporcional a P e l é proporcional a V , a seguinte relação é válida:

Equação 5.10
$$\left(\frac{\partial S}{\partial l} \right)_T = - \left(\frac{\partial F}{\partial T} \right)_l$$

Substituindo esta relação na equação 5.9 e resolvendo as equações 5.8 e 5.9 para $(\partial U / \partial l)_T$ temos:

Equação 5.11
$$\left(\frac{\partial A}{\partial l} \right)_T - T \left(\frac{\partial F}{\partial T} \right)_l = F - T \left(\frac{\partial F}{\partial T} \right)_l$$

E portanto,

Equação 5.12
$$\left(\frac{\partial A}{\partial l} \right)_T = F$$

Assim, substituindo na equação 5.9 temos:

Equação 5.13
$$F = \left(\frac{\partial U}{\partial l} \right)_{T,V} - T \left(\frac{\partial S}{\partial l} \right)_{T,V}$$

Para um elastômero ideal a contribuição da variação da energia interna é negligenciável, assim:

Equação 5.14
$$F = -T \left(\frac{\partial S}{\partial l} \right)_{T,V}$$

Utilizando a termodinâmica estatística para redes poliméricas ideais e fazendo uso de funções de probabilidade, a variação de entropia de uma borracha tensionada pode ser relacionada ao número de cadeias N_i , portanto ao número de retículos que ligam as cadeias, pela equação: ^{32, 46}

Equação 5.15
$$\Delta S = -0,5kN_i(\alpha_x^2 + \alpha_y^2 + \alpha_z^2 - 3)$$

Onde k é a constante de Boltzmann e $\alpha = l/l_0$ é a razão de alongamento.

Se sob tensão a cadeia é alongada em uma única direção ($\alpha_x = \alpha$) e simultaneamente contraída nas outras duas direções ($\alpha_y = \alpha_z = 1/\alpha^{0,5}$) a Equação 5.15 se torna:

Equação 5.16
$$\Delta S = -0,5kN_i\left(\alpha^2 + \frac{2}{\alpha} - 3\right)$$

Considerando que $\alpha = l/l_0$, após diferenciação temos:

Equação 5.17
$$\left(\frac{\partial \Delta S}{\partial l} \right)_{T,V} = -\frac{kN_i(\alpha - \alpha^{-2})}{l_0}$$

Substituindo na equação 5,14 temos:

$$\text{Equação 5.18} \quad F = \frac{kTN_i(\alpha - \alpha^{-2})}{l_0}$$

Se ambos os lados forem divididos pela área da seção transversal original $A_0 = V_0/l_0$, com a definição da tensão $\sigma = F/A_0$ e da constante dos gases reais $R = kN_L$, onde N_L é a constante de Avogadro, e da concentração molar das cadeias da rede polimérica $[M_i] = N_i/V_0N_L$, a Equação 5.18 torna-se:

$$\text{Equação 5.19} \quad \sigma = RT[M_i](\alpha - \alpha^{-2})$$

A equação acima descreve bem o comportamento experimental em casos de compressão e pequenos alongamentos de borracha natural.

A razão de alongamento α na Equação 5.19 pode ser escrita em função do alongamento por tensão ε , lembrando que na Lei de Hooke $\varepsilon = \Delta l/l_0$, então $\alpha = 1 + \varepsilon$. Por expansão binomial, temos:

$$\text{Equação 5.20} \quad \alpha^{-2} = (1 + \varepsilon)^{-2} = 1 - 2\varepsilon + \dots$$

Para pequenas deformações, os termos de ordens maiores podem ser desprezados, então a Equação 5.19 se torna:

$$\text{Equação 5.21} \quad \sigma = 3RT[M_i]\varepsilon$$

Lembrando que na Lei de Hooke $\sigma = E\varepsilon$, assim o módulo de elasticidade é:

Equação 5.22
$$E = 3RT[M_i]$$

Pela regra de Poisson, Equação 5.3, para deformação a volume constante, a relação entre o módulo de elasticidade e de cisalhamento é $E = 3G$. Assim, a Equação 5.19 pode ser reescrita como:

Equação 5.23
$$\sigma = G(\alpha - \alpha^{-2})$$

onde $G = RT[M_i]$.

Flory e colaboradores⁴⁷ mostraram que quando um elastômero é reticulado e intumescido de forma que a fração volumétrica do polímero decresça para φ_2 , a Equação 5.19 será:

Equação 5.24
$$\sigma = \frac{\rho_2 RT}{M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{\bar{M}_n} \right) \varphi_2^{1/3} (\alpha - \alpha^{-2})$$

Onde M_c é a massa molar entre retículos, ρ_2 e \bar{M}_n são a densidade e a massa molar média numérica do polímero, respectivamente.

Segundo Peppas N. A. e Merrill, E. W., para o caso no qual o polímero está inicialmente em solução a uma concentração $C_{2,r}$, a versão apropriada da Equação 5.24, conduz a:

Equação 5.25
$$\sigma = RT \frac{C_{2,r}}{M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{M_n} \right) \left(\frac{\varphi_{2,s}}{\varphi_{2,r}} \right)^{1/3} (\alpha - \alpha^{-2})$$

Onde $\varphi_{2,s}$ é fração volumétrica do polímero intumescido ao equilíbrio e $\varphi_{2,r}$ é a fração volumétrica do polímero após a reticulação e antes de intumescido. Substituindo $C_{2,r}$ na Equação 5.25 por $\rho_2 V_2 / V_r$, onde ρ_2 e V_2 são a densidade e o volume do polímero e V_r o volume do gel após a síntese (volume relaxado). Considerando que $V_2/V_r = \varphi_{2,r}$, a Equação 5.25 pode ser reescrita na forma:

Equação 5.26
$$\sigma = \frac{\rho_2 RT}{M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{M_n} \right) \left(\frac{\varphi_{2,r}}{\varphi_{2,s}} \right)^{2/3} \varphi_{2,s} (\alpha - \alpha^{-2})$$

Para hidrogéis sintetizados a partir de polímeros lineares com massa molar média numérica \bar{M}_n a densidade de reticulação ν_e é dada por:

Equação 5.27
$$\nu_e = \frac{\rho_2}{M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{\bar{M}_n} \right)$$

Quando $\bar{M}_n \gg M_c$ ou quando o hidrogel é sintetizado a partir das unidades monoméricas, ν_e se reduz a:

Equação 5.28
$$\nu_e = \frac{\rho_2}{M_c}$$

Assim, incluindo v_e na Equação 5.26 obtemos:

Equação 5.29
$$\sigma = RTv_e \left(\frac{\varphi_{2,r}}{\varphi_{2,s}} \right)^{2/3} \varphi_{2,s} (\alpha - \alpha^{-2})$$

A Equação 5.29 tem sido usada em estudos das propriedades mecânicas de hidrogéis para avaliação da densidade de reticulação e cálculo da massa molar média entre retículos.^{48, 49} Esses parâmetros são importantes na caracterização de hidrogéis pois influenciam nas propriedades de intumescimento dos hidrogéis e no tamanho de poros das redes poliméricas, e conseqüentemente na liberação de fármacos, quando esses hidrogéis são preparados com o objetivo de liberação controlada de fármacos.

5.1.2 Grau de Intumescimento e Cinética de Intumescimento de Hidrogéis

Uma das características marcantes de hidrogéis é sua capacidade de absorver água aumentando em várias vezes o valor de sua massa em relação à massa ou volume do hidrogel seco. Um parâmetro que caracteriza essa capacidade é o grau de intumescimento, com relação ao volume Q_V ou a massa Q_W , calculados a partir de sua massa ou volume secos e intumescidos,^{50, 51} como segue:

Equação 5.30
$$Q_V = \frac{V_I}{V_o}$$

Equação 5.31
$$Q_w = \frac{W_I}{W_o}$$

Os índices V_I e W_I se referem ao volume e a massa do hidrogel intumescido e V_o e W_o aos seus volumes e massa secos, respectivamente. Neste trabalho a caracterização do intumescimento dos hidrogéis foi feita através de Q_w , no entanto foi suprimido o índice w .

Alternativamente para caracterizar a capacidade de absorção de um hidrogel têm se usado o índice de intumescimento S ,⁵² que é a relação da massa de água absorvida pela massa seca do hidrogel, calculado como segue:

Equação 5.32
$$S = \frac{W_I - W_o}{W_o}$$

Esses parâmetros são dependentes da estrutura química dos hidrogéis e das condições ambientes, como pH e temperatura.⁵

O transporte de água e solutos em hidrogéis pode ser descrito pela equação semi-empírica Equação 5.33, que possui contribuição de difusão Fickiana e do relaxamento das cadeias poliméricas.⁵¹

Equação 5.33
$$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^{1/2} + k_2 t$$

Onde M_t e M_∞ são a massa de água absorvida, ou soluto liberado no tempo t e no equilíbrio, respectivamente. k_1 e k_2 são constantes. Ritger, P. L. e Peppas, N. A. sugeriram uma expressão semi-empírica, com a qual é possível descrever o mecanismo de difusão de água ou soluto em dispositivos poliméricos, que depende da geometria do hidrogel.

Equação 5.34
$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Onde k é uma constante característica do sistema de rede macromolecular e do permeante, e n é o expoente difusional, que é indicativo do mecanismo de transporte. A equação é válida até um limite de $\frac{M_t}{M_\infty} \leq 60\%$ e n varia de acordo com a geometria conforme Tabela 5.3.

Tabela 5.3. Dependência do expoente difusional n e do mecanismo difusional com a geometria.

Expoente difusional, n			Dependência do mecanismo difusional
Geometria			
Filmes	Cilindros	Esferas	
0,50	0,45	0,43	Fickiana
$0,50 < n < 1,0$	$0,45 < n < 1,0$	$0,43 < n < 1,0$	Anômalo - contribuição Fickiana e relaxamento macromolecular.
1,0	1,0	1,0	Relaxamento macromolecular

5.1.3 Testes de Citotoxicidade

Testes de citotoxicidade representam a fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações biomédicas, sendo utilizados em uma pré-seleção para detectar se o material em questão provoca morte das células e/ou outros efeitos negativos nas funções celulares.^{53,54} Diferentes métodos têm sido desenvolvidos e padronizados, porém dependendo da especificidade do material, algumas adaptações devem ser feitas para que se possam obter bons resultados da aplicação do teste.^{53,55,56}

Para ser aprovado em um teste de citotoxicidade *in vitro*, um material não deve causar a morte das células nem afetar as funções celulares. Assim sendo, com o uso de técnicas de cultura de células, os testes podem detectar se ocorre a lise (rompimento da parede celular) das células, a inibição do crescimento celular e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material em teste e/ou extrato oriundo desse material.^{53,57}

Entre os protocolos padrões já estabelecidos para os testes de citotoxicidade, podem ser citados:^{53,58}

- ASTM F-813-01 - Prática padrão para avaliação de materiais para dispositivos médicos por contato direto de cultura de células.

- ASTM F-813-83 - Método de contato direto para avaliação de materiais e dispositivos médicos frente à cultura de células;
- ASTM F-895-84 - Método de difusão em ágar de cultura de células para seleção de materiais por citotoxicidade;
- ISO 10993-5 - Avaliação biológica de dispositivos médicos - Parte 5: Testes para citotoxicidade : métodos *in vitro*.

Normalmente, utilizam-se nestes testes células de linhagens bem estabelecidas, devido à facilidade de obtenção e manutenção em laboratório. As linhagens celulares mais recomendadas para testes de citotoxicidade são: NTC clone 929; Balb/3T3 clone A31; MRC-5 a WI-38; VERO; BHK-21 e a V-79. Além destas, podem ser utilizadas outras linhagens se for possível demonstrar que os resultados obtidos são semelhantes.

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita, entre outras, pela análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, de atividade biossintética.

Além de aspectos referentes ao procedimento, os padrões normalmente especificam a linhagem celular, o meio de cultura, as técnicas para avaliação da citotoxicidade e os materiais a serem utilizados como controle positivo e negativo.^{53,57}

Controle positivo é uma substância que apresenta efeito citotóxico, enquanto que controle negativo é um material ou substância que não produza efeito citotóxico.

Nesta etapa do trabalho foram preparados hidrogéis a partir dos PVA-MAs com graus de substituição nominal obtidos da razão molar $[-OH(PVA)/GMA]$ 2,5%, 3,5% e 5,0% e hidrogéis com esses mesmos graus de substituição associados com sulfato de condroitina por redes semi-interpenetradas (semi-IPN). Os hidrogéis obtidos foram caracterizados por medidas do intumescimento em água deionizada e pela cinética de intumescimento em fluídos de simulação gástrica e intestinal. Também foram estudadas as propriedades mecânicas dos hidrogéis por medidas de compressão, das quais foram calculados os módulos de elasticidade (E); de cisalhamento (G); e as respectivas densidades de reticulação (ν_e) e massas molares entre retículos (M_c). Os hidrogéis assim obtidos foram também avaliados com relação à citotoxicidade *in vitro* por metodologia de crescimento de células.

5.2 EXPERIMENTAL

5.2.1 Materiais e Equipamentos

Poli(álcool vinílico), PVA, M_w nominal 13-23 kg Mol⁻¹, Aldrich: 34840-6; metacrilato de glicidila, GMA, Acros: 16589;

N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina, TEMED, Aldrich: 2,250-0; álcool etílico PA, Synth; dimetilsulfóxido (DMSO) PA, Synth; persulfato de sódio, Aldrich: 21,623-2; sulfato de condroitina, Solabia; meio de cultura DMEM (Minimum Essential Medium), GIBCO - Invitrogen; Azul de Tripán.

Bomba de alto vácuo Edwards RV5; banho termostaticado Julabo VL4; Estufa a vácuo Fanem modelo 099EV; Texturômetro marca Texture Analyser modelo TA.XT2i; Tubos de Leighton; Estufa micro-biológica, Fanem; Câmara de Neubauer, microscópio eletrônico de varredura Shimadzu, modelo SS-550 Superscan.

5.2.2 Procedimentos Experimentais

O PVA e o glicosaminoglicano sulfato de condroitina foram caracterizados segundo suas massa molares.

As massas molares M_w e M_n do PVA foram determinadas por cromatografia de exclusão em gel usando uma coluna linear Ultra-hydrogel acoplada a um aparelho HPLC Shimadzu com detector de índice de refração. Foi usado solução aquosa de NaNO_3 0,1 M como solvente e manteve-se um fluxo de $0,5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Pullulan da Sorex Denko foi usado como padrão. O PVA apresentou massas molares $M_w = 23,4 \text{ kg Mol}^{-1}$ e $M_n = 11,3 \text{ kg Mol}^{-1}$, com $M_w/M_n = 2,07$.

A massa molar do SC foi determinada por viscosimetria de solução diluída a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ usando a equação de Mark-Houwink-Sakurada

$[\eta]=kM^a$. A força iônica da solução foi mantida constante em 0,2 M e os valores de k e a usados foram de 5×10^{-6} e 1,14, respectivamente, conforme descrito por Sipos, P. e colaboradores.⁵⁹ O valor da massa molar média viscosimétrica, M_v foi de 19,9 kg Mol⁻¹.

5.2.2.1 Modificação do PVA

Poli(álcool vinílico) foi modificado utilizando as condições experimentais otimizadas, 62 °C e 6 h de reação, conforme item 4.2.2.2 desta tese, para se obter PVA-Ma com graus de substituição nominais de 2,5%, 3,5% e 5,0% (mols de GMA em relação à quantidade de grupos OH no PVA). A precipitação e secagem do PVA-Ma foram as mesmas usadas no item 3.2.2.1.

5.2.2.2 Síntese dos Hidrogéis de PVA-Ma

Hidrogéis foram preparados a partir de solução aquosa a 10% m/v dos PVA-Mas com graus de substituição nominal 2,5%, 3,5% e 5,0% na forma de membranas com 3 mm de espessura ou na forma cilíndrica com diâmetros de aproximadamente 10 e 15 mm. Adicionou-se 0,04 mL de TEMED 0,57 mol/L para cada 10 mL de solução de PVA-Ma. As soluções foram purgadas com N₂ por 15 min, sob agitação. Após a adição de 0,05 mL de Na₂S₂O₈ 0,2 g/mL, sob forte agitação, acondicionou-se rapidamente a solução resultante entre

placas de acrílico com espaçadores de borracha de 3 mm de espessura (para obtenção de membranas) ou em seringas de 5 e 10 mL (para obtenção de cilindros), e deixou-se em repouso por 24 horas para reticulação.

5.2.2.3 Síntese dos Hidrogéis de PVA-Ma com Sulfato de Condroitina (SC)

Foram preparados hidrogéis, na forma de membranas e na forma de cilindros, de PVA-Ma/SC a partir dos PVA-Mas com graus de substituição nominal de 2,5%, 3,5% e 5,0% mantendo-se uma proporção 10, 20 e 33 % de SC em relação à massa total (PVA-Ma + SC). Foram dissolvidos 2,5 g do respectivo PVA-Ma em 18 mL água destilada e foram adicionados 7 mL de uma solução contendo 0,1389 g, 0,625 g ou 1,25 g de SC. Foi adicionado 0,2 mL de TEMED 0,57 mol/L. As soluções foram purgadas com N₂ por 15 min sob agitação. Após a adição de 0,15 mL de Na₂S₂O₈ 0,2g/mL seguiu-se os mesmos procedimentos descritos no item 5.2.2.2. Também foram preparados hidrogéis de PVA-Ma com GS nominal 2,5%, 3,5% e 5,0% sem SC, utilizando procedimento análogo ao descrito anteriormente.

5.2.2.4 Determinação do Grau de Intumescimento

O grau de intumescimento, Q , a 25 °C em água deionizada foi calculado como sendo a razão da massa do hidrogel intumescido

por 48 horas (no equilíbrio) pela massa do hidrogel seco. Foi determinada a massa de cada hidrogel seco. A secagem foi feita inicialmente em estufa a 40 °C durante 48 h. Após, os hidrogéis foram mantidos sob pressão reduzida pela bomba de alto vácuo e nas mesmas condições de temperatura durante aproximadamente 72 h, até massa constante.

5.2.2.5 Medidas de Cinética de Intumescimento em Fluido de Simulação Gástrica (FSG) e em Fluido de Simulação Intestinal (FSI).

A cinética de intumescimento dos hidrogéis foi determinada em fluido de simulação gástrica (FSG), pH 1,2 ± 0,1, e em fluido de simulação intestinal (FSI), pH 7,5 ± 0,1, segundo farmacopéia americana USP,⁶⁰ mas sem a adição de enzimas. Hidrogéis na forma de cilindros, com aproximadamente 15 mm de diâmetro, foram cortados em pedaços com 15 mm de altura e secos até massa constante, conforme descrito no item 5.2.2.4. Os hidrogéis foram colocados em recipientes contendo 50 mL dos fluídos FSG ou FSI a 37°C, e suas massas foram determinadas em intervalos de tempo, a partir de 5 min de intumescimento até massa constante. A cinética de intumescimento foi avaliada por meio da equação 5.35, descrita anteriormente.

Equação 5.35
$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Onde M_t é a massa de solução absorvida no tempo t e M_∞ a massa absorvida no equilíbrio. Os valores de k e n foram determi-

nados por meio de gráfico de $\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right)$ versus $\ln t$, conforme Equação 5.35.

Equação 5.35
$$\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \ln k + n \ln t$$

5.2.2.6 Determinação das Propriedades Mecânicas dos Hidrogéis e da Massa Molar entre Reticúlos

As propriedades mecânicas dos hidrogéis de PVA-Ma e de PVA-Ma/SC foram analisadas medindo-se a força de compressão com relação à deformação da membrana do hidrogel, usando uma taxa de deformação de 0,2 mm/s por uma sonda de 12,7 mm de diâmetro.

O módulo G foi obtido por meio da Equação 5.36 usando a porção linear inicial das curvas de σ versus $(\alpha - \alpha^{-2})$ onde a razão de deformação $\alpha = \left(2 - \frac{l}{l_0}\right) < 1,10$.

Equação 5.36
$$G = \frac{\sigma}{(\alpha - \alpha^{-2})} = RTv_e \left(\frac{\varphi_{2,r}}{\varphi_{2,s}}\right)^{2/3} \varphi_{2,s}$$

A densidade de reticulação, v_e , e massa molar entre os retículos, M_c , dos hidrogéis de PVA-Ma sem a adição de sulfato de condroitina, foram obtidas a partir dos valores do módulo G, por meio da Equação 5.37 e Equação 5.38.

Equação 5.37

$$v_e = G / RT \left(\frac{\phi_{2,r}}{\phi_{2,s}} \right)^{2/3} \phi_{2,s}$$

Equação 5.38

$$M_c = \frac{\rho_2}{\left(v_e + \frac{2\rho_2}{M_n} \right)}$$

Os valores de $\phi_{2,s}$ e $\phi_{2,r}$ foram calculados por meio da Equação 5.39 e Equação 5.40, respectivamente:

Equação 5.39

$$\phi_{2,s} = \frac{V_0}{V_I} = \frac{W_0 / \rho_2}{W_0 / \rho_2 + (W_I - W_0) / \rho_{H_2O}}$$

Equação 5.40

$$\phi_{2,r} = \frac{V_0}{V_R} = \frac{W_0 / \rho_2}{W_0 / \rho_2 + (W_R - W_0) / \rho_{H_2O}}$$

V_0 e V_I são os volumes do hidrogel seco e intumescido, respectivamente. V_R é o volume do hidrogel no estado relaxado (logo após a síntese). W_0 é a massa do hidrogel seco e W_R e W_I são as massas do hidrogel no estado relaxado (logo após a síntese) e após intumescido, respectivamente. A densidade do hidrogel seco, ρ_2 foi considerada com sendo igual a densidade do PVA atático, 1,269 g/cm³.⁴⁹

5.2.2.7 Propriedades morfológicas dos hidrogéis

Hidrogéis sintetizados como descrito anteriormente foram imersas em água a temperatura ambiente, durante 48 h. Após esse período, as amostras foram removidas e em seguida foram congela-

das mergulhando-as em nitrogênio líquido. Os hidrogéis congelados foram liofilizados durante 24 h com temperatura de -55 °C. Micrografias dos hidrogéis de PVA-Ma e de PVA-Ma/SC (com 10 e 20% de SC) foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura Shimadzu modelo SS 550 operando em 8 keV. Todas as micrografias foram obtidas das superfícies de fratura, recobertas com ouro, dos hidrogéis liofilizados.

5.2.2.8 Avaliação da Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade foi realizada conforme procedimentos citados por Malmonge, S. M. e colaboradores⁵³ e descritos na norma ASTM-F813-01.⁵⁸

As amostras de hidrogéis cilíndricos, preparados em seringas de 5 mL, e os controles utilizados (silicone e placa de polietileno) foram cortados na forma de discos com 10 mm de diâmetro e 2 mm de espessura. Os hidrogéis foram deixados em água deionizada por 48 h com troca da água a cada 6 h antes de serem testados. Os hidrogéis e os controles foram esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 min. Como controle positivo foi utilizado discos de silicone e como controle negativo fragmentos de placas de meio de cultura de polietileno de alta densidade. Cada amostra foi colocada sobre uma lamínula de vidro no interior do tubo de Leighton e mantida em meio DMEM, com 10 % de soro fetal bovino

(SFB) por 24 h a 37 °C com 5 % de CO₂, antes de serem inoculadas.

Aliquotas de 1 mL de células de linhagem VERO a uma concentração de 10⁵ células ml⁻¹ foram inoculadas nos tubos de Leighton, cultivadas em meio DMEM com 10 % SFB. Os tubos foram mantidos durante 48 h a 37 °C em ambiente com 5 % CO₂, em volume. Após o período de incubação, os meios de cultura de cada frasco foram coletados, diluídos 1:1 em solução de azul de Tripán 0,1% em salina 0,9% . As células não viáveis presentes no meio de cultura foram contadas em câmara de Neubauer.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os hidrogéis obtidos tiveram aparência opaca. Os hidrogéis de PVA-Ma com 33 % da massa total em SC, preparados na forma de membranas e de cilindros, não foram testados com respeito às suas propriedades mecânicas e à cinética de intumescimento. Esses hidrogéis, quando na forma de membranas, apresentaram-se irregulares e com muitas bolhas, devido à viscosidade da solução na qual os hidrogéis foram sintetizados. Nos experimentos de cinética de intumescimento, feitas a partir dos hidrogéis secos na forma de cilindro, esses hidrogéis também apresentaram propriedades mecânicas pobres, partindo-se facilmente durante os ensaios.

5.3.1 Caracterização dos Hidrogéis

5.3.1.1 Grau de Intumescimento

Na Figura 5.1 são apresentados os gráficos de grau de intumescimento, Q , determinados em água deionizada a 25 °C, para os hidrogéis de PVA-Mas com valores de GS nominais 2,5%, 3,5% e 5,0% e PVA-Ma/SC com 10, 20 e 33% de SC, em função do tempo de imersão. Os valores dos erros experimentais foram obtidos de medidas feitas em duplicatas. Pode-se verificar que os hidrogéis atingem o equilíbrio de intumescimento em 48 h.

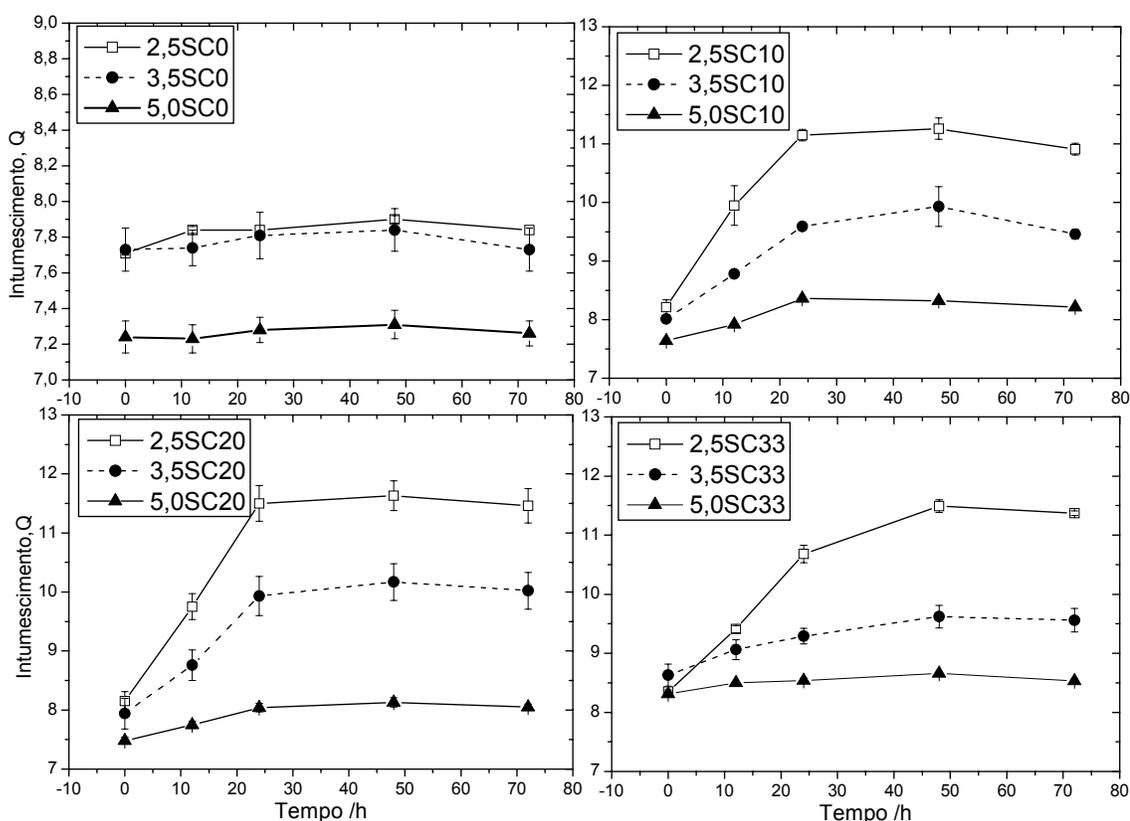


Figura 5.1 Gráficos de intumescimento, Q , em função do tempo para os hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC com valores de graus de substituição nominal do PVA-Ma de 2,5%, 3,5% e 5,0% com 0, 10, 20 e 33% de SC, medidos a partir do hidrogel relaxado em água deionizada a 25C.

Na Tabela 5.4 são apresentados os valores de graus de intumescimento no equilíbrio, 48 h, para aqueles hidrogéis e seus respectivos erros experimentais.

Tabela 5.4. Valores de graus de intumescimento, Q no equilíbrio (48h), e seus erros^a, para os hidrogéis de PVA-Ma com graus de substituição nominal de 2,5%, 3,5% e 5,0% com 0, 10, 20 e 33% de sulfato de condroitina (SC), medidos em água deionizada a 25°C.

GS /%	GRAUS DE INTUMESCIMENTO, Q			
	SC 0%	SC 10%	SC 20%	SC 33%
2,5	7,90 ± 0,02	11,26 ± 0,18	11,63 ± 0,25	11,49 ± 0,11
3,5	7,84 ± 0,12	9,93 ± 0,34	10,17 ± 0,31	9,62 ± 0,19
5,0	7,31 ± 0,08	8,32 ± 0,01	8,13 ± 0,08	8,66 ± 0,02

^a erros padrão determinados de replicatas com n=2.

Na Figura 5.2 é apresentado o gráfico do grau de intumescimento em função dos valores nominais de GS para os hidrogéis de PVA-Mas com 0, 10, 20 e 33 % de SC, referentes aos dados da Tabela 5.4.

Pode ser observado pelo gráfico da Figura 5.2 que o grau de intumescimento diminui com o aumento do grau de substituição dos hidrogéis. Isto se deve à maior densidade de reticulação das cadeias devido ao aumento de insaturações presentes no PVA-Ma precursor, capazes de formar retículos no processo de gelificação. Este efeito é menos acentuado nos hidrogéis sem a adição de SC. Com a adição de sulfato de condroitina, há um aumento no grau de intumescimento dos hidrogéis devido, provavelmente, à grande hidrofiliabilidade do SC, característica dos glicosaminoglicanos presentes nas proteoglicanas, constituinte das matri-

zes extracelulares das células e dos tecidos conjuntivos, que têm grande capacidade de reterem água.^{27,28}

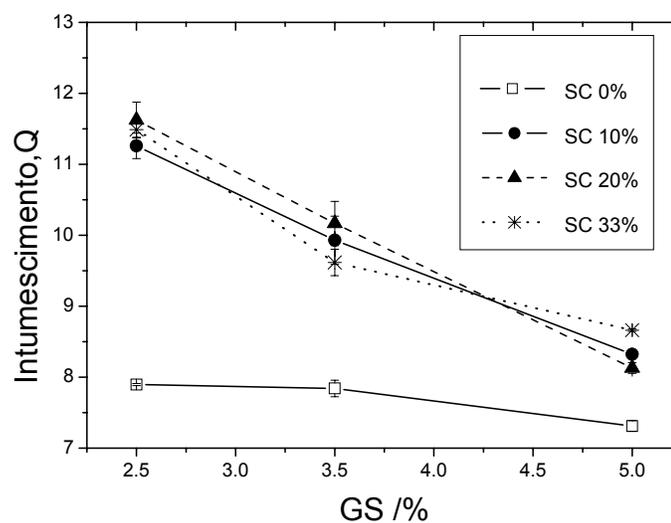


Figura 5.2. Grau de intumescimento Q em função do grau de substituição nominal dos hidrogéis de PVA-Ma com 0, 10, 20 e 33 % de SC, referentes ao dados da Tabela 5.4.

Não há diferença significativa no grau de intumescimento para os hidrogéis de mesmo valor de GS e com conteúdos de SC entre 10 a 33 %. O efeito do SC no valor de Q desses hidrogéis é governado pela mobilidade das cadeias de PVA/Ma. Em hidrogéis com menor GS as cadeias de PVA-Ma possuem maior mobilidade, o que permite maior absorção de água.

Com o aumento de GS do PVA-Ma, conseqüentemente maior densidade de reticulação dos respectivos hidrogéis, a mobilidade das cadeias poliméricas diminui, reduzindo a capacidade absorção de

água pelo hidrogel. Pela análise das curvas da Figura 5.2 pode-se inferir que hidrogéis de PVA-Ma/SC altamente reticulados possuem grau de intumescimento muito próximos dos respectivos hidrogéis de PVA-Ma. Em hidrogéis de PVA-Ma altamente reticulados o efeito da hidrofiliabilidade do SC é significativamente minimizado.

5.3.1.2 Propriedades Mecânicas dos Hidrogéis

Nas Figuras 5,3, 5.4 e 5.5 são apresentados os gráficos de tensão de compressão (σ) em função de $(\alpha - \alpha^{-2})$ para $\alpha < 1,10$. As medidas foram feitas a 25 °C após 48 h de intumescimento, tempo necessário para atingir o equilíbrio. As curvas da Figura 5.3 são referentes aos hidrogéis de PVA-Ma com GS nominal 2,5, 3,5 e 5,0 % e as curvas das Figuras 5.4 e 5.5 são referentes aos hidrogéis com estes mesmos valores de GS, porém com 10 e 20 % de SC (em massa). As curvas das Figuras 5.3 a 5.5 são lineares. Isto indica que no intervalo de α estudado a deformação plástica, se houve, é não significativa. Assim, os módulos de cisalhamento G dos hidrogéis foram obtidos das inclinações das curvas das Figuras 5.3 a 5.5, conforme Equação 5.36.

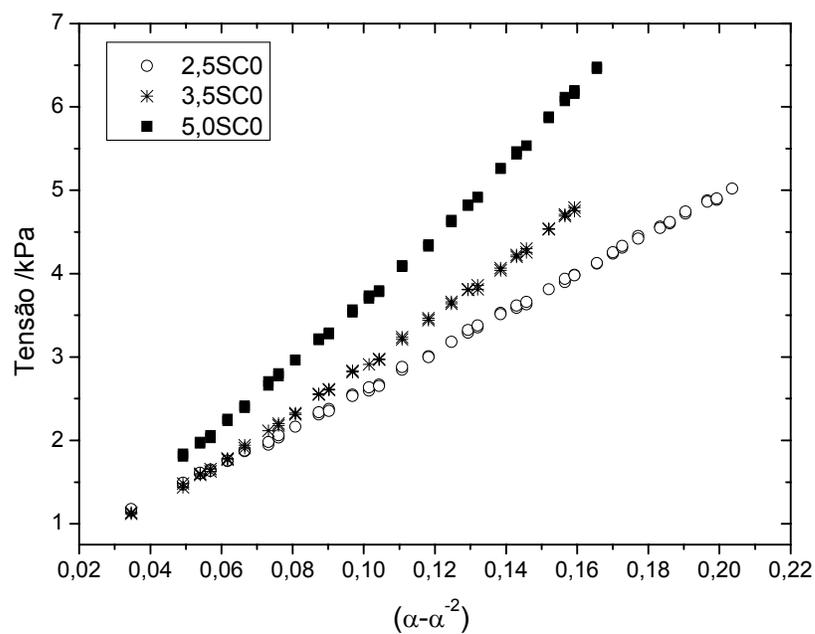


Figura 5.3. Gráfico de Tensão em função de $(\alpha - \alpha^2)$ das membranas dos hidrogéis de PVA-Ma sem adição de sulfato de condroitina.

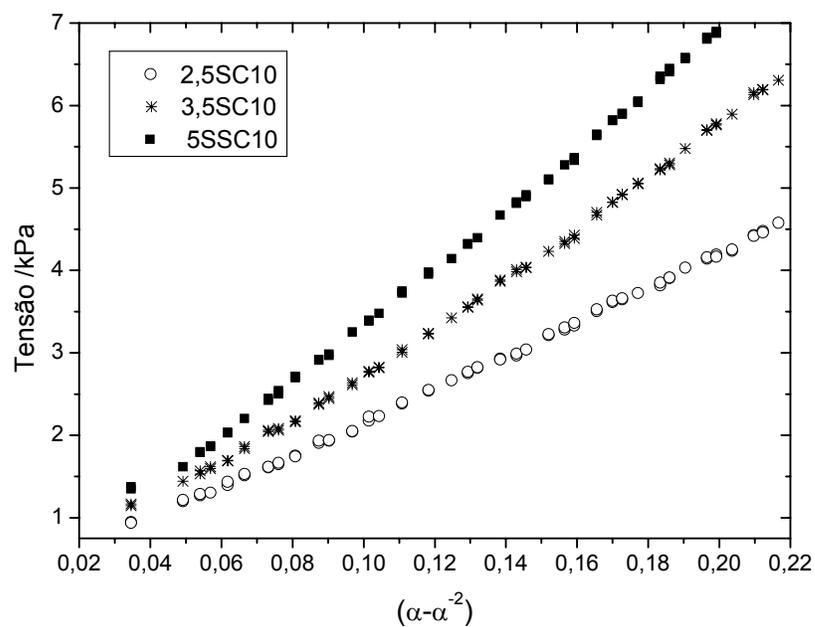


Figura 5.4. Gráfico de tensão em função de $(\alpha - \alpha^2)$ das membranas dos hidrogéis de PVA-Ma/SC com adição 10% de sulfato de condroitina.

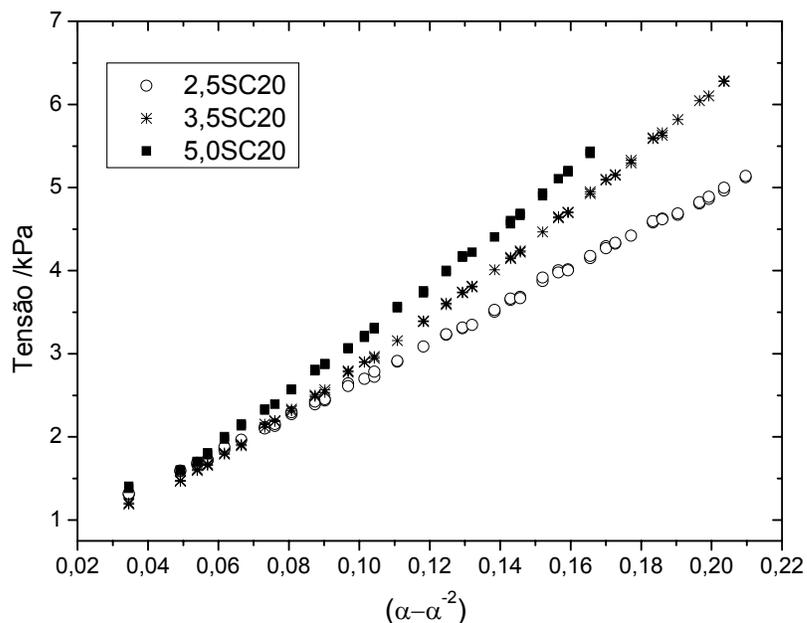


Figura 5.5. Gráfico de tensão em função de $(\alpha - \alpha^2)$ das membranas dos hidrogéis de PVA-Ma/SC com adição 20% de sulfato de condroitina.

Na Tabela 5.5 são apresentados os módulos de elasticidade E , calculados a partir do módulo G , considerando o valor do módulo de elasticidade como sendo $E = 3G$, conforme discutido na seção 5.1.1.2. Os erros experimentais foram obtidos de medidas em duplicatas de membranas distintas. Os valores do módulo de elasticidade variam de 63 a 126 kPa. Peppas N. A. e Merrill, E. W. obtiveram valores para E nesta mesma ordem de grandeza para hidrogéis de PVA obtidos por radiação de solução aquosa, a 10 %, por feixe de elétrons. Os valores obtidos por esses autores variam de 31 a 340 kPa e são dependentes da intensidade da radiação.

Tabela 5.5 Valores dos módulos de elasticidade, e seus erros^a, das membranas dos hidrogéis de PVA-Ma com graus de substituição nominal de 2,5, 3,5 e 5,0% e PVA-Ma/SC com adição de 10 e 20% de sulfato de condroitina.

GS / %	Módulo de Elasticidade, E / kPa		
	SC0%	SC10%	SC20%
2,5	70,80±4,86	63,11±5,00	68,79±2,61
3,5	89,85±0,95	80,10±5,84	75,78±0,93
5,0	126,58±7,78	97,99±1,91	96,19±2,00

^a erros padrão determinados de replicatas com n=2.

Na Figura 5.6, é apresentado o gráfico do módulo de elasticidade em função de GS nominal do PVA-Ma para os hidrogéis, referentes aos dados da Tabela 5.5.

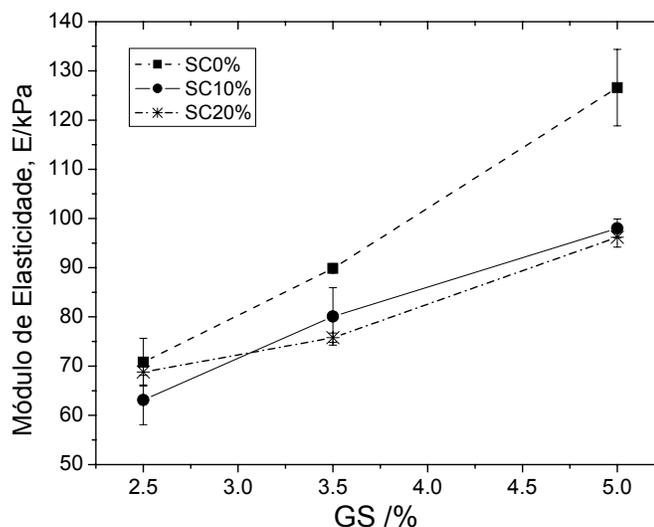


Figura 5.6. Gráfico do módulo de elasticidade E em função do grau de substituição nominal para as membranas dos hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC, referentes aos dados da Tabela 5.5.

Pode-se observar que o valor do módulo de elasticidade aumenta com o acréscimo de GS do PVA-Ma, sendo maiores para os hidro-

géis sem a adição de SC. Isto está de acordo com os dados de intumescimento dos hidrogéis no equilíbrio, apresentados na Tabela 5.4 e na Figura 5.2, onde pode ser visto que os hidrogéis sem SC apresentam os menores valores de Q . Os hidrogéis de PVA-Ma/SC apresentaram maiores valores de Q se comparados aos respectivos hidrogéis de PVA-Ma e, portanto, absorveram mais água. Estes possuem módulos de elasticidade menores que os hidrogéis de PVA-Ma. Comparando as curva de Q versus GS da Figura 5.2 com a curva de E versus GS da Figura 5.6 nota-se que a modificação química do PVA-Ma não afeta acentuadamente a hidrofiliabilidade do PVA (se $2,5 < GS < 5,0$) quanto afeta o valor de E . Conforme dados da Tabela 5.5, E aumenta em cerca de 80 % se GS varia de 2,5 para 5,0% ao passo que o valor de Q decresce cerca de 7 % para esta variação de GS . Fazendo as mesmas comparações para os hidrogéis de PVA-Ma/SC observa-se que GS afeta positivamente o valor de E e negativamente o valor de Q . Nesses hidrogéis, o efeito de GS no valor de Q é, como já enfatizado, devido à mobilidade das cadeias poliméricas que é governado pela densidade de reticulação.

A densidade de reticulação, ν_e , foi calculada por meio da equação 5.38 e a massa molar entre retículos, M_c , por meio da equação 5.39. Na Tabela 5.6 são apresentados os valores de ν_e e de M_c para os hidrogéis de PVA-Ma. Também são apresentados nessa tabela os dados referentes às frações volumétricas do polímero

no hidrogel relaxado e intumescido, $\phi_{2,r}$ e $\phi_{2,s}$ respectivamente, e seus respectivos valores de módulo G. Não foram calculados ν_e e de M_c para os hidrogéis de PVA-Ma/SC.

Na Figura 5.7 é apresentada a dependência de ν_e com GS. Pode ser observado que ν_e aumenta linearmente com GS, o que é um comportamento esperado. Extrapolando a curva da Figura 5.7 para $GS = 0$, tem-se o valor da contribuição dos entrelaçamentos das cadeias poliméricas para a densidade de reticulação, ν_e^0 . O valor desse parâmetro é cerca de $30,5 \text{ mol/m}^3$. Os entrelaçamentos contribuem positivamente no valor de E e, por conseguinte, para as propriedades mecânicas dos hidrogéis.³²

Tabela 5.6. Valores de densidade de reticulação, ν_e , massa molar entre retículos, M_c , módulo G e frações volumétricas, $\phi_{2,r}$ e $\phi_{2,s}$, e seus erros^a, em função do grau de substituição nominal do PVA-Ma para os hidrogéis de PVA-Ma sem adição de sulfato de condroitina.

HIDROGEL	$\phi_{2,r}$	$\phi_{2,s}$	G /kPa	ν_e /mol.m ⁻³	M_c /g.mol ⁻¹
2,5SC0	0,1051	0,1026	23,60	91,4	4590
	±0,0002	±0,0003	±1,62	±6,3	±104
3,5SC0	0,1049	0,1033	29,95	115,9	4214
	±0,0017	±0,0016	±0,32	±3,0	±43
5,0SC0	0,1122	0,1110	42,19	152,4	3762
	±0,0015	±0,0012	±2,59	±11,2	±125

^a erros padrão determinados de replicatas com n=2.

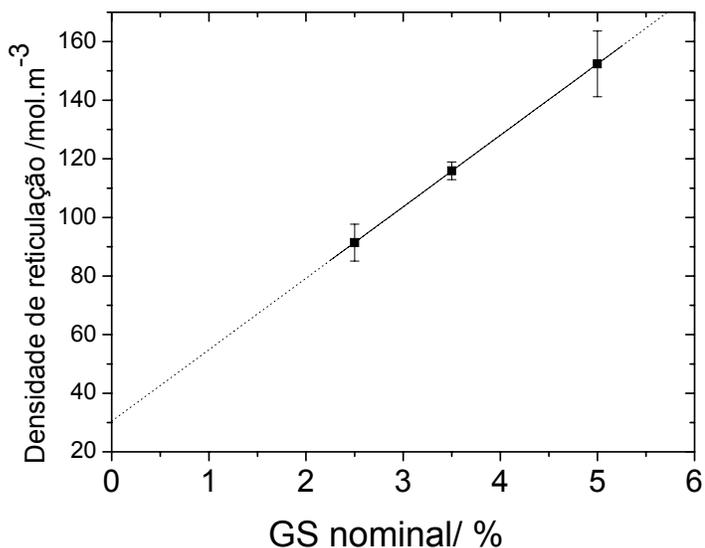


Figura 5.7. Gráfico da densidade de reticulação, v_e , em função do grau de substituição d PVA-Ma para membranas dos hidrogéis sem adição de sulfato de condroitina.

5.3.1.3 Cinética de Intumescimento

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 são apresentados os gráficos de Q em função do tempo, em horas, obtidos em fluido de simulação gástrica (FSG), pH 1,2, a partir dos hidrogéis secos. Observa-se nos gráficos que os valores de Q dos hidrogéis de PVA-Ma e de PVA-Ma/SC praticamente não variam para GS 2,5 e 3,5 %, mas diminuem se GS aumenta de 3,5 para 5,0 %. Comparando os valores de Q obtidos para os hidrogéis de PVA-Ma e para PVA-Ma/SC neste fluido, mantendo fixo o valor de GS, verifica-se um efeito negativo da presença do SC no intumescimento. Esse efeito é contrário ao observado em água destilada, onde Q foi medido a partir dos hidrogéis no estado relaxado.

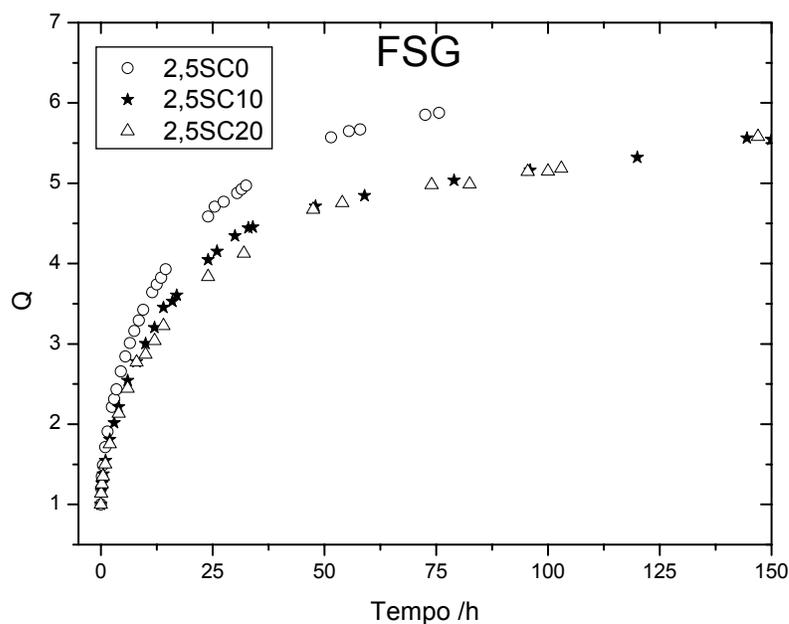


Figura 5.8 Gráfico do grau de intumescimento Q em função do tempo em horas para os hidro-géis de PVA-Ma/SC com grau de substituição de 2,5% com 0, 10 e 20% de sulfato de condroitina, em fluido de simulação gástrica.

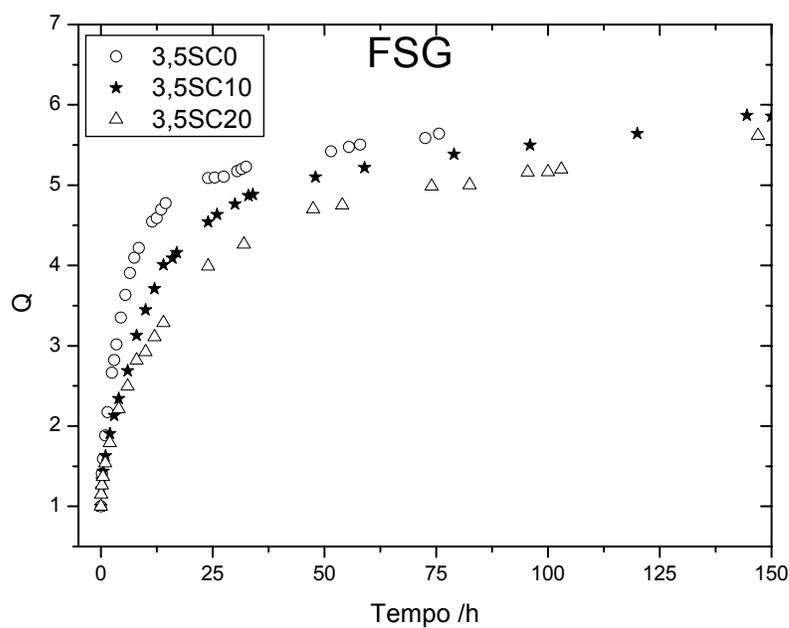


Figura 5.9 Gráfico do grau de intumescimento Q em função do tempo em horas para os hidro-géis de PVA-Ma/SC com grau de substituição nominal de 3,5% com 0, 10 e 20% de sulfato de condroitina, em fluido de simulação gástrica.

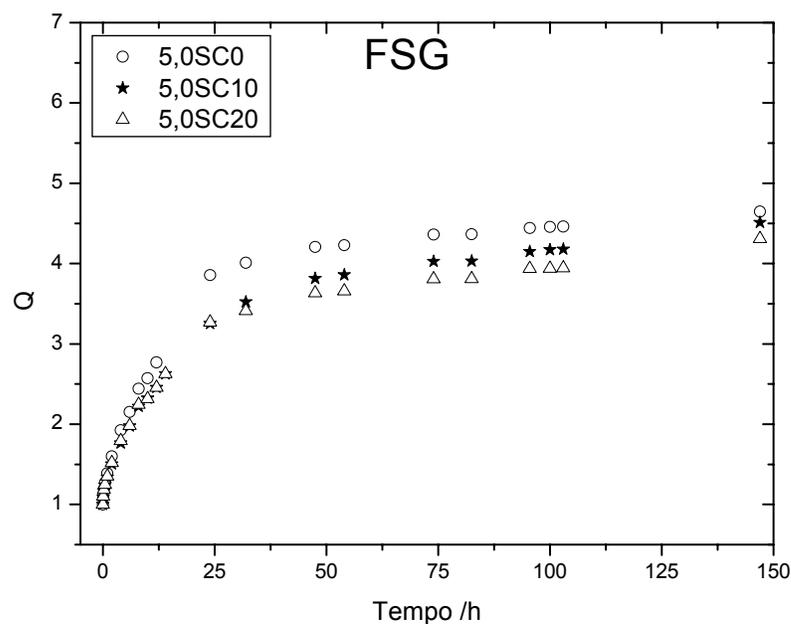


Figura 5.10 Gráfico do grau de intumescimento Q em função do tempo em horas para os hidrogéis de PVA-Ma/SC com grau de substituição de 5,0% com 0, 10 e 20% de sulfato de condroitina, em fluido de simulação gástrica.

Isto pode ser explicado com base na presença dos grupamentos carboxílicos e sulfatos do SC. Em pH ácido, esses grupamentos tendem a permanecer protonados, diminuindo a quantidade de espécies carregadas. As repulsões entre as espécies carregadas, por sua vez, contribuem para o aumento do grau de intumescimento. Esta é uma característica de hidrogéis iônicos.⁶¹

Nas figuras 5.11, 5.12 e 5.13 apresentados os gráficos do grau de intumescimento, Q , em função do tempo, em horas, obtidos em fluido de simulação intestinal (FSI), pH 7,5, a partir dos hidrogéis secos. Para os hidrogéis de PVA-Ma e de PVA-MA/SC em

FSI, o grau de intumescimento diminui quando GS aumenta de 2,5 para 5,0 %.

Ao contrário do comportamento em FSG, pH 1,2, em que os grupos carboxílicos e sulfatos tendem a permanecer protonados, em FSI, pH 7,5, esses grupos estarão parcial ou totalmente carregados, o que deveria contribuir para o aumento do intumescimento. Na verdade o efeito observado é exatamente o oposto: há evidente decréscimo nos valores de Q no equilíbrio, principalmente para os hidrogéis de PVA-Ma/SC com GS 2,5 e 5,0 % se comparados com os respectivos hidrogéis de PVA-Ma.

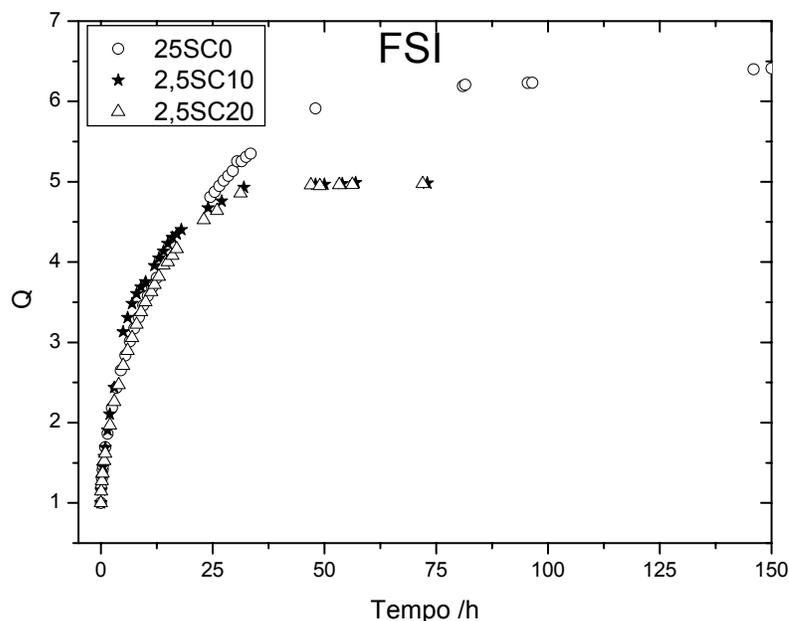


Figura 5.11 Gráfico do grau de intumescimento Q em função do tempo em horas para os hidrogéis de PVA-Ma/SC com grau de substituição de 2,5% com 0, 10 e 20% de sulfato de condroitina, em fluido de simulação intestinal.

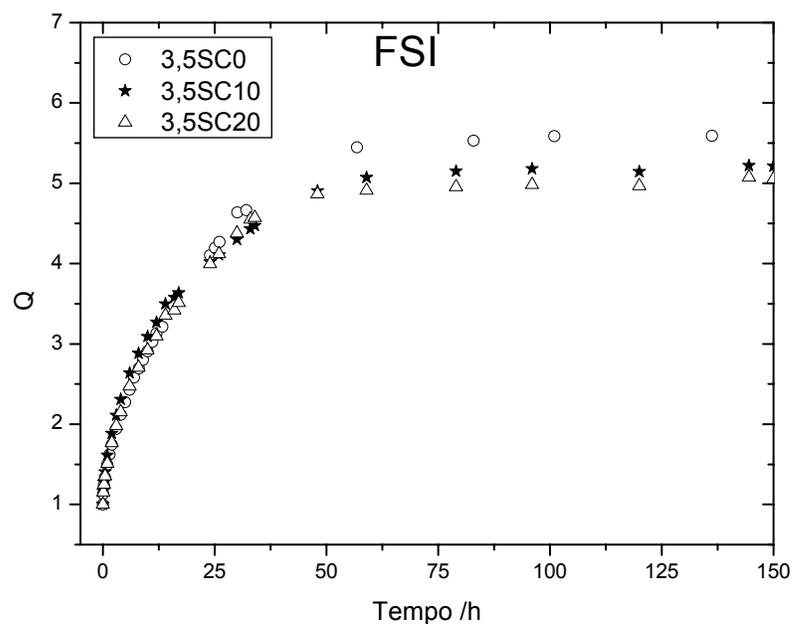


Figura 5.12 Gráfico do grau de intumescimento Q em função do tempo em horas para os hidro-géis de PVA-Ma/SC com grau de substituição de 3,5% com 0, 10 e 20% de sulfato de condroitina, em fluido de simulação intestinal.

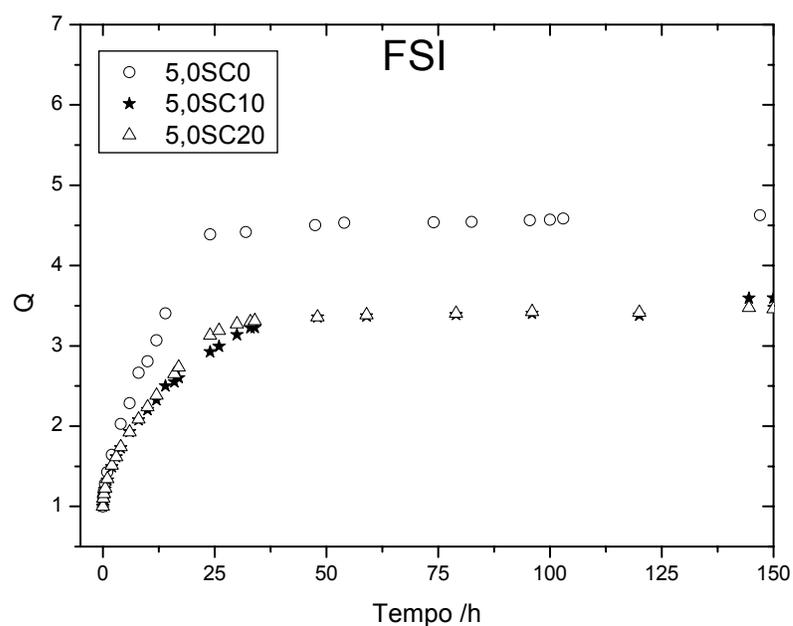


Figura 5.13 Gráfico do grau de intumescimento Q em função do tempo em horas para os hidro-géis de PVA-Ma/SC com grau de substituição de 5,0% com 0, 10 e 20% de sulfato de condroitina, em fluido de simulação intestinal.

Uma explicação para isso seria a perda de massa durante o período de intumescimento devido a possível saída de sulfato de condroitina para o exterior do hidrogel, pelo fato deste não estar quimicamente ligado à rede polimérica de PVA-Ma. Este fato ainda está em investigação. Deve ser enfatizado que os hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC não apresentaram sinal aparente de degradação nos tempos de intumescimento estudados tanto em FSG quanto em FSI

Nas Tabelas 5.7 e 5.8 são apresentados os valores dos parâmetros cinéticos k e n , avaliados conforme Equação 5.34. Estes parâmetros foram obtidos por meio de gráficos de $\ln\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right)$ em função de $\ln t$, conforme Equação 5.35, para hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC com GS nominal 2,5, 3,5 e 5,0 % em FSG e FSI.

Tabela 5.7. Valores de k e n das medidas de cinética de intumescimento, e seus erros^a, para os hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC, obtidos em fluido de simulação gástrica.

GS /%	Parâmetros cinéticos - FSG					
	SC 0%		SC 10%		SC 20%	
	$k / 10^{-1}$	n	$k / 10^{-1}$	n	$k / 10^{-1}$	n
2,5	1,50	0,535	1,16	0,567	1,22	0,552
	±*	±*	±0,10	±0,001	±0,13	±0,004
3,5	1,69	0,593	1,19	0,572	1,25	0,546
	±0,56	±0,024	±*	±*	±0,09	±0,005
5,0	1,18	0,581	1,19	0,563	1,29	0,554
	±0,09	±0,004	±0,23	±0,002	0,26	±0,010

^a erros padrão determinados de replicatas com $n=2$.

* erros não determinados por problemas experimentais.

Tabela 5.8. Valores de k e n das medidas de cinética de intumescimento, e seus erros^a, para os hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC, obtidos em Fluido de simulação Intestinal.

GS /%	Parâmetros cinéticos - FSI					
	SC 0%		SC 10%		SC 20%	
	k /10 ⁻¹	n	k /10 ⁻¹	n	k /10 ⁻¹	n
2,5	1,33	0,560	1,55	0,589	1,39	0,582
	±*	±*	±0,26	±0,039	±0,21	±0,016
3,5	1,11	0,558	1,36	0,553	1,32	0,578
	±0,01	±0,008	±0,01	±0,002	±0,11	±0,010
5,0	1,47	0,616	1,39	0,572	1,43	0,585
	±0,24	±0,023	±0,16	±0,004	±0,14	±0,010

^a erros padrão determinados de replicatas com n=2.

* erros não determinados por problemas experimentais

Pode ser observado que os valores de n situam-se entre 0,535 e 0,593 para os hidrogéis intumescidos em FSG. Para hidrogéis intumescidos em FSI tais valores situam-se entre 0,553 e 0,616. Segundo Peppas, N. A, e Ritger, L. R., para hidrogel na forma de cilindro, valores de n entre 0,45 e 1,0 indicam que o mecanismo de absorção de água pelo hidrogel é do tipo anômalo, ou seja, possui, ao mesmo tempo, contribuições de difusão fickiana e do relaxamento das cadeias poliméricas.

5.3.1.4 Análise Morfológica dos Hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

Nas Figuras 5,14 a 5.16 são apresentadas as micrografias eletrônicas de varredura dos hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC (com 10 e 20 % de SC) obtidos de PVA-Ma com GS 2,5, 3,5 e 5,0%. As

morfologias apresentadas pelos hidrogéis de PVA-Ma são bastante similares e não variam acentuadamente com o GS do PVA-Ma precursor. No entanto, uma análise mais detalhada permite visualizar um ligeiro aumento no tamanho médio de poros no hidrogel obtido do PVA-Ma com GS nominal 5,0 %. Para esse hidrogel, a expectativa era obter morfologia com tamanho médio de poros menor em relação aos hidrogéis de PVA-Ma com GS 2,5 e 3,5 %. No processo de obtenção dos hidrogéis, foi verificado que a gelificação é mais rápida para o PVA-Ma com GS nominal 5,0 % em relação aos PVA-Mas com GS 2,5 e 3,5 %. Na verdade, para PVA-Ma com GS 2,5 e 3,5 % a gelificação se inicia, em média, cerca de 3 min após adicionar a solução de persulfato de sódio na solução aquosa de PVA-Ma já contendo TEMED. No entanto, para a gelificação do PVA-Ma com GS 5,0 % este tempo se reduz para cerca de 30 s. Assim, os hidrogéis de PVA-Ma com GS 5,0 % tendem a apresentar maior heterogeneidade em relação à distribuição de tamanho de poros se comparados aos PVA-Ma de menor GS. Deve ser enfatizado que a micro-heterogeneidade é uma característica comum em hidrogéis. Soluções de PVA-Ma contendo SC são mais viscosas, assim, este efeito é acentuado nos hidrogéis de PVA-Ma/SC. Micro-heterogeneidade contribui para o aumento do tamanho médio de poros.⁶²

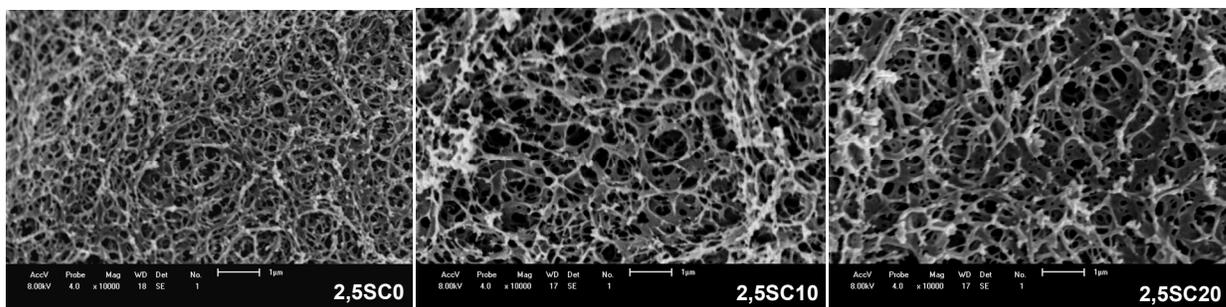


Figura 5.14. Micrografias Eletrônicas de Varredura dos hidrogéis de PVA-Ma com GS 2,5% com 0, 10 e 20% de SC, aumento de 10.000X.

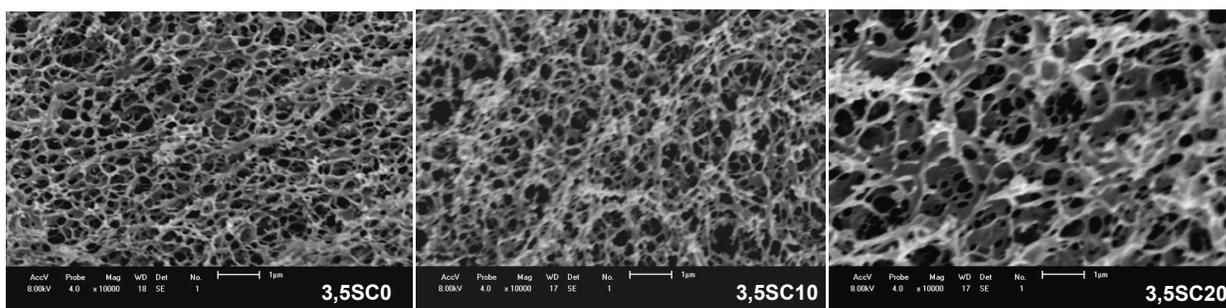


Figura 5.15. Micrografias Eletrônicas de Varredura dos hidrogéis de PVA-Ma com GS 3,5% com 0, 10 e 20% de SC, aumento de 10.000X.

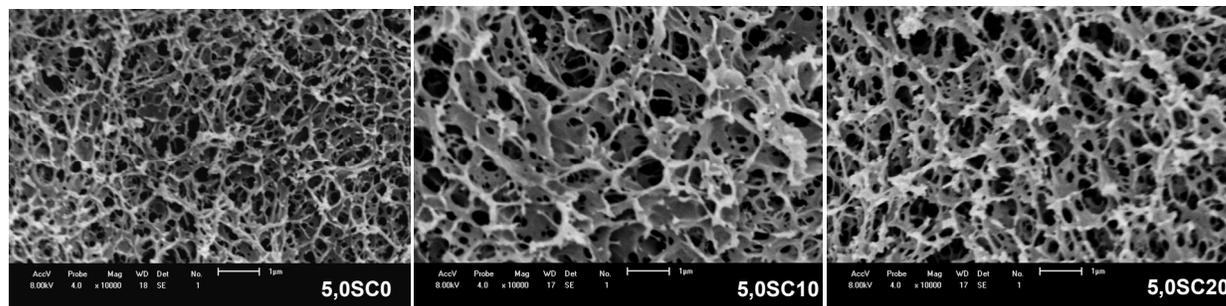


Figura 5.16. Micrografias Eletrônicas de Varredura dos hidrogéis de PVA-Ma com GS 5,0% com 0, 10 e 20% de SC, aumento de 10.000X.

As morfologias dos hidrogéis de PVA-Ma/SC (com 10 e 20 % de SC) são diferentes das observadas para os hidrogéis de PVA-Ma. Os hidrogéis de PVA-Ma/SC com 10 e 20 % de SC possuem morfologias similares, porém com tamanho de poros levemente maior do que os hidrogéis de PVA-Ma. Assim, a presença de SC na matriz de PVA-Ma contribui para o aumento do grau de intumescimento que re-

flete em acréscimo no tamanho de poros. Esta comparação deve ser feita apenas qualitativamente, pois, como já mencionado, a presença de SC nos hidrogéis contribui para aumentar a viscosidade da solução precursora do hidrogel o que conduzi a maior heterogeneidade no hidrogel.

5.3.1.5 Avaliação da Citotoxicidade

Na Tabela 5.9 são apresentados os valores de contagem de células não viáveis em suspensão no meio de cultura dos testes de citotoxicidade dos hidrogéis de de PVA-Ma e PVA-Ma/SC (com 10 e 20 e 33 % de SC) obtidos de PVA-Ma com GS 2,5, 3,5 e 5,0%. Também são apresentados os valores obtidos para os testes feitos com os controles positivo e negativo, conforme descrito no item 5.2.2.8.

Tabela 5.9. Contagem de células não viáveis nos experimento de citotoxicidade por contato direto de crescimento de células tipo VERO.

GS/%	Número de Células /10 ⁴ mL			
	SC 0%	SC 10%	SC 20%	SC 33%
2,5	3,0 ± *	1,0 ± *	1,6 ±0,4	0,7 ±0,3
3,5	2,5 ± *	2,0 ± *	1,4 ±0,1	1,0 ± *
5,0	4,0 ± *	3,5 ± *	1,7 ±0,4	1,0 ± *
Controle Positivo	8,0 ± *			
Controle Negativo	1,9 ±0,6			

* erros não determinado por problemas experimentais.

Na Figura 5.17 é apresentado o gráfico de porcentagem de inibição do crescimento celular nos testes de citotoxicidade, calculados por meio dos valores apresentados na Tabela 5.9, considerando o número de células no controle positivo com 100 %.

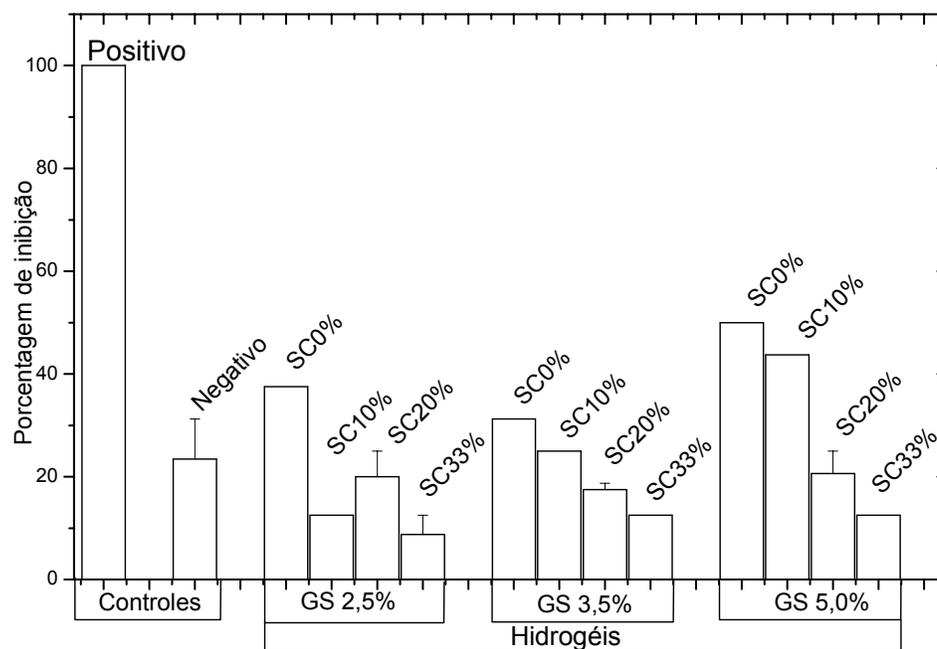


Figura 5.17. Gráfico de percentual de inibição do crescimento celular, avaliado por contagem de células não viáveis no sobrenadante do meio de cultura de células tipo VERO.

Observa-se no gráfico que os hidrogéis apresentam boa citocompatibilidade. Os hidrogéis de PVA-Ma/SC apresentaram menores taxas de inibição do crescimento celular quando comparados aos respectivos hidrogéis de PVA-Ma. Tal contraste se intensifica com a maior quantidade de SC no hidrogel. Isto pode ser explicado pela natureza biológica do sulfato de condroitina, presente nas proteoglicanas de matrizes extracelulares de células a-

nimais, responsáveis pela aderência e fixação dessas células. Comparadas com os controles, há tendência de aumento na citotoxicidade dos hidrogéis com acréscimo valor de GS nos PVA-Ma precursores.

6 CONCLUSÕES

Poli(álcool vinílico) pode ser quimicamente modificado pela reação com metacrilato de glicidila em DMSO usando TEMED como catalisador. A reação, caracterizada por RMN ^1H e ^{13}C , ocorre exclusivamente por transesterificação com a adição de grupos metacrilóila, do GMA, e podem ser obtidos diferentes graus de substituição, GS.

Dentre os fatores estudados, atmosfera de N_2 , tempo de reação e temperatura, a atmosfera de N_2 não mostrou, nas condições estudadas, influência significativa no valor de GS.

As melhores condições de tempo e de temperatura para a reação, obtidas por RSM, foram cerca de 6 horas e $62\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Nestas condições, a dependência de GS com a razão molar $[-\text{OH}(\text{PVA})/\text{GMA}]$ é linear até o valor de (1/0,25).

O PVA modificado, PVA-Ma, com GS 2,5, 3,5 e 5,0 % pode ser reticulado em meio aquoso formando hidrogéis. Ainda, podem ser obtidos hidrogéis, do tipo semi-IPN, de PVA-Ma contendo diferentes teores de sulfato de condroitina, SC.

Os hidrogéis de PVA-Ma e de PVA-Ma/SC com até 20 % de SC (em massa) apresentaram boas propriedades mecânicas, com valores de módulo de elasticidade, E, entre 63 e 126 kPa.

Os graus de intumescimento, Q , dos hidrogéis em FSI e em FSG diferem dos obtidos em água destilada. A diferença foi atribuída, em parte, aos grupamentos ionizáveis do SC nesses diferentes meios.

Os hidrogéis apresentam mecanismo de transporte anômalo no intumescimento, com contribuição da difusão do solvente e do relaxamento das cadeias.

Nas condições estudadas, pH 1,2 e 7,5, os hidrogéis não apresentaram sinais aparentes de degradação em até 150 horas de imersão.

Os hidrogéis de PVA-Ma/SC apresentaram menor citotoxicidade se comparados com os hidrogéis de PVA-Ma. Há tendência de aumento na citotoxicidade dos hidrogéis com acréscimo valor de GS nos PVA-Ma precursores.

Assim, conclui-se que os hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC desenvolvidos nesta tese apresentam potencial para serem aplicados na área farmacêutica como carreadores para liberação de fármacos.

7 Sugestões de Estudos Futuros

- ✓ Complementação dos estudos de citotoxicidade dos hidrogéis por crescimento de células tipo VERO pela avaliação da morfologia das células.
- ✓ Obtenção de hidrogéis de PVA-Ma e PVA-Ma/SC com outros tipos ou processos de iniciação, por exemplo luz UV.
- ✓ Incorporação de fármacos-modelo e estudos de liberação *in vitro* e *in vivo*.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Banker, G. S.; Rhodes, C. T., Modern Pharmaceutics: Sustained- and Controlled-Released Drug Delivery, Jantzen, G. M.; Robinson, J. R., Ed. Marcel Dekked, 1996, Cap.15, pg. 575.
- 2 Rao, K. V. R.; Devi, K. P., Swelling controlled-release systems: recent developments and applications, International Journal of Pharmaceutics, 1988, 48, 1-13.
- 3 Bell, C. L.; Peppas, N. A., Biomedical Membranes from Hydrogels and Interpolymer Complexes, Advance in Polymer Science, 1995, 122, 125-175.
- 4 Hoffman, A. S., Hidrogels for biomedical applications, Advanced Drug Delivery Reviews, 2002, 43, 3-12
- 5 Qiu, Y.; Park, K., Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, Advanced Drug Delivery Reviews, 2001, 53, 321-339.
- 6 Gutowska, A.; Bae, Y. H.; Jacobs, H.; Feijen, J.; Kim, S. W., Termosensitive Interpenetrating Polymer Networks: Synthesis, Characterization, and Macromolecular Release, 1994, 27, 4167-475.
- 7 Cascone, M. G.; Barbani, N.; Cristallini, C.; Giusti, P.; Ciadelli, G.; Lazzeri, L., Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides, Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition, 2001, 12, 3, 267-281.

-
- 8 Mark, H. F.; Gaylord, N. G., Vinyl Alcohol Polymer, in Encyclopedia of Polymer Science and Technology, N. G. Bikales, Jhon Wiley & Sons, New York, vol.14, 1971, 149-207.
- 9 Finch, C. A., Polyvinyl Alcohol: Properties and applications, John Wiley & Sons, New York, 1973.
- 10 DeMerlis, C. C.; Schoneker, D. R., Review of oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA), Food and Chemical Toxicology, 2003, 41, 319-326.
- 11 Kelly, C. M.; DeMerlis, C. C.; Schoneker, J. F.; Borzelleca, J. F., Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol, Food and Chemical Toxicology, 2003, 41, 719-727.
- 12 Martens, P.; Anseth, K. S., Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers, Polymer, 2000, 41, 7715-7722.
- 13 Matsuyama, H.; Teramoto, M.; Urano, H., Analysis of solute diffusion in poly(vinyl alcohol) hydrogel membrane, Journal of Membrane Science, 1997, 126, 151-160.
- 14 Shaheen, M. S.; Yamaura, K., Preparation of theophylline hydrogels of atactic poly(vinyl alcohol)/NaCl/H₂O system for drug delivery system, Journal of Controlled Release, 2000, 81, 367-377.

-
- 15 Qi, M.; Gu, Y.; Sakata, N.; Kim, D.; Shiouzu, Y.; Yamamoto, C.; Hiura, A.; Sumi, S.; Inoue, K., PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas, *Biomaterials*, 2004, 25, 5885-5892.
- 16 Reis, A.V.; Cavalcanti O. A.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C., Synthesis and characterization of hydrogels formed from glycidyl methacrylate derivative of galactomannan, *International Journal of Pharmaceutics*, 2003, 267, 13-25.
- 17 van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Franssen, O.; Talsma, H.; van Steenberghe, M. J.; Kettenes-van den Bosch, J.J.; Hennink, W. E., Synthesis, Characterization, and Polymerization of Glycidyl Methacrylate Derivatized Dextran, *Macromolecules*, 1995, 28, 6317-6322.
- 18 van Dijk-Wolthuis, W. N. E.; Kettenes-van den Bosch, J.J.; van der Kerk-van Hoof, A; Hennink, W. E., Reaction of Dextran with Glycidyl Methacrylate: An Unexpected Transesterification, *Macromolecules*, 1997, 30, 3411-3413.
- 19 Ferreira, L.; Vidal, M. M.; Geraldés, C. F. G. C.; Gil, M. H., Preparation and characterization of gels based on sucrose modified with glycidyl methacrylate, *Carbohydrate Polymers*, 2000, 41, 15-24.
- 20 Mühlebach, A.; Müller, B.; Pharisa, C.; Hofmann, M.; Seifering, B.; Gerry, D., New water-Soluble Photo Cross-linkable

-
- Polymers Based on Modified Poly(vinyl alcohol), *Journal Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, 1997, 34, 3603-3611.
- 21 Gung, Y-W.; Kuo, S. M.; Wang, Y-J, Effect of PVA-AA on dentine bonding of HEMA, *Biomaterials*, 1997, 18, 367-371.
- 22 Vervoort, L.; Rombaut, P.; Van den Mooter, G.; Augustijns, P.; Kinget, R., Inulin Hydrogels. II. In vitro degradation study, *International Journal of Pharmaceutics*, 1998, 172, 137-145.
- 23 Maris, B.; Verheden, L.; Van Reeth, K.; Samy, C.; Augustijns, P.; Kinget, R.; Van den Mooter, Synthesis and characterization of inulin-azo hydrogels designed for colon targeting, *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, 213, 143-152.
- 24 Pitarresi, G.; Palumbo, F. S.; Giommona, G.; Casadei, M. A.; Micheletti, M. F., Biodegradable hydrogels obtained by photocrosslinking of dextran and polyaspartamide derivatives, *Biomaterials*, 2003, 24, 4301-4313.
- 25 Rubinstein, A.; Nakar, D.; Sintov, A., Chondroitin sulfate: A potential biodegradable carrier for colon-specific drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, 1992, 84, 141-150.

-
- 26 Avci, F. Y.; Toida, T.; Linhardt, R. J., Chondroitin o-methyl ester: unusual substrate for chondroitin AC lyase, *Carbohydrate Research*, 2003, 338, 2001-2104.
- 27 Stryer L., *Bioquímica*, Ed. Guanabara Koogan, 1996, 4° Edição, Cap. 18, 437-455.
- 28 Iwafune; I. Kikizaki, I.; Nakazawa, H.; Nukatsuka, I.; Endo, M.; Takagaki, K. A glycomic approach to proteoglycan with a two-dimensional polysaccharide chain map, *Analytical Biochemistry*, 2004, 325, 35-40.
- 29 Sorensen, R. B.; *Chondroitin Sulphate in the Treatment of Interstitial Cystitis and Chronic Inflammatory Disease of Urinary Bladder*, *European Urology Supplements*, 2003, 2, 16-18.
- 30 Kuijpers, A. J.; Engbers, G. H. M; Kevis, T. K. L., Smedt, S. S. C.; Demmester, J.; Krijgsveld, J.; Zaat, S. A. J.; Dankert, J.; Feijen, J. Combined Gelatin-Chondroitin Sulfate Hydrogels for Controlled release of Cationic Antibacterial Proteins, *Macromolecules*, 2000, 33, 3705-3713.
- 31 Dawlee, S.; Sugandhi, A.; Balakrishnam, B.; Labarre, D.; Jayarkrishnan, A. Oxidized Chondroitin Sulfate-Cross-linked Gelatin, Matrixes: A New Class of Hydrogels, *Biomacromolecules*, 2005, 6, 2040-2048.

-
- 32 Elias, Hans-George, *Macromolecules: Structure and Properties*, 2nd ed., vol. 1, Ed. Plenum Press, New York, 1983.
- 33 Findlay, P.H.; Sherrington, D. C., The Unexpected Transesterification between Glycidyl Methacrylate and 2-
{[2(Dimethylamino)ethyl]methylamino}ethanol, *Macromolecules*, 1999, 32, 5970-5972.
- 34 Li, Q.; Wang, D.; Elisseeff, J. H., Heterogeneous-Phase Reaction of Glycidyl Methacrylate and Chondroitin Sulfate: Mechanism of Ring-opening - Transesterification Competition, *Macromolecules*, 2003, 36, 2556-2562.
- 35 Tarducci, C.; Kinmond, E. J.; Baydal, J. P. S., Epoxy-Functionalized Solid Surfaces, *Chem. Mater.*, 2000, 12, 1884-1889
- 36 Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S., *Introduction of Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry*, Harcourt Brace College Publishers, 2nd ed., Orlando, 1996.
- 37 Neto, B. de B.; Scarmino, I., S.; Bruns R. E., *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*, Editora da UNICAMP, 2001, Campinas, SP.
- 38 Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S., *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*, John Wiley & Sons, New York, 1978.

-
- 39 Montgomery, D. C., *Design and Analysis of Experiments*, John Wiley & Sons, New York, 1997. Box, G. E. P.; Hunter, W. G.; Hunter, J. S., *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building*, John Wiley & Sons, New York, 1978.
- 40 Box, G. E. P.; Draper, N. R., *Empirical Model-Building and Surfaces*, John Wiley & Sons, New York, 1987.
- 41 Peppas, N. A.; Huang, Y.; Torres-Lugo, M.; Ward, J. H.; Zhang, J., *Physicochemical Foundations and Structural Design of Hydrogels In Medicine and Biology*, *Annual Reviews Biomedical Engineering*, 2000, 2, 9-29.
- 42 Byrne, E. M.; Park, K.; Peppas, N. A., *Molecular Imprinting within Hydrogels*, *Advanced Drug Reviews*, 2002, 54, 19-161.
- 43 Anseth, K. S.; Bowman, C. N.; Brannon-Peppas, L., *Mechanical Properties of Hydrogels and their experimental determination*, *Biomaterials*, 1996, 17, 1647-1657.
- 44 Peppas N. A.; Merrill, E. W., *Crosslinked Poly(vinyl alcohol) Hydrogels as Swollen Elastic Networks*, *J. of Applied Polymer Science*, 1977, 21, 1763-1770.
- 45 Cowie, J. M. G., *Polymers: Chemistry & Physics of Modern Materials*, 2nd edition, Blackie Academic & Professional, London, 1991.

-
- 46 Aklonis, J. J.; MacKnight, W. J.; Shen, M., Introduction to Polymer Viscoelasticity, Wiley-Interscience, New York, 1972.
- 47 Flory P. J.; Rabjohn, N.; Shaffer, C. M., Dependence of Elastic Properties of Vulcanized Rubber on the Degree of Cross-linking, Journal of Polymer Science, 1949, 4, 225-245.
- 48 Lee, K. Y.; Rowley, J. A.; Eiselt, P.; Moy, E. M.; Bouhadir, K. H.; Mooney, D. J., Controlling Mechanical and Swelling Properties of Alginate Hydrogels Independently by Cross-linker Type and Cross-linking Density, Macromolecules, 2000, 33, 4291-4294.
- 49 Paradossi, G.; Cavalieri, F.; Capitani, D.; Crescenzi, V., Physicochemical Characterization of Chemical Hydrogels Based on PVA, Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics, 37, 1999, 1225-1233.
- 50 Bell, C. L.; Peppas, N. A, Water, solute and protein diffusion in physiologically responsive hydrogels of poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol), Biomaterials, 1996, 17 , 1203-1218.
- 51 Bell, C. L.; Peppas, N. A., An apparatus to measure polymer swelling under load, International Journal of Pharmaceutics, 1996, 134, 167-172.

-
- 52 Yidiz, B.; Isik, B.; Kis, M., Synthesis and characterization of thermoresponsive isopropylacrylamide-acrylamide hydrogels, *European Polymer Journal*, 2002, 38, 1343-1347.
- 53 Malmonge, S. M.; Zavaglia, C. A. C; Santos Jr. A.; Wada, M. L. F., Avaliação da Citotoxicidade de Hidrogéis de poliHEMA: Estudo *in vitro*, *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, 1999, 15, 1-2, 49-54.
- 54 Kotzar, G.; Freas, M.; Abel, P.; Fleischman, A.; Roy, S.; Zorman, C.; Moran, J. M.; Melzak, J., Evaluation of MEMS materials of construction for implantable medical devices, *Biomaterials*, 23, 2002, 2737-2750.
- 55 Black, J. Biological performance of material. In: *Fundamentals of Biocompatibility*, Marcel Dekker, New York, 1992.
- 56 Kirkpatrick, C.J., Biological testing of materials and medical devices - A critical review of current and proposed methodologies for biocompatibility testing cytotoxicity *in vitro*". *Regulatory Affairs*, 1992, 4, 13-32
- 57 Freshney, R. I., *Animal cell culture - A practical approach*, IRL Press, 1989.
- 58 ASTM-F813-01, *Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices*, American Society for Testing and Materials, 2005.

-
- 59 Sipos, P.; Pierre, T. G. St.; Tombacz E.; Webb, J., Rod-Like Iron(III) Oxyhydroxide Particles in Iron(III)-Polysaccharide Solutions, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 1995, 58, 129-138.
- 60 The United States Pharmacopeia, USP-23, United States Pharmacopeial Convention, Inc, Rand McNally, Massachusetts, 1995, pg. 2053.
- 61 Bell C. L.; Peppas N. A., Biomedical membranes from hydrogels and interpolymer complexes, *Advances in Polymer Science*, 1995, 122, 125-175.
- 62 Yoshinari, E.; Furukawa, H.; Horie, K., Fluorescence study on the mechanism of rapid shrinking of grafted poly(N-isopropylacrylamide) gels and semi-IPN gels, *Polymer*, 2005, 46, 7741-7748.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)