

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

“Júlio de Mesquita Filho”

Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais – POSMAT

Rondes Ferreira da Silva

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ÓXIDO NÍTRICO
BASEADOS EM DITIOCARBAMATOS**

Bauru/SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

**SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA DE ÓXIDO NÍTRICO
BASEADOS EM DITIOCARBAMATOS**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do título de Mestre à Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais, área de concentração: Materiais Poliméricos, Híbridos, e Nano-Estruturados, sob a orientação do Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff.

Bauru/SP

2009

*Dedico este trabalho em memória de meu Pai, Geraldo
Ferreira da Silva, ao acreditar que minha existência
seria possível, me fez forte para acreditar que em Deus
“Tudo é Possível”!*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico de Oliveira Graeff, pela oportunidade, suporte para realização das pesquisas e orientação.

Ao Prof. Dr. Marcelo Nalin e Profa. Dra. Alejandra H. M. Gonzalez, pelo apoio, conselhos e pela amizade.

Aos Professores da POSMAT que ajudaram em minha formação, José Humberto Dias da Silva, Carlos R. Grandini, Margarida Juri Saeki, Paulo Noronha, pelos conselhos e orientações.

À FAPESP, pelo suporte financeiro do projeto e pela bolsa de estudos.

Ao técnico Carlos Brunello, pelo apoio técnico e pela participação direta em vários experimentos, imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório Rondinelli Herculano, Jorge A. Gomez, João Borin, os quais tiveram grande participação em minhas pesquisas.

À Mayler Martins, pela prontidão em ajudar, pelos conselhos, pelos ensinamentos, pela solidariedade nos momentos difíceis e acima de tudo pela amizade.

Aos colegas da POSMAT que de alguma forma participaram de minha trajetória. Em especial, aos amigos que tanto me ajudaram e acrescentaram em meu crescimento, Paula Martins, Leandro M. Campos Pinto, Samira Medina, Anne H. Yonamine, Marcilene Maluf, André L. J. Pereira, Rafael Inocente, Rafael Ferreira.

Ao apoio, compreensão e ajuda de minha família, em especial à minha mãe Joana Lúcia da Silva, ao meu irmão Daniel Ferreira da Silva e minhas primas queridas, Lucimara Silva, Kelen Silva, Simone Rodrigues e Suzana Rodrigues.

"Agradeço a todos aqueles que acreditam no meu sucesso, que participaram direta ou indiretamente de minha trajetória no POSMAT."

RESUMO

O óxido nítrico (NO) é um radical livre com inúmeras funções fisiológicas, tais como regulação da pressão sanguínea e sistema nervoso. O desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada (SLC) de NO no organismo são de grande importância em tratamentos de diversas patologias, bem como para a indústria farmacêutica. A espectroscopia de ressonância paramagnética (RPE) foi utilizada para detecção e caracterização da taxa de liberação de NO. Esta é uma técnica amplamente utilizada no estudo de entes paramagnéticos existentes em sistemas biológicos.

Os SLCs de NO foram desenvolvidos a partir da incorporação do agente aprisionador de NO, FeDETC, nas matrizes biocompatíveis de látex e siloxano-poli(oxipropileno) (PPO). O foco deste trabalho é obter membranas para liberação controlada de NO que sejam capazes de liberar NO localmente através de estímulos externos.

A matriz de PPO apresentou forte sinal de NO, resistência mecânica e estabilidade igual às melhores matrizes sólidas já obtidas em nosso laboratório. Mantendo a matriz de PPO em ambiente sem iluminação e à temperatura ambiente, o NO permanece aprisionado ao FeDETC por até 45 dias nas primeiras sínteses e 33 dias nas últimas sínteses. Em experimentos feitos com a matriz de látex foi observado que o NO permanece complexado ao FeDETC até 61 dias e 45 dias para amostras estocadas no escuro à temperatura ambiente e sob temperatura de 50°C. Em ambas matrizes, foi observado que a taxa de liberação de NO do sistema pode também ser acelerada através da aplicação de um campo magnético ou através do aumento de temperatura. Estas características fazem do PPO e látex, matrizes ideais para construção de SLCs de NO.

ABSTRACT

Nitric oxide (NO) is a free radical species with multiples physiological functions, such as the regulation of blood pressure and nervous system. The development of drug delivery systems (DDS) of NO in the body are of great importance in the treatment of various diseases, as well as for the pharmaceutical industry. Electron Paramagnetic Resonance (EPR) technique, was used for NO detection and characterization of the NO delivery kinetics. This is a technique widely used in the study of paramagnetic entities existing in biological systems.

NO DDSs were developed based in trap FeDETC incorporated in siloxane–poly(oxypropylene) (PPO) and latex biocompatible matrix. The focus of this work is to obtain membranes for controlled release of NO that are able to release NO locally by external stimuli.

The PPO400 and PPO2000 DDS presents a stronger EPR signal, strength and highest stability, equal to the best solid matrices already obtained in our laboratory, e. g. latex matrix. Keeping the matrix in PPO environment without lighting and temperature, the NO remains trapped in FeDETC for up to 45 days in the first synthesis and summaries for the last 33 days. In experiments made with the latex matrix was observed that NO remains trapped in FeDETC until 61 or 45 days for samples stored in the dark at room temperature and samples left at the greenhouse 50°C. In both matrices was observed that the kinetics of NO release of the system can also be accelerated by applying modulated magnetic field of 40G or by increasing temperature. These characteristics make the PPO and latex, matrices ideal for building DDS NO.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da nitroglicerina.....	16
Figura 2 – Reação catalisada pela NOS	16
Figura 3 – Enzima óxido nítrico sintetase (dímero).....	18
Figura 4 – Formação de NO na célula a partir da arginina por estímulo direto da NO sintetase tipo I e III ou por citocinas via NO sintetase tipo II.	18
Figura 5 – Formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPC), a partir da guanosina trifosfato (GTP), mediada por NO (DUSSE, 2003).	19
Figura 6 - Comparação entre concentrações de óxido nítrico expirado por indivíduos saudáveis (controle) e apresentando asma brônquica.....	22
Figura 7 – Estruturas de (A) N-acetil-cisteína (NAC), (B) Glutathiona, (C) S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e (D) S-nitrosoglutathiona (GSNO) (SHISHIDO, 2003).....	25
Figura 8 – Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.	31
Figura 9 – O desdobramento dos níveis de energia e a transição devido ao fenômeno da Ressonância do Spin Eletrônico	34
Figura 10 – Ilustração (a) da absorção das microondas em um espectro de RPE com um possível campo magnético de amplitude de modulação H_{mod} e (b) espectro de RPE: primeira derivada do espectro de absorção da microonda.....	35
Figura 11 - Níveis de energia de um elétron interagindo com um núcleo de spin 1/2 e com constante de acoplamento A e a primeira derivada das curvas de absorção em um campo magnético H.....	37
Figura 12 - Espectro de RPE idealizado de uma amostra contendo espécies paramagnéticas randomicamente orientadas de um sistema de simetria axial com $g_{//} > g_{\perp}$. (a) Espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro de absorção.....	38
Figura 13 – Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica RPE, VARIAN-E4/1969.....	40

Figura 14 - Métodos de obtenção da intensidade do sinal de RPE: (a) pela altura do sinal RPE de pico a pico (pico superior ao pico inferior), e (b) pela área obtida por dupla integração do próprio sinal de RPE.	42
Figura 15 - Fórmula molecular do híbrido PPO, com $n = 34$ e 5 para o PPO2000 e PPO300, respectivamente.	44
Figura 16 – Estrutura molecular do látex natural.	48
Figura 17 – Espectros de RPE do SLC de NO- PPO300 com diferentes concentrações de FeDETC.	51
Figura 18 – Espectros de RPE do SLC de NO – PPO2000 sem FeDETC (A) e com razão $[\text{FeDETC}]/[\text{PPO}]$ igual a $0,0325$	52
Figura 19 - Intensidades relativas dos SLC de NO - PPO300 (B) e PPO2000 (A) em função da razão $[\text{FeDETC}]/[\text{PPO}]$	53
Figura 20 - Espectro de RPE das amostras de PPO2000 $0,69 \text{ m/m}\%$, PPO400* $0,69 \text{ m/m}\%$ e $4,0 \text{ m/m}\%$	54
Figura 21 – Sinal RPE dos sensores PPO300 e PPO2000, com diferentes razões $[\text{FeDETC}]/[\text{PPO}]$, após 14 dias do aprisionamento do NO.	57
Figura 22 – Intensidade relativa dos SLCs de NO – PPO300 e PPO2000 com diferentes razões $[\text{FeDETC}]/[\text{PPO}]$ em função do tempo. A intensidade do sinal foi normalizada pelo peso da matriz e pela razão $[\text{FeDETC}]/[\text{PPO}]$. As amostras foram estocadas a temperatura e atmosfera ambiente.	58
Figura 23 – Espectro de RPE do SLC de PPO2000 - $0,69 \text{ m/m}\%$ para diferentes intervalos de tempo – Grupo controle.	60
Figura 24 - Espectro de RPE do SLC de NO PPO400 - $4,00 \text{ m/m}\%$ para diferentes intervalos de tempo – Grupo Controle.	61
Figura 25 – Espectro de RPE do SLC PPO2000- $0,69 \text{ m/m}\%$ exposto à temperatura de 50°C	62
Figura 26 – Espectro de RPE do SLC PPO400- $4,00 \text{ m/m}\%$ exposto à temperatura de 50°C	63
Figura 27 – Espectro de RPE do SLC PPO2000- $0,69 \text{ m/m}\%$ exposto ao laser azul.	64

Figura 28 – Espectro de RPE do SLC PPO400-0,69 m/m% exposto ao laser azul.	65
Figura 29 – Espectro de RPE do SLC de PPO400 exposto à campo magnético com amplitude de modulação de 40G.	66
Figura 30 – Espectro de RPE do SLC de PPO2000 exposto à Modulação de 40G.	67
Figura 31 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO PPO300 0,0325 m/m%, estocados a temperatura ambiente (A), sob radiação ultravioleta (B), a temperatura de 50°C (C) e em ambiente escuro (D).	70
Figura 32 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC-PPO2000 0,0325m/m%, estocados a radiação UV(A), em ambiente escuro (B), temperatura de 50 °C (C) e sob campo magnético com amplitude de modulação 40G a 100 KHz (D).	71
Figura 33 – Intensidade de sinal em função dos SLCs de NO a base de PPO2000 0,69 m/m% e PPO400 4,00 m/m% em amostras do grupo controle.	73
Figura 34 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO a base de PPO2000 0,69 m/m% e PPO400 4,00m/m%, expostos à temperatura de 50°C.	74
Figura 35 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO a base de PPO2000 0,69m/m% e PPO400 4,00m/m%, expostos ao laser azul.	75
Figura 36 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO a base de PPO2000 0,69m/m% e PPO400 4,00m/m%, expostos a campo magnético modulado de 40G e 100kHz.	77
Figura 37 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO PPO400 4,00 m/m%, grupo controle, exposto a temperatura de 50°C, ao laser azul e à modulação de campo magnético de 40G.	78
Figura 38 - Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO PPO2000 0,69 m/m%, grupo controle, exposto a temperatura de 50°C, ao laser azul e à modulação de campo magnético de 40G.	79
Figura 39 - Espectro de RPE das amostra controle para diferentes intervalos de tempo.	80
Figura 40 – Espectro de RPE da amostra exposta à temperatura 50°C para diferentes intervalos de tempo.	81

Figura 41 - Espectro de RPE da amostra exposta ao laser azul para diferentes intervalos de tempo.	82
Figura 42 – Espectro de RPE, amostra exposta à modulação de campo magnético de 40G para diferentes intervalos de tempo.....	83
Figura 43 – Intensidade normalizada do sinal de RPE em função do tempo para amostras estocadas a diferentes condições.	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores das variáveis do espectrômetro durante as medidas do sinal RPE dos SLCs de NO.....	41
Tabela 2 – Relação de FeDETC nas amostras de PPO300 e PPO2000 (lote A) feitas pelo grupo da professora Leila A.Chiavacci.	45
Tabela 3 – Relação de FeDETC nas amostras de PPO400 e PPO 2000 (lote B).	46
Tabela 4 – Matrizes de PPO300, PPO400 e PPO2000 (lote A e lote B) e matrizes a base de latex, expostas a diferentes condições.	50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. A molécula de NO	13
1.1.1. A bioquímica do NO	15
1.1.2. Disfunções causadas por falhas no metabolismo de NO	21
1.2. Doadores de NO	23
1.2.1. Sistemas de liberação controlada de NO	24
1.2.2. Sistema de Liberação Controlada (SLC) de NO a base de siloxano- poli(oxipropileno) PPO	27
1.2.3. Sistema de Liberação Controlada (SLC) de NO a base de Látex	28
1.3. O método sol-gel	30
1.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica	32
1.4.1. Fenômeno da Ressonância Paramagnética Eletrônica RPE	33
1.4.2. Interação Hiperfina	36
1.4.3. Anisotropia do fator g	37
2. OBJETIVOS	39
3. MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1. Breve descrição das técnicas utilizadas	40
3.2. Preparação dos SLCs de NO	43
3.2.1. Preparação da solução de FeDETC	43
3.2.2. Matriz de PPO	44
3.2.3. Matriz de Látex	47
3.2.4. Aprisionamento de NO nos SLCs de látex e PPO	48
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1. Sistema de liberação controlada de NO a base de PPO	51
4.1.1. Intensidade do Sinal RPE	51
4.1.2. Estudo da estabilidade do sinal	56
4.1.3. Avaliação da taxa de liberação de NO	68
4.2. Sistema de liberação controlada de NO a base de látex	80
4.2.1. Estudo da estabilidade do sinal RPE	80
5. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	88

1. INTRODUÇÃO

O Programa de Pós-graduação e Tecnologia de Materiais (POSMAT), tem como objetivo o aprimoramento e elaboração de novos dispositivos. A ciência dos materiais relaciona os elementos estruturais dos materiais e suas propriedades. O conhecimento adquirido por pesquisadores em ciência dos materiais nos últimos 60 anos, fornece aos cientistas e pesquisadores condições de moldar as características dos materiais (ASKELAND, 1994; SMITH, 1995).

Os materiais podem ser classificados de maneira simples como: metais, cerâmicos e polímeros, tal que os materiais metálicos são normalmente combinações de elementos metálicos, os cerâmicos em linhas gerais são compostos entre os elementos metálicos e não metálicos (por exemplo, óxidos, nitretos e carbetos) e polímeros compreendem os materiais comuns de plástico e borracha (CALLISTER, 2002).

Os biomateriais, em particular, podem ser obtidos de quaisquer materiais classificados anteriormente, porém são empregados em componentes implantados em sistemas biológicos como o corpo humano, para substituição e ou reconstituição de partes do corpo, doentes ou danificadas. Além disso os biomateriais precisam apresentar biocompatibilidade com os organismos vivos.

Investigações na linha de biomateriais é a grande área de atuação de nosso grupo de pesquisas. Este trabalho trata especificamente de biomateriais poliméricos, híbridos orgânico-inorgânicos como matrizes para a liberação de óxido nítrico nos sistemas biológicos. Na sequência discorreremos sobre a molécula de NO e sua importância biológica, bem como os mecanismos e materiais usados para caracterizar e quantificar a liberação desta molécula através das matrizes poliméricas estudadas.

1.1. A molécula de NO

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa, inorgânica e incolor, habitualmente encontrada no espaço inter-estelar, na atmosfera de Vênus, Marte e também em nossa atmosfera. Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (BREDT, 1989). Contudo, em 1987, a atenção da comunidade científica voltou-se ao NO, com a descoberta de seu papel importante na relaxação muscular endotelial (MONCADA, 1991).

Quando em meio aquoso, o NO possui meia vida de menos de 10 segundos, devido à sua rápida oxidação a nitrito (NO_2^-) e a nitrato (NO_3^-) (KERWIN, 1995; FILHO, 2000). O NO é considerado um dos mais importantes mediadores nos processos intra e extracelular, está envolvido em processos fisiológicos que variam da vasodilatação à neurotransmissão. O NO está associado ao fator de relaxamento da musculatura lisa vascular derivada do endotélio (*endothelial-derived relaxing factor* - EDRF) (NAGANO, 2002), tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo, além de ser o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (HIBBS; MARLETTA, 1988). No sistema imune, macrófagos, quando estimulados, produzem grande quantidade de NO, que funciona como uma molécula assassina, destruindo células-alvo (cancerosas) e micro-organismos.

O conhecimento da dinâmica espaço-temporal da liberação de NO das células é importante para uma compreensão da neurotransmissão, bem como a compreensão da evolução de doenças inflamatórias e de um grande número de condições patológicas, tais como o câncer, o diabetes e doenças neurodegenerativas. Sabe-se que os efeitos biológicos

do NO são dependentes do seu local de atuação e fonte de produção, bem como da concentração (LEE, 2007).

O óxido nítrico NO é um importante neurotransmissor com capacidade potencializadora, atuando na memória e no aprendizado, tendo também ações endócrinas, autócrinas e parácrinas. A sua ação na imuno-regulação está presente na inflamação e nos mecanismos de autoimunidade. Esta molécula tem revolucionado e obrigado a revisão de paradigmas da medicina, principalmente em neurologia, cardiologia, nefrologia e gastroenterologia (SNYDER, 1998).

1.1.1. A bioquímica do NO

A identificação do NO como vasodilatador veio, em parte, de estudos que o identificaram como a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, como a nitroglicerina (Figura 2), que resultava na dilatação das artérias coronárias, melhorava o suprimento sanguíneo ao coração e, conseqüentemente, aliviava os sintomas. Katsuki *et al.* (KATSUKI, 1977) demonstraram que o mecanismo pelo qual estes compostos causavam vasodilatação envolvia a ativação da enzima guanilato ciclase (GC), mediada por NO, e o conseqüente acúmulo de guanosina monofosfato cíclica GMPc.

Os primeiros estudos da produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos foram feitos por Schmidt e Walter (SCHMIDT, 1994), os quais sugeriram na década de 70 que os mamíferos produzem óxidos de nitrogênio. No início da década de 80 demonstrou-se que a quantidade eliminada destes compostos excedia a quantidade ingerida. Foi demonstrado que camundongos e seres humanos alimentados com uma dieta pobre em NO_3^- excretavam quantidades substanciais deste composto, comprovando, de modo inquestionável, a produção endógena de NO_3^- nos mamíferos (GREEN, 1981(a)). Posteriormente GREEN *et al.*, demonstraram a produção de NO_3^- em camundongos isentos de germes e um estudo do balanço metabólico comprovou a biossíntese de NO_3^- em homens saudáveis (GREEN, 1981(b)). Em 1985 demonstrou-se que macrófagos ativado por compostos bacterianos eram capazes de promover a produção de nitritos e nitratos (STUEHR, 1985). Vale ressaltar que a nitroglicerina é geralmente administrada a indivíduos que sofrem de “angina pectoris” (uma doença causada por fluxo de sangue insuficiente ao músculo cardíaco) para rapidamente, porém temporariamente, aliviar a dor no peito.

O NO é sintetizado biologicamente nos mamíferos por três diferentes isoformas da enzima NOS (SCHMIDT, 1994; NAGANO, 2002), Figura 3, (ROUSSEAU, 2009). A NOS neural (nNOS ou NOS I) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS III) são constitutivas das células neurais e endoteliais, respectivamente. Então, ambas são chamadas de cNOS, enquanto a NOS induzível (iNOS ou NOS II) atua em células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos. Como esquema ilustrado na Figura 4, o NO é formado na célula a partir da arginina por estímulo direto da NO sintetase tipo I e III ou por citocinas via NO sintetase tipo II. Após difusão para fora da célula o NO pode reagir com radicais de oxigênio e então sofrer degradação para óxidos de nitrogênio. NO pode estimular a atividade da guanilato ciclase em células, inibir a síntese de DNA e a atividade da aconitase. A indução de NO sintetase II pode ser inibida por glicocorticóides. Todas NO sintetases são inibidas por análogos da arginina (L-NMMA, L-NA, LNAME). A reação pode ser inibida por hemoglobina e superóxido com inativação de NO, e por azul de metileno, um inibidor da guanilato ciclase. Apesar das cNOS e iNOS não apresentarem diferença significativa nas suas atividades específicas, a atividade da cNOS é dependente da concentração de Ca^{2+} enquanto que a atividade da iNOS é independente da concentração de Ca^{2+} e elas atuam em diferentes níveis de concentração enzimática uma da outra. Desde que a atividade das cNOS é dependente da concentração transiente de Ca^{2+} intracelular, os níveis de NO produzidos nas células endotelial e neural são baixos (abaixo de micromolar) comparados ao nível da NOS em macrófagos (1-10 *m* M) (NAGANO, 2002). Portanto, cNOS é uma isoforma de produção lenta de NO enquanto a atuação da iNOS se dá de forma bem mais expressiva, resultando numa produção rápida, de alta liberação de NO.

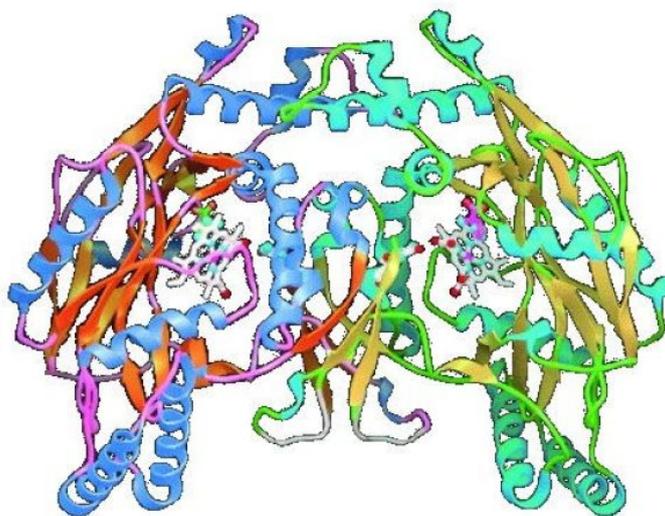


Figura 3 – Enzima óxido nítrico sintetase (dímero).

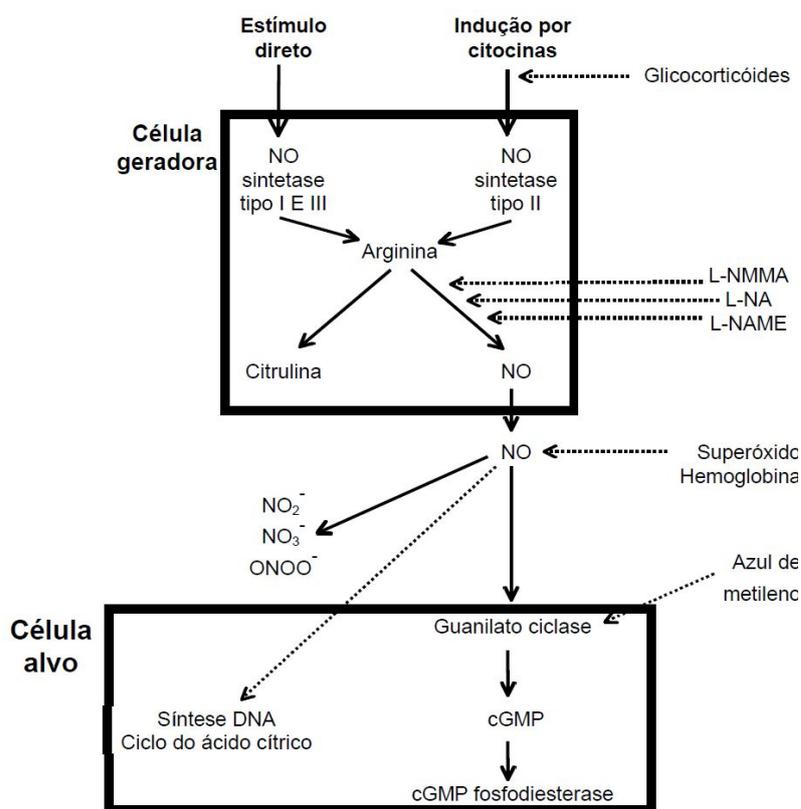


Figura 4 – Formação de NO na célula a partir da arginina por estímulo direto da NO sintetase tipo I e III ou por citocinas via NO sintetase tipo II.

O NO apresenta difusão rápida e a facilidade de penetração em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (MONCADA, 1991). As três principais reações de diluição do NO em sistemas fisiológicos são:

i) Reação com o NO no interior da célula muscular: o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, Figura 5, acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de GMPC.

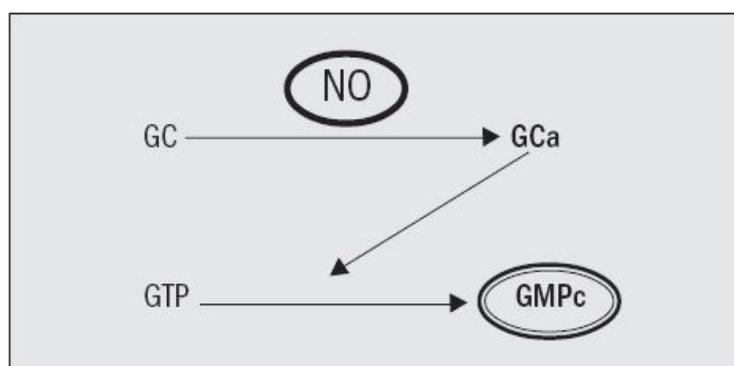


Figura 5 – Formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPC), a partir da guanosina trifosfato (GTP), mediada por NO (DUSSE, 2003).

ii) Reação rápida e irreversível com a oxihemoglobina (Hb) para produzir nitrato:



Em sistemas biológicos o NO diluído apresenta concentração da ordem de 10 a 400 nM. As células sanguíneas vermelhas contém aproximadamente 20 mM de Hb e tem portanto a capacidade de aniquilar o NO difundido nos canais vasculares. O NO pode difundir por volta de 100 μm , a distância média de um capilar, em poucos segundos.

iii) A terceira reação se trata da reação irreversível do superóxido ($\text{O}_2 \cdot^-$) o qual encerra a difusão limite com o óxido nítrico (HUIE, 1993) para formar o poderoso oxidante ânion peroxinitrito (ONOO^-).



O peroxinitrito ONOO^- apesar de ser estável é tóxico, pois seu alcance de difusão é da ordem do diâmetro de uma célula e pode contribuir para danos teciduais. O ONOO^- pode ser produzido em concentrações substanciais por macrófagos ativos (ISCHIROPOULOS, 1992) e neutrófilos (CARRERAS, 1994). Pode ser também uma das principais espécies perigosas produzidas por isquemia miocárdial e cerebral, assim como por inflamações, sepsia e várias outras condições patológicas (MATHEIS, 1992; MULLIGAN, 1991; NOWICKI, 1991). A meia vida do NO cai para a ordem de milissegundos quando o NO se encontra no sangue, devido à rápida reação do NO com as oxiemoglobinas (LIU, 1998) pode ser também devido à rápida reação com o ONOO^- .

1.1.2. Disfunções causadas por falhas no metabolismo de NO

O descontrole do seu delicado equilíbrio (NOS) leva a situações fisiopatológicas. A superprodução inapropriada de NO pode causar uma série de patologias tais como doenças degenerativas, incluindo inflamação, doenças reumáticas, choque séptico, diabetes e isquemia cerebral. Portanto, para regular a produção de NO, o desenvolvimento de inibidores específicos de isoformas de NOS tem sido uma área ativa de pesquisa. Por outro lado, produção insuficiente de NO também causa sérios problemas médicos. Muitas doenças como hipertensão e aterosclerose envolvem deficiência de produção de NO. Portanto, um composto que pode liberar NO sob condições específicas pode ser usado terapêuticamente como paliativo na subprodução de NO. De fato, o mais conhecido doador de NO, nitroglicerina, tem sido utilizado por mais de um século para aliviar ataques agudos de “angina pectoris”.

No presente, doadores de NO têm uma variedade de aplicações biomédicas. Embora a compreensão da fisiologia e patologia do NO pareça bastante incompleta, informações indiretas e diversas correlações sugerem que tanto o excesso quanto a insuficiência de NO induzem doenças e danos a tecidos. De longe, as doenças mais significativas associadas à insuficiência de NO são cardiovasculares. Além de suplementação de NO em situações em que a insuficiência de NO representa patologia, como na disfunção erétil, doadores de NO podem também regular o mecanismo fisiológico. O benefício da administração de NO tem sido reconhecido em muitas outras doenças, além de desordens cardiovasculares, doenças do sistema nervoso e inflamação.

O NO serve também como sinalizador de algumas doenças. No tratamento da asma brônquica, foi mostrado que existe diferença significativa de concentração de NO no

ar expirado e no escarro induzido entre indivíduos saudáveis e indivíduos com a doença, estando significativamente aumentado em asmáticos, Figura 6. O óxido nítrico exalado encontra-se aumentado na asma atópica, aumenta durante as exacerbações, diminui com terapia antiinflamatória (BARALDI, 1997) e aumenta quando doses de corticóides inalados são reduzidas (KHARINOTOV, 1996). Como instrumento de diagnóstico, os níveis de NO exalado discriminam asmáticos de não asmáticos, com alta sensibilidade e especificidade (CHATKIN, 1999).

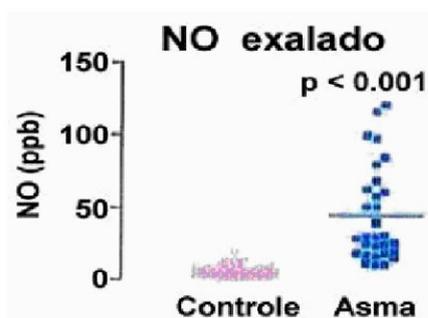


Figura 6 - Comparação entre concentrações de óxido nítrico expirado por indivíduos saudáveis (controle) e apresentando asma brônquica.

1.2. Doadores de NO

Alguns reagentes químicos já foram utilizados em grande escala como doadores contínuos de NO em condições fisiológicas, como a nitroglicerina (NG), o nitroprussiato de sódio (NPS) e a S-nitroso-N-acetil-penicilamina (SNAP) (SHAFFER, 1992). Além destes compostos, vale ressaltar outros doadores de NO como os nitratos orgânicos, nitritos orgânicos, complexos NO-amino (NOCs), S-nitrosotióis (RSNOs), complexos ferro-nitrosila e rutênio-nitrosila (KATAYANA , 2008). Porém o NPS como agente doador de NO, oferece risco de contaminação por cianeto, um veneno que pode ser subproduto de seu uso no organismo.

A NG foi utilizada durante mais de 100 anos para tratamento de angina e outros problemas de circulação. Até então, o mecanismo de ação deste doador de NO, era desconhecido. Atualmente, sabe-se que a NG é metabolizada dentro da mitocôndria pela enzima nitrato redutase (aldeído deshidrogenase mitocondrial) que catalisa especificamente a decomposição de NG, formando 1,2-dinitrato de glicerina e nitrito, levando à produção de GMPc e à relaxação da musculatura lisa [32] (CHEN, 2002).

1.2.1. Sistemas de liberação controlada de NO

Devida a importância da molécula de NO produzida pelo organismo dos mamíferos, existe grande interesse dos pesquisadores sobre maneiras de obter e liberar NO através de sistemas que possam controlar a liberação local de NO em organismos vivos. No sentido de quantificar NO *in vitro* e *in vivo*, nosso grupo de pesquisas tem desenvolvido metodologias de quantificação de NO pela técnica de EPR através do uso de Fe(DETC)₂ como *trap* (BORIN, 2003), tem trabalhado na construção de sensores com Fe(DETC)₂ ocluso em matrizes de sílica (MELO, 2004) e de látex – borracha natural (HERCULANO, 2006).

Sistemas de Liberação Controlada (SLC) trata-se de materiais biocompatíveis que possam ser usados como membranas, por exemplo, para liberação de NO em determinadas regiões do organismo que apresentarem baixa concentração desta molécula.

O principal objetivo das pesquisas recentes, a respeito de sistemas doadores de NO, tem sido o desenvolvimento de sistemas de liberação local de NO, tal que a taxa de liberação a partir de agentes liberadores de NO possa ser controlada (IGNARRO, 2002). Alguns estudos sugerem que as cisteínas tióis (RSHs) de peptídeos bioativos, tais como a glutatona (GSH), as mais abundantes proteínas não-tiol encontradas *in vivo*, e N-acetilcisteína (NAC), um endógeno produto de cisteína, possam conduzir NO nos tecidos (GASTON, 1999; WOOD, 1996). Acredita-se que os tióis mostrados na Figura 7, estão envolvidos intrinsecamente no metabolismo e mobilização de NO (HOGG, 1996). A GSH está especialmente susceptível a formar S-nitrosoglutatona (GSNO) e a NAC para formar S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC), *in vivo*. GSNO e SNAC pertencem a uma classe de compostos denominados doadores de NO e agem como reservatórios de NO *in vivo*,

devido a excelente estabilidade deles em comparação com o radical livre NO (SINGH, 1999; BUTLER, 1997; ASKEW, 1995; DE OLIVEIRA, 2002).

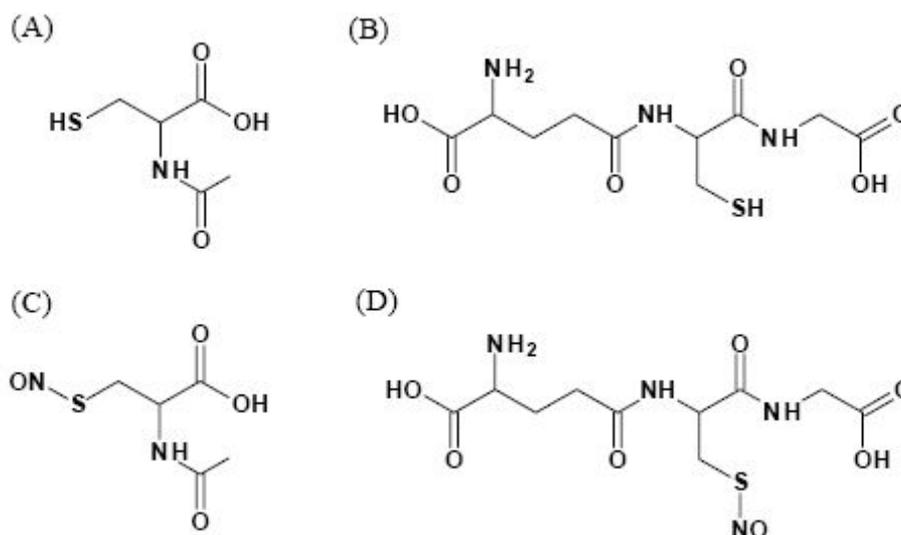


Figura 7 – Estruturas de (A) N-acetil-cisteína (NAC), (B) Glutathiona, (C) S-nitroso-N-acetilcisteína (SNAC) e (D) S-nitrosoglutathiona (GSNO) (SHISHIDO, 2003) .

Diversos sistemas de liberação controlada de NO são desenvolvidos utilizando NO aprisionado em bases poliméricas, tal que estes sistemas podem fazer com que o NO se difunda, de forma controlada, para fora da base polimérica. Além de eliminar o risco de intoxicação (caso do NPS), as bases poliméricas que promovem a liberação local do NO, apresentam uma alternativa que permite a redução das doses e dos riscos dos tratamentos cardiovasculares.

Estudos realizados (SHISHIDO, 2003) através de experimentos em animais e depois em pessoas saudáveis, conseguiram mostrar que a aplicação de polímeros sobre a pele era capaz de dilatar os vasos sanguíneos e aumentar o fluxo sanguíneo na área. Estes estudos se concentram no desenvolvimento de uma formulação baseada em hidrogéis

termicamente reversíveis capazes de liberar NO a partir de RSNOs (SHISHIDO, 2003), usando um copolímero tribloco F127 como uma matriz. O copolímero tribloco F127 é disponibilizado comercialmente e se trata de um polímero surfactante não-iônico que possui uma estrutura simétrica composta por poli(óxido etileno)₉₉-poli(óxido propileno)₆₅-poli(óxido etileno)₉₉ (DESAI, 2000). Os hidrogéis de F127 apresentam baixa toxicidade e são bons candidatos para sistemas liberadores de droga.

Alguns sistemas doadores de NO apresentam má solubilidade em meio fisiológico, falta de segmentação específica, capacidade limitada de entregar certas concentrações terapêuticas e ainda, em alguns casos, podem gerar subprodutos tóxicos (diaminas e nitrosaminas) (GASTON,1993; HOGG, 1996; SINGH, 1999). Trabalhos usando nanopartículas apresentam uma solução e tem sido estudado extensivamente por pesquisadores, com o objetivo de aumentar a eficácia da permeabilidade de partículas doadoras de NO em sistemas fisiológicos, liberar NO localmente e controlar a liberação de NO (BUTLER, 1997; ASKEW, 1995 DE OLIVEIRA, 2002; ALBERT, 1991; VODOVOTZ, 2000; AL-SA'DONI, 2000). Vários doadores de NO em micro e nano escala têm sido desenvolvidos usando uma gama de macromoléculas incluindo albumina e conjugados, copolímero ácido polilactoglicólico, microesferas de polietilamina, partículas de polimetacrilato, (SEXTON, 1994; STUEHR, 1993), *clusters* de ouro, (SANTOS, 2001; SANTOS, 2002) dendrímeros (MEYER, 1994) e partículas de sílica (DESAI, 2000; BLONDER, 1999). Entre estes, nanopartículas de sílica têm se mostrado uma base atraente como veículo de entrega controlada de NO, por causa de suas características físicas e versatilidade química (WANG, 2005; WANG, 2002; HRABIE , 1999; KUMAR, 2005).

Assim posto, sobre a importância de novos SLCs de NO, neste trabalho investigamos dois biomateriais com o propósito de usá-los como matrizes para a

construção de novos SLCs de NO. As matrizes estudadas foram obtidas a partir dos polímeros: borracha natural (látex), e do siloxano-poli(oxipropileno) PPO, como SLCs de NO. Nos itens subsequentes será abordado com mais detalhes, cada tipo de SLC de NO investigados.

1.2.2. Sistema de Liberação Controlada (SLC) de NO a base de siloxano-poli(oxipropileno) PPO

O siloxano-poli(oxipropileno) PPO é uma matriz híbrida muito interessante para a construção de um SLC de NO, pelo fato de os materiais híbridos serem capazes de unir em um só material propriedades típicas de materiais orgânicos, como flexibilidade, e propriedades típicas de materiais inorgânicos, como excelentes propriedades mecânicas e ópticas, além de apresentar transparência e fácil síntese. A sua rede de poros facilita a difusão do NO, excelente característica para a construção de SLCs. Os SLCs de NO a base de PPO são preparados pelo método sol-gel, o qual será descrito nos próximos itens. Para investigar as potencialidades do PPO como SLC de NO é utilizado um espectrômetro de Ressonância Paramagnética eletrônica (RPE).

1.2.3. Sistema de Liberação Controlada (SLC) de NO a base de Látex

A matriz a partir de látex natural já vem sendo investigada por nosso grupo de pesquisas (HERCULANO, 2006) como sensor de NO. O látex natural é obtido da seringueira (*Hevea brasiliensis*) e possui muitas aplicações industriais, principalmente a automobilística, devido a suas características físicas, como elasticidade, plasticidade, resistência ao desgaste (fricção) e propriedades de isolamento elétrico (HERCULANO, 2005). O látex natural apresenta biocompatibilidade e estímulo natural a angiogênese e por este motivo tem se tornado um material interessante para construção de membranas para uso em próteses e enxertos médicos (ALVES, 2003).

A solução de látex foi extraída da seringueira “*Hevea brasiliensis*” na fazenda experimental da ESALQ, USP-Piracicaba/SP (MELO, 2004). Logo após a extração, o látex forma um sistema coloidal polifásico e polidisperso. Depois de centrifugado, o látex pode ser representado como sendo formado por três componentes fundamentais:

- **Fase borracha (30 a 50%) (hidrocarboneto isoprênico)**, composição estrutural. Apresenta coloração branca, formada quase exclusivamente de borracha (STEIN, 2000).
- **Soro (48%)**. Fração intermediária aquosa é o meio dispersivo do sistema coloidal látex e contém proteínas e sais dissolvidos.
- **Fração de fundo (depósito) (15%)**. Apresenta coloração amarela e é constituída por: lutóides (proteínas, fosfolipídios e sais minerais) e partículas Frey-Wyssling (constituídas de carotenóides e lipídios conferindo à borracha, a coloração amarela).

O látex natural, no primeiro instante que se escoia da seringueira, tem pH levemente alcalino ou neutro (7,0-7,2). Por efeito de ações químicas e sobretudo bioquímicas, vai se acidificando rapidamente em contato com o ar. As partículas de borracha estão suspensas numa emulsão aquosa a qual também contém materiais protéicos. Elas são prontamente coaguladas por ácidos tais como ácido fórmico ou ácido acético, e para uso comercial são então formadas em chapas por tratamento em uma prensa aquecida.

Sob o ponto de vista técnico, o beneficiamento do látex e produtos secundário da seringueira segue duas linhas básicas (D' AUZAC, 1989; BERNARDES, 2000):, linha de látex concentrado e linha de borracha sólida. Elas são definidas, principalmente, pelos produtos finais do beneficiamento e pela utilização industrial a que se destinam os produtos. A linha que mais nos interessa é a de látex concentrado, pois deste material saem os produtos destinados a aplicações médicas.

A matéria prima da linha de látex concentrado é o látex de campo, sendo que este passa por um processo de concentração (retirada da água) elevando o teor de borracha seca para 60 % através de processo físico-mecânico (centrifugação) ou físico-químico (cremagem). Deste processo resulta o látex com 60% de borracha seca e o soro que contém entre 0,5% e 2% de borracha seca.

1.3. O método sol-gel

O método sol-gel é um processo no qual uma suspensão coloidal transforma-se em gel pelo estabelecimento de ligações entre as partículas ou entre as espécies moleculares, levando à formação de uma rede sólida tridimensional. De acordo com a literatura (MELO, 2004), materiais recentemente obtidos pela técnica do sol-gel tem sido utilizados no aprisionamento de enzimas (MOMENI, 1999), anticorpos (GUN, 1996), catalisadores inorgânicos (ZHAO, 1996), estendendo-se para aplicações na indústria da microfabricação (LI, 2000) e na produção de materiais cerâmicos.

O uso do processo sol-gel na produção de sensores para aplicações analíticas na indústria química tem despertado considerável interesse (HIRATSUKA, 1995) devido a vários fatores: a facilidade da fabricação, a flexibilidade do projeto de síntese e o fato de que a oclusão de materiais no seu interior como as enzimas não altera suas atividades catalíticas (BRINKER, 1990; ILER, 1979; SAKKA, 1984; HENCH, 1990; CORRIU, 1996).

O método sol-gel trata-se de qualquer rota de síntese de materiais onde ocorre uma transição de um sistema sol para um sistema gel. O termo sol define uma dispersão de partículas coloidais (dimensão entre 1 e 100nm) estável num fluido e o termo gel é referente a um sistema formado pela estrutura rígida de partículas coloidais (gel coloidal) ou de cadeias poliméricas (gel polimérico).

Os géis podem ser classificados de acordo com a estrutura das partículas em coloidais ou poliméricos. Os géis coloidais resultam da agregação linear de partículas primárias (Figura 8a), que só pode ocorrer pela alteração apropriada das condições físico-químicas da suspensão. Os géis poliméricos são geralmente preparados a partir de soluções

onde se promovem reações de polimerização. Neste caso, a gelatinização ocorre pela interação entre as longas cadeias poliméricas lineares (Figura 8b).

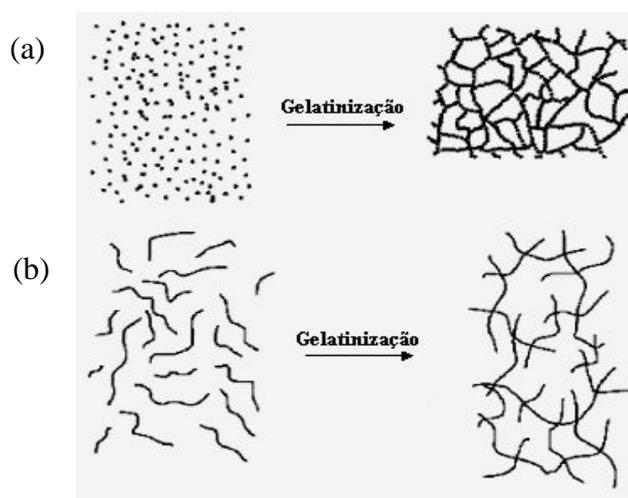


Figura 8 – Esquema da transição sol-gel: (a) formação de gel particulado e (b) formação de gel polimérico.

A química do processo sol-gel (SOL-GEL SCIENCE AND TECHNOLOGY , 1989) é baseada em reações de polimerização. Os precursores usualmente empregados são soluções aquosas de sais inorgânicos (cloretos, nitratos, sulfetos, etc.) ou alcóxidos dissolvidos em solventes orgânicos. Após as reações de hidrólise e subsequente condensação das espécies hidratadas, pode-se ter a formação de partículas coloidais ou de cadeias poliméricas lineares. Os precursores mais utilizados na rota de preparação dos sólidos pelo processo sol-gel são do tipo alcóxidos, como o 3-isocianatopropiltriétoxissilano (IsoTrEOS) o que justifica a utilização desse composto neste trabalho como veremos na seção experimental. A transformação de um sol em gel é designada transição sol-gel. Após secagem do gel, um xerogel é formado.

1.4. Ressonância Paramagnética Eletrônica

A Ressonância Paramagnética Eletrônica RPE (em inglês, electron paramagnetic resonance EPR) é observada em sistemas com elétrons desemparelhados, como radicais livres, íons com camadas eletrônicas incompletas ou defeitos em sólidos (BORIN, 2003).

Radicais livres geralmente têm vida curta, mas desempenham importantes papéis em muitos processos, como em fotossíntese, oxidação, catálise, reações de polimerização, etc. Substâncias com elétrons desemparelhados são encontradas na natureza, ou podem ser produzidas artificialmente. Como exemplos de substâncias naturais, temos as moléculas de NO, O₂ e NO₂, e os íons de metais de transição e seus complexos, como Fe³⁺, Va⁴⁺ e [Fe(CN)₆]³⁻. Essas substâncias são estáveis e facilmente estudadas por RPE.

Portanto a técnica de RPE é uma poderosa ferramenta usada em vários campos da física, química, ciências dos materiais, biologia, medicina, entre outros. Neste trabalho será utilizada a técnica RPE para detecção de NO, porém como não é possível monitorar o NO livre, pois o NO exposto à atmosfera sofre oxidação em aproximadamente 10s, aprisionamos esta molécula em matrizes e quantificamos com o tempo a liberação de NO.

1.4.1. Fenômeno da Ressonância Paramagnética Eletrônica RPE

A Ressonância Paramagnética Eletrônica RPE, é baseada na absorção ressonante de microondas por substâncias paramagnéticas.

Historicamente a descoberta do spin do elétron deveu-se ao experimento de Stern-Gerlach no qual observou-se que um feixe de átomos de prata era separado em dois componentes por um campo magnético inhomogêneo. Esse resultado era difícil de ser explicado pela velha teoria quântica porque a separação em apenas dois componentes implicava na existência de um momento angular semi-inteiro. Goudsmit e Uhlenbeck resolveram o problema com a sugestão radical de que o momento angular semi-inteiro fosse devido a um spin intrínseco do elétron, e com essa teoria foram capazes de explicar a estrutura fina do espectro atômico. Mais tarde, a formulação da mecânica quântica de Dirac mostrou a necessidade de invocar um grau de liberdade interno para um elétron, com as propriedades de momento angular.

A interação entre o momento magnético do elétron e um campo magnético externo caracteriza o fenômeno da ressonância paramagnética eletrônica. A condição de ressonância pode ser detectada por espectrômetros, a partir de campos magnéticos correspondentes a um fóton do campo das microondas e a condição de ressonância é atingida variando-se o campo magnético até que o campo magnético na condição de ressonância H seja atingido, Figura 9.

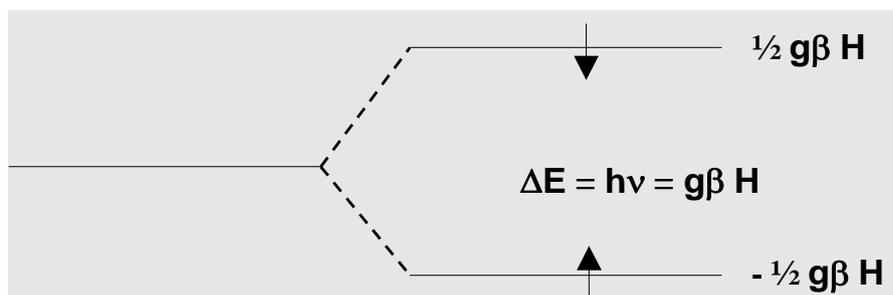


Figura 9 – O desdobramento dos níveis de energia e a transição devido ao fenômeno da Ressonância do Spin Eletrônico.

Sendo que, g é fator de desdobramento espectroscópico ($g = 2,00023$) denominado simplesmente de fator g , β é o magnéton de Bohr e ΔE é a diferença de energia para elétrons com autovalores de momento magnético de spin $+\frac{1}{2}$ ou $-\frac{1}{2}$.

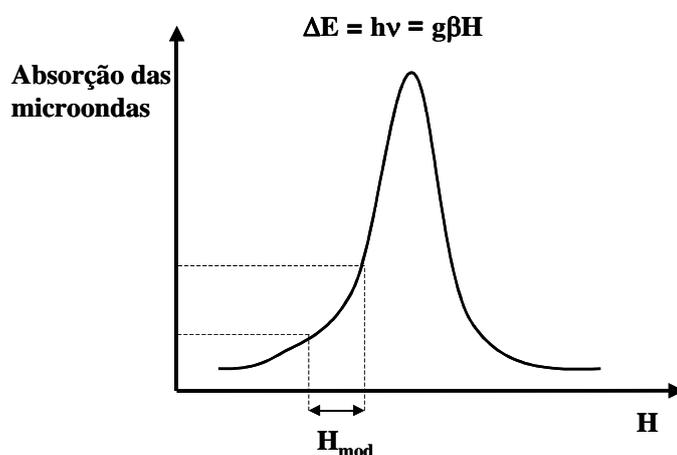
Existem dois estados que são degenerados quando o campo H for nulo, e cuja separação aumenta linearmente à medida que H aumenta. Podemos combinar a separação entre esses dois níveis de energia com um quantum de radiação através da condição de frequência de Bohr: “A transição entre os níveis de energia é induzida quando o sistema recebe uma quantidade de energia ($h\nu$), de um campo eletromagnético, equivalente a diferença entre estes níveis.” **Essa condição, chamada de ressonância, é expressa pela seguinte relação:**

$$E = h\nu = g\beta H \quad (4)$$

Aqui está então, a base para uma técnica espectroscópica: uma transição do spin eletrônico está associada com a emissão ou a absorção de energia na forma de radiação de frequência. Além disso, como a frequência da radiação é proporcional ao campo magnético aplicado, podemos em princípio, estudar o espectro de spin em qualquer

região do espectro eletromagnético, bastando para isso escolher o campo apropriado. Em um sistema a absorção de energia a partir de um campo magnético aplicado pode ser monitorado por um sistema eletrônico de detecção que faz parte do espectrômetro. A Figura 10(a) mostra o espectro de absorção de energia com a variação do campo. Usualmente é apresentada a primeira derivada da curva de absorção, devido a aspectos experimentais, Figura 10(b).

(a)



(b)

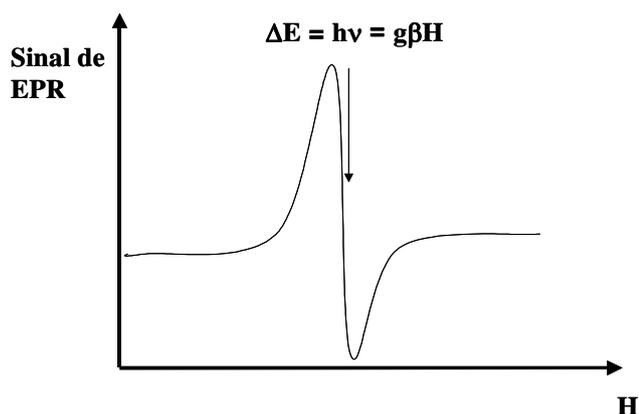


Figura 10 – Ilustração (a) da absorção das microondas em um espectro de RPE com um possível campo magnético de amplitude de modulação H_{mod} e (b) espectro de RPE: primeira derivada do espectro de absorção da microonda.

1.4.2. Interação Hiperfina

A interação hiperfina (IH) é detectada como uma perturbação no sinal de RPE, esta perturbação é causada devido a interação do spin eletrônico com o spin nuclear. A contribuição da Ressonância Magnética Nuclear (RMN) no espectro de RPE é pequena, pois as transições energéticas em RMN ocorrerem a baixas frequências (~MHz) já as transições em RPE ocorrerem em frequências altas (~GHz).

As IHS magnéticas podem ser isotrópicas ou anisotrópicas. As interações anisotrópicas dependem da orientação relativa dos dipolos magnéticos do núcleo e do elétron e as isotrópicas, são relativas à probabilidade finita de encontrar o elétron no núcleo (interação de Fermi ou de contato). A primeira tende a zero, em grande parte dos materiais, quando realizamos um processo de média, restando a segunda, de natureza isotrópica (BORIN, 2003). As IHS isotrópicas ou de contato são proporcionais a densidade de spin eletrônica total nos núcleos e podem ser distinguidas das anisotrópicas em um experimento de RPE. A Figura 11 mostra os níveis de energia de um elétron interagindo com um núcleo de spin 1/2 e com constante de acoplamento A e a primeira derivada das curvas de absorção em um campo magnético H

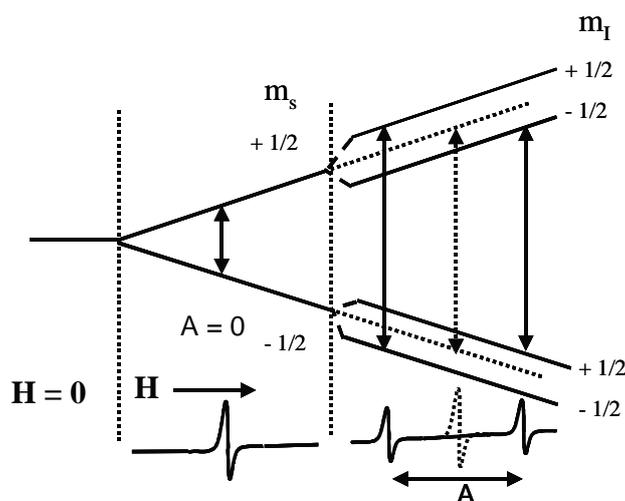


Figura 11 - Níveis de energia de um elétron interagindo com um núcleo de spin $1/2$ e com constante de acoplamento A e a primeira derivada das curvas de absorção em um campo magnético H .

A distância entre os picos é correspondente à constante de acoplamento A e o centro entre as linhas (curva tracejada) determina o fator g .

1.4.3. Anisotropia do fator g

A partir do fator g , é possível obter informação acerca da estrutura eletrônica do centro paramagnético. Visto que um elétron desemparelhado sofre não só a ação do campo magnético aplicado, H , mas também o efeito de campos magnéticos locais, como o de átomos com spin nuclear. Utilizamos o elétron livre, pois é uma boa aproximação para sistemas de partículas isoladas, como íons em estado de vapor, por exemplo. Entretanto, quando trata-se de íons ligados a uma rede cristalina, o spin resultante é diferente de $1/2$,

devido às interações elétricas e magnéticas com as cargas elétricas presentes na rede.

Estas interações são tratadas como perturbações no sistema.

Na maioria das situações em que usamos amostras biológicas, as entidades paramagnéticas estão randomicamente orientadas, e o espectro de RPE observado representa uma sobreposição de todos os possíveis valores de H_r . Quando os valores principais do fator g diferem uns dos outros significativamente, eles podem ser obtidos pelo espectro. Na Figura 12 é ilustrado um exemplo disso para um sistema onde $g_{//} > g_{\perp}$. É comum chamarmos os fatores g de: $g_{//}$ o fator g paralelo ao eixo de simetria ($g_{//} = g_{zz}$) e g_{\perp} o fator g perpendicular ao eixo de simetria ($g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$).

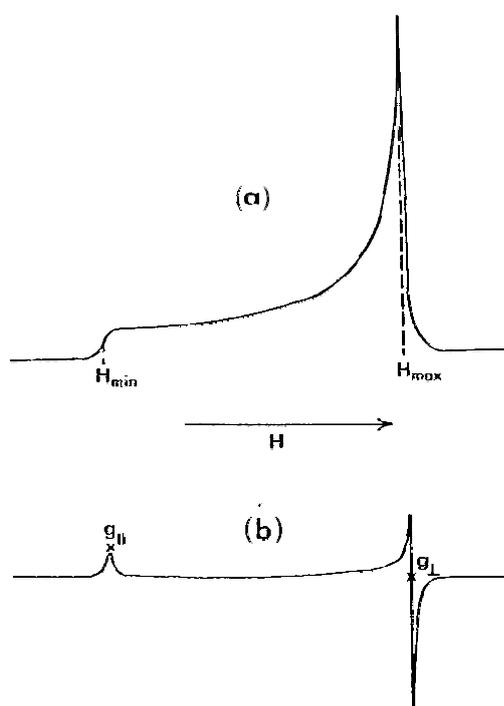


Figura 12 - Espectro de RPE idealizado de uma amostra contendo espécies paramagnéticas randomicamente orientadas de um sistema de simetria axial com $g_{//} > g_{\perp}$.

(a) Espectro de absorção e (b) primeira derivada do espectro de absorção.

2. OBJETIVOS

Neste presente trabalho, o foco foi a construção de SLCs de tal maneira a terem uma taxa de liberação controlada e entrega localizada de NO. Para construção destes SLCs foram utilizadas matrizes sólidas poliméricas, de látex e de (PPO). Os SLCs foram obtidos através da oclusão do agente aprisionador ferro(II)-dietilditiocarbamato nas matrizes, com a finalidade de aprisionar a molécula de NO. Foram analisadas matrizes de látex e PPO. As matrizes de PPO analisadas foram as de peso moleculares 300, 400 e 2000 g/mol, com diferentes concentrações de FeDETC.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Breve descrição das técnicas utilizadas

A caracterização e análise da taxa de liberação de NO, a partir dos SLCs de NO a base de látex e PPO, foram feitas utilizando um espectrômetro de RPE. Os dados foram tratados no Origin 7.5.

Neste trabalho foi utilizado um espectrômetro RPE VARIAN-E4 de 1969, Figura 12, acoplado a um amplificador Lock-in EG&G 7260, a um freqüencímetro HEWLETT PACKARD 5350B controlado computacionalmente através de placa e cabos GPIB.



Figura 13 – Espectrômetro de Ressonância Paramagnética Eletrônica RPE, VARIAN-E4/1969.

A caracterização do sinal de NO nos SLC foram feitos com o espectrômetro RPE ajustado de acordo com os parâmetros da Tabela 1

Tabela 1 - Valores das variáveis do espectrômetro durante as medidas do sinal RPE dos SLCs de NO.

Frequência de microondas	<i>9,48 GHz</i>
Potência do microondas	<i>20 mW</i>
Constante de tempo	<i>500 ms</i>
Frequência de modulação	<i>100 KHz</i>
Amplitude de modulação	<i>0,4 mT (4 G)</i>
Campo Central	<i>331,5 mT (3315 G)</i>
Tempo de Varredura	<i>120 s</i>
Número de varreduras	<i>3</i>
<i>Temperatura</i>	<i>300 K</i>

A técnica de RPE é capaz de quantificar de modo relativo, a concentração das entidades paramagnéticas presentes na amostra em estudo. Para essa quantificação, como lido em MELO (MELO, 2004), dois métodos são geralmente utilizados: 1) medindo-se a altura do sinal, como na Figura 14 (a); ou 2) medindo-se a área da curva obtida entre a linha de base e o sinal por dupla integração, como na Figura (14b).

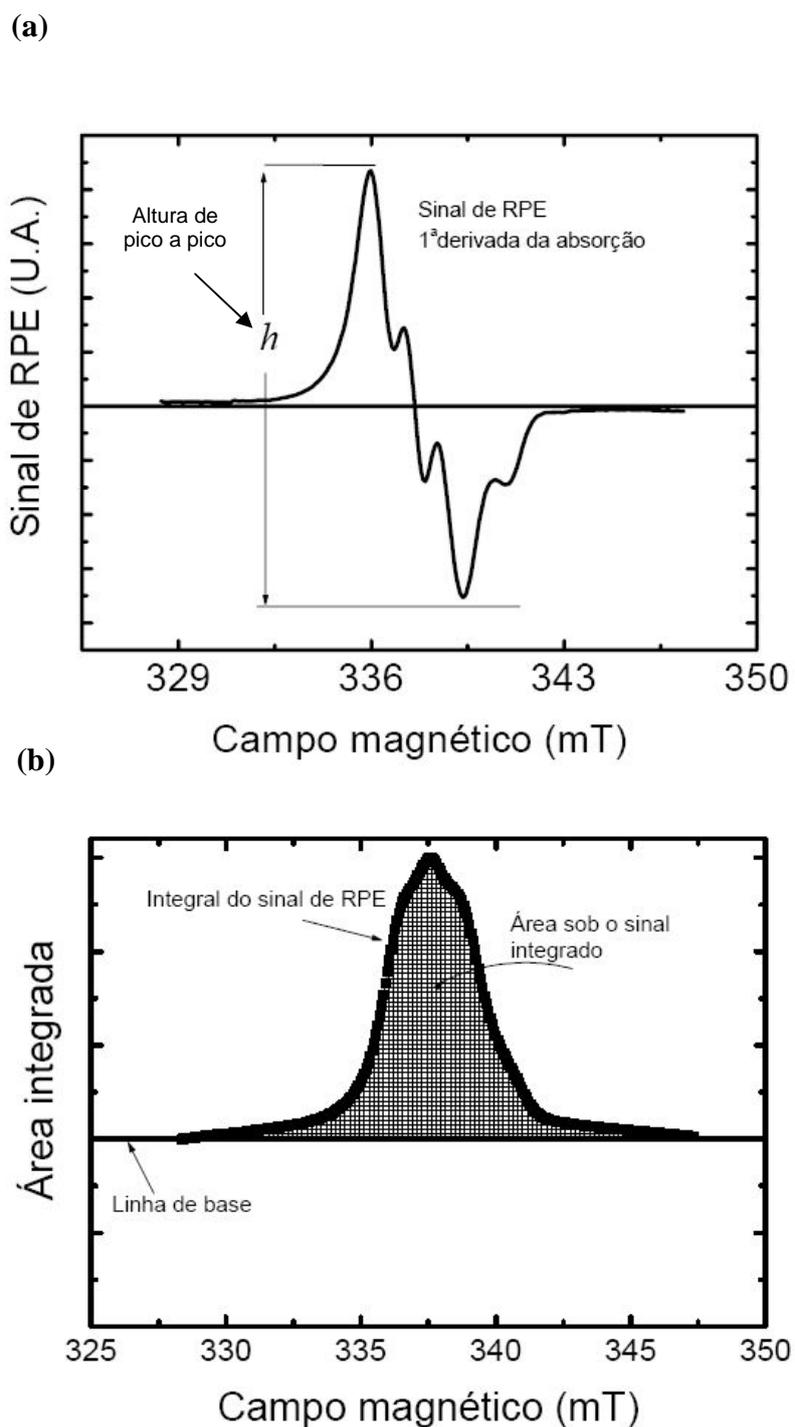


Figura 14 - Métodos de obtenção da intensidade do sinal de RPE: (a) pela altura do sinal RPE de pico a pico (pico superior ao pico inferior), e (b) pela área obtida por dupla integração do próprio sinal de RPE.

Nos SLCs desenvolvidos neste trabalho, foi investigado somente uma espécie paramagnética, o NO. Para construção dos SLCs de NO primeiro foram preparadas as amostras a base da borracha natural, látex, e a base dos polímeros PPO400 e PPO2000 com Fe(DETC)₂ incorporado. Todas as amostras foram estocadas à temperatura ambiente. O SLC de NO a base látex, não apresentou nenhuma mudança significativa na forma de linha nos espectros analisados, desta forma neste tipo de sistema a intensidade do sinal será determinada pelo método (1), descrito como mostra a Figura 14(a). Porém o SLC de NO a base dos polímeros PPO400 e PPO2000 apresentaram mudança significativa na forma de linha nos espectros analisados, neste caso a intensidade do sinal de RPE será determinada pelo método (2), de acordo com a Figura (14b).

3.2. Preparação dos SLCs de NO

A preparação dos SLCs se dá em quatro etapas:

- i) preparação da solução de FeDETC;
- ii) preparação das matrizes a partir da mistura de um dos precursores PPO ou látex com solução de FeDETC;

Estas etapas serão discutidas a seguir.

3.2.1. Preparação da solução de FeDETC

Para o preparo das soluções de dietilcarbamato de ferro (FeDETC) foram utilizados os seguintes compostos: cloreto de ferro hexahidratado(FeCl₃. 6H₂O), N-N-dimetilformamida (DMF) (C₃H₇ON), N,N-dietilditiocarbamato de sódio trihidratado

(DETC) ($C_5H_{10}NNaS_2 \cdot 3H_2O$). A solução de FeDETC foi preparada dissolvendo-se 12 mg de Cloreto de ferro com 20 mg de DETC em 3 mL de DMF sob agitação magnética durante 10 minutos.

3.2.2. Matriz de PPO

A matriz foi obtida através da oclusão do *agente aprisionador* FeDETC numa matriz de PPO, Figura 15. O PPO foi obtido através do processo sol-gel. Os reagentes 3-isocianatopropiltriétoxissilano (IsoTrEOS) e O,O'-bis(2-aminopropil(polióxipropileno)) foram misturados em THF, formando o precursor híbrido $3(EtO)Si-(PPO)-Si(OEt)_3$. O sol foi obtido pela mistura do precursor, FeDETC e uma solução de etanol contendo HCl. A reação de hidrólise foi promovida através da adição de água, seguindo-se da reação de policondensação. Este processo foi realizado para polímeros PPO com peso molecular (M_w) de 300, 400 e 2000 g/mol, obtendo-se as matrizes chamadas respectivamente de PPO300, PPO400 e PPO2000.

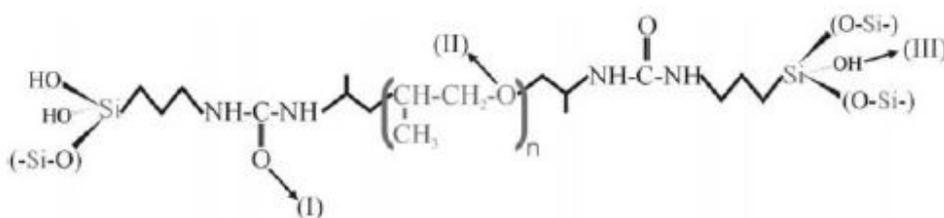


Figura 15 - Fórmula molecular do híbrido PPO, com $n = 34$ e 5 para o PPO2000 e PPO300, respectivamente.

As primeiras matrizes de PPO que utilizamos Tabela 2, foram fornecidas pela professora Leila A. Chiavacci, do Departamento de Fármacos da UNESP de Araraquara. Denominaremos estas primeiras matrizes sintetizadas (Tabela 2), de matrizes do lote A.

Tabela 2 – Relação de FeDETC nas amostras de PPO300 e PPO2000 (lote A) feitas pelo grupo da professora Leila A. Chiavacci.

Amostra	(m/m%) de FeDETC
PPO300	Zero
PPO300	1,26
PPO300	2,52
PPO300	3,25
PPO300	6,50
PPO2000	Zero
PPO2000	3,25

Após os primeiros estudos de SLC utilizando as matrizes do lote A, precisávamos efetuar a síntese através do processo sol-gel de um novo lote de matrizes, para garantir a reprodução dos resultados. Porém, o complexo de ferro responsável pelo aprisionamento do NO não permanecia estável na matriz. Além disso, algumas matrizes não gelificaram, indicando algum problema possivelmente com a reação de hidrólise. Esse problema foi provocado possivelmente pela qualidade dos reagentes que estavam sendo utilizados. Após a troca dos reagentes, partimos para um longo processo de otimização dos parâmetros de síntese da matriz, através da alteração da concentração de água, catalisador e

do complexo de ferro na matriz. Recentemente chegamos aos melhores parâmetros de síntese das matrizes de PPO400 e PPO2000, Tabela 3.

As novas sínteses de PPO foram feitas com as amostras PPO400 e PPO2000, Tabela 3. Denominaremos este novo lote de sínteses de lote B. Não utilizamos mais o precursor PPO300, porque este tipo de precursor não nos foi mais fornecido.

A solução de FeDETC foi ocluída na matriz de PPO em diversas concentrações. Desta forma, para avaliação da quantidade ideal de FeDETC nas matrizes do lote B, foram usadas diferentes concentrações de FeDETC nas sínteses. A Tabela 3 apresenta a quantidade de FeDETC na matriz de PPO em percentual em massa (m/m%) e em percentual molar (mol%).

Tabela 3 – Relação de FeDETC nas amostras de PPO400 e PPO 2000 (lote B).

Concentração de FeDETC	
m/m%	
	0,23
	0,35
	0,69
	1,37
	2,04
	2,71
	3,36
	4,00
	4,64
	5,27
	5,89

As matrizes de PPO2000 feitas pelo método sol-gel do lote B, com concentração de FeDETC 0,23 m/m%, 0,35 m/m%, 2,71 m/m% e 5,27 m/m%, não chegaram a formar a fase xerogel. No processo de formação das matrizes PPO2000,

3,36m/m%, 4,00m/m%, 4,64 m/m% e 5,89 m/m%, o precursor PPO2000 não se misturou com solução de FeDETC e não ocorreu o processo de hidrólise e subsequente condensação. Portanto, não houve a formação de cadeias poliméricas.

As matrizes de PPO400 feitas pelo método sol-gel, com concentração de FeDETC 0,23 m/m%, 0,35 m/m%, 1,37 m/m%, 2,71 m/m%, 3,36 m/m% e 5,27 m/m%, não chegaram a formar a fase xerogel.

Obtivemos sucesso na síntese das matrizes de PPO2000 com concentração de FeDETC 0,69 m/m%, 1,37 m/m% e 2,04m/m% e também nas síntese das matrizes de PPO400 com concentração de FeDETC 0,69 m/m%, 2,04 m/m%, 4,00 m/m%, 4,64 m/m% e 5,89 m/m%, as quais formaram a fase xerogel.

3.2.3. Matriz de Látex

O látex utilizado como matriz para nossos SLC, foi o látex natural concentrado, cuja estrutura molecular é apresentada na Figura 16. O látex foi diluído numa proporção de 1:1 em água deionizada. Para a oclusão do agente aprisionador de NO na matriz de látex misturamos em mesma proporção o FeDETC e o látex diluído. Foi depositado com auxílio de micropipeta, 3 ml da solução látex/FeDETC em 8 placas de Petri. A solução látex-FeDETC foi submetida a um procedimento de secagem em estufa (temperatura 50° C) por 3 dias. Após o processo de secagem cada uma das 8 amostras cujas dimensões aproximadas eram 5,9 cm de diâmetro e 0,1 cm de espessura, foram divididas em pedaços iguais, retangulares de dimensões aproximadamente 0,6 cm por 0,2 cm.

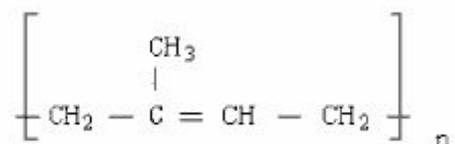
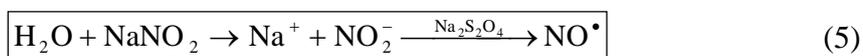


Figura 16 – Estrutura molecular do látex natural.

3.2.4. Aprisionamento de NO nos SLCs de látex e PPO

Depois de prontas, as matrizes tanto de látex quanto de PPO, são mergulhadas em solução aquosa saturada de NO, para aprisionamento do NO no SLC, como descreveremos a seguir. O radical livre, óxido nítrico foi obtido pela redução do nitrito de sódio (NaNO_2) utilizando ditionito de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$), como descrito na seguinte reação.



Após mergulhar as matrizes na solução saturada de NO ($[\text{NO}] \sim 2,5 \text{ mM}$) durante 30 minutos, de acordo com a equação 5, as mesmas são secas e logo após medidas no espectrômetro de RPE.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O PPO é uma matriz híbrida ideal para a construção de um SLC, devido à suas ótimas propriedades mecânicas, transparência e fácil síntese. A sua rede de poros facilita a difusão do NO, o que contribui para a liberação de NO. De acordo com a literatura, os efeitos biológicos do NO são dependentes do seu local de atuação, fonte de produção e da concentração (KATSUKI, 1977). O foco das pesquisas foi em desenvolver SLCs que possam ser implantados em sistemas biológicos e, através de um estímulo externo, provocar a liberação local de NO. Foi investigada a taxa de liberação de NO aprisionado nas matrizes de PPO300, PPO400 e PPO2000 do lote A e lote B, Tabela 4.

A matriz de látex também é promissora em aplicações biomédicas por apresentar excelentes propriedades de bio-compatibilidade (MRUE, 2004), de estímulo natural a angiogênese e boas propriedades mecânicas (FRADE, 2001). A matriz de látex contendo o FeDETC como agente aprisionador de NO permite a liberação natural e gradativa de NO. Exploramos maneiras de liberar NO localmente em sistemas biológicos. Com esse objetivo, investigamos o sinal de RPE em função do tempo, ou seja a taxa de liberação de NO aprisionado na matriz de látex-FeDETC em diferentes condições, mostradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Matrizes de PPO300, PPO400 e PPO2000 (lote A e lote B) e matrizes a base de latex, expostas a diferentes condições.

Condições que as matrizes foram expostas	PPO2000 e 300 (Lote A)	PPO2000 e 400 (Lote B)	Latex
Temperatura ambiente, no escuro (grupo controle).	X	X	X
Temperatura de 50°C	X	X	X
Campo magnético com amplitude de modulação de 40 G a 100 KHz	-	X	X
Radiação ultravioleta (UV)	X	-	-

Nos itens subseqüentes são apresentados os resultados das análises realizadas, bem como as discussões a respeito da liberação de NO a partir das matrizes estudadas.

4.1. Sistema de liberação controlada de NO a base de PPO

4.1.1. Intensidade do Sinal RPE

As Figuras 17 e 18 mostram, respectivamente, o sinal RPE do SLC de NO a partir das primeiras matrizes sintetizadas, lote A (Tabela 3), PPO300 e PPO2000 com diferentes concentrações de FeDETC.

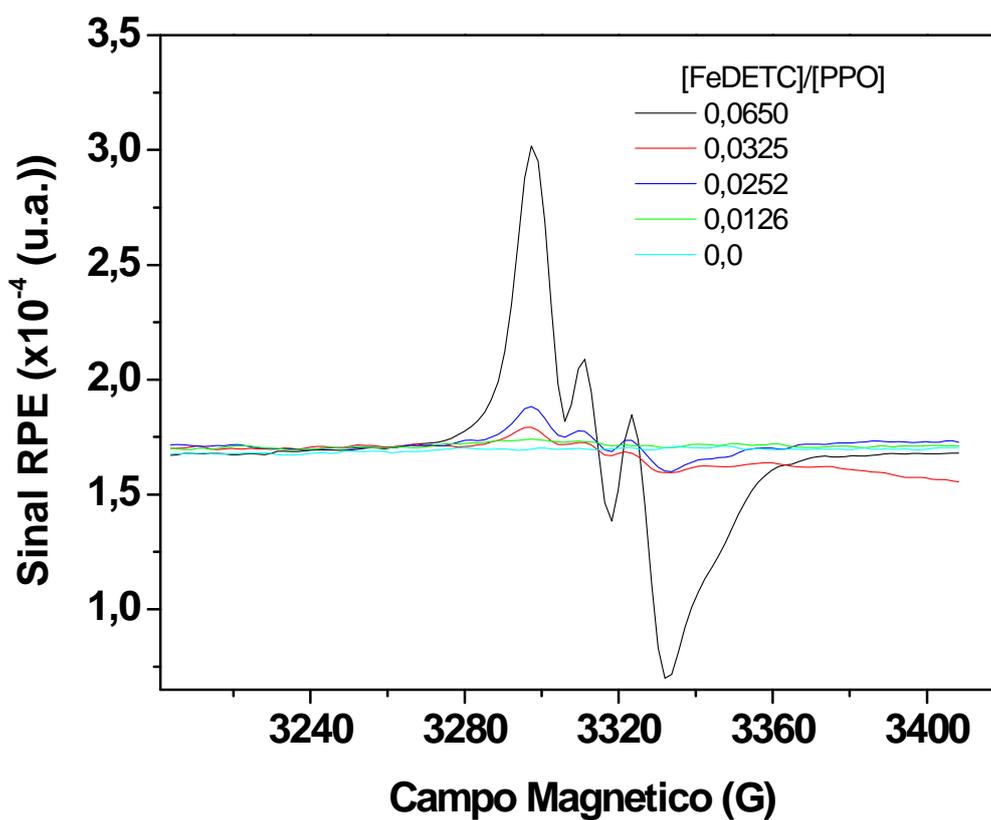


Figura 17 – Espectros de RPE do SLC de NO- PPO300 com diferentes concentrações de FeDETC.

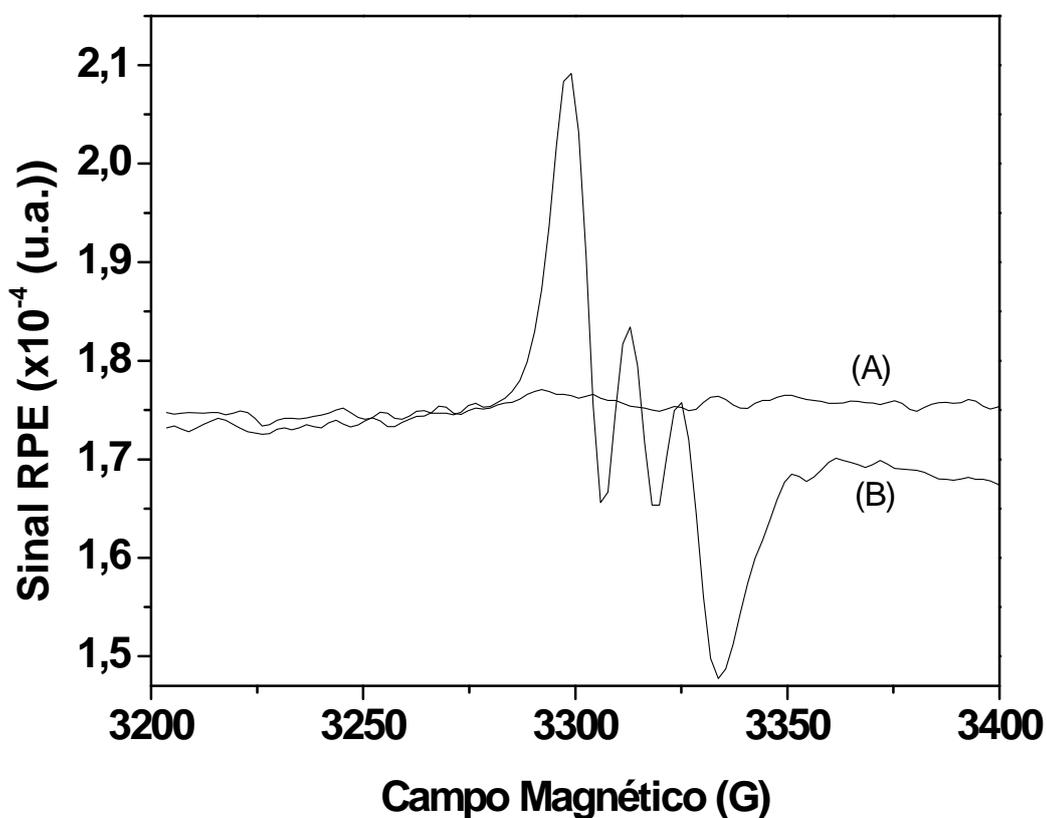


Figura 18 – Espectros de RPE do SLC de NO – PPO2000 sem FeDETC (A) e com razão [FeDETC]/[PPO] igual a 0,0325

A Figura 19 mostra a intensidade do sinal RPE do SLC de NO, determinada pelo método (1) exposto na Figura 14 (a), para as matrizes PPO300 e PPO2000 em função da concentração de FeDETC (m/m%). Observa-se o aumento da intensidade do sinal RPE nos SLC a base de PPO com o aumento da concentração mássica de FeDETC na matriz. O aumento da intensidade do sinal RPE com a concentração de FeDETC se deve ao aumento da quantidade de sítios disponíveis para o aprisionamento do NO.

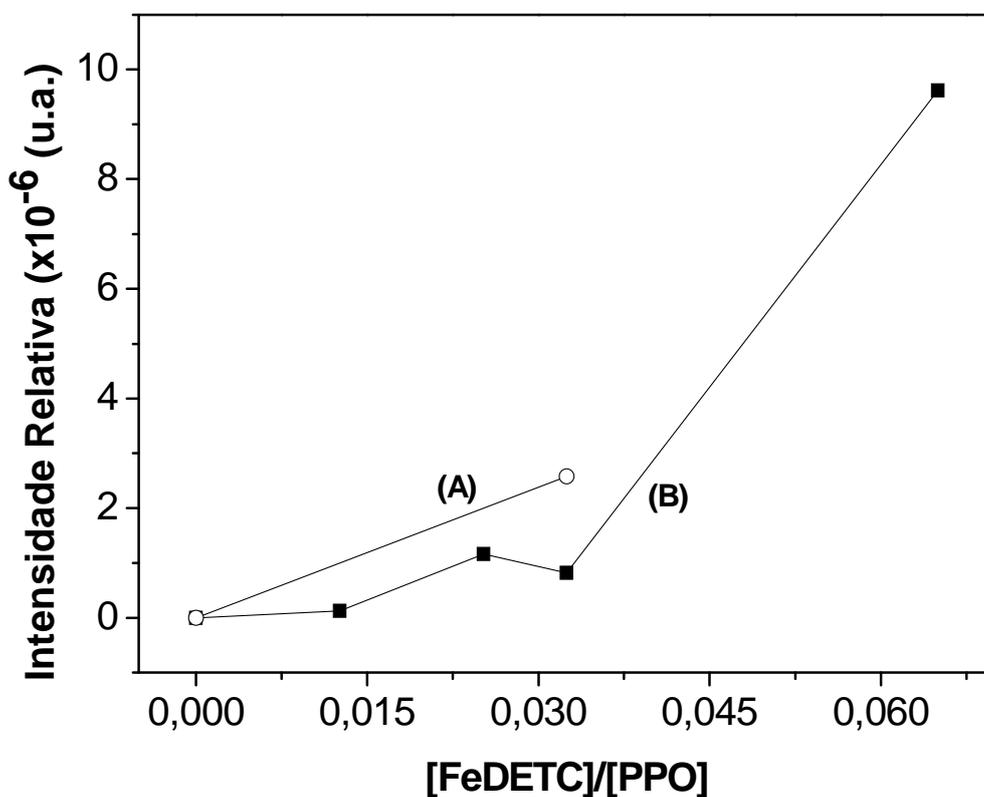


Figura 19 - Intensidades relativas dos SLC de NO - PPO300 (B) e PPO2000 (A) em função da razão [FeDETC]/[PPO].

Analisando o aumento do sinal RPE dos SLC de NO a base das matrizes PPO300 e PPO2000 (lote A), ambas matrizes com concentração igual a 0,0325 m/m%, Figura 19, pode-se perceber que o SLC de NO a partir da matriz PPO2000 apresenta maior intensidade do sinal de RPE que a matriz de PPO300. Isto pode estar relacionado com a porosidade da matriz PPO2000 ser maior que da matriz de PPO300, facilitando que o complexo ferrodinitrosil (FeDETC-NO) se difunda e disperse pela matriz de PPO2000.

O fato de a Figura 19 não apresentar barras de incerteza, não nos dá a segurança de afirmar que o sinal de RPE do SLC de NO - PPO2000 0,0325 m/m% apresenta maior intensidade. Portanto, novas sínteses de PPO foram feitas, lote B - Tabela 3, para que estes experimentos pudessem ser refeitos.

A Figura 20 mostra o sinal de RPE dos SLC de NO a base de PPO2000 - 0,69 m/m%, PPO400 - 0,69 m/m%, PPO400 - 4,0m/m%, sínteses do lote B – Tabela 3.

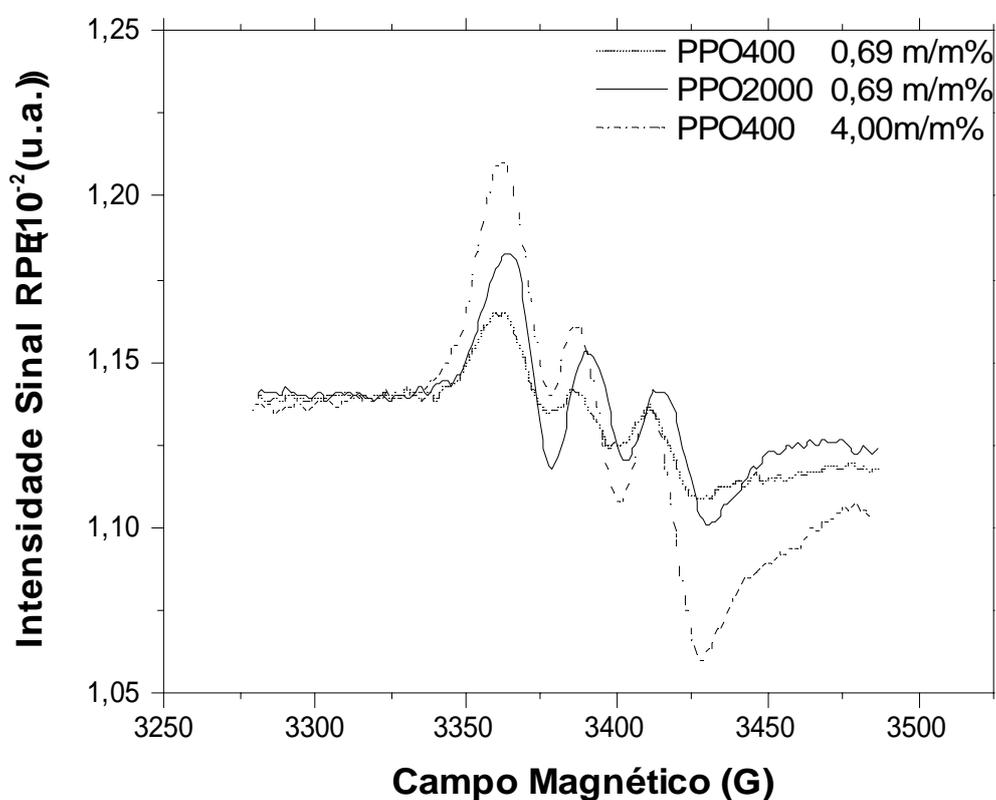


Figura 20 - Espectro de RPE das amostras de PPO2000* 0,69 m/m%, PPO400* 0,69 m/m% e 4,0 m/m%.

* A intensidade do sinal RPE, Figura 20, foi normalizada pela massa de cada amostra:

PPO2000-0,69 m/m%, 19,7 mg ; PPO400-0,69 m/m%, 19 mg; PPO400-4,0m/m%, 22 mg.

Observa-se a partir da Figura 20 que o SLC de NO a partir de PPO2000 0,69 m/m% apresenta maior intensidade de sinal de RPE em relação à matriz de PPO400 de mesma concentração (lote B). Os SLCs de NO a partir de PPO2000 e PPO300 3,25m/m% (lote A) tiveram comportamento semelhante, a matriz de PPO2000 apresentou maior intensidade de sinal de RPE. Isso reafirma a hipótese de que a porosidade da matriz PPO2000 deve ser maior que das matrizes de peso molecular menor, PPO300 e PPO400, facilitando que o complexo ferrodinitrosil (FeDETC-NO) se difunda e disperse mais facilmente pela matriz de PPO2000.

Analisando a Figura 20 é possível observar que o SLC de NO a partir da matriz de PPO400-4,00 m/m% apresenta maior intensidade de sinal que a partir da matriz PPO2000-0,69 m/m%. Este resultado é coerente com a maior quantidade do agente aprisionador de NO (FeDETC) ocluída na matriz 4,00 m/m%, Tabela 3.

4.1.2. Estudo da estabilidade do sinal

Devido à alta reatividade do NO, é necessário avaliar a estabilidade do sinal RPE no SLC de NO. Para avaliarmos a estabilidade do sinal RPE dos SLCs de NO, monitoramos o sinal em função do tempo, observando como se modifica a forma e a intensidade do sinal. Será analisada a estabilidade do sinal dos SLCs de NO a base de látex e PPO. As matrizes de PPO serão analisadas a partir das sínteses de PPO300 e PPO2000 do primeiro lote (lote A) e depois de PPO400 e 2000 do segundo lote (lote B), Tabela 4.

I) PPO2000 e 300 – Lote A

Nos SLCs de NO obtidos a partir das matrizes de PPO300 e PPO2000 sintetizadas no Lote A, após monitorarmos o sinal de RPE por 14 dias, percebemos que a forma do sinal de RPE não apresentou alteração com o tempo, veja Figura 21. Portanto será usado o método (1) exposto na Figura 14(a), para calcular a intensidade relativa do sinal de RPE.

A Figura 22 mostra a dependência da intensidade do sinal RPE com o tempo dos SLCs de NO nas matrizes PPO300 e PPO2000. Os SLC de NO foram mantidos em temperatura e atmosfera ambiente. Houve um aumento da intensidade do sinal RPE dos SLCs de NO após os primeiros dias. Isto pode ser devido ao fato da primeira medida ser feita logo após a imersão dos SLCs de NO em solução aquosa saturada de NO. A água presente nos SLCs de NO funciona como um poderoso absorvedor de microondas, prejudicando a detecção do sinal RPE. A segunda medida, realizada após os sete primeiros dias, foi realizada com o SLC de NO livre de água, obtendo-se então uma maior intensidade de sinal. Após o sétimo dia, a intensidade do sinal RPE dos SLCs de NO caiu

com o tempo. A redução da intensidade do sinal com o tempo pode estar associada a reações de oxidação do NO ou à descomplexação do ferrodinitrosil, promovendo a liberação do NO.

Os resultados a partir do SLC de NO das matrizes de PPO 300 e 2000, mostraram que o sinal RPE característico do NO pode ser monitorado por 45 dias após o aprisionamento do NO. Assim, este tipo de sistema pode liberar NO de forma contínua no sistema biológico durante dias.

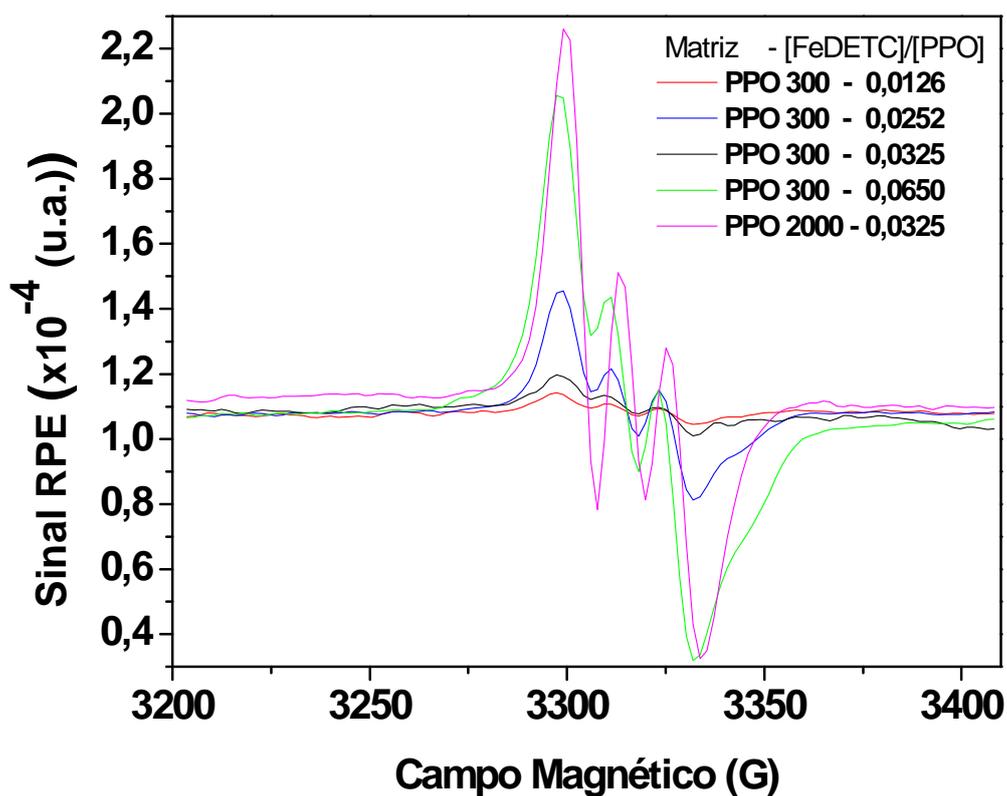


Figura 21 – Sinal RPE dos sensores PPO300 e PPO2000, com diferentes razões [FeDETC]/[PPO], após 14 dias do aprisionamento do NO.

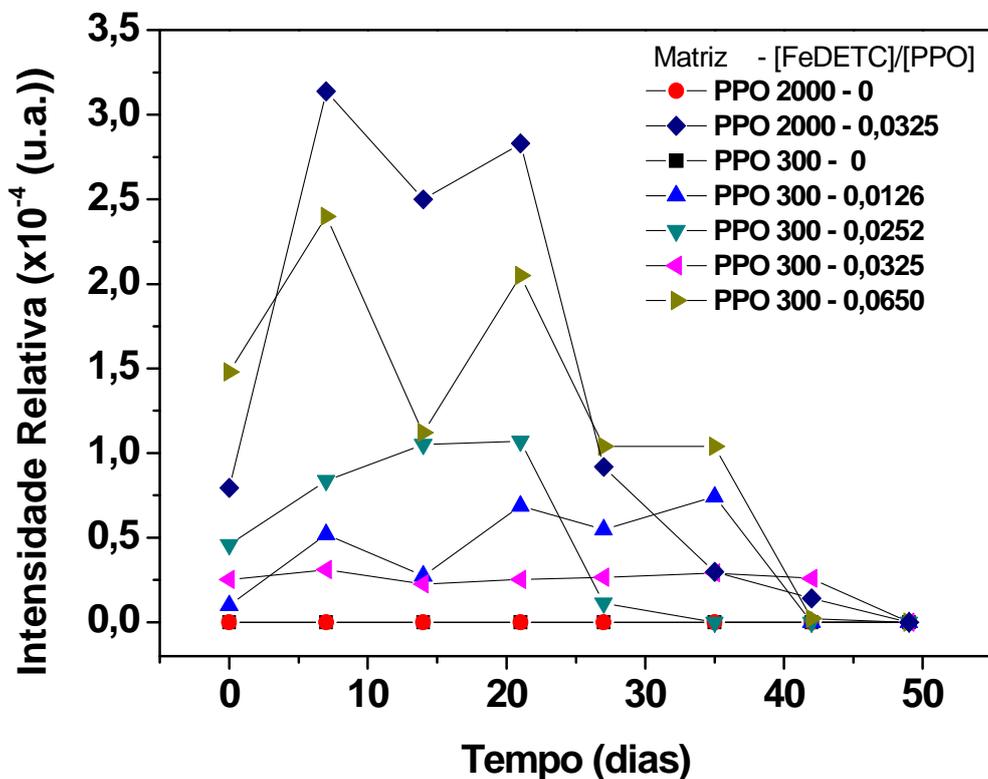


Figura 22 – Intensidade relativa dos SLCs de NO – PPO300 e PPO2000 com diferentes razões [FeDETC]/[PPO] em função do tempo. A intensidade do sinal foi normalizada pelo peso da matriz e pela razão [FeDETC]/[PPO]. As amostras foram estocadas a temperatura e atmosfera ambiente.

II) PPO 2000 e PPO400 – Lote B

Os SLC de NO a base de PPO400 e 2000 (lote B) expostos a diversas condições (Tabela 4), foram monitorados com o tempo. As Figuras subsequentes mostram a intensidade do sinal RPE em diferentes intervalos de tempo, para cada situação a que foram expostos os SLC de NO a base de PPO.

As Figuras 23 e 24 mostram a intensidade do Sinal de RPE dos SLC de NO das amostras do grupo controle, PPO2000 – 0,69m/m% e PPO400 – 4,0m/m%. Tanto no SLC de NO a partir da matriz PPO2000 quanto na matriz PPO400, ocorreu um aumento na intensidade do sinal RPE após os primeiros dias de medida. No SLC de NO a base de

PPO2000, a intensidade do sinal aumentou após decorrer 7 dias, porém a forma do sinal mudou após 12 dias: se tornou mais estreito. O aumento na intensidade de sinal que ocorreu logo após o início das medidas pode ser devido ao fato da primeira medida ser feita logo após a imersão dos SLCs de NO em solução aquosa saturada de NO. Como visto, a água presente nos SLCs de NO funciona como um poderoso absorvedor de microondas, prejudicando a detecção do sinal RPE. Portanto os SLCs de NO livre de água, podem apresentar maior intensidade de sinal RPE. Após o décimo segundo dia, para as amostras a base de PPO2000 e PPO400, respectivamente, ocorreu alteração na forma do sinal RPE. Neste caso para quantificar a intensidade do sinal é necessário utilizar o método (2), Figura 14(b).

Percebe-se que redução da intensidade do sinal com o tempo pode estar associada a reações de oxidação do NO ou à descomplexação do ferrodinitrosil, promovendo a liberação do NO. O SLC de NO apresentou elevada estabilidade do complexo ferrodinitrosil. Os resultados a partir do SLC de NO das matrizes de PPO2000 e PPO400, mostraram que o sinal RPE característico do NO pode ser monitorado por aproximadamente 33 dias após o aprisionamento do NO.

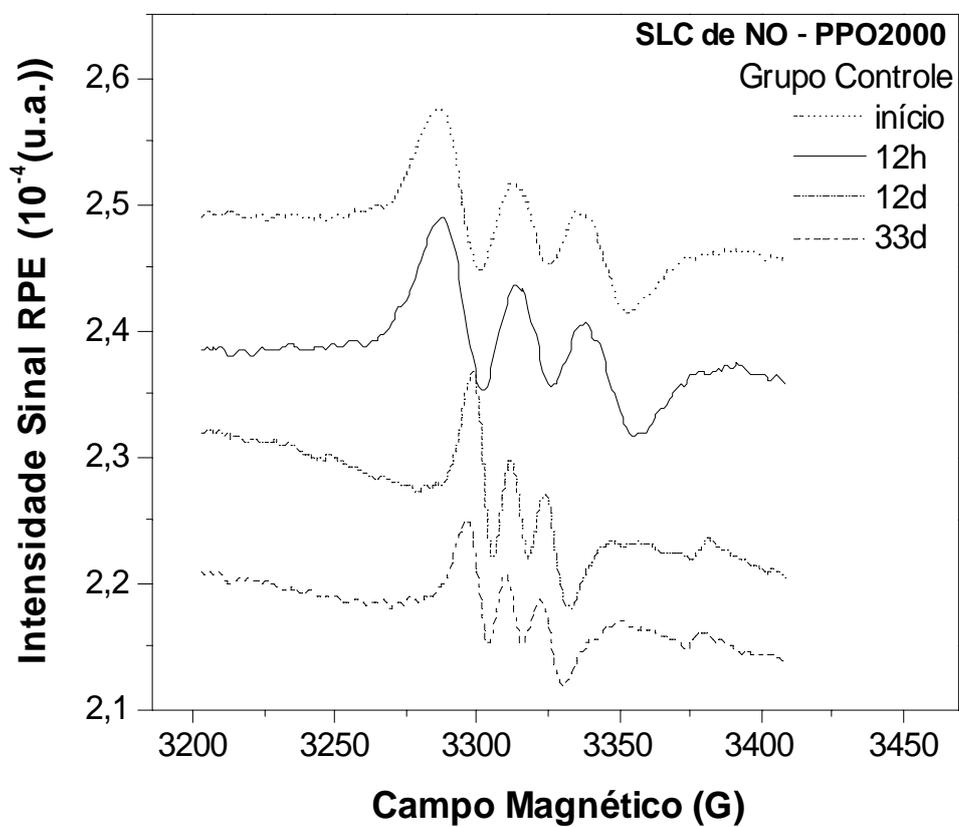


Figura 23 – Espectro de RPE do SLC de PPO2000 - 0,69 m/m% para diferentes intervalos de tempo – Grupo controle.

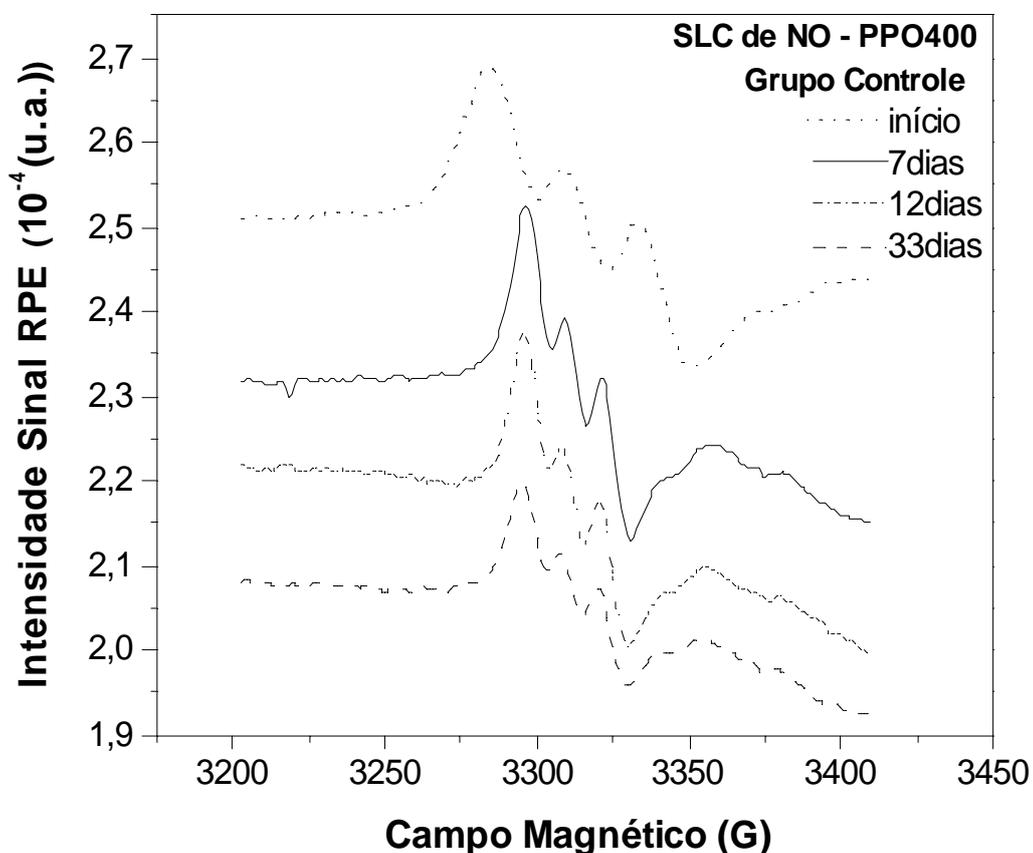


Figura 24 - Espectro de RPE do SLC de NO PPO400 - 4,00 m/m% para diferentes intervalos de tempo – Grupo Controle.

As Figuras 25 e 26 mostram o sinal típico de RPE dos SLC de NO a partir de PPO2000 – 0,69m/m% e PPO400 – 4,0m/m%, mantidas em temperatura de 50°C para diferentes intervalos de tempo. Houve um aumento na intensidade de sinal RPE logo após a primeira medida. Como já visto, isso pode ser devido a presença de água na amostra. Porém como este SLC de NO ficou exposto à temperatura de 50°C, é de se esperar que a intensidade de sinal caia com o tempo. O aumento de temperatura provoca um maior grau

de agitação das moléculas e desta forma a temperatura pode estar aumentando a taxa de descomplexação do ferrodinitrosil, promovendo a liberação completa de NO em aproximadamente 7 dias para SLC de NO a base de PPO2000 e aproximadamente 72 horas para SLC de NO a base de PPO400.

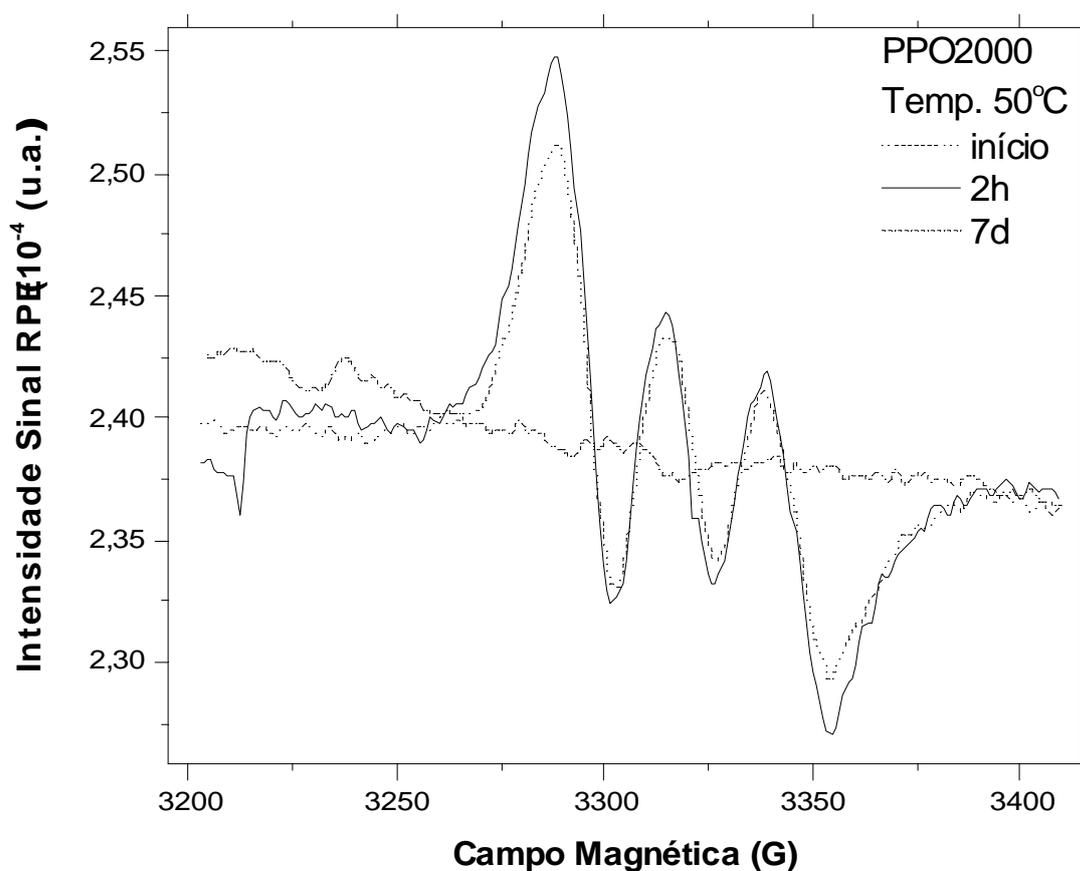


Figura 25 – Espectro de RPE do SLC PPO2000-0,69 m/m% exposto à temperatura de 50°C.

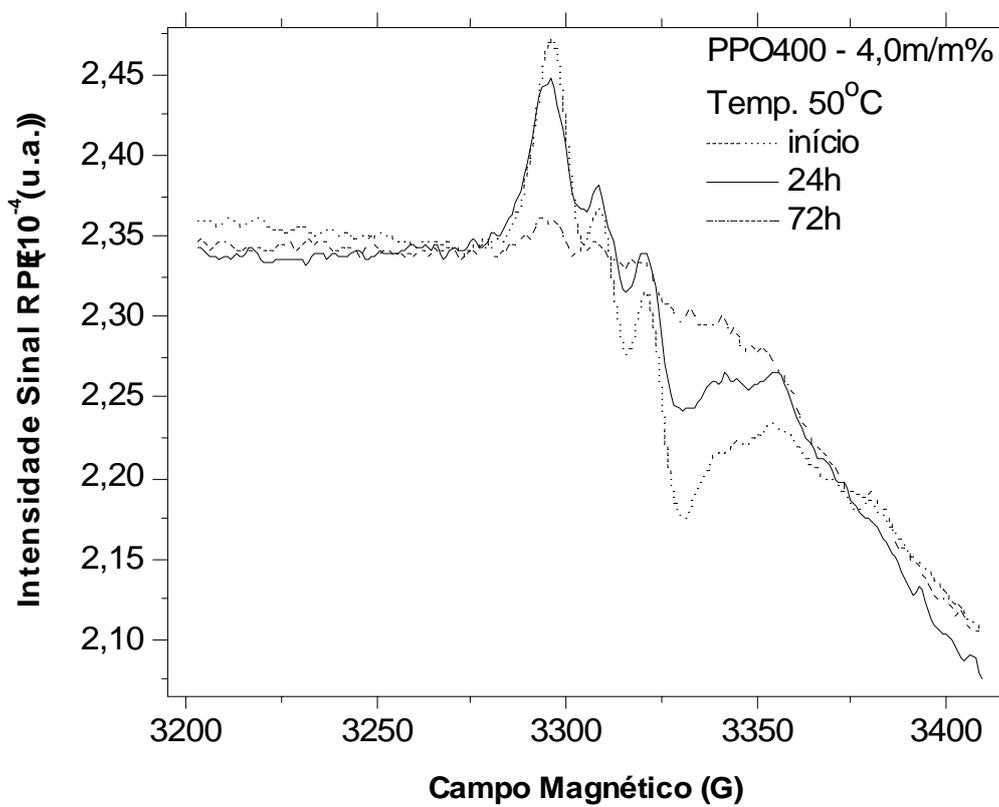


Figura 26 – Espectro de RPE do SLC PPO400-4,00 m/m% exposto à temperatura de 50°C.

As Figuras 26 e 27 mostram o sinal típico de RPE, dos SLCs de NO a partir de PPO2000 – 0,69m/m% e PPO400 – 4,0m/m%, expostos ao laser azul para diferentes intervalos de tempo. O sinal RPE foi monitorado por aproximadamente 22 horas. É notável o decréscimo da intensidade de sinal RPE em ambos SLCs de NO, a base de PPO2000 e PPO400. Consta na literatura o uso de excitações fotoquímicas com o objetivo de aumentar a liberação de drogas. Neste âmbito a excitação a partir de laser azul produziu resultado satisfatório, porém como a forma do sinal se altera, uma comparação mais segura

com amostras do grupo controle será feita na próxima seção, com gráficos obtidos utilizando o método 2, Figura 14 (b).

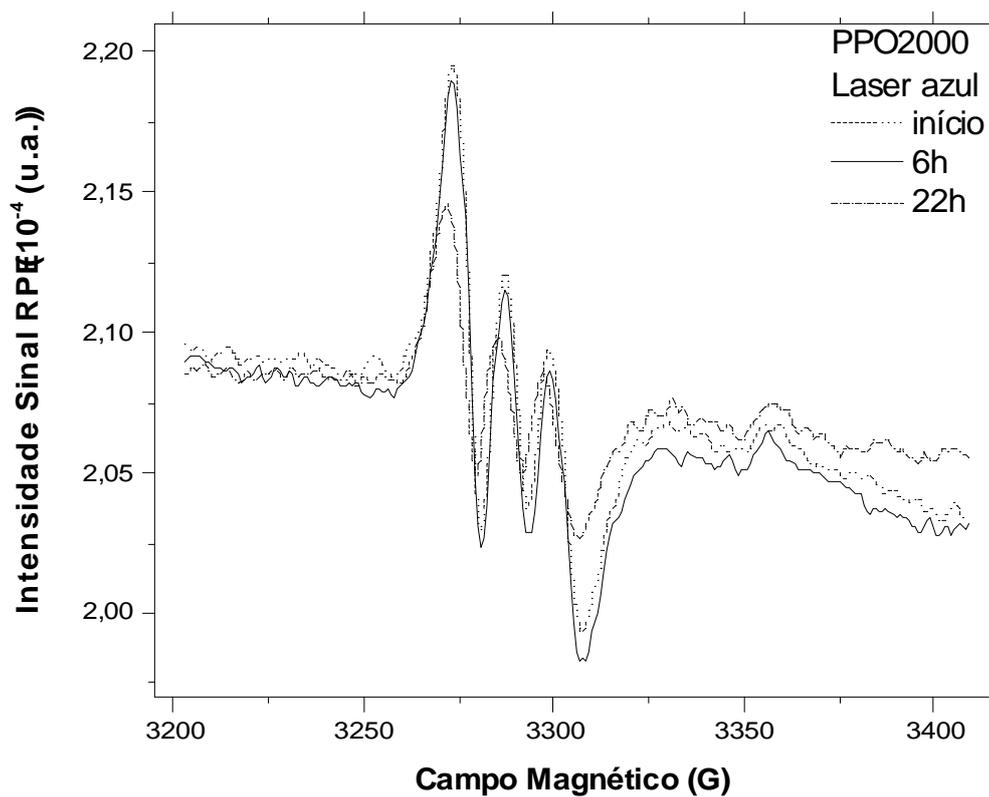


Figura 27 – Espectro de RPE do SLC PPO2000-0,69 m/m% exposto ao laser azul.

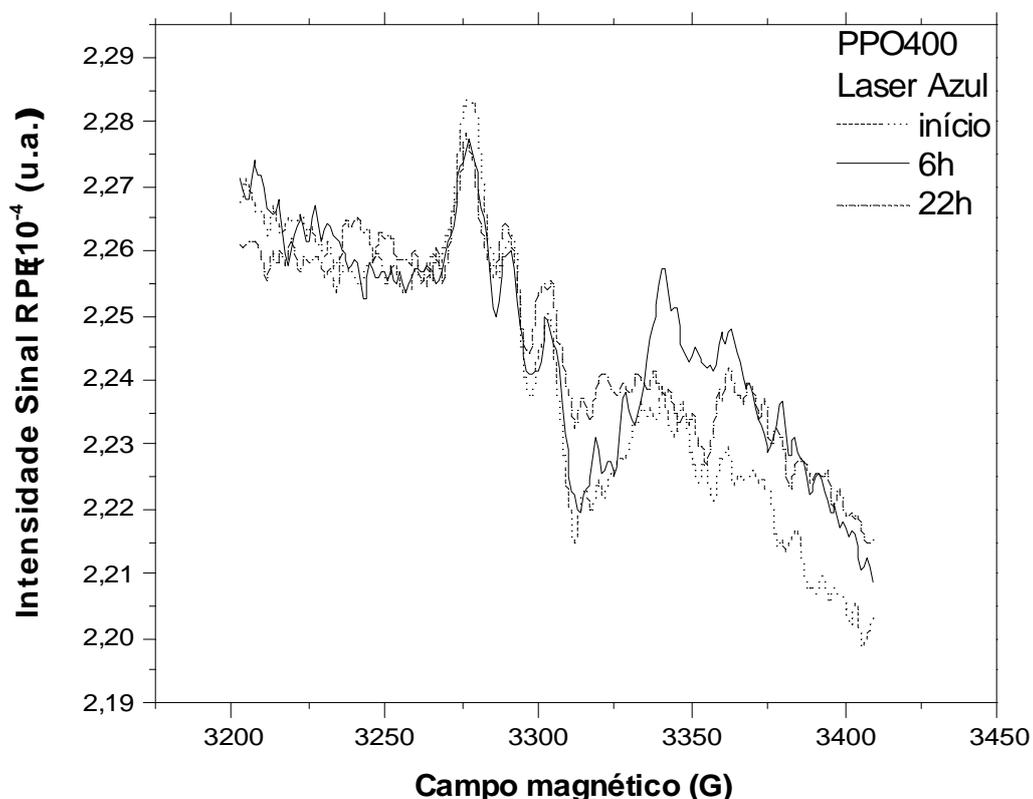


Figura 28 – Espectro de RPE do SLC PPO400-0,69 m/m% exposto ao laser azul.

As Figuras 29 e 30 mostram o sinal típico de RPE, dos SLCs de NO a partir de PPO2000 – 0,69m/m% e PPO400 – 4,0m/m%, expostos à campo magnético com amplitude de modulação de 40G para diferentes intervalos de tempo. No SLC de NO a base de PPO400 o sinal praticamente sumiu após 24 horas e no sistema a base de PPO2000, a intensidade de sinal também apresentou uma queda brusca após um intervalo de tempo de aproximadamente 30 horas. Isso pode ser devido à interação do campo magnético aplicado com amplitude de modulação de 40G com os spins do complexo ferrodinitrosil, causando movimento vibracional descontínuo e conseqüente excitação das moléculas até que ocorra a descomplexação do ferrodinitrosil.

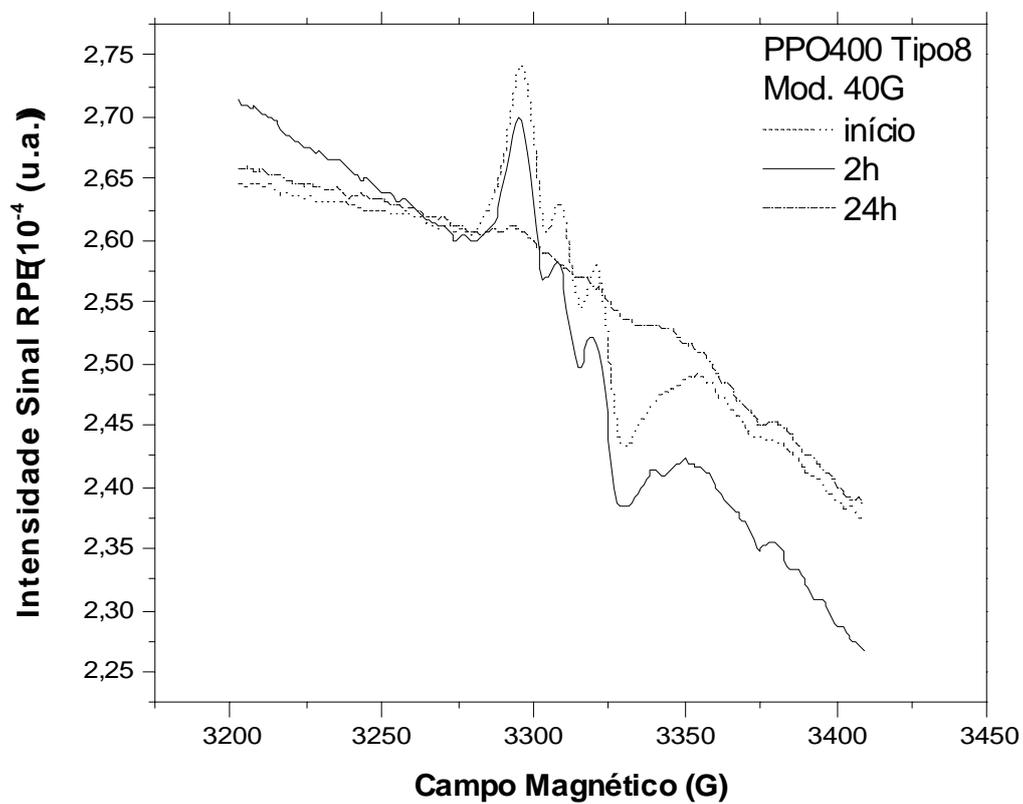


Figura 29 – Espectro de RPE do SLC de PPO400 exposto à campo magnético com amplitude de modulação de 40G.

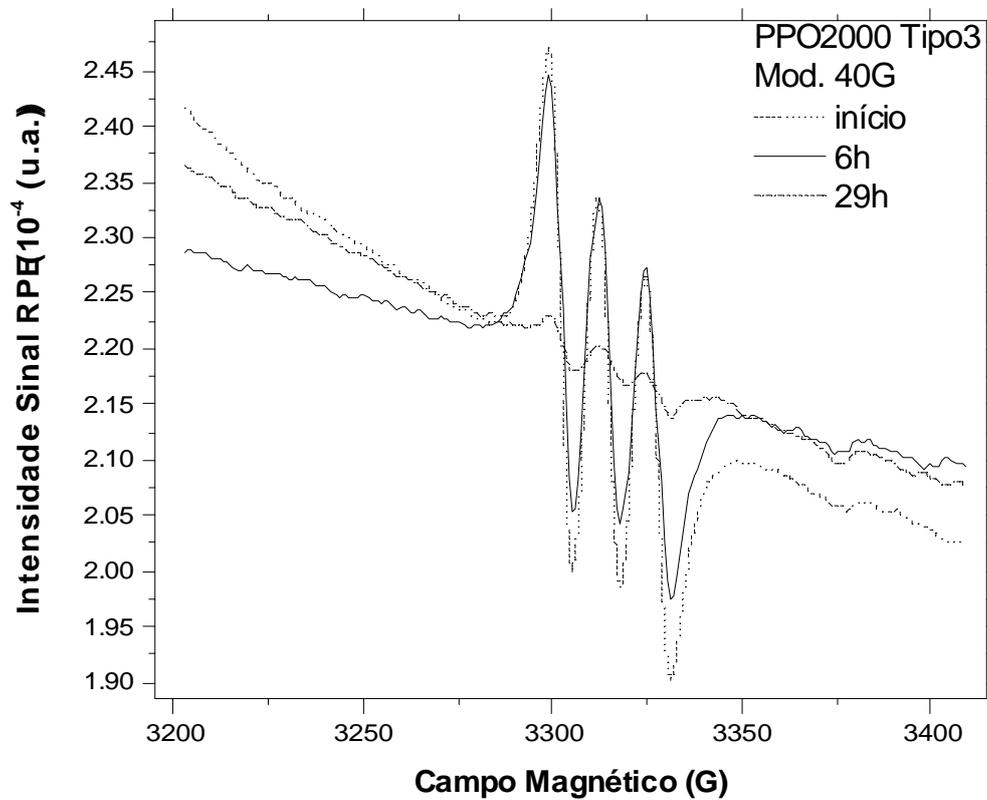


Figura 30 – Espectro de RPE do SLC de PPO2000 exposto à Modulação de 40G.

4.1.3. Avaliação da taxa de liberação de NO

Para analisar a aplicação potencial do PPO como SLC de NO, foram investigadas a taxa de liberação de NO das matrizes expostas a diferentes condições, de acordo com a Tabela 4. Pelo fato das matrizes de PPO terem sido sintetizadas em diferentes lotes, será analisado a taxa de liberação de NO primeiramente do lote A (I) e depois do lote B (II).

I) PPO2000 e 300 – Lote A

Foram investigadas a taxa de liberação de NO de amostras estocadas a temperatura ambiente, a temperatura de 50°C, na presença de campo magnético com amplitude de modulação de 40G a 100 KHz e sob radiação ultravioleta (UV). Como grupo controle, foi investigada a taxa de liberação de NO de amostras estocadas em ambiente escuro. Todas as amostras foram estocadas a atmosfera ambiente. Visto que não houve variação na forma do sinal RPE obtido das amostras do lote A, a intensidade relativa de sinal RPE foi determinada pelo método (1), Figura 14(a). A taxa de liberação de NO, sob estas condições, para a amostra de PPO300 é mostrada na Figura 31, enquanto que para a amostra de PPO2000 é mostrada na Figura 32.

A Figura 31 mostra a taxa de liberação de NO das amostras de PPO300 estocadas em diferentes condições. Percebemos que a amostra estocada a temperatura de 50 °C apresentou uma taxa de liberação de NO similar a amostra controle (estocada em ambiente escuro). A amostra estocada a temperatura ambiente e sob radiação UV apresentou uma taxa de liberação menos acelerada que a amostra controle.

A Figura 32 apresenta a taxa de liberação de NO das amostras de PPO2000.

As amostras estocadas a temperatura de 50° C e sob campo magnético com amplitude de modulação de 40G apresentaram uma taxa de liberação mais acelerada que a amostra controle, enquanto as amostras estocadas sob radiação UV e em ambiente sem iluminação apresentam uma taxa de liberação menos acelerada.

Observando-se as Figuras 31 e 32, percebemos que as amostras de PPO2000 estocadas sob campo magnético com amplitude de modulação de 40G ou a temperatura de 50 °C, apresentaram sinal de NO até aproximadamente 20h, já as amostras de PPO300 expostas às mesmas condições apresentaram sinal de NO até aproximadamente 66h. Isto pode ser devido à suposta maior porosidade do PPO2000, que oferece menos barreiras a difusão do NO e fornece mais graus de liberdade ao complexo ferrodinitrosil.

Devido ao decréscimo do sinal de NO com o tempo a partir dos SLC de NO – PPO, podemos considerar que estes SLCs possuem bom potencial para a liberação de NO com o tempo. Esta matriz possui também um grande potencial para construção de um SLC de NO que possa ser reutilizado após a sua exposição a um campo magnético ou elevação de sua temperatura, para a liberação total do NO.

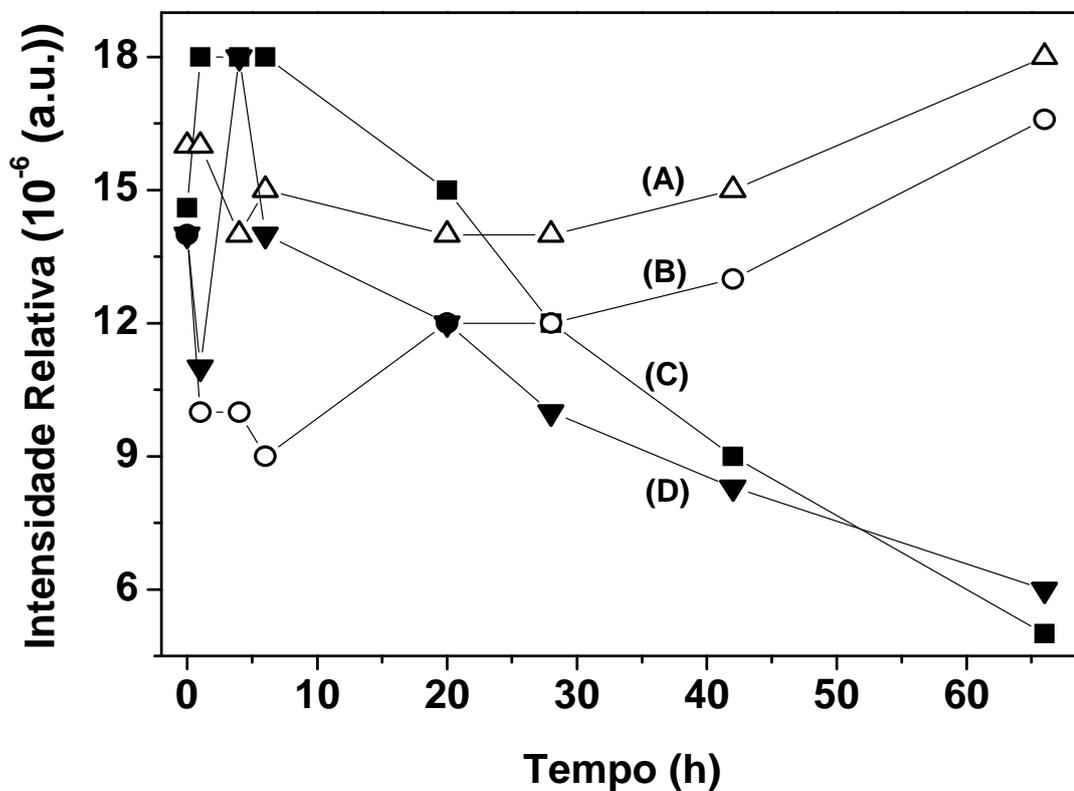


Figura 31 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO PPO300 0,0325 m/m%, estocados a temperatura ambiente (A), sob radiação ultravioleta (B), a temperatura de 50°C (C) e em ambiente escuro (D).

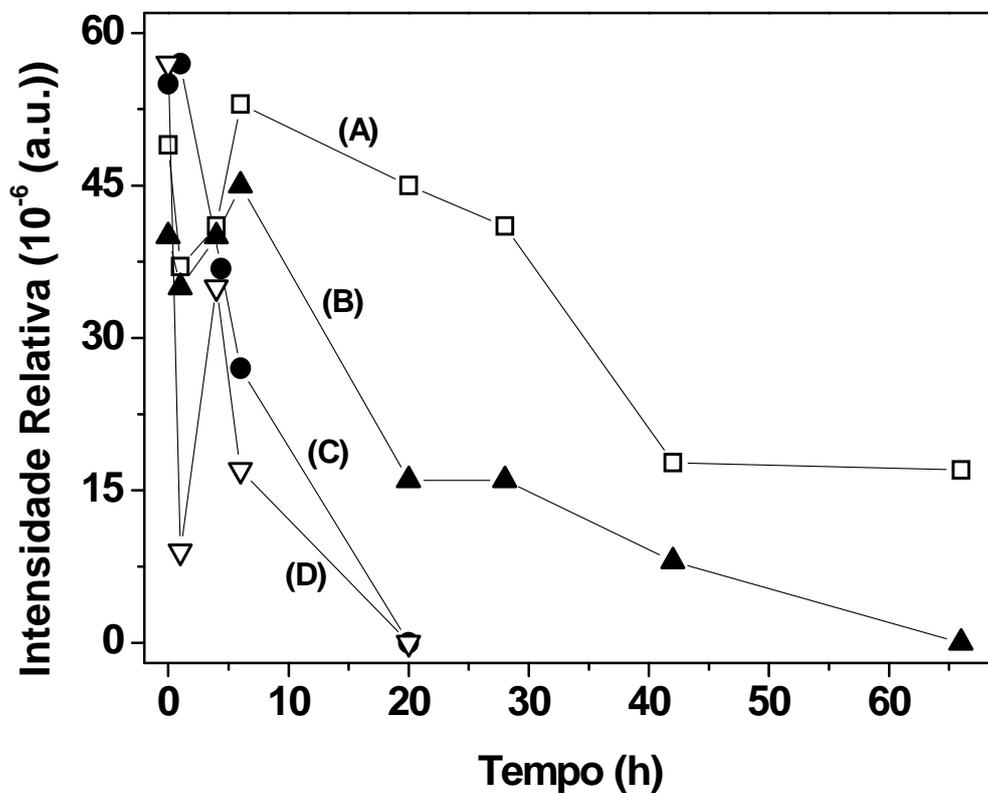


Figura 32 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC-PPO2000 0,0325m/m%, estocados a radiação UV(A), em ambiente escuro (B), temperatura de 50 °C (C) e sob campo magnético com amplitude de modulação 40G a 100 KHz (D).

II) PPO 2000 e PPO400 – Lote B

Foram investigadas a taxa de liberação de NO dos SLCs de NO expostos a diferentes condições, Tabela 4. Visto que para estas amostras houve alteração na forma do sinal RPE, neste caso para determinar a intensidade relativa do sinal RPE será usado o método (2), apresentado na Figura 14(b). As amostras foram estocadas à temperatura

ambiente em ambiente sem iluminação (amostras do grupo controle), à temperatura de 50°C, na presença de campo magnético com amplitude de modulação de 40 G a 100 KHz e sob laser azul. Todas as amostras foram estocadas a atmosfera ambiente. Com o intuito de estudar a taxa de liberação de NO sob estas condições, foram feitas análises da intensidade de sinal RPE relativa em função do tempo, para os SLCs de NO a base de PPO400 e PPO2000.

A Figura 33 mostra a taxa de liberação de NO das amostras do grupo controle. A taxa de liberação de NO foi acompanhada por aproximadamente 33 dias. A liberação de NO tanto a partir do SLC a base de PPO400 quanto a base de PPO2000, apresentou taxa de decaimento similares.

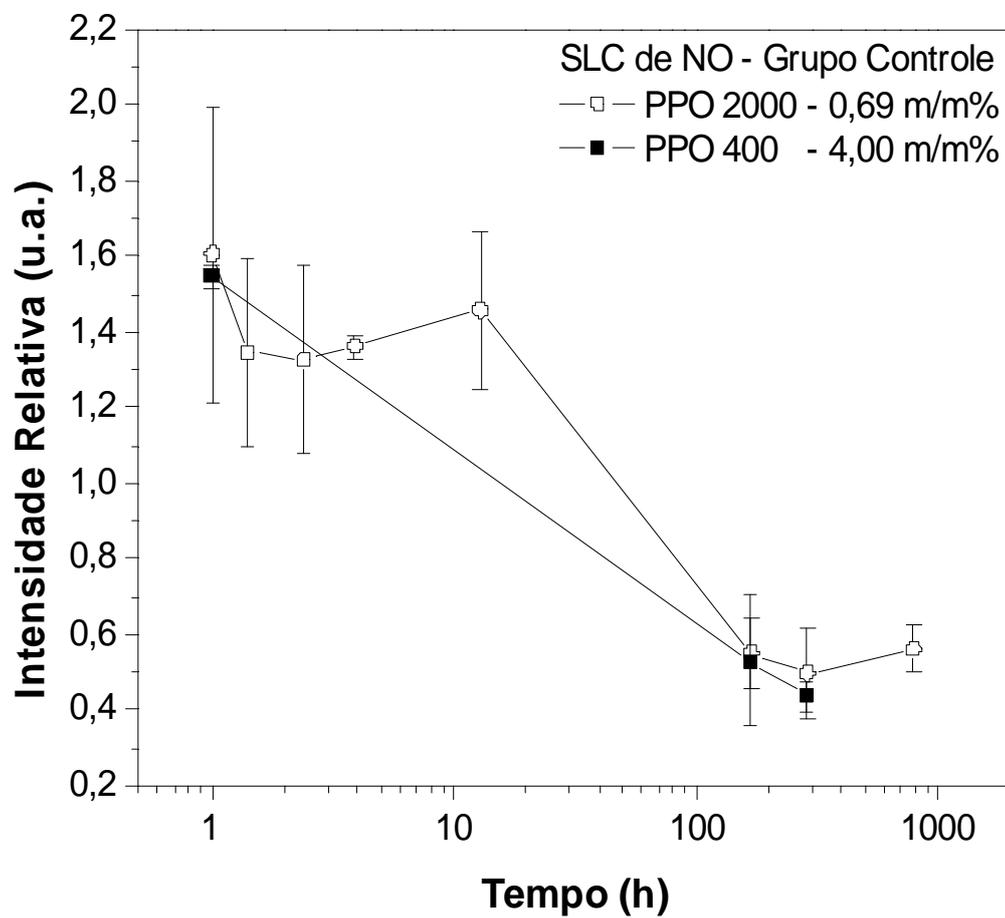


Figura 33 – Intensidade de sinal em função dos SLCs de NO a base de PPO2000 0,69 m/m% e PPO400 4,00 m/m% em amostras do grupo controle.

A Figura 34 mostra a taxa de liberação do SLC de NO, PPO2000 em relação ao PPO400, expostos à temperatura de 50°C. O PPO400 apresenta taxa de liberação maior que a amostra PPO2000, o sinal de NO cai em aproximadamente 72 horas a partir do PPO400 e 120 horas (5 dias) a partir do PPO2000. A taxa de decaimento do SLC de NO - PPO400 é de 13,73 e PPO2000 é de 8,69.

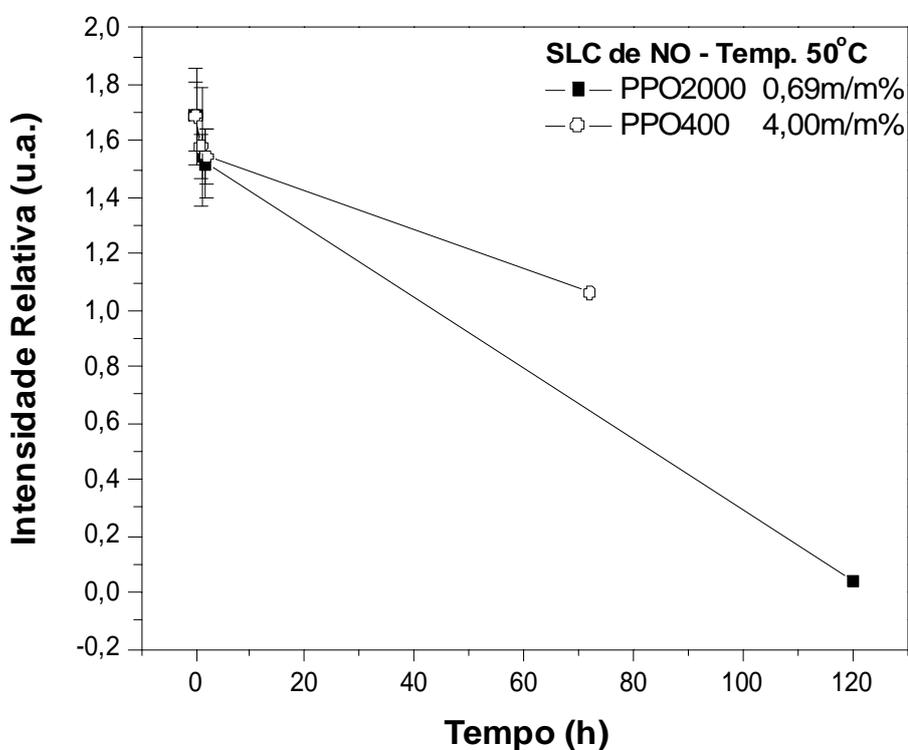


Figura 34 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO a base de PPO2000 0,69 m/m% e PPO400 4,00m/m%, expostos à temperatura de 50°C.

A Figura 35 mostra a taxa de liberação dos SLCs de NO, PPO2000 em relação ao PPO400, expostos ao laser azul. Os SLCs de NO foram monitorados por aproximadamente 24 horas. Neste intervalo de tempo o PPO2000 apresentou taxa de

liberação de NO maior que o PPO400, comportamento oposto aos SLCs do grupo controle e aos expostos à temperatura de 50°C. A taxa de decaimento do SLC de NO - PPO400 é de 6,92 e PPO2000 é de 14,99. Porém estes experimentos não puderam ser refeitos para que tivéssemos uma maior segurança a respeito da taxa de decaimento do sinal RPE com o tempo, pois o espectrômetro RPE, Figura 13, está sendo desabilitado.

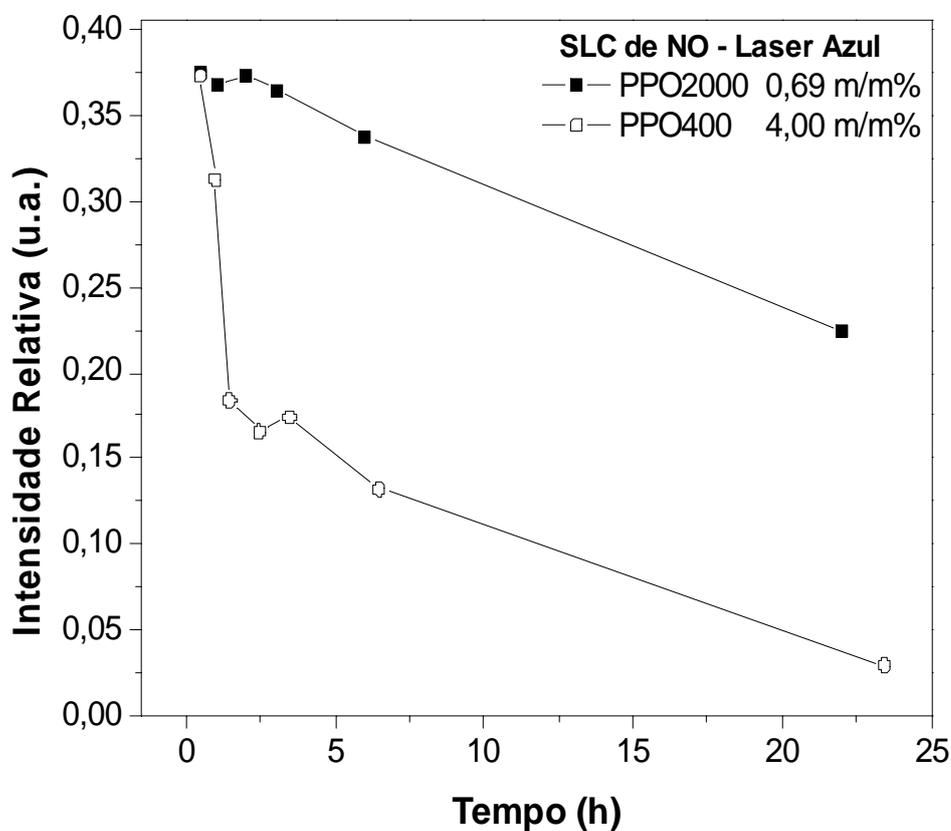


Figura 35 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO a base de PPO2000 0,69m/m% e PPO400 4,00m/m%, expostos ao laser azul.

A Figura 36 mostra a taxa de liberação dos SLCs de NO, PPO2000 em relação ao PPO400, expostos ao campo magnético modulado de 40G. Os SLCs de NO foram monitorados por aproximadamente 24 horas. Neste intervalo de tempo o PPO400 apresentou taxa de liberação maior que o PPO2000, de maneira similar ao comportamento dos SLCs de NO do grupo controle e aos expostos à temperatura de 50°C. A taxa de decaimento do SLC de NO - PPO400 é de aproximadamente 20 e PPO2000 é de 10,5. Pelo mesmo motivo que os experimentos feitos com o uso do laser azul não puderam ser refeitos, estes experimentos usando campo magnético modulado de 40G, também não puderam ser refeitos.

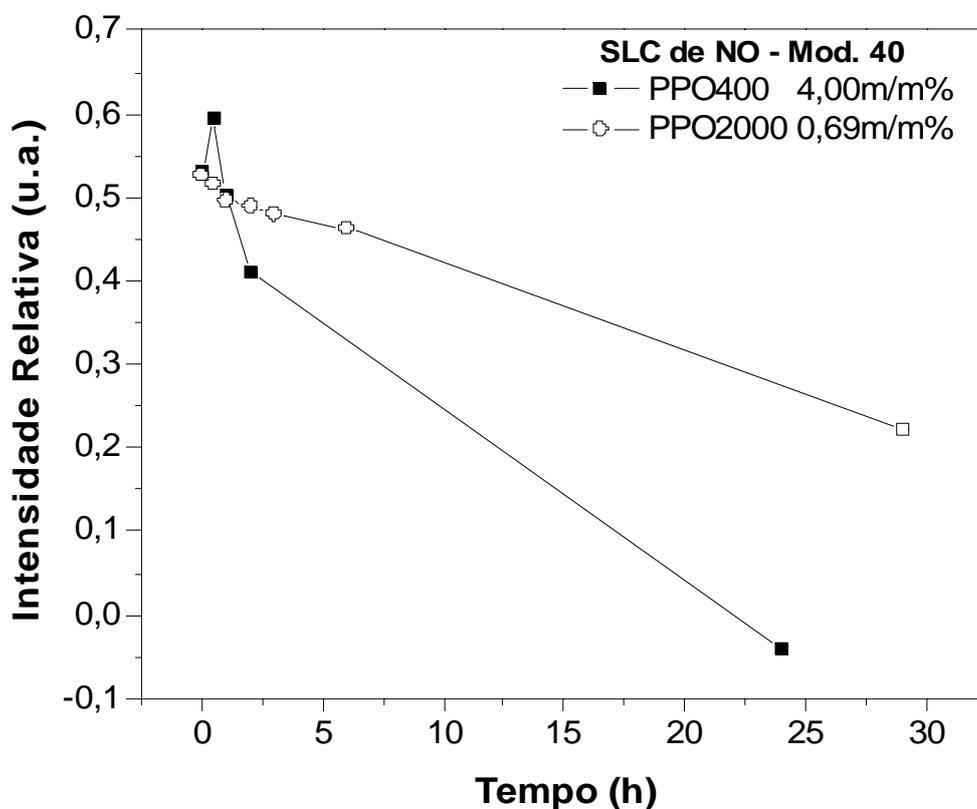


Figura 36 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO a base de PPO2000 0,69m/m% e PPO400 4,00m/m%, expostos a campo magnético modulado de 40G e 100kHz.

A partir das Figuras 37 e 38 pode se observar que os SLCs de NO, liberam NO mais rapidamente quando estão sob algum tipo de excitação externa. Percebemos que a amostra estocada a temperatura de 50 °C apresentou uma taxa de liberação de NO similar a amostra controle (estocada em ambiente escuro), porém a liberação de NO em um intervalo de tempo mais curto. A amostra exposta ao laser azul e ao campo magnético modulado de 40G, apresentou uma taxa de liberação mais acelerada que a amostra controle.

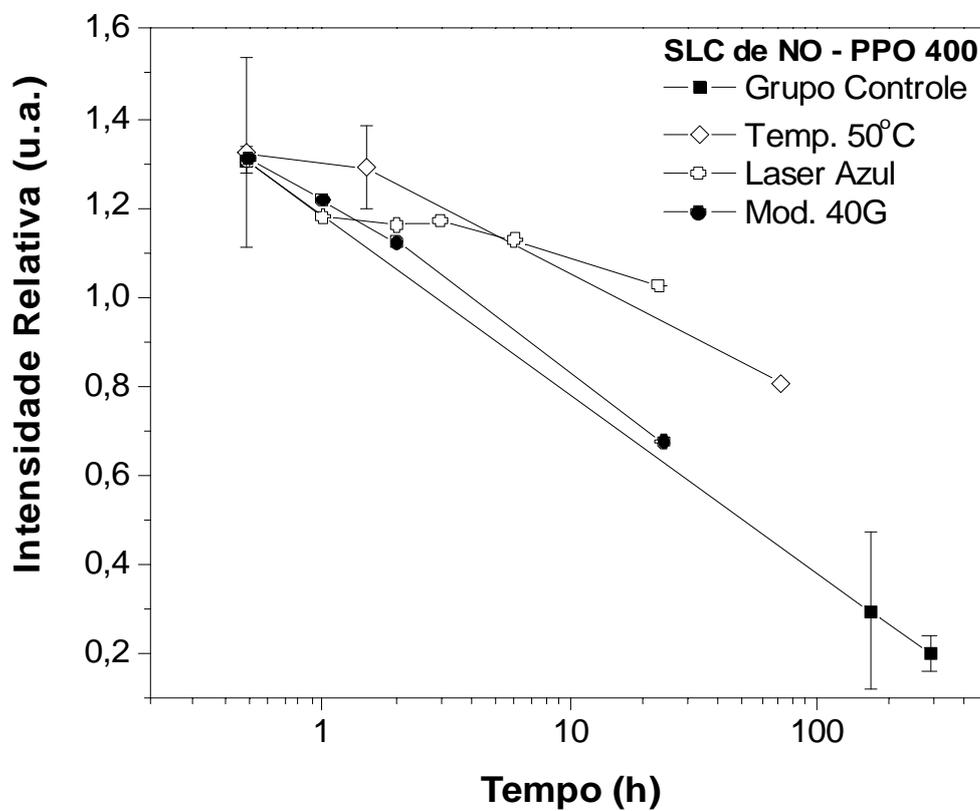


Figura 37 – Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO PPO400 4,00 m/m%, grupo controle, exposto a temperatura de 50°C, ao laser azul e à modulação de campo magnético de 40G.

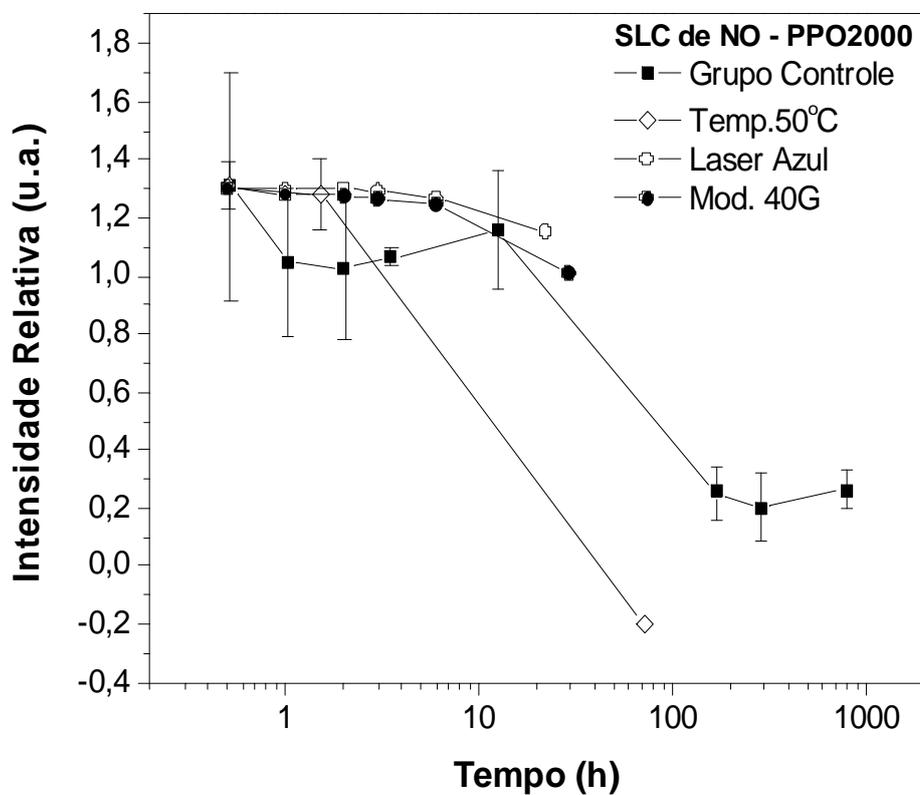


Figura 38 - Intensidade de sinal em função do tempo do SLC de NO PPO2000 0,69 m/m%, grupo controle, exposto a temperatura de 50°C, ao laser azul e à modulação de campo magnético de 40G.

4.2. Sistema de liberação controlada de NO a base de látex

4.2.1. Estudo da estabilidade do sinal RPE

Como já citado, devido ao NO ser altamente reativo é necessário investigar a estabilidade do sinal de NO em função tempo. Será analisado a estabilidade do sinal de NO dos SLCs de látex, estocados à em ambiente sem iluminação em condições normais de pressão e temperatura (grupo controle), à temperatura de 50°C, sob laser azul e sob campo magnético modulado de 40G.

A Figura 39 mostra o sinal típico de RPE para a amostra controle .

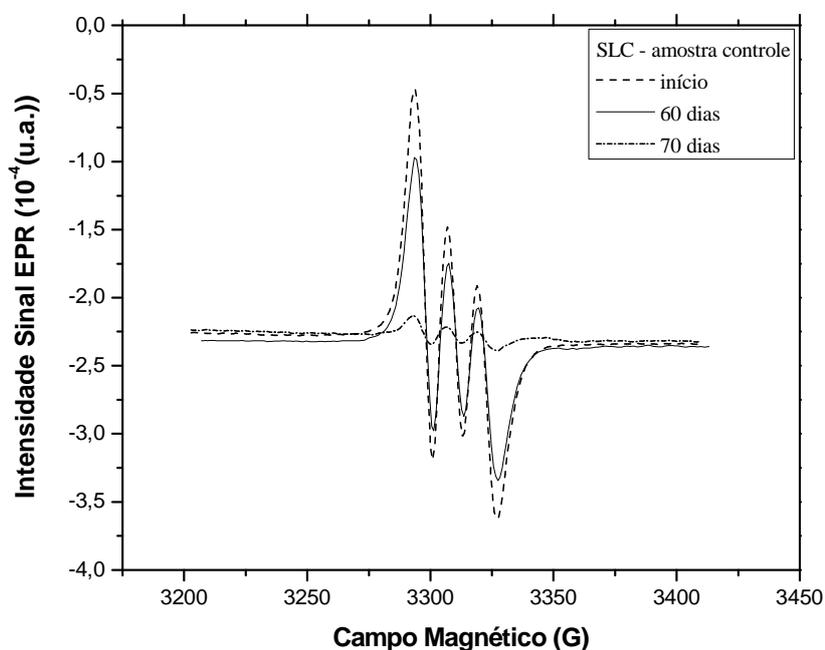


Figura 39 - Espectro de RPE das amostra controle para diferentes intervalos de tempo.

A Figura 40 mostra o sinal típico de RPE, para amostra mantida em temperatura de 50°C para diferentes intervalos de tempo.

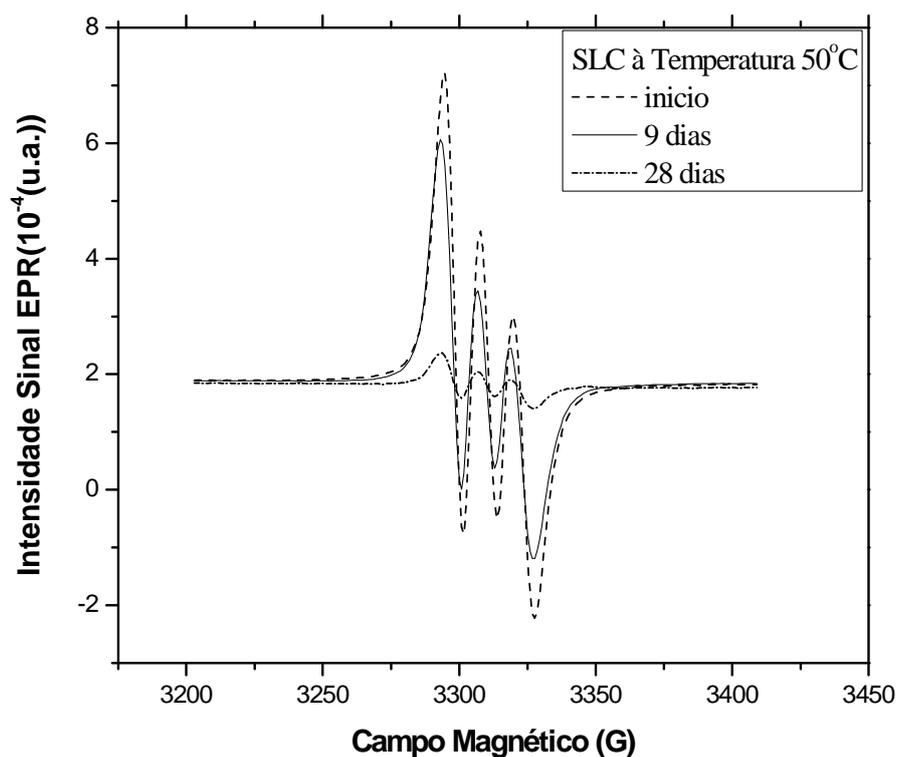


Figura 40 – Espectro de RPE da amostra exposta à temperatura 50°C para diferentes intervalos de tempo.

A Figura 41 mostra o sinal típico de RPE, para amostra exposta ao laser azul para diferentes intervalos de tempo.

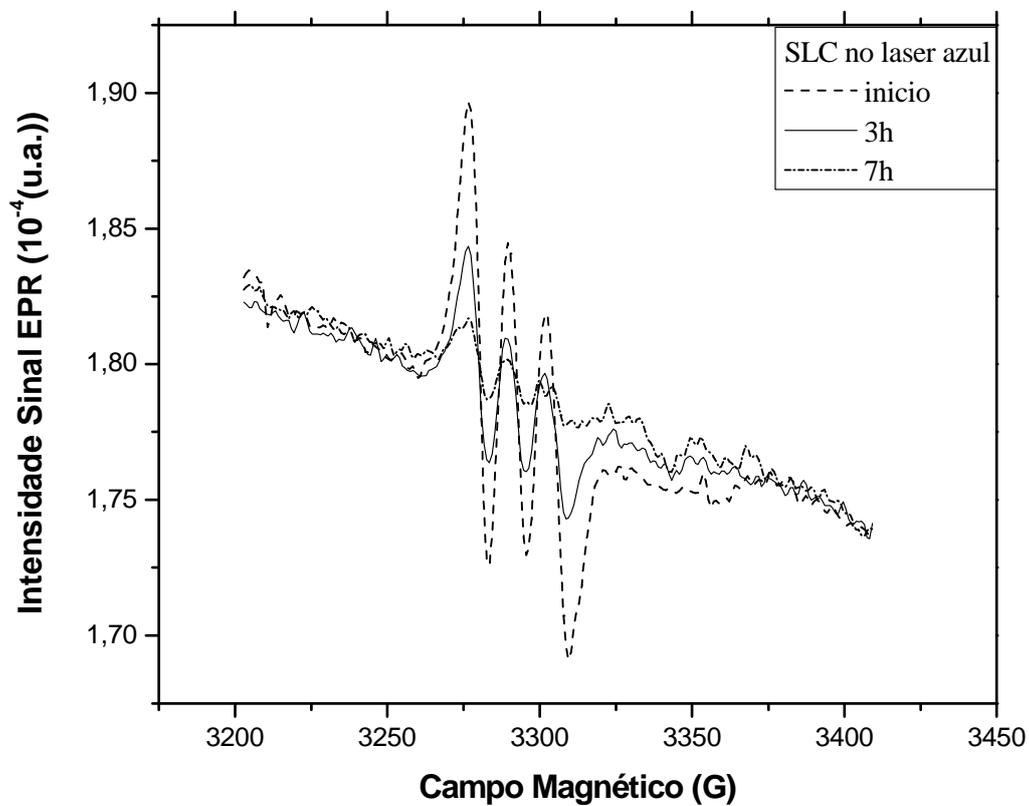


Figura 41 - Espectro de RPE da amostra exposta ao laser azul para diferentes intervalos de tempo.

A Figura 42 mostra o sinal típico de RPE, para amostra exposta à amplitude de modulação de 40G para diferentes intervalos de tempo.

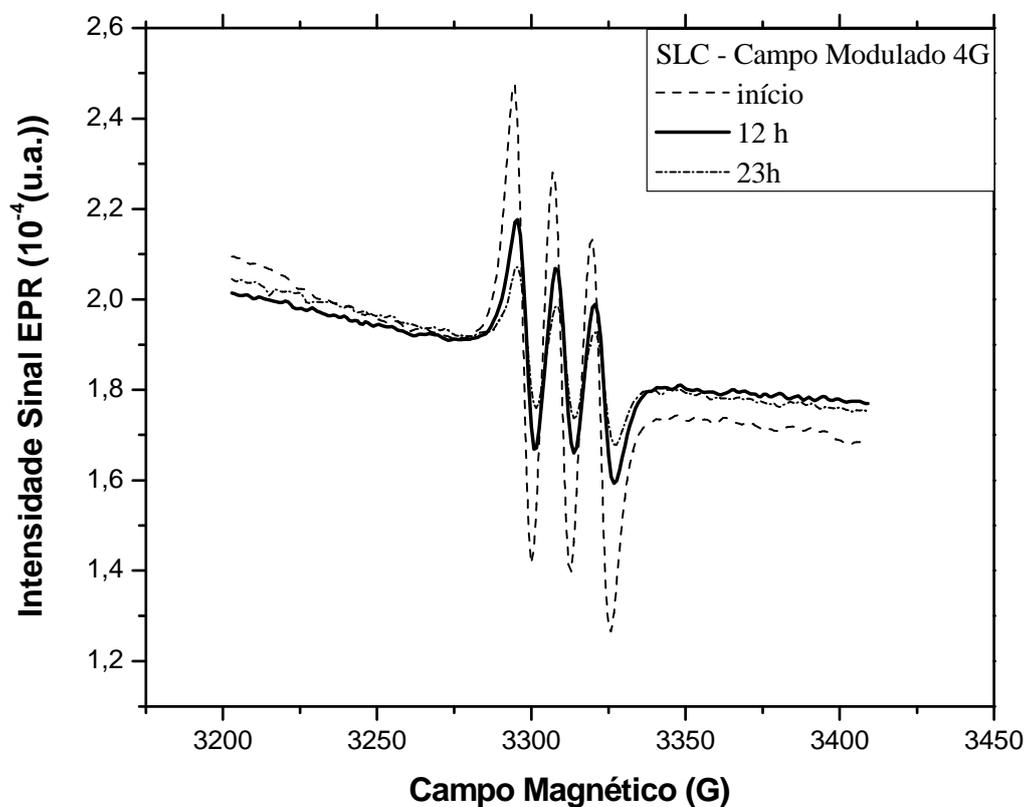


Figura 42 – Espectro de RPE, amostra exposta à modulação de campo magnético de 40G para diferentes intervalos de tempo.

Observando as Figuras 39 a 42 pode-se notar que para todas as amostras o sinal de NO caiu com o tempo. Em todas as situações que as amostras foram expostas, o sinal de NO apresentou a mesma forma e esta se manteve com o tempo. Esta estabilidade do sinal de NO a partir das matrizes de látex é importante para aplicação sistemática tanto na quantificação de NO quanto na liberação de NO.

A Figura 43 mostra a intensidade do sinal de RPE em função do tempo para amostras expostas a diferentes condições. Para uma melhor comparação, a intensidade de sinal foi normalizada pela massa do SLC.

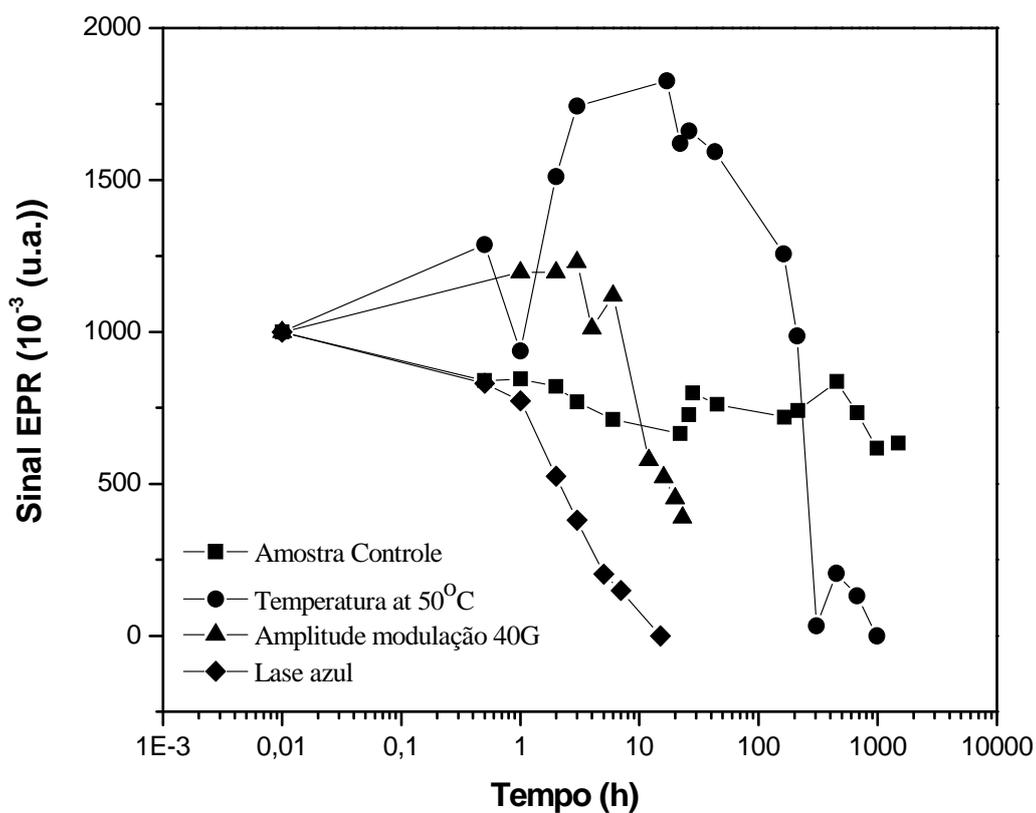


Figura 43 – Intensidade normalizada do sinal de RPE em função do tempo para amostras estocadas a diferentes condições.

Nas primeiras medidas de RPE em função do tempo, para algumas amostras, ocorreu um aumento da intensidade do sinal de RPE do SLC. Isto pode ser devido ao fato das primeiras medidas serem feitas logo após a imersão do SLC em solução aquosa saturada de NO. Como já visto, esse fato está em concordância com a evidência de que a água possa mascarar a intensidade de sinal de NO nas primeiras medidas. As últimas medidas, foram realizadas com o SLC livre de água, devido à evaporação, obtendo-se então uma maior intensidade de sinal.

A intensidade do sinal de RPE, para a amostra mantida a 50°C, apresentou um aumento do sinal de RPE em relação às primeiras medidas. Após aproximadamente 3 horas de medidas o sinal começou a cair com o tempo. De acordo com os dados obtidos, a elevação da temperatura no SLC provoca uma aceleração na taxa de liberação de NO em relação a amostra controle.

A amostra exposta à amplitude de modulação de 40G apresentou maior aceleração da taxa de liberação que a amostra controle e que a amostra mantida à temperatura de 50°C. Já a amostra exposta ao laser azul, a taxa de liberação foi a mais acelerada em relação às outras amostras medidas.

5. CONCLUSÕES

Foi observado a partir das matrizes de PPO300 3,25m/m%, PPO400 4,00m/m%, PPO2000 3,25m/m% e PPO2000 0,69 m/m%, que é possível induzir a taxa de liberação através da aplicação de um campo magnético, aumento da temperatura, aplicação da radiação UV ou laser azul. Os SLCs de NO estocadas em ambiente sem iluminação (grupo controle) e expostas à temperatura 50°C permitem o acompanhamento da taxa de liberação por aproximadamente 33 dias, já as amostras estocadas sob laser azul e campo magnético 40G permitem acompanhar a taxa de liberação por 22 horas e 24 horas, respectivamente. As matrizes PPO300 e 2000 com concentração 3,25 m/m%, assim como as matrizes PPO400 e 2000 com concentração 0,69 m/m%, tiveram comportamento semelhantes no que diz respeito a maior intensidade sinal das matrizes de PPO2000 em relação as matrizes de menor peso molecular. Estas matrizes possuem também um grande potencial para construção de um SLC de NO que possa ser reutilizado após a sua exposição a um campo magnético ou elevação da temperatura, aplicação da radiação UV ou laser azul, para a liberação total do NO.

As matrizes de látex como SLC de NO quando mantidas em ambiente sem iluminação em temperatura ambiente permitem que a taxa de liberação do NO seja acompanhada até aproximadamente 62 dias. Nota-se por meio de testes com amostras expostas a temperatura controlada (50°C), que o sinal de NO desaparece em aproximadamente 41 dias. Já com amostras expostas a campo magnético modulado e laser azul, o tempo de liberação de NO reduz para 27 e 20 horas, respectivamente. Portanto estes métodos se mostram promissores para a liberação de NO.

Os diversos tipos condições que os SLCs de NO a base de látex e de PPO foram expostas, apresentaram alternativas para liberar NO localmente em sistemas biológicos através de excitação externa. Ou seja, estes tipos de SLCs podem liberar NO de forma contínua e controlada no sistema biológico!

REFERÊNCIAS

- AL-SA'DONI, H.H.; FERRO A. **Clin Sci** 2000, v.98, p.507, 2000.
- ALBERT J. *et. al*, **Thromb Res** 2001; v.102, p.161, 2001.
- ALVES, M. C. O. – “Teste da angiogênese estimulada por membrana de látex natural.” – Dissertação de Mestrado, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras – USP, Ribeirão Preto, 2003.
- ASKELAND D. R. *The Science and Engineering of Materials*, 3rd edition, Brooks/Cole Publishing Co., Pacific Grove, CA, 1994.
- ASKEW S.C. *et. al*, *J. Chem Soc Perkin Trans v.2* 1995, n.4, p.741, 1995.
- BERNARDES, M. S. *Sangria da Seringueira*, 2 ed. ESALQ/FEALQ. Piracicaba, 2000.
- BLONDER J.M. *et. al*, **Dose. Life Sci** 1999, v. 65, p.261, 1999.
- BORIN, J. F. Estudos de Ressonância Paramagnética Eletrônica de Óxido Nítrico Ligado a Complexos de Ferro. 2003. 137f. Tese (Doutorado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, 2003.
- BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 86: 9030-3, 1989.
- BRINKER, C. J.; SCHERER, G. W. **Academic Press**, Inc.: San Diego, 1990.
- BUTLER A.R.; RHODES P. **Anal Biochem** 1997, v.249, p.1, 1997.
- CALLISTER, William D. Jr., *Ciência e Engenharia dos Materiais: Uma Introdução*, 5a edição, LTC – Livros Técnicos e Científicos, 2002).
- CARRERAS, M.C. *et. al*, v.18, p. 151-161, 1994.
- CHEN, A.; ZHANG, J.; STAMLER, J.S.. **Proc. Nrl. Acad. Sci. U.S.A.** v.99, p.8306, 2002.
- CORRIU, R. J. P.; LECLER, C. Q. D. **Angew. Chem., Int.** v. 35, n. 13-14, p.1420-1436, 1996.
- D' AUZAC *et. al*, - **Physiology of Rubbber Tree Latex - CRC Press**, 1989.
- DE OLIVEIRA, M.G., *et. al*, **J. Phys Chem A**, v.106, n.38, p.8963, 2002.
- DESAI, M. *et. al.*, **J Surfactants Deterg**, v.3, p.193, 2000.
- DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. **J. Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.

- FILHO, F.R.; ZILBERSTEIN, B. **Assoc. Med. Bras.**, v.46, n.3, 2000.
- FRADE, M.A.C. *et. al*, J.; **International Journal of Dermatology**, v. 40, n.3, p. 238, 2001.
- GASTON B. *et. al*, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.90, p.10957, 1993.
- GASTON B. **Biochim Biophys Acta**, v.1441, p. 323, 1999.
- GREEN, L.C. *et. al*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 78: 7764-8, 1981 (b).
- GREEN, L.C. *et al*, **Science**, 212: 56-8, 1981 (a).
- GUN, J.; LEV, O. **Anal. Chim. Acta**. v. 336, n. 1-3, p. 95-106, 1996.
- HENCH, L. L.; WEST, J. K. **Chem. Rev.** v. 90, n.1, p. 33-72, 1990.
- HERCULANO, R. D.; BRUNELLO, C. A.; GRAEFF, C.F.O. **Macromol Symp.**, n. 245–246, p. 529, 2006.
- HIBBS Jr., J.B. *et. al*, **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 157: 87-94, 1988.
- HIBBS, J. B.; TAINTOR, R. R.; VAVRIN Z. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.
- HIRATSUKA, R. S.; SANTILLI, C.V.; PULCINELLI, S.H. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 171-180, 1995.
- HOGG, N.; SINGH, R.J.; KALYANARAMAN B. **FEBS Lett**, v.382, p.223, 1996.
- HRABIE, J. A. *et. al*, **Bioconjugate Chem**, 1999, v.10, p.838, 1999.
- HUIE, R. E.; PADMAJA, S. **Free Radicals Res. Commun**, v. 18, p. 195-199, 1993.
- IGNARRO L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO J. **Circ Res**, v.;90, p.21, 2002.
- IGNARRO, L. J. *et al*, **Proc Natl Acad Sci USA**, v.84, p. 9265-9269, 1987.
- ILER, R.K. **The chemistry of silica**, Wiley, New York, 1979).
- ISCHIROPOULOS, H. *et. al*, **Arch. Biochem. Biophys.** v. 298, p. 446-451, 1992.
- KATAYANA, Y. Dojindo Newsletter. v.1. Disponível em <<http://www.dojindo.com/newsletter/review.html>>, acesso em março de 2008.
- KATSUKI, S.A. *et al*, **J Cyclic. Nucleotide Res**, v.3. p. 23-5, 1977.
- KERWIN, J. F.; LANCASTER, J. R.; FELDMAN P. L. **J. Med.Chem.**, v.38, p.4343, 1995.

- KUMAR, C. S. S. R.; HORMES, J.; LEUSCHNER, C. **Wiley-VCH: Weinheim, Germany**, 2005.
- LEE, D. H.; PFEIFER, G. P. **Mutagenesis**, v. 22, n.1, p. 63, 2007.
- LI, J.; TAN, S. N. **Anal. Lett.** v. 33, n.8, p.1467-1477, 2000.
- LIU, X. *et al*, **J. Biol. Chem.** v. 273, p. 18709-18713, 1998.
- MARLETTA, M.A. *et al*, **Biochemistry**, v.27, p.8706-11, 1988.
- MATHEIS, G. *et al*, **Am. J. Physiol.**, v.262, p.H616-H620, 1992.
- MELO, J. P. Sensor Sólido para o Óxido Nítrico Utilizando a Técnica Sol-Gel. 2004. 90f. Dissertação (Mestrado em Física Aplicada à Medicina e Biologia) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, 2004.
- MEYER D.J. *et. al.*, **FEBS Lett**, v.345, p.177, 1994.
- MOMENI, N. *et. al*, **Anal. Chim. Acta.**, v. 387, n.1, p. 21-27, 1999.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS E.A. **Pharmacol Rev.**, v. 43, p. 109, 1991.
- MRUE, F. *et. al*, **Materials Research**, v. 7, n.2, p. 277, 2004.
- MULLIGAN, M. S. *et. al*, **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v.88, p.6338-6342, 1991.
- NAGANO, T.; YOSHIMURA, T. **Chem. Rev.**, v. 102, p. 1235-1269, 2002.
- NOWICKI, J.P. *et. al*, **Eur. J. Pharmacol.**, v.204, p. 339-340, 1991.
- ROUSSEAU, Dept. of Physiology & Biophysics, Albert Einstein College of Medicine. Disponível em <http://www.aecom.yu.edu/home/biophysics/rousseau/nos/nos.htm>, acesso em dezembro 2009.
- SAKKA, S. in: Better ceramics through chemistry, eds. Brinker, C. J., CLARK, D.E., and ULRICH, D.R. **Elsevier-North-Holland**, New York, 1984, p. 91.
- SANTOS K.F.R. *et. al*, **Hypertension**, 2001; v.37, p.1039, 2001.
- SANTOS K.F.R. *et. al*, **Nitric Oxide: Biol Chem**, v.7, n.1, p. 57, 2002.
- SCHMIDT., H.H.W.; WALTER, U. **Cell**, 78: 919-25,1994.
- SCHNACKENBERG, C.G. *et al*, **American J. Phys**, 272 Pt2: R879-R886, 1997.
- SEXTON D. J. *et. al*, **Photochem Photobiol**, v. 59, p.463, 1994.

SHAFFER, J.E. *et al*, **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 260, p.286, 1992.

SHISHIDO, S. M. *et. al*, **Biomaterials**, v.24, p. 3543, 2003.

SINGH R. J. *et. al*, **Arch Biochem Biophys**, v.372, p.8, 1999.

SMITH, W.F., Principles of Materials Science and Engineering, 3rd edition, McGraw-Hill Book Company, New York, 1995.

SNYDER, S. H.; JAFFREY, J. R.; ZAKHARY R. **Brain Res Rev.**, v.26, p. 167, 1998.

SOL-GEL SCIENCE AND TECHNOLOGY , edited by AEGERTER M. A., JAFELLICCI Jr., M., SOUZA, D. F.; ZANOTTO, E. D., World Scientific, Singapore 1989.

STEIN, A.; MELDE, B. J.; SCHRODEN, R. C. **Adv. Mater.**, v.12, p.1403, 2000.

STUEHR, D. J., FELDAMAN P. L., GRIFFITH O. W. **Chem Eng News**, v.20, p.26., 1993.

STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 82, p. 7738-7742,1985.

VODOVOTZ, Y, *et. al*, **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 48, p.1167, 2000.

WANG, P. G.; CAI, T. B.; TANIGUCHI, N. **Wiley -VCH: Weinheim**, Germany, 2005.

WANG, P. G. *et. al*, **J. Chem. Rev.**, v. 102, p.1091, 2002.

WOOD P. D.; MUTUS B.; REDMOND R. W. **Photochem Photobiol**, v.64, p.518

ZHAO, M.; XIA, Y.; WHITESIDES, G. M. **Adv. Mater**

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](#)