

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE DO USO DE
HIDROGÉIS POLIMÉRICOS NA TERAPEUTICA DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA”**

Vanessa Bezerra da Silva

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA, área de concentração: FÍSICO-QUÍMICA.

Orientador: Caio Marcio Paranhos da Silva

Bolsista CAPES

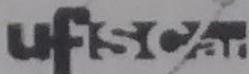
**São Carlos - SP
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, Vanessa Bezerra da
Avaliação da potencialidade do uso de hidrogéis poliméricos na terapêutica de leishmaniose cutânea / Vanessa Bezerra da Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
90 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

1. Hidrogéis nanocompósitos. 2. Poli(álcool vinílico). 3. Criogelificação. 4. Liberação controlada. 5. Leishmaniose cutânea. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Vanessa Bezerra da Silva, realizada em 10/11/2015:

Prof. Dr. Caio Marcio Paranhos da Silva
UFSCar

Profa. Dra. Alessandra Lifitch Viçosa
FIOCRUZ

Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz
UFSCar

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos aqueles que amo, vivos ou não. Enquanto eu existir este sentimento seguirá vivo. Vocês me ajudaram a construir quem eu sou e isso já me é suficiente.

Agradecimentos

Ao meu orientador Caio Paranhos, por tudo o que me ensinou e por toda a paciência que teve comigo. Muito obrigada, profes. Tudo que sei de ciência dos materiais devo a você.

À Dra Alessandra Viçosa, por ceder o medicamento essencial neste trabalho.

Ao Professor Edenir, pela ajuda com os cálculos de quimiometria. Sem isso eu estaria fazendo análises até agora.

Ao Professor Clóvis, pelas análises microbiológicas e pelo carinho e paciência com que me explicou os experimentos e tirou minhas dúvidas.

À Embrapa Pecuária Sudeste, à Doutora Cintia Marcondes, à Amanda e ao Thiago Robeldo pela doação do sangue bovino.

Ao frigorífico Siltomac, ao José Benedito Costa e à Nayara Costa pela doação do sangue bovino e por fazerem de tudo para que desse certo.

Ao Boi e aos novilhos 9649, 9261 e 9418, pela doação propriamente dita.

À Doutora Ana Catarina Gomes, pelas análises de TGA, pela amizade e pelas conversas.

Ao José Arnaldo, pelas análises de DRX e por ser essa figura engraçadíssima.

Aos amigos feitos no Laboratório de polímeros ao longo desses anos, pelos bolos, risadas, sofrimentos e felicidades compartilhadas.

Aos meus pais e ao meu tio Ven, por terem me dado toda a base e apoio para que isso acontecesse, sempre cuidando para que meus sonhos fossem realizados e para que eu não perdesse a vontade de realizá-los e por acreditarem tanto em mim. Amo vocês!

Ao Pedro Froner por toda paciência, carinho, amor, colo e por saber que eu sempre estou certa. Muito obrigada, amor.

Ao Lulu *in memoriam*, à Estrela, à Cristal e à Loliro por me mostrarem que a felicidade realmente está nas pequenas coisas, por me tornarem uma pessoa melhor e por me fazerem tão bem.

Aos meus amigos pelas conversas, apoio, paciência, risadas e por confiarem mais em mim do que eu mesma. Deu certo!!

À república Etanóis por me acolher tão bem sempre que precisei de amigos e por me fazer sentir feliz mesmo quando as coisas não estavam tão bem assim.

Muito obrigada!

Sometimes you climb out of bed in the morning and you think: "I'm not going to make it", but you laugh inside, remembering all the times you've felt that way."

Charles Bukowski



Lista de abreviaturas

ATCC – Coleção de microorganismos norte americana (American Type Culture Collection)

BSA – Albumina Sérica Bovina (Bovine Serum Albumin)

ΔH_m – Entalpia de fusão cristalina

ΔH_v – Entalpia de vaporização da água

kD – kilodalton

MIC – Concentração mínima inibitória (minimum inhibitory concentration)

PARO – Sulfato de paromomicina

PVA – Poli(álcool vinílico)

PVA P 1C – Hidrogel de PVA Puro produzido com 1 ciclo de criogelificação

PVA P 3C – Hidrogel de PVA Puro produzido com 3 ciclos de criogelificação

PVA P 5C – Hidrogel de PVA Puro produzido com 5 ciclos de criogelificação

PVA 1 1C – Hidrogel de PVA com 1% de sepiolita incorporada e produzido com 1 ciclo de criogelificação

PVA 1 3C – Hidrogel de PVA com 1% de sepiolita incorporada e produzido com 3 ciclos de criogelificação

PVA 1 5C – Hidrogel de PVA com 1% de sepiolita incorporada e produzido com 5 ciclos de criogelificação

PVA 2,5 1C – Hidrogel de PVA com 2,5% de sepiolita incorporada e produzido com 1 ciclo de criogelificação

PVA 2,5 3C – Hidrogel de PVA com 2,5% de sepiolita incorporada e produzido com 3 ciclos de criogelificação

PVA 2,5 5C – Hidrogel de PVA com 2,5% de sepiolita incorporada e produzido com 5 ciclos de criogelificação

PVA 5 1C – Hidrogel de PVA com 5% de sepiolita incorporada e produzido com 1 ciclo de criogelificação

PVA 5 3C – Hidrogel de PVA com 5% de sepiolita incorporada e produzido com 3 ciclos de criogelificação

PVA 5 5C – Hidrogel de PVA com 5% de sepiolita incorporada e produzido com 5 ciclos de criogelificação

SBF – Fluido biológico simulado (Simulated Body Fluid)

SEP – Sepiolita

Tg – Temperatura de transição vítrea

Tm – Temperatura de fusão cristalina

Tv – Temperatura de vaporização da água

Xc – Grau de cristalinidade da amostra

Lista de tabelas

TABELA 3.1: Reagentes para o preparo do SBF	28
TABELA 3.2: Concentração iônica (mmol L^{-1}) de SBF e plasma sanguíneo humano	29
TABELA 3.3: Composição do anticoagulante	32
TABELA 4.1: Parâmetros dos mecanismos de sorção de SBF nos hidrogéis nanocompósitos	41
TABELA 4.2 Parâmetros térmicos obtidos por DSC para os hidrogéis	44
TABELA 4.3: Perda de massa das amostras durante os processos descritos	48
TABELA 4.4: Temperaturas a 10 e 50% de degradação da amostra e “onset” das degradações	50
TABELA 4.5: Condições experimentais do planejamento fatorial realizado	51
TABELA 4.6: Matriz obtida a partir do modelo empírico	53
TABELA 4.7: Cálculos para obtenção do erro quadrático puro e dos graus de liberdade	55
TABELA 4.8: Tabela ANOVA dada como resposta pelo programa Octave	56
TABELA 4.9: Análise dos coeficientes b	57
TABELA 4.10: Tabela ANOVA recalculada pelo Octave	57
TABELA 4.11: Novos coeficientes b calculados pelo Octave	58
TABELA 4.12: Dados sobre o estado da água obtidos através do DSC.	63
TABELA 4.13: Halos formados pela liberação da paromomicina	74

Lista de figuras

FIGURA 2.1: Ilustração das classificações dos hidrogéis [Moreira, 2011]	2
FIGURA 2.2: Estruturas do hidrogel seco e intumescido [Moreira, 2011]	3
FIGURA 2.3: hidrólise do poli(acetato de vinila) para a formação do poli(vinil álcool)	4
FIGURA 2.4: Estrutura do PVA obtido por ciclos de congelamento/descongelamento. [Ricciardi, 2005]	5
FIGURA 2.5: Publicações com o termo criogel entre os anos 1983-2013 [Okay, 2014]	7
FIGURA 2.6: estrutura da sepiolita [Sepiolita, 2015]	10
FIGURA 2.7: Ilustrações de sistemas de liberação controlada: (a) membranas; (b) Matriz polimérica [Stamatialis, 2008]	15
FIGURA 2.8: Esquema ilustrativo da liberação de fármacos [Bajpai, 2008]	17
FIGURA 2.9: Lesões de 30 dias de evolução de LTA [Sociedade Brasileira de Medicina Tropical]	20
FIGURA 2.10: Número de casos registrados no Brasil entre 1998 e 2013	21
FIGURA 2.11: Mapa de distribuição de casos de LTA registrados entre 2005 e 2007 [SVS/MS, 2010]	21
FIGURA 2.12: Fórmula estrutural do estibogluconato de sódio [Barret, 2012]	22
FIGURA 2.13: Fórmula estrutural do Antimoniato de N-metilglucamina – Glucantime® [Fraga, 2007]	23
FIGURA 2.14: Fórmula estrutural da paromomicina [Barret, 2012]	23
FIGURA 3.1: a) Semeadura do inóculo na placa b) Poços de 0,7mm; c) Adição da solução; d) Poço com solução de liberação	36
FIGURA 4.1: a) Solução polimérica; b) Membrana após um ciclo de criogelificação; c) Membrana pós segundo ciclo de criogelificação	37
FIGURA 4.2: a) Solução de PVA; b) Estrutura da membrana após um ciclo de criogelificação; c) Estrutura da membrana após o segundo ciclo; d) Estrutura da membrana após alguns ciclos [Willcox, 2000]	38
FIGURA 4.3: Cinética de inchamento dos hidrogéis nanocompósitos: a) sem sepiolita; b) com 1% de sepiolita; c) com 2,5% de sepiolita e d) com 5 % de sepiolita	39

FIGURA 4.4: Dependência do inchamento dos hidrogéis no equilíbrio com o teor de nanopartículas	40
FIGURA 4.5: Espectro de UV-Vis das amostras	42
FIGURA 4.6: Comparação entre a temperatura de transição vítrea e o grau de cristalinidade dos hidrogéis nanocompósitos em função do teor de nanopartícula	45
FIGURA 4.7: Curvas de difração para os hidrogéis produzidos	46
FIGURA 4.8: Curvas de TGA para os hidrogéis nanocompósitos	47
FIGURA 4.9: Mecanismo de desidratação do PVA [Finch, 1973]	48
FIGURA 4.10: Curvas de DTGAs dos hidrogéis nanocompósitos	49
FIGURA 4.11: Superfície de resposta obtida	58
FIGURA 4.12: Esquema das estruturas das águas de hidratação no PVA	59
FIGURA 4.13 Curva de DSC para a água deionizada	60
FIGURA 4.14: Curva de DSC para o PVA puro (curva de baixo) e PVA com 1% de SEP (curva de cima)	61
FIGURA 4.15: Curvas de DSC para PVA puro (curva de baixo) e PVA com 1% de SEP (curva de cima) inchadas em solução de sulfato de paromomicina	61
FIGURA 4.16: Curva de DSC para solução de paromomicina com sepiolita	62
FIGURA 4.17: Grau de hemólise observado nos hidrogéis	66
FIGURA 4.18: Esquema da adsorção de proteínas na superfície de materiais	67
FIGURA 4.19: Capacidade de adsorção de BSA pelos hidrogéis	68
FIGURA 4.20: Grau de hemólise para os hidrogéis	69
FIGURA 4.21: Reavaliação do grau de hemólise para os hidrogéis	70
FIGURA 4.22: Concentração de paromomicina nos sistemas: a) Pva puro; b) PVA + 1% SEP	72
FIGURA 4.23: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos: a) e b) primeira hora e segunda hora, respectivamente, de liberação de paromomicina para hidrogel de PVA puro; c) e d) primeira hora e segunda hora de liberação para hidrogel com 1% de SEP	73
FIGURA 4.24: Liberação acumulada da paromomicina	74

Resumo

AValiação DA POTENCIALIDADE DO USO DE HIDROGÉIS POLIMÉRICOS NA TERAPEUTICA DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Poli(álcool vinílico) - PVA é um polímero semicristalino altamente hidrofílico que possui excelentes propriedades, como boa resistência química e elevada biodegradabilidade e biocompatibilidade. Devido à sua natureza semicristalina, os domínios cristalinos, sob condições controladas de crescimento, podem atuar como pontos de reticulação físicos, mantendo a integridade da estrutura sob inchamento. Esta característica torna hidrogéis de PVA bastante promissores em relação ao desenvolvimento de sistemas de carreamento de fármacos e outras substâncias bioativas. Soluções aquosas de PVA podem formar hidrogéis com boas propriedades mecânicas através de ciclos de resfriamento e aquecimento. Este método resulta na formação de cristalitos que atuam como reticulações físicas, mantendo a insolubilidade do material em água. Recentemente muitos estudos mostram o uso de nanoestruturas para melhorar as propriedades mecânicas e o comportamento difusional de pequenas moléculas. Paromomicina é um antibiótico aminoglicosídeo muito utilizado para o tratamento de Leishmaniose cutânea (LC) no Brasil. Nos últimos anos, estudos mostraram que a adesão de pacientes ao tratamento de LC com pomadas é baixa. Portanto hidrogéis são uma interessante alternativa para este tratamento. Como o principal objetivo deste trabalho foi o preparo e a caracterização de hidrogéis poliméricos nanocompósitos de PVA contendo nanopartículas de SEP para a viabilidade preliminar do uso como sistema de liberação controlada para paromomicina, os hidrogéis foram preparados através de um processo de criogelificação. Este procedimento garante a formação do hidrogel, pois os domínios cristalinos do PVA formados durante os ciclos atuam como pontos de reticulação da membrana, permitindo a avaliação das medidas de transporte de água e do fármaco das membranas na presença de SEP. Neste estudo as membranas foram caracterizadas através de calorimetria diferencial, termogravimetria e difração de raios-X. Ainda foram feitos estudos de retenção polimérica, inchamento em plasma simulado, hemocompatibilidade, carreamento e liberação de fármaco. Os resultados mostram que os ciclos de criogelificação alteram significativamente o inchamento das membranas; as interações polímero-nanopartícula aumentam a rigidez da fase amorfa. O grau de hemólise diminui nos hidrogéis nanocompósitos quando comparados com os hidrogéis puros. O aumento

da porcentagem de nanopartícula diminui a cristalinidade da membrana. O perfil de degradação, a estabilidade térmica das amostras e a liberação do fármaco não são modificados pela quantidade de nanopartícula incorporada.

Palavras-chave: Hidrogéis nanocompósitos, Poli(álcool vinílico), Criogelificação, Liberação controlada, Leishmaniose cutânea.

Abstract

EVALUATION OF POLYMERIC HYDROGELS DRUG DELIVERY SYSTEMS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS THERAPEUTICS

Poly(vinyl alcohol) - PVA is a high hydrophilic semicrystalline polymer which has excellent properties such as good chemical resistance and high biodegradability and biocompatibility. Due to its semi-crystalline nature, crystalline domains, under controlled conditions, may act as physical crosslinking points, while maintaining the integrity of the structure under swelling. This feature makes PVA hydrogels promising for the development of drug, or other bioactive substances, delivery systems. Another interesting feature of this kind of hydrogels is the ability to form high stable network from crystalline domains formed through freezing and thawing cycles. This method shows the formation of crystallites which act as physical crosslinks while maintaining the insolubility of the material in water. Recently many studies show the use of nanostructures to improve mechanics properties and diffusional behavior of small molecules. Paromomycin is an aminoglycoside antibiotic widely used for cutaneous leishmaniasis therapeutics in Brazil. In the last years some studies have revealed that the patient adherence to the treatments of cutaneous leishmaniasis with ointments form is low. Therefore hydrogels are an interesting alternative to the ointment forms. As the main objective of this work was the preparation and characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogels containing sepiolite nanoparticles for the preliminary feasibility of using as controlled release system for paromomycin, hydrogels were prepared by cryogelation process. This ensures the formation of the hydrogel, as long as the crystalline domains formed during the PVA cycles act as crosslinking points, allowing the membranes water transport measurements of the drug in the presence of sepiolite. In this investigation membranes were characterized by differential calorimetry, thermogravimetry and X-ray diffraction. Furthermore polymer retention, swelling in simulated body fluid, hemocompatibility and drug delivery were studied to establish structure-properties correlations. The results show that cryogelation cycles significantly alter the swelling of the membranes; interactions polymer-nanoparticle increases the rigidity of the amorphous phase. Comparing to pure PVA hydrogels, in nanocomposites hydrogels the hemolysis decreased. Increasing the percentage of nanoparticles the membrane crystallinity decreases.

The samples degradation profile, the thermal stability and drug delivery profile are not modified by the amount of nanoparticles incorporated.

Key-words: Nanocomposites hydrogels, Poly(vinyl alcohol), Cryogelation, Drug delivery, Cutaneous leishmaniasis.

Sumário

1 - Objetivos	1
1.1 - Geral	1
1.2 - Específicos	1
2 - Introdução	2
2.1 - Hidrogéis poliméricos	2
2.2 - Poli(álcool vinílico) (PVA)	3
2.3 - Criogelificação em polímeros	4
2.4 - Hidrogéis nanocompósitos	7
2.5 - Argilominerais	8
2.6 - Sepiolita	9
2.7 - Hidrogéis nanocompósitos para liberação controlada	10
2.8 - Processos de inchamento dos hidrogéis	12
2.9 - Sistemas de difusão em membranas poliméricas	14
2.9.1 - Membranas ou reservatórios	14
2.9.2 - Matriz polimérica	14
2.10 - Sistemas de liberação de fármaco	16
2.11 - Adesivos dérmicos e transdérmicos	17
2.12 - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	19
2.13 - Terapêutica da Leishmaniose cutânea	22
3 - Materiais e métodos	25
3.1 - Reagentes e solventes	25
3.2 - Equipamentos	26
3.3 - Metodologia	27
3.3.1 - Caracterização dos hidrogéis	27
3.3.1.1 - Preparo dos hidrogéis de PVA – sepiolita	27
3.3.1.2 - Medidas de inchamento	27
3.3.1.3 - Capacidade de retenção polimérica	30
3.3.1.4 - Calorimetria diferencial exploratória – DSC	30
3.3.1.5 - Termogravimetria – TGA	31
3.3.1.6 - Determinação do estado da água	31
3.3.1.7 - Difração de raios-X – DRX	32
3.3.2 - Hemocompatibilidade	32
3.3.2.1 - Capacidade de hemólise	32

3.3.2.2 - Potencial anti-trombogênico	33
3.3.2.3 - Absorção de Albumina Bovina Sérica – BSA	33
3.3.3 - Carreamento, liberação e análise do fármaco	34
3.3.3.1 - Carreamento do fármaco	34
3.3.3.2 - Liberação do fármaco	34
3.3.3.3 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (teste de halo de inibição)	35
4 - Resultados e discussão	37
4.1 - Preparo dos hidrogéis nanocompósitos	37
4.2 - Medidas de inchamento em fluido plasmático simulado – SBF	38
4.3 - Capacidade de retenção polimérica	42
4.4 - Análise de calorimetria diferencial exploratória – DSC	43
4.5 - Difração de raios-X – DRX	46
4.6 - Análise termogravimétrica – TGA	47
4.7 - Planejamento fatorial	50
4.8 - Estado da água no interior dos hidrogéis	59
4.9 - Hemocompatibilidade <i>in vitro</i>	64
4.9.1 - Teste de hemólise	65
4.9.2 - Adsorção de albumina bovina sérica – BSA	66
4.9.3 - Formação de trombos	68
4.10 - Liberação do fármaco	70
5 - Conclusões	76
6 - Referências bibliográficas	78
Anexo I - Calculo do parâmetro n	87
Anexo II - DRX de sepiolita pura	89
Anexo III - Curva de calibração para o sulfato de paromomicina	90

1 - Objetivos

1.1 - Geral

- Síntese e caracterização de sistema polimérico baseado em hidrogel nanoestruturado visando à potencialidade de aplicação como adesivo transdérmico na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana.

1.2 - Específicos

- Obter hidrogéis nanoestruturados a partir da incorporação de sepiolita em uma matriz de poli(álcool vinílico) com diferentes teores da nanopartícula e forma de preparo;
- Correlacionar a nanoestrutura final dos hidrogéis com as propriedades térmicas;
- Correlacionar a nanoestrutura final dos hidrogéis com as propriedades de transporte de água e do sulfato de paromomicina em condições fisiológicas;
- Correlacionar a nanoestrutura final dos hidrogéis com a bio e hemocompatibilidade;
- Avaliar o carregamento de sulfato de paromomicina nos hidrogéis nanoestruturados sob diferentes metodologias.

2 - Introdução

2.1 - Hidrogéis poliméricos

Hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais constituídas de polímeros hidrofílicos ou parcialmente hidrofílicos, que possuem grande capacidade de retenção de água. Podem ser classificados como químicos ou físicos. Os hidrogéis químicos apresentam pontos de conectividade (reticulações) baseados em ligações covalentes. Estas ligações impedem que alterações físico-químicas, como temperatura, pH e pressão perturbem a estabilidade do hidrogel, o que permite também classificá-lo como hidrogel permanente. Já os hidrogéis físicos apresentam diversos tipos de interações, tais como ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas, emaranhados moleculares e outras. Com isto, o hidrogel físico é dependente das variações físico-químicas, e, portanto, pode ser também classificado como hidrogel reversível [Hoffman, 2002; Paranhos, 2007], como mostra a Figura 2.1.

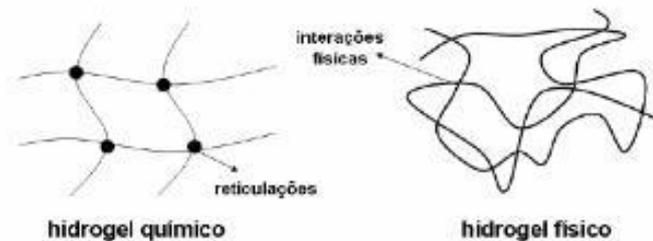


FIGURA 2.1: Ilustração das classificações dos hidrogéis [Moreira, 2011].

Quando as cadeias poliméricas formadoras do hidrogel entram em contato com um meio de intumescimento aquoso, podem sofrer interações com este meio provocando uma expansão, aumentando a distância entre seus retículos e o volume entre eles, como pode ser observado na Figura 2.2. A força osmótica que conduz o solvente para o interior do hidrogel é contrabalanceada por uma força elástica retrativa gerada pela mudança conformacional (entrópica) das cadeias poliméricas. Quando estas duas forças estão contrabalanceadas o hidrogel atinge seu estado de equilíbrio de intumescimento [Moreira, 2011].

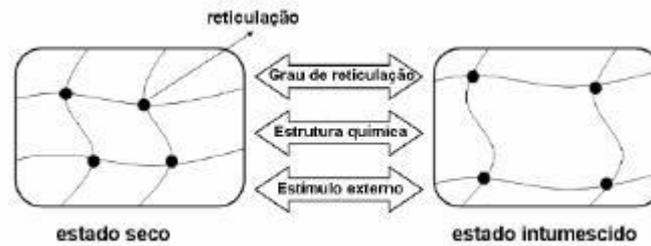


FIGURA 2.2: Estruturas do hidrogel seco e intumescido [Moreira, 2011].

Nos hidrogéis a absorção de água aumenta a interação polímero-solvente, permitindo a entrada e a incorporação de substâncias capazes de interagir com o polímero. A capacidade de incorporar um ou mais princípios ativos, a atoxicidade e biocompatibilidade, aliada com as propriedades físicas como alta permeabilidade ao oxigênio, permitindo o fluxo de fluidos corpóreos pelo hidrogel; capacidade de intumescer em água e fluidos biológicos, assemelhando-se muito aos tecidos vivos; consistência elastomérica e minimizando o atrito entre tecidos e o hidrogel fazem com que hidrogéis possam ser utilizados como matrizes de liberação controlada.

2.2 - Poli(álcool vinílico) (PVA)

Descoberto em 1924 por Herrmann e Haehnel, o poli(álcool vinílico) (PVA) é a resina sintética **hidrossolúvel** produzida em maior volume no mundo. É obtido através da hidrólise do poli(acetato de vinila) (PVAc) como mostra a Figura 2.3. O PVA é um copolímero de PVA/PVAc, porque a reação não é 100% efetiva e o polímero final apresenta algum grau de hidrólise (quantidade de grupos acetato remanescentes após reação de obtenção do PVA). Seu grau de hidrólise e grau de polimerização ditam suas propriedades físico-químicas básicas, sendo um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas. A solubilização do PVA (99% hidrolisado) em água requer temperaturas elevadas devido à alta energia associada à dissolução da fase cristalina. Com o aumento da temperatura, as ligações hidrogênio são mais facilmente rompidas levando a diminuição das forças intra e intermoleculares, aumentando assim a solubilidade. Mais recentemente tem sido usado como

carreador de medicamentos e em um grande número de aplicações biomédicas como, por exemplo, implantes, lentes de contato e órgãos artificiais devido às suas propriedades de degradabilidade, atoxicidade, biocompatibilidade e por não ser carcinogênico. Os hidrogéis de PVA vem ganhando muitas aplicações como matrizes de liberação de medicamentos por ser um polímero linear que permite a formação de reticulações. Porém, métodos tradicionais de reticulação com agentes químicos como glutaraldeído, borato de sódio ou ácido bórico podem apresentar efeitos secundários sobre o fármaco liberado, alterando permanentemente ou destruindo sua estrutura, e reações adversas no paciente devido a resíduos que podem ficar nos hidrogéis formados [Ficek, 1993; Li, 1998; Aranha, 2001].

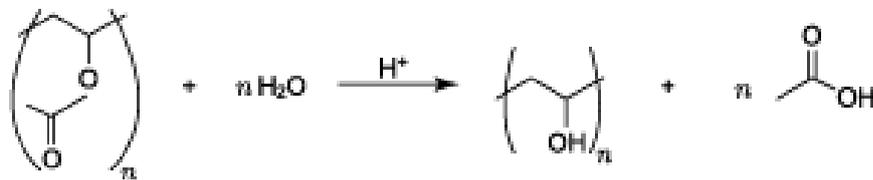


FIGURA 2.3: Hidrólise do poli(acetato de vinila) para a formação do poli(vinil álcool).

Os polímeros para aplicações farmacêuticas e biológicas normalmente necessitam de uma alta biodegradabilidade e biocompatibilidade. Assim o desenvolvimento de outras técnicas de reticulações para obtenção do produto com as características desejadas se fez necessário. Uma solução para o problema está em uma propriedade característica do PVA. Hidrogéis de PVA quando preparados usando ciclos de criogelificação (congelamento/descongelamento), formam cristalitos e o sistema comporta-se como se tivesse sido quimicamente reticulado ancorando a fase amorfa, mas sem a necessidade de agentes químicos apresentando, assim, reticulações físicas, além de propriedades mecânicas desejáveis, propriedades de inchamento e redes cristalinas insolúveis [Ficek, 1993; Hassan, 2000; Hamidia, 2008].

2.3 - Criogelificação em polímeros

O processo de criogelificação foi primeiramente descrito por Nambu [Massao, 1982] mostrando a formação dos domínios cristalinos atuando como reticulações físicas que mantêm a insolubilidade do material em água. Stauffer e

Peppas [Stauffer, 1992] estudaram o espalhamento de luz em membranas de PVA previamente tratadas com ciclos de 45-120 minutos a -20°C e períodos um pouco maiores para o descongelamento, e avaliaram a porcentagem de luz transmitida pelos hidrogéis em função do tempo de congelamento/descongelamento mostrando que as microestruturas cristalinas que formam o hidrogel aumentam de tamanho com o aumento do número de ciclos.

Ricciardi e coautores mostram, através de análises de SANS, que os criogéis de PVA apresentam uma estrutura bifásica composta por duas fases, uma região rica em PVA e uma região pobre em PVA (Figura 2.4) e essa segregação acontece durante o primeiro ciclo de criogelificação, aumentando com o aumento dos ciclos, o que está de acordo com um estudo feito previamente por Pines e Prins [Pines, 1973]. Eles também mostraram que a estrutura cristalina fica mais organizada com o aumento do número de ciclos de criogelificação [Ricciardi, 2005].

Willcox e coautores, mostraram que o aumento de ciclos de congelamento/descongelamento e o aumento do grau de cristalinidade da rede, provocam um aumento nas propriedades mecânicas do hidrogel [Willcox, 2000].

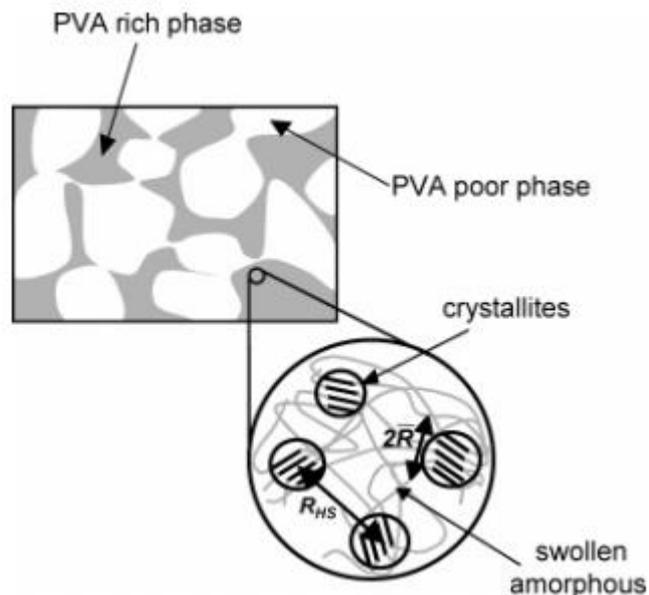


FIGURA 2.4: Estrutura do PVA obtido por ciclos de congelamento/descongelamento. [Ricciardi, 2005].

Trabalhos realizados por Lozinski mostram que a partir de cinco ciclos de criogelificação não há mudanças significativas no domínio cristalino da membrana [Lozinski, 2003].

Hickey e Peppas [Hickey, 1995] mostraram que quando soluções contendo de 8 a 20% de PVA eram resfriadas em -4 e -20 °C e descongeladas até temperatura ambiente, membranas relativamente fortes eram formadas devido ao ordenamento molecular e à cristalização das cadeias macromoleculares. A ordem molecular foi analisada por DSC e foi descoberto que esta se dava devido aos ciclos de congelamento/descongelamento. Peppas ainda descreveu que hidrogéis produzidos com este tratamento possuem várias características únicas como, por exemplo, podem ser alongados de cinco a seis vezes o seu tamanho original, indicando sua natureza borrachosa e elástico e sua alta resistência mecânica [Peppas, 1991].

Como o principal objetivo deste trabalho foi o preparo e a caracterização de hidrogéis poliméricos nanocompósitos de PVA contendo nanopartículas de SEP para a viabilidade preliminar do uso como sistema de liberação controlada para paromomicina, os hidrogéis foram preparados através de um processo de criogelificação que consiste em ciclos de congelamento (-20 °C) e descongelamento (temperatura ambiente) de uma hora cada, como será exposto no tópico 3.3.1. Este procedimento garante a formação do hidrogel, pois os domínios cristalinos do PVA formados durante os ciclos atuam como pontos de reticulação da membrana, permitindo a avaliação das medidas de transporte de água e do fármaco das membranas na presença de SEP.

Desde 1980 o termo criogel tem se tornado mais popular. A Figura 2.5 mostra as publicações com o termo criogel por ano de 1983 a 2013.

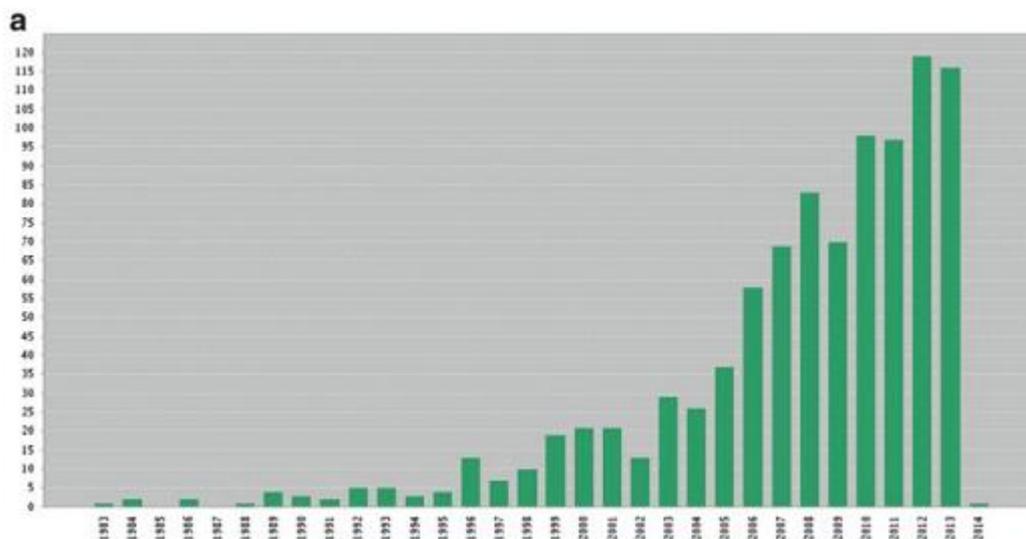


FIGURA 2.5: Publicações com o termo criogel entre os anos 1983-2013 [Okay, 2014].

2.4 - Hidrogéis nanocompósitos

Hidrogéis nanocompósitos vem ganhando muita atenção nos últimos anos como os sistemas mais promissores de liberação de medicamentos, pois combinam as características de um hidrogel (hidrofilicidade, alto grau de inchamento e elasticidade) com a nanopartícula (capaz de adsorver diversas substâncias e aumentar a resistência mecânica do material).

Hidrogéis nanocompósitos possuem propriedades físicas semelhantes a tecidos vivos mais do que qualquer outra classe de biomateriais sintéticos, que são atribuídas ao seu elevado teor de água, baixa tensão interfacial com água e fluidos biológicos e sua flexibilidade [Hamidia, 2008].

Apesar de sua grande afinidade por água, hidrogéis apresentam inchamento ao invés de se dissolverem em ambiente aquoso devido às reticulações presentes em sua estrutura. Como o mecanismo mais comum de liberação é a difusão Fickiana, moléculas com características e tamanhos diferentes podem difundir livremente da matriz do hidrogel. De acordo com a primeira lei de Fick, o comportamento controlado por difusão é o mecanismo mais aplicável para descrever a liberação do fármaco a partir de hidrogéis. A difusão do fármaco para fora do hidrogel depende do tamanho da rede de sua matriz [Canal, 1989]. Tamanhos

típicos descritos na literatura variam entre 5 a 100 nm (no estado inchado), para hidrogéis com aplicações biomédicas, que são maiores do que a maioria das moléculas de medicamentos [Cruise, 1998]. Shakya e colaboradores mostraram que o hidrogel nanocompósito pode ser obtido pela técnica de mistura das soluções dos materiais orgânico e inorgânico, seguido de criogelificação [Shakya, 2013].

Os hidrogéis poliméricos estão bem estabelecidos, embora estudos acerca desses materiais continuem a ser desenvolvidos. Hidrogéis criogelificados apresentam resistência mecânica maior que os géis químicos de mesma composição, uma vez que a carga aplicada a esses materiais pode ser distribuída ao longo dos cristalitos. Entretanto uma forma de conseguir aumentar a resistência de géis físicos seria a adição de carga inorgânica [Hamidia, 2008].

Dentre as cargas inorgânicas possíveis para hidrogéis aplicados em saúde, destacam-se os argilominerais. Esses silicatos apresentam em sua composição elementos não agressivos ao corpo e servem de reforço para os hidrogéis.

2.5 - Argilominerais

O uso de minerais com finalidades medicinais data da pré-história. Existem indícios de que o *Homo Erectus* e o *Homo Neanderthalensis* misturavam água com diferentes tipos de lamas com a finalidade de curar feridas, acalmar irritações e como método de limpeza da pele. Isso pode ter surgido da mimetização de animais, que utilizam instintivamente esses minerais para esses fins. Nos séculos XVIII e XIX, com o desenvolvimento da cristalografia e mineralogia, obteve-se grande avanço no conhecimento desses minerais usados em farmácia e cosmética [Carretero, 2002].

Argila é um material natural, com textura terrosa e baixa granulometria, que quando misturado a uma quantidade limitada de água desenvolve plasticidade [Aguiar, 2002]. Numa definição menos genérica, argila é uma rocha que é constituída basicamente por um grupo de minerais que recebe o nome de argilominerais.

Majoritariamente, argilominerais são silicatos de alumínio (Al), ferro (Fe) ou magnésio (Mg) hidratados que possuem estrutura cristalina em camadas e são chamados também de filossilicatos, constituídos por folhas contínuas de tetraedros de silício (SiO_4), ordenados de forma hexagonal. Entre as camadas tetraédricas, há camadas octaédricas de Mg (ou Al, Fe), (COELHO, 2007).

Conforme a morfologia classificam-se as argilas em: argilas lamelares e fibrosas. A sepiolita e a atapulgita são os únicos argilominerais que fazem parte do último grupo, que possuem como características o aspecto fibroso e estrutura de canais que se prolongam pela fibra. Essas argilas apresentam grande área superficial e muitos sítios de adsorção [Aguiar, 2002].

2.6 - Sepiolita

Sepiolita é um argilosilicato de magnésio hidratado e com fórmula geral $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$. Seu aspecto fibroso revela uma estrutura baseada na alternância de blocos e túneis (padrão zeolítico – Figura 2.6) que crescem na direção da fibra. Cada bloco estrutural é composto de duas camadas tetraédricas de sílica e uma camada octaédrica central contendo magnésio. Devido à descontinuidade da camada externa de sílica, um significativo número de grupos silanol (Si-OH) está presente na superfície desta argila. A partir deste perfil, a inserção de nanopartículas como a sepiolita em hidrogéis poliméricos pode levar a uma ampla gama de possibilidades para o controle da natureza do inchamento e da capacidade de liberação controlada de fármaco, aliada a uma melhoria nas propriedades mecânicas e viscoelásticas [Carrado, 1996; Yu, 2003; Paranhos, 2007].

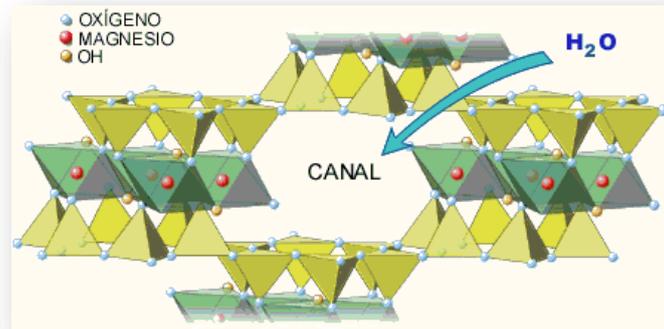


FIGURA 2.6: Estrutura da sepiolita [Sepiolita, 2015].

Sua morfologia acicular gera uma área superficial com cerca de 380 m², muito maior do que a observada para silicatos lamelares como a montmorilonita (80 m²). Isto faz com que a argila tenha uma elevada dispersão na matriz polimérica, produzindo um reticulado tridimensional que ocupa todo o líquido gerando interessantes propriedades [Paranhos, 2009].

A sepiolita possui a capacidade de sorver espécies orgânicas devido à variedade de propriedades atrativas que possui como, por exemplo, elevada área de superfície específica, porosidade e superfície ativa. A presença de canais na estrutura da sepiolita propicia a sorção e dessorção de diferentes tipos de materiais. Seu uso decorre dessas e de outras características [Luz, 2005; Alkan, 2009].

Dispersões aumentam a qualidade da argila e viabilizam a sua utilização em materiais sofisticados, inclusive como reforço em hidrogéis para aplicação como biomaterial [Killeen, 2012].

2.7 - Hidrogéis nanocompósitos para liberação controlada

Hidrogéis de liberação controlada ou sistemas de liberação controlada são destinados a oferecer o fármaco ou o composto de interesse durante um tempo específico predeterminado no organismo para atender às necessidades terapêuticas específicas. Os hidrogéis, entre os diferentes sistemas de liberação controlada explorados até agora, tem propriedades que os tornam específicos para serem considerados potencialmente como um dos sistemas de liberações ideais no

futuro [Kikuchi, 2002]. Os sistemas de administração à base de hidrogel podem ser divididos em duas categorias principais: sistemas controlados por tempo e sistemas de liberação induzidos/estimulados. Este último é desenvolvido para entregar seu conteúdo em resposta a uma condição, de forma que coincida desejavelmente com as necessidades fisiológicas no momento e lugar adequados [Lin, 2006].

Apesar da enorme atração centrada nesses novos sistemas com base nos hidrogéis no passado e atualmente, esses sistemas possuem algumas desvantagens. A desvantagem mais importante é o seu tempo de resposta significativamente lento. Para atingir um tempo de resposta mais rápido grupos de pesquisa estão desenvolvendo hidrogéis mais finos e menores que, por sua vez, provocam a fragilidade e perda de resistência mecânica na rede polimérica [Qiu, 2001].

Os hidrogéis sensíveis aos estímulos do ambiente também são conhecidos como sistemas 'inteligentes' e podem ser sub-classificados em: sistemas de liberação induzidas fisicamente; sistemas de liberação induzidas quimicamente e sistemas de liberação induzidas por estímulos. Temperatura, electricidade, luz, pressão, som, e campo magnético estão entre os estímulos físicos de interesse, enquanto que o pH, composição do solvente, íons e eventos específicos de reconhecimento molecular são estímulos químicos relatados até agora. Hidrogéis termossensíveis tem ganhado considerável atenção devido à sua capacidade de inchamento-desinchamento em resposta às mudanças de temperatura ambiente [Kikuchi, 2002; Miyata, 2002; Bromberg, 1998; Dinarvand, 1995].

Uma série de estudos farmacêuticos sobre a aplicação destes hidrogéis tem mostrado resultados promissores. Por outro lado, os sistemas de hidrogel quimicamente induzidos propõem diversas classes de hidrogéis que podem desencadear a liberação do fármaco a partir de um depósito no que diz respeito a alterações na concentração de uma molécula específica, ou composto bioactivo nos meios circundantes [Ishihara, 2003].

2.8 - Processos de inchamento dos hidrogéis

O processo de difusão da água dentro dos hidrogéis é descrito pela Equação 2.1, que permite calcular a permeabilidade através de uma seção com uma concentração determinada, também serve como base para a estimativa de como o sistema muda com o tempo como resultado de fluxo assim como para determinados fenômenos que regem o transporte de água através da rede do hidrogel. É importante salientar que esta equação é válida para descrever o processo de transporte de água nos hidrogéis para frações menores do que 60% de água contida nos mesmos, visto que para grandes inchamentos a espessura da membrana não permanece constante, assim a expressão não se ajusta à realidade [Vera, 2012].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K \cdot t^n \quad (2.1)$$

onde M_t/M_∞ é a fração de água no hidrogel, K é uma constante que incorpora as características da rede em questão, t é o tempo e n é o parâmetro de difusividade. Neste sentido, um valor de $n = 0,50$ indica um mecanismo de difusão Fickiana, um valor entre $0,50 < n < 1$ indica uma difusão não Fickiana e quando $n = 1$ tem-se um caso especial onde a difusão tem o nome de “Tipo II”. Basicamente, quando se observa um transporte de natureza Fickiana, há um efeito de relaxação das cadeias que ocorre mais rapidamente do que na difusão em si, enquanto que quando o transporte apresenta um comportamento não Fickiano, existe uma superposição entre a relaxação (convecção) e a difusão e o sistema apresenta um sistema de transporte complexo formado por esses dois processos. Isto é, na difusão Fickiana, a velocidade de difusão da água mostra um incremento linear em função da raiz quadrada do tempo, já no transporte não Fickiano o tempo de difusão e o tempo de relaxação macromolecular são similares e ambos os fenômenos controlam a taxa de penetração e sorção. Ao mesmo tempo, no caso limite, denominado tipo II, há um predomínio da relaxação.

A quantidade de água retida dentro do hidrogel no equilíbrio pode ser expressa através da porcentagem de hidratação ou Índice de inchamento (Equação 2.2).

$$S (\%) = \frac{M_t - M_0}{M_0} \cdot 100 \quad (2.2)$$

onde S é a porcentagem de hidratação ou índice de inchamento, M_t é o peso da membrana inchada e M_0 o peso da membrana seca. É importante ressaltar que S pode alcançar valores muito acima de 100%.

O estudo da água presente nos hidrogéis é importante, pois pode determinar a permeação total de nutrientes no hidrogel. A água atua como meio de transporte na matriz polimérica para as espécies dissolvidas, como o oxigênio. Desta maneira a água presente nos hidrogéis pode existir de forma livre ou associada. Quando a membrana seca começa a absorver água, as primeiras moléculas que entram na matriz irão hidratar os grupos hidroxila (-OH) presentes na cadeia polimérica. Esta primeira camada de água que interage intimamente com o polímero é chamada água primária e perde suas características físico-químicas. Quando as hidroxilas estão completamente hidratadas, as moléculas de água que continuam difundindo pelo polímero interagem com as moléculas de água primária e formam uma segunda camada de água, chamada água secundária. As águas primária e secundária combinadas são chamadas de “água total”. A água adicional que é absorvida depois da “água total” é chamada “água livre”. A difusão de soluto através do hidrogel e o mecanismo de adsorção/absorção são determinados pela quantidade de água no hidrogel, a fração volumétrica de água e a “água total” versus “volume livre”. A água primária não cristaliza mesmo a temperaturas de -100°C ; a água secundária cristaliza a temperaturas abaixo de 0°C , enquanto a água livre cristaliza a 0°C . O comportamento anômalo da água nos materiais poliméricos é atribuído ao efeito de condensação capilar, confinamento de clusters de água nas cadeias poliméricas ou à grande interação entre as moléculas de água e os grupos hidrofílicos do polímero [Ping, 2001].

O estado que se encontra a água no hidrogel é fundamental, pois um aumento na proporção de água livre piora sua resistência mecânica, já que a água se comporta como um plastificante diminuindo a temperatura de transição vítrea do material.

A importância do estado da água na prática para a liberação controlada está relacionada com o transporte. A água primária não poderá contribuir muito para

a solvatação das espécies que difundem pelo hidrogel, já a água livre facilita esse transporte.

2.9 - Sistemas de difusão em membranas poliméricas

Em sistemas de difusão em membranas, a liberação do fármaco é controlada pelo transporte da droga através da membrana. Este transporte é dependente da difusividade do fármaco pela membrana e da espessura da membrana, de acordo com a lei de Fick. Estes sistemas são aplicados em pílulas, implantes e adesivos transdérmicos. A liberação se dá devido à diferença de concentração entre o sistema e a pele ou outras forças motrizes. Tecnologias desenvolvidas para liberação passiva de medicamentos podem ser classificadas em duas categorias: membranas ou reservatórios e matrizes poliméricas.

2.9.1 - Membranas ou reservatórios

O fármaco é incorporado em um reservatório localizado entre uma membrana e uma camada impermeável, Figura 2.7a. A liberação pode ser controlada variando a composição do reservatório, a permeação da droga através da membrana ou pela camada adesiva contida na membrana para fixá-la à pele.

2.9.2 - Matriz polimérica

O fármaco é incorporado em uma matriz polimérica que entra em contato com a pele e, dependendo do polímero, uma camada adesiva se faz necessária ou não.

O fármaco é liberado pela diferença de concentração entre a membrana ($C_{D,res}$) e a pele ($C_{D,skin}$) e pode ser descrito pela lei de Fick (Equação 2.3).

$$J_D^{PD} = \frac{k_D D_D (C_{D,res} - C_{D,skin})}{l} \quad (2.3)$$

onde J_D^{PD} é o fluxo de fármaco através da pele, k_D é o coeficiente de partição do fármaco na pele, D_D é o coeficiente de difusão do fármaco através da pele e l é a espessura da pele.

Quando a concentração no reservatório é muito maior do que a concentração na pele, a Equação 2.3 pode ser escrita como a Equação 2.4.

$$J_D^{PD} = \frac{k_D D_D C_{D,res}}{l} = k_D^{PD} C_{D,res} \quad (2.4)$$

onde k_D^{PD} é o coeficiente de permeabilidade do fármaco através da pele. Fármacos com alto coeficiente de partição através da pele e alto coeficiente de difusão são os melhores candidatos a sistemas de liberação controlada [Stamatialis, 2008].

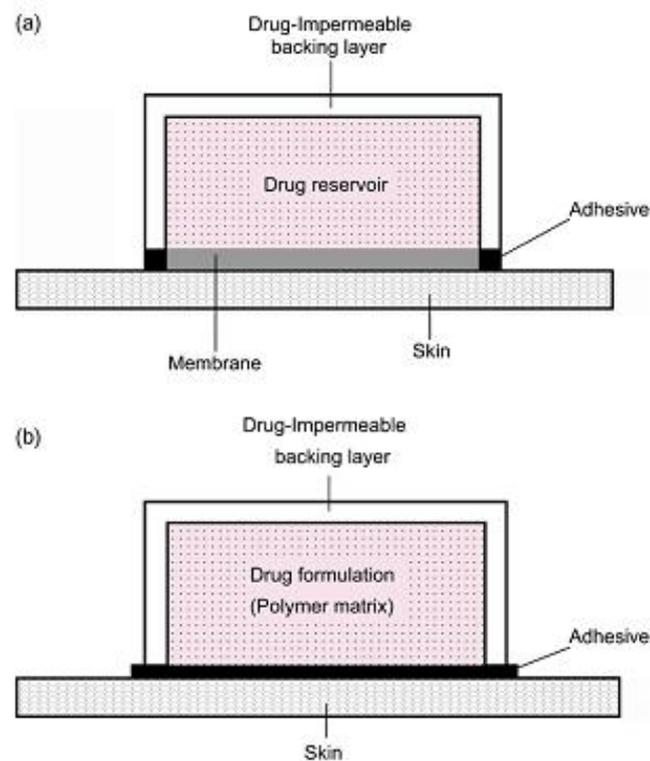


FIGURA 2.7: Ilustrações de sistemas de liberação controlada: (a) membranas; (b) matriz polimérica [Stamatialis, 2008].

2.10 - Sistemas de liberação de fármaco

Sistemas de liberação de fármaco foram desenvolvidos para prolongar o tempo de liberação do medicamento no organismo, sustentar sua concentração plasmática e controlar a localização das moléculas in vivo por meio de aplicação de princípios químicos e biológicos. Assim a disponibilidade biológica do fármaco é aumentada e as alterações cíclicas na concentração são eliminadas (Figura 2.8) [Villanova, 2010].

Os sistemas transdérmicos, conhecidos como *patches*, têm como objetivo proporcionar uma liberação prolongada do fármaco no sentido de manter concentrações plasmáticas constantes ao longo do tempo. Sistemas de administração convencionais, como as pílulas, apresentam um aumento na concentração do fármaco, logo após a administração do mesmo, atingem um pico máximo de dosagem no sangue e depois declinam, conforme o tempo de ação do medicamento, como mostrado na Figura 2.8. Com a liberação controlada tem-se uma constante liberação durante quase todo o tempo de ação do fármaco. Dentre as vantagens do sistema de liberação controlada, tem-se:

- A absorção contínua do fármaco no organismo pode garantir que a concentração do fármaco em um determinado tecido ou órgão se mantenha acima do valor mínimo da concentração necessária para a devida resposta terapêutica e abaixo do limiar de toxicidade do fármaco, evitando-se desta forma o surgimento de efeitos colaterais;
- Liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz, aumentando assim a eficácia terapêutica;
- A menor frequência de administração de doses leva a uma menor possibilidade de esquecimento da dose pelo paciente. Isto revela uma melhoria na qualidade de vida de pacientes sob medicação diária e no controle de doenças crônicas;
- Com a frequência menor de doses em relação aos tratamentos convencionais, associados ao consequente benefício terapêutico ampliado com a redução de efeitos colaterais e a diminuição do tempo gasto pelos profissionais de saúde no atendimento, administração e monitoramento de pacientes, o custo médio de tratamentos por períodos prolongados na rede de saúde pública é bem menor em relação às formas farmacêuticas tradicionais.

- Administração segura com ausência de reações inflamatórias locais e um menor número de doses;

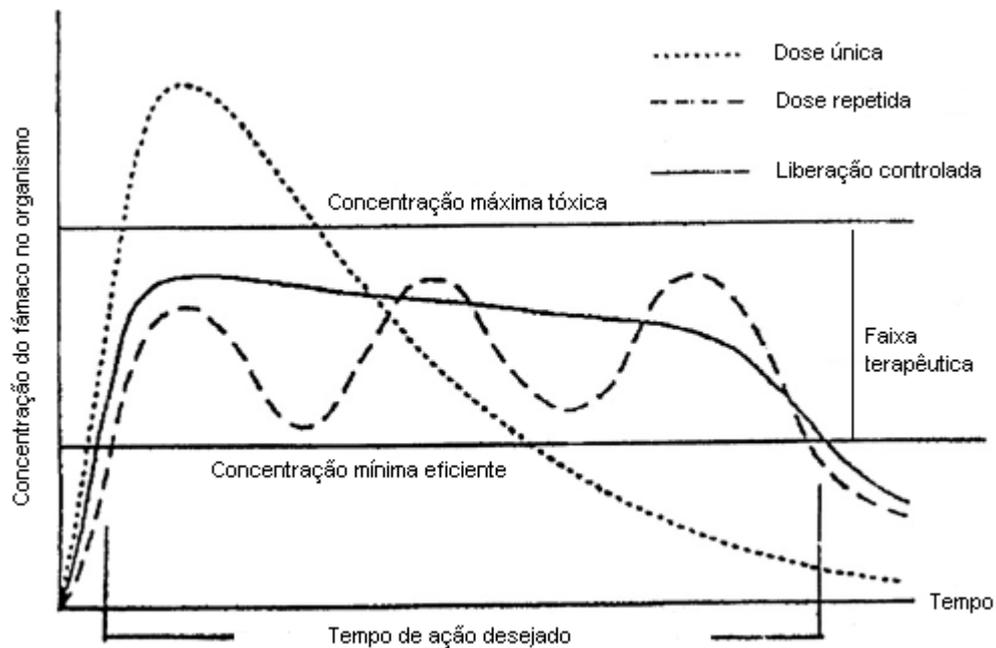


FIGURA 2.8: Esquema ilustrativo da liberação de fármacos [Bajpai, 2008].

Além disso, podem reduzir a toxicidade do fármaco, eliminar as reações adversas e diminuir o número de doses administradas. Segundo Villanova, polímeros são empregados como excipientes em preparações convencionais de medicamentos e cosméticos. Excipiente é qualquer substância, diferente do fármaco, que tem sua segurança avaliada e, a partir de então, pode ser incluída na forma farmacêutica, auxiliando na preparação, fornecendo estabilidade física, química e microbiológica ao produto, melhorando a disponibilidade do ativo no organismo, garantindo a aceitabilidade do paciente e promovendo qualquer outro atributo relacionado à segurança e efetividade do produto [Villanova, 2010].

2.11- Adesivos dérmicos e transdérmicos

Atualmente, os adesivos dérmicos e transdérmicos são um sistema bem aceito como forma de conseguir a liberação de medicamentos para o sistema circulatório através da pele, sendo utilizados na medicina convencional para tratar

hipertensão, angina pectoris, síndrome do climatério, distúrbios de movimento, dores crônicas, dependência a nicotina, entre outros [Serafim, 2013].

Existem várias formas de elaborar medicamentos dérmicos/transdérmicos. Estes podem se apresentar como adesivos, lipossomas, microemulsões e até sistemas de microagulhas.

Uma interessante alternativa à terapia quimioterápica da LTA é a utilização de adesivos (*patches*) dérmicos. Em comparação ao tratamento convencional invasivo, os adesivos dérmicos podem apresentar vantagens como:

- Não há a perda da biodisponibilidade em função do metabolismo hepático;
- Diminuição do número de doses em um tratamento de vários dias;
- Manutenção de um nível constante de concentração plasmática do fármaco, reduzindo significativamente o risco de sub ou superdosagem;
- Possibilidade de cessar o tratamento imediatamente em caso de efeitos colaterais;
- Facilidade de tratamento no caso de pacientes inconscientes ou comatosos;
- Alternativa para pacientes incapazes de serem medicados por via intravenosa ou parenteral
- Como é um método indolor pode ser aplicado pelo próprio paciente, evitando traumas associados à terapia parental;
- Rota alternativa para medicamentos que podem causar irritação gastrointestinal ou sangramentos ao serem consumidos via oral.

Mas também pode apresentar algumas desvantagens, tais como:

- Nem todas as substâncias são passíveis de administração pela via dérmica/transdérmica;
- Pode causar irritação cutânea em aplicações a médio e longo prazo;
- Em alguns casos a metabolização pelas enzimas da pele evita que o medicamento alcance a região vascularizada;
- Quando comparadas com injetáveis as doses de medicamentos liberadas são quantitativamente menores.

Assim é válido avaliar as formas de administração transdérmica como uma possível alternativa para a terapêutica de doenças, de modo a ampliar as opções e acessibilidade aos medicamentos.

2.12 - Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), também conhecida como Leishmaniose Cutânea (LC), é uma doença infecto-parasitária, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que acomete pele e/ou mucosas. É transmitida pela picada de insetos vetores dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*. A maioria das infecções ocorre como zoonoses entre animais silvestres, geralmente roedores, sendo o homem um hospedeiro acidental. Os ciclos de transmissão, no entanto, estão se adaptando às regiões urbanas e se espalhando para áreas não endêmicas, sendo recorrente a inserção de cães como centro da zoonose [Desjeux, 2001; Gontijo, 2003]. Estudos de 2010, desenvolvidos pela Organização Mundial da Saúde, apontam que a estimativa anual de incidência de Leishmaniose no mundo é de 1,5 milhão de casos de LTA e 500.000 casos de Leishmaniose Visceral [Salah, 2013].

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* causadoras de LTA pertencem a dois subgêneros: (1) *Viannia*, representado, principalmente, pelas espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*, associadas com lesões cutâneas localizadas, disseminadas ou mucocutâneas e (2) *Leishmania*, representado pela espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, associada com o desenvolvimento de lesões cutâneas localizadas com a forma difusa da LTA (Figura 2.9). Dentre estas espécies, *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a mais prevalente no nosso meio e cerca de 1 a 10% dos pacientes acometidos apresentam a forma clínica mucosa ou mucocutânea [Ashford, 2000; Gontijo, 2003; Machado – Coelho, 2005; Ministério da Saúde, 2007].



FIGURA 2.9: Lesões de 30 dias de evolução de LTA [Sociedade Brasileira de Medicina Tropical].

Juntamente a tuberculose, malária, esquistossomose, doença de Chagas e a febre amarela, a leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença negligenciada, ou seja, faz parte de um conjunto de doenças tropicais endêmicas entre as populações pobres da América Latina, África e Ásia e que não é alvo de grandes investimentos para controle/prevenção e erradicação [WHO, 2009].

No Brasil, o Ministério da Saúde notifica anualmente cerca de 30.000 novos casos, sendo a maioria destes registrados nas regiões norte e nordeste, Figuras 2.10 e 2.11, confirmando geograficamente a inserção da leishmaniose como doença negligenciada histórica no país.

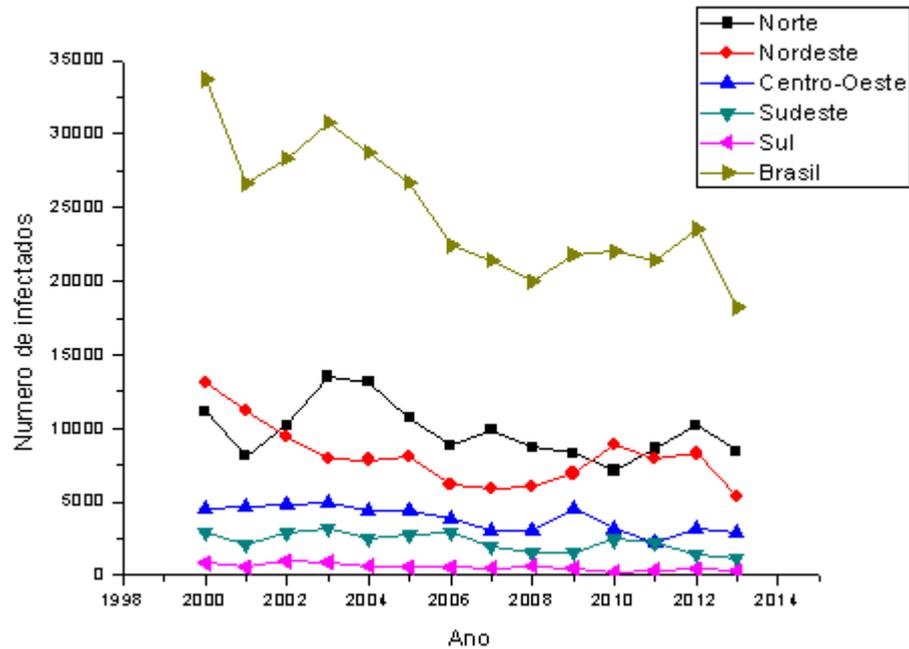


FIGURA 2.10: Número de casos registrados no Brasil entre 1998 e 2013 [Situação epidemiológica – dados].

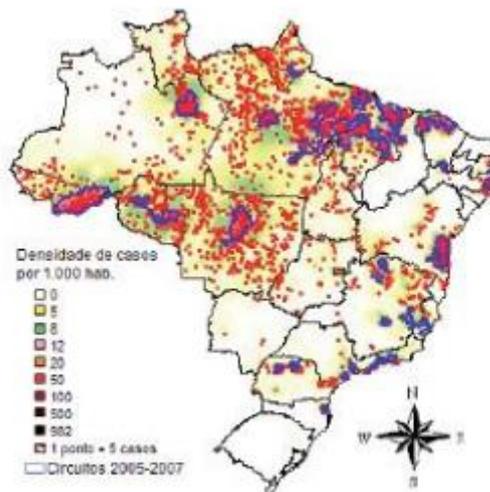


FIGURA 2.11: Mapa de distribuição de casos de LTA registrados entre 2005 e 2007 [SVS/MS, 2010].

A utilização de sistemas poliméricos visando à terapêutica de Leishmaniose ainda encontra-se em um momento inicial. Poucas investigações na literatura detalham o desenvolvimento de *patches* poliméricos para uso externo a

partir da liberação dos principais fármacos desta terapêutica. Em um estudo feito em 2010, López-Jaramillo e colaboradores compararam a liberação de óxido nítrico por *patches* nas feridas de leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina aplicado por meio intramuscular. O estudo comprovou a diminuição das feridas e a significativa diminuição dos efeitos colaterais nas pessoas tratadas com os *patches* [López-Jaramillo, 2010]. Oliveira produziu *patches* de hidrogéis de PVA reticulados através de processo de radiação ionizante e contendo Glucantime[®], os quais submeteu a testes *in vivo* e comprovou a cura clínica para as lesões cutâneas provocadas por *Leishmania amazonensis* [Oliveira, 2013].

Desta forma, entende-se que o desenvolvimento de *patches* poliméricos para terapêutica de leishmaniose é uma oportunidade científica a ser considerada.

2.13 - Terapêutica da Leishmaniose Cutânea

A terapêutica da LTA consiste na aplicação intravenosa ou parenteral de compostos antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como o estibogluconato de sódio (Figura 2.12) e o antimoniato de N-metil glucamina (AM) (Figura 2.13) [Phillips, 2006].

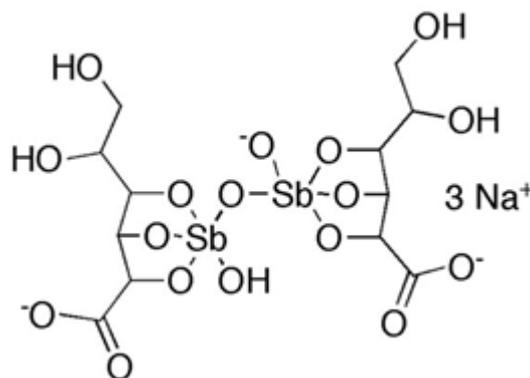


FIGURA 2.12: Fórmula estrutural do estibogluconato de sódio [Barret, 2012].

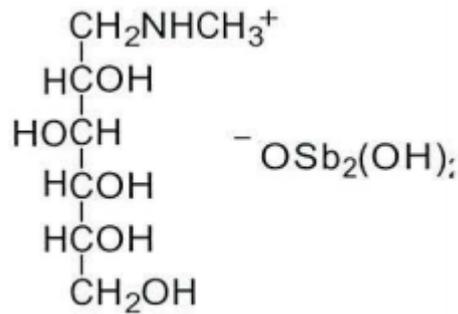


FIGURA 2.13: Fórmula estrutural do Antimoniato de N-metilglucamina – Glucantime® [Fraga, 2007].

Apesar de estes quimioterápicos terem sido introduzidos na terapêutica da leishmaniose desde 1915, houve poucos avanços no desenvolvimento de novos fármacos. É internacionalmente reconhecido que os compostos antimoniais pentavalentes apresentam cardiotoxicidade (afetam os músculos do miocárdio), hepatotoxicidade (aumentam o nível das transaminases) e a prolongada duração do tratamento leva ao abandono prematuro por parte dos pacientes, fato que favorece o aparecimento de cepas resistentes [Deps, 2000; FIOCRUZ, 1997]. Logo, quimioterápicos com baixo índice terapêutico e alta toxicidade são quadros comuns associados à terapêutica de doenças negligenciadas.

Deste modo, muitos tratamentos sistêmicos (internos) e tópicos (locais) vem sendo utilizados para o tratamento da LTA. Como tratamento alternativo, a terapia local tem grande valor, pois sua administração é simples, segura e com poucos efeitos colaterais. Sulfato de paromomicina (PA) (Figura 2.14), um antibiótico aminoglicosídeo extraído de culturas do *Streptomyces rimosus*, tem demonstrado uma alta atividade contra *Leishmania major* [Barret, 2012].

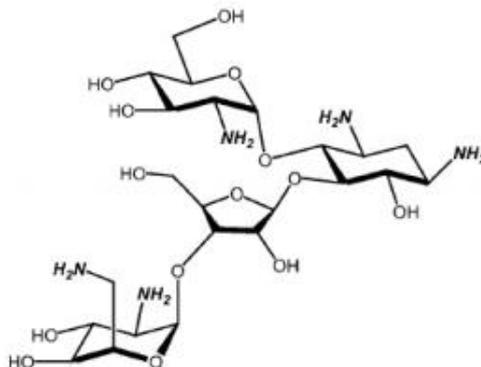


FIGURA 2.14: Fórmula estrutural da paromomicina [Barret, 2012].

Seu mecanismo de ação consiste na inibição de síntese protéica, através de ligação às proteínas ribossômicas induzindo a leitura equivocada do mRNA. Desta forma, interfere no complexo de formação de peptídeos e causa a ruptura dos polissomos em monossomos não funcionais [Barret, 2012]. Possui solubilidade máxima de 50 mg mL⁻¹ em água e é estável até 120 °C [Sigma-aldrich, 2004].

Em estudos *in vitro* realizados em pele excisada de camundongos glabros a permeação de PA foi cerca de 30 vezes maior a partir de formulações hidrofílicas (creme ou gel) quando comparada com uma pomada. Estudos em animais infectados com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* demonstraram que a formulação hidrofílica de PA tópica, quando comparada com AM administrado por via sistêmica, obteve resultados satisfatórios. Uma consideração importante a ser levada em conta é a condição da pele afetada pela doença. Formulações tópicas devem ser aplicadas em lesões abertas, que perderam a pele, ou em lesões mais espessas, que apresentam uma barreira para a absorção do medicamento [Gomes, 2004; Soares-Bezerra, 2004; Santos, 2008].

Em uma abordagem recente, a Organização Mundial da Saúde (WHO) e outros especialistas ditam que primeiro deve ser feito o tratamento local da LTA e somente se este não for efetivo o tratamento sistêmico deve ser utilizado. Este procedimento minimiza o risco de efeitos colaterais severos, aumenta a adesão, facilita e reduz os custos do tratamento enquanto preserva sua eficácia. [Sosa, 2013]. Em estudos mais recentes, Matin mostra que o uso tópico da paromomicina deve ser considerado eficaz e tolerável como um tratamento de primeira linha para crianças com LTA. [Matin, 2015].

3 - Materiais e métodos

3.1 - Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes estão listados em ordem alfabética. Todos apresentam grau de pureza PA e foram utilizados como recebidos.

Ácido bórico – Merck

Ácido cítrico – Merck

Ácido clorídrico – Synth

Ágar Müller Hinton – Oxoid

Água deionizada – Springway

Albumina bovina sérica – Aldrich

Álcool etílico – Synth

Azida sódica – Spectrum Inc.

Bicarbonato de sódio – Aldrich

Caldo triptona de soja – Oxoid

Citrato de sódio dihidratado – Aldrich

Cloreto de cálcio – Aldrich

Cloreto de magnésio hexahidratado – Merck

Cloreto de potássio – Aldrich

Cloreto de sódio – Vetec

Dextrose – Merck

Fosfato de potássio dibásico – Aldrich

Fosfato de sódio monobásico – Aldrich

Iodeto de potássio – Merck

Iodo – Merck

Poli (álcool vinílico) – PVA – Aldrich – $M_w = 104.000 \text{ g mol}^{-1}$, grau de hidrólise > 99%

Sepiolita – Fluka

Solução salina (0,9% p/v NaCl) – Arboreto

Sulfato de paromomicina – Biovet

Sulfato de sódio – Aldrich

Tris(hidroximetil)-aminometano – Vetec

1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno – Aldrich

3.2 - Equipamentos

Além das vidrarias normalmente utilizadas em laboratório foram utilizados os seguintes equipamentos:

Agitador mecânico – Nova Ética

Agitador magnético – Ika c – Mag HS4

Analisador termogravimétrico (TGA) – NETZSCH T G, modelo 209 F3 Tarsus

Balança analítica – Ohaus analytical plus com cinco casas decimais

Banho termostatizado – Marconi

Calorímetro diferencial exploratório (DSC) – NETZSCH DSC, modelo 200 F3 Maia

Difratômetro de raios-X – Shimadzu, modelo XRD – 6000

Espectrômetro de ultravioleta-visível (UV/Vis) – Agilent Cary Varian 50

Freezer – Consul

Geladeira – Electrolux

Microscópio eletrônico de varredura (MEV) – F50 Inspect

pHmetro – Ion pHB 500

Pipeta automática – Discovery comfort – 50 μL ; Digilar – 100 a 1000 μL e 20 a 200 μL ; Kacil – 200 μL

Tubo BD vacutainer K2 EDTA

Ultrassom – Thornton T14

3.3 - Metodologia

3.3.1 - Caracterização dos hidrogéis

3.3.1.1 - Preparo dos hidrogéis de PVA – sepiolita

Em um frasco reagente da marca Schott de 50 mL foram aquecidos, a 90°C, 5,0 gramas de PVA e 50 mL de água deionizada, com o auxílio de uma placa de aquecimento e agitação, até que o polímero solubilizasse (cerca de 1 hora). Aproximadamente 0,001 gramas de azida sódica foram utilizados como antifúngico. Em um Becker as quantidades necessárias para preparação de hidrogéis com 1%, 2,5% e 5% (v/v) de teor de sepiolita foram dispersas em 25 mL de água deionizada e colocadas no ultrassom por 20 minutos. Após isso, a suspensão foi adicionada à solução contendo o polímero. Com o auxílio de uma proveta graduada, 3 mL da mistura foi vertida em placas de petri com 6 cm de diâmetro e colocadas no freezer a -20°C por 17 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas a ciclos de congelamento/descongelamento para formação de hidrogéis com diferentes graus de cristalinidade. Em cada ciclo as amostras eram submetidas à temperatura ambiente por uma hora seguida de uma hora à -20°C e em seguida eram mantidas em dessecador com sílica gel até apresentarem massa constante, cerca de quatro dias.

3.3.1.2 - Medidas de inchamento

Amostras de 1 x 1 cm foram imersas em 25 mL de fluido biológico simulado (SBF), mantidas a 22 °C e pesadas a cada 20 minutos na primeira hora, a cada hora durante seis horas e após 24 horas do início do experimento. Todas as

análises foram feitas em triplicata. O protocolo para a produção do SBF foi o descrito por Kokubo [Kokubo, 1990]: em um Becker previamente lavado, foram adicionados 500 mL de água deionizada e os reagentes descritos na Tabela 3.1, um por um na sequência dada, sempre aguardando a completa dissolução de cada reagente e sob agitação constante.

TABELA 3.1: Reagentes para o preparo do SBF [Kokubo, 1991].

Ordem	Reagente	Quantidade
1	NaCl	7,996 g
2	NaHCO ₃	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,228 g
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,305 g
6	HCl 1 mol L ⁻¹	40 mL (cerca de 90% da quantidade total a ser adicionada)
7	CaCl ₂	0,278 g
8	Na ₂ CO ₄	0,071 g
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6,057 g

Ajustou-se a temperatura da solução para 36,5 °C com a ajuda de um banho termostatizado e seu pH pode ser ajustado para 7,35 com a solução de HCl 1 molL⁻¹. A solução final foi transferida para um balão volumétrico e o volume foi ajustado para 1 L com água deionizada. Essa solução foi colocada em uma garrafa de polietileno e mantida a 5 °C. A Tabela 3.2 mostra a concentração iônica do SBF produzido e a do plasma sanguíneo humano.

TABELA 3.2: Concentração iônica (mmol L^{-1}) de SBF e plasma sanguíneo humano [Kokubo, 1991].

Íon	Fluido Simulado	Plasma sanguíneo
Na^+	142,0	142,0
K^+	5,0	5,0
Mg^{2+}	1,5	1,5
Ca_2^+	2,5	2,5
Cl^-	147,8	103,0
HCO_3^-	4,2	27,0
HPO_4^{2-}	1,0	1,0
SO_4^{2-}	0,5	0,5

A razão de inchamento das amostras foi determinada através da Equação 3.1:

$$\text{Razão de inchamento} = \frac{m_t - m_s}{m_s} \quad (3.1)$$

onde m_t é a massa da amostra no tempo t e m_s é a massa da amostra seca. Para avaliar o mecanismo de difusão do SBF nas membranas, foi utilizada a Equação 3.2 [Crank, 1975]

$$\frac{m_t}{m_{eq}} = K t^n \quad (3.2)$$

onde m_t é a massa da amostra inchada no tempo t , m_{eq} é a massa da amostra inchada no equilíbrio, K é uma constante relacionada à geometria da amostra e n o expoente que define o mecanismo de sorção. Quatro classes de difusão podem ser descritas a partir do valor de n obtido, de acordo com as taxas relativas de difusão do permeante e da relaxação das cadeias poliméricas [Crank, 1975].

- I. Difusão Fickiana ou Caso I ($n \leq 0,5$): no qual a taxa de difusão é muito menor do que a de relaxação. Neste caso, a difusão é controlada por um processo difusivo;
- II. Caso II ($n = 1,0$) é o outro extremo, no qual o processo de difusão é muito mais rápido quando comparado à relaxação das cadeias poliméricas;

- III. Anômalo ou Não-Fickiana ($n = 0,5 - 1,0$), que descreve os casos onde as taxas de difusão e de relaxação são comparáveis;
- IV. Super Caso II ($n > 1$), que define um complexo processo de relaxação que ocorre na interface entre regiões inchadas e não inchadas no interior da matriz polimérica.

Para a determinação do coeficiente de difusão da água, utilizou-se a Equação 3.3 [Crank, 1975]:

$$\frac{m_t}{m_{eq}} = \left(\frac{4D}{\pi l^2} \right)^{1/2} t^{1/2} \quad (3.3)$$

onde D é o coeficiente de difusão e l é a espessura da amostra. O desvio experimental aceitável foi fixado em 5 %.

3.3.1.3 - Capacidade de retenção polimérica

Após ficarem imersas em 25 mL de SBF por 24 horas, as amostras foram retiradas das soluções e foram tratadas segundo o seguinte protocolo: para cada 1 mL de solução foram adicionados 15 mL de água deionizada, 7,5 mL de ácido bórico (40 g L^{-1}) e 1,5 mL de solução KI/I_2 ($12,7 \text{ g L}^{-1}$ e $25 \text{ g L}^{-1} \text{ I}_2$). A presença de PVA foi analisada em 690 nm em espectrofotômetro de UV-Vis.

3.3.1.4 - Calorimetria diferencial exploratória – DSC

As Análises de DSC para analisar o grau de cristalinidade, entalpias de vaporização da água e da fusão cristalina (ΔH_v e ΔH_m , respectivamente), as temperaturas de vaporização da água (T_v), de fusão dos cristais (T_m) e de transição vítrea (T_g) das diferentes membranas produzidas foram feitas em um equipamento NETZSCH DSC 200 F3 Maia. As amostras foram cortadas do centro de cada membrana com aproximadamente 5 mg. Para a determinação da T_v , ΔH_v , T_m e ΔH_m , as amostras foram aquecidas de 20 a 250 °C com uma taxa de 20 °C/min. Em seguida, foi feito um resfriamento até temperatura ambiente e novamente um

aquecimento até 250 °C para se determinar a T_g . As T_m e T_v foram tomadas como os máximos dos picos endotérmicos e as entalpias como as áreas dos respectivos picos. A transição vítrea foi calculada pelo método da meia altura dos prolongamentos das linhas tangentes à curva antes e após a transição.

3.3.1.5 - Análise termogravimétrica – TGA

Cerca de 10 mg da amostra foi cortada do centro da membrana e analisada em um equipamento TG 209 F3 Tarsus, sob fluxo contínuo de N_2 , em uma faixa de temperatura de 40 à 600 °C a uma taxa de aquecimento de 20 °C min^{-1} . Assim foram obtidos os perfis de degradação térmica de cada amostra.

3.3.1.6 - Determinação do estado da água

Para a análise do estado na água nas membranas, foi utilizado o equipamento NETZSCH DSC 200 F3 Maia. As amostras previamente cortadas foram inchadas em água destilada a 21 °C por 24 horas. Cerca de 100 mg das amostras foram utilizadas em cada análise. As amostras foram resfriadas da temperatura ambiente até -60 °C a uma taxa de 5°C min^{-1} , permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. Após isso, foram aquecidas até 30 °C a uma taxa de 5 °C min^{-1} .

O estado da água foi avaliado a partir da Equação 3.4.

$$W_b = W_t - \frac{\Delta H_{endo}}{\Delta H_f} \quad (3.4)$$

onde W_b e W_t são o teor de água secundária e a razão de inchamento, respectivamente, ΔH_{endo} é a entalpia de fusão dos hidrogéis inchados e ΔH_f é a entalpia de fusão da água (372,3 J g^{-1}).

3.3.1.7 - Difração de raios-X – DRX

As análises de DRX para as amostras de hidrogel foram obtidas à temperatura ambiente, empregando radiação de cobre/potássio de $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, a partir do cristal de grafite operando a 30 kV e 30 mA. As varreduras foram executadas em uma faixa de $3^\circ - 40^\circ (2\theta)$ com taxa de 2° min^{-1} , na intenção de se averiguar a rede cristalina formada.

3.3.2 - Hemocompatibilidade

Para a avaliação da hemocompatibilidade das membranas, as amostras foram submetidas a testes feitos com sangue bovino doado pelo Frigorífico Siltomac e pela Embrapa Pecuária Sudeste. O sangue coletado foi misturado com solução de anticoagulante na razão de 19 mL de anticoagulante para 30 mL de sangue. A Tabela 3.3 mostra a composição do anticoagulante utilizado.

TABELA 3.3: Composição do anticoagulante [Paranhos, 2007].

Componente	Quantidade (g)	
Citrato de sódio dihidratado	1,315	
Ácido cítrico	0,165	Para 50 mL de água deionizada
Fosfato de sódio monobásico	0,110	
Dextrose	1,595	

3.3.2.1 - Capacidade de hemólise

As amostras foram inchadas em solução salina (0,9% p/v NaCl) a 30° C por 24 horas. Em seguida a membrana foi transferida para placa de poços. Com o auxílio de uma pipeta automática foram adicionados 0,20 mL de sangue na superfície da amostra. Após 20 minutos foram adicionados 3,0 mL de solução salina para interromper a hemólise. Controles negativo e positivo foram obtidos através da

adição de 0,20 mL de sangue em 3,0 mL de solução salina e água deionizada, respectivamente. Alíquotas de 1,0 mL do sobrenadante foram retiradas e analisadas em espectrofotômetro de UV-vis a 545 nm. O grau de hemólise foi calculado através da Equação 3.6.

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_{\text{amostra}} - A_{(-)}}{A_{(+)} - A_{(-)}} \quad (3.6)$$

onde A_{amostra} , $A_{(-)}$ e $A_{(+)}$ são as absorbâncias obtidas pela amostra, o controle negativo e o controle positivo, respectivamente.

3.3.2.2 - Potencial anti-trombogênico

O potencial anti-trombogênico foi avaliado pela formação de trombos na superfície do hidrogel. Os hidrogéis foram inchados em solução salina (0,9% p/v NaCl) a 37 °C por 24 horas. Em seguida foram transferidos para placa de petri descartável de 6 cm de diâmetro. Na superfície das membranas foram adicionados 0,5 mL de sangue e 0,03 mL de solução 4 mol L⁻¹ de CaCl₂, iniciando a formação dos trombos. Após 20 minutos o processo foi interrompido pela adição de 10,0 mL de água deionizada. Os glóbulos vermelhos que não foram aprisionados durante a formação dos trombos rompem-se e a hemoglobina livre pode ser detectada através de espectrofotômetro de UV/Vis a 545 nm.

3.3.2.3 - Absorção de Albumina Bovina Sérica – BSA

A absorção de BSA pelas amostras foi avaliada segundo o protocolo: solução de BSA 2 mg mL⁻¹ em SBF. Amostras de 1x1 cm foram imersas em 10 mL de solução e deixadas a 37 °C por 24 horas. Em seguida, 2 mL de sobrenadante foram retirados com o auxílio de uma pipeta automática para a análise em espectroscopia de UV-Vis a 280 nm.

A quantidade de BSA absorvida foi calculada através da Equação 3.5.

$$BSA_{ab} = \frac{(C_o - C_e)V}{m} \quad (3.5)$$

onde C_o e C_e são as concentrações inicial e final do BSA, respectivamente, V é o volume da solução e m é a massa da amostra inchada.

3.3.3 - Carreamento, liberação e análise do fármaco

3.3.3.1 - Carreamento do fármaco

O carreamento do antibiótico foi feito por difusão. Amostras de 1x1 cm foram submersas em 25 mL de solução de fármaco (50 mg mL^{-1}) e mantidas a $21 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas. Em seguida as amostras foram deixadas em dessecador para secarem completamente.

3.3.3.2 - Liberação do fármaco

A liberação foi feita em tubos contendo 6 mL de SBF. A cada hora as amostras foram retiradas da solução, secas delicadamente em papel absorvente e colocadas em nova solução de SBF. Isto foi feito por cinco horas e então as amostras foram deixadas em solução por 24 horas. Foram feitas análises em espectrofotômetro de UV-vis e microbiológicas.

3.3.3.3 - Derivatização do fármaco

A 5,0 mL de amostra obtida através do método descrito na seção 3.3.6 foram adicionados 1,0 mL de solução 2% de bicarbonato de sódio e agitada. Em cada tubo foram adicionados 2,0 mL de solução etanólica (95%) de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno ($0,25 \text{ mL} / 100 \text{ mL}$), com a ajuda de uma pipeta automática. O conteúdo foi misturado cuidadosamente. Após 30 minutos a solução foi neutralizada pela adição de 0,5 mL de HCl 1 mol L^{-1} . A absorbância foi medida a 415 nm em

espectrofotômetro de UV/Vis e utilizando água destilada como referência (RYAN, 1984).

3.3.3.4 - Teste de sensibilidade aos antimicrobianos (teste de halo de inibição)

Em placa de petri descartável de poliestireno foram adicionados 15 mL de solução de ágar Müller Hinton, meio de cultura recomendado para a realização de antibiograma (teste de sensibilidade), para a realização da técnica de difusão de discos proposta por Kirk-Bauer.

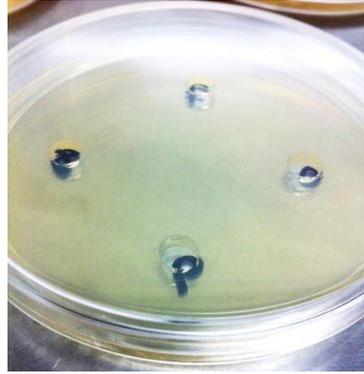
Em um tubo de ensaio estéril, 5 ml de caldo soja tripticaseína (TSB) foram dispersos, e repicados, neste meio, quatro colônias puras da bactéria *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228). A solução foi incubada por 6 horas à $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Em um tubo de ensaio contendo solução tampão fosfato, foram adicionadas gotas deste caldo com bactéria, até que uma turbidez de 0,5 na escala de Mc Farland fosse atingida. Após o acerto da turvação, a concentração bacteriana no meio é de $1 \cdot 10^8$ bactérias mL^{-1} .

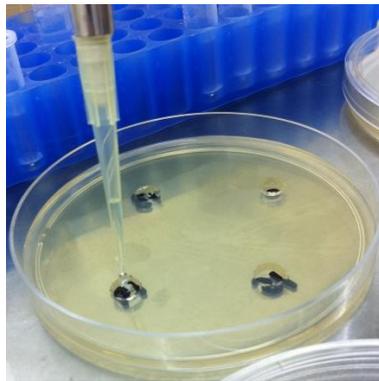
A semeadura do inóculo foi realizada com swab. A extremidade do swab foi embebida no inóculo aferido e então pressionada na parede do tubo, de forma a remover o excesso. Delicadamente, aplicou-se o inóculo sobre a superfície da placa previamente preparada de ágar (Figura 3.1a), em várias direções, de forma a cobrir toda a placa. Foram feitos quatro poços de 0,7 mm de diâmetro em cada placa, Figura 3.1b, e com um auxílio de uma pipeta automática, foram adicionados 50 μL das soluções obtidas na liberação do fármaco, Figura 3.1c e 3.1d. As placas foram encubadas por 24 horas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.



a)



b)



c)



d)

FIGURA 3.1: a) Semeadura do inóculo na placa b) Poços de 0,7mm; c) Adição da solução; d) Poço com solução de liberação.

Este teste foi feito segundo descrição presente na farmacopéia americana [USP, 2010].

4 - Resultados e discussão

4.1 - Preparo dos hidrogéis nanocompósitos

Foram feitas comparações visuais entre as membranas preparadas, conforme mostra a Figura 4.1. A solidificação do polímero usualmente se dá da parede do molde para o seu interior. Como consequência, após o primeiro ciclo de congelamento, os grãos da microestrutura do sólido formado são colunares, longos, estreitos e perpendiculares à parede do molde (Figura 4.1b). A Figura 4.1c, mostra como a membrana se comporta visualmente após o segundo ciclo de congelamento. Quando há o primeiro descongelamento os domínios cristalinos formados não fundem completamente, deixando pequenos cristais por toda a membrana. A partir de então a formação dos cristais se dá em cima desses cristais pré-formados, deixando a membrana mais homogênea.

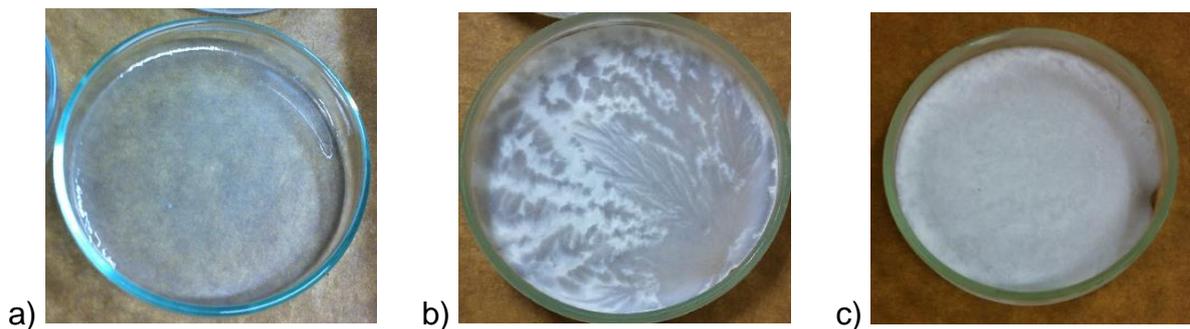


FIGURA 4.1: a) Solução polimérica; b) Membrana após um ciclo de criogelificação; c) Membrana pós segundo ciclo de criogelificação.

A Figura 4.2 ilustra esse processo para melhor entendimento. A Figura 4.2a mostra uma solução polimérica; a Figura 4.2b demonstra a formação inicial dos cristais na membrana após o primeiro ciclo de congelamento; a Figura 4.2c mostra como os cristais se consolidam a partir dos cristais pré-existentes e a Figura 4.2d mostra a organização da rede cristalina polimérica ao final dos ciclos de criogelificação.

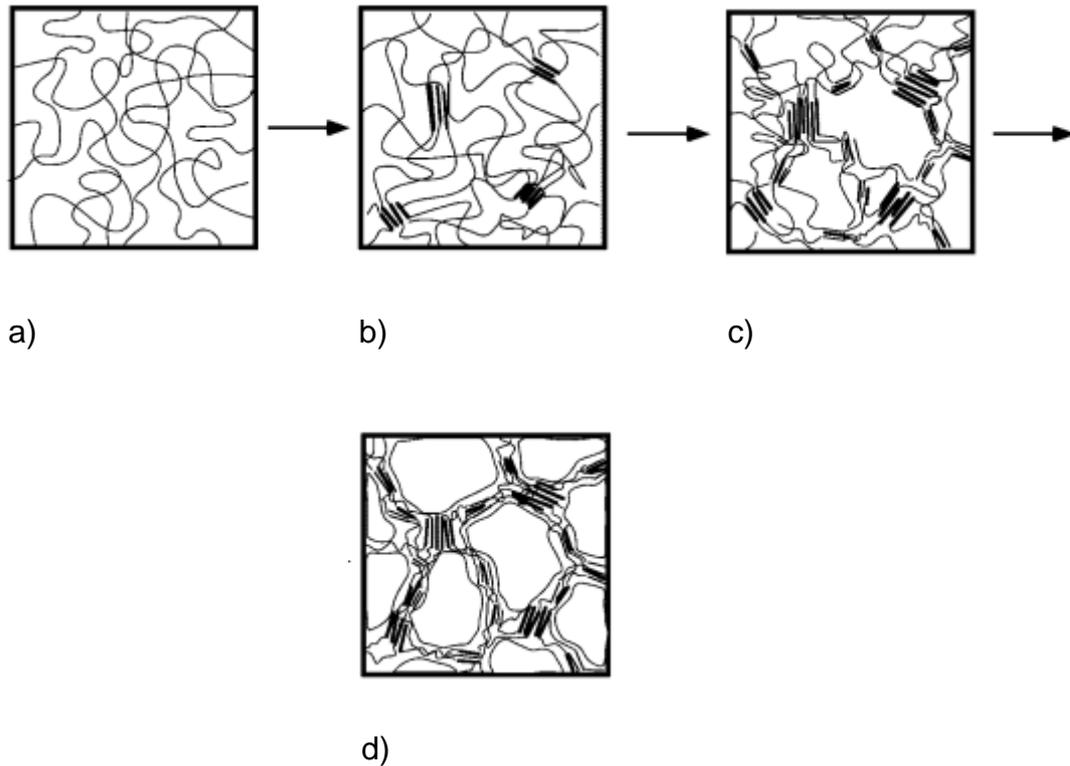


FIGURA 4.2: a) Solução de PVA; b) Estrutura da membrana após um ciclo de criogelificação; c) Estrutura da membrana após o segundo ciclo; d) Estrutura da membrana após alguns ciclos [Willcox, 2000].

4.2 - Medidas de inchamento em fluido plasmático simulado – SBF

Para avaliar a possibilidade de utilização dos hidrogéis produzidos em sistemas de liberação controlada, foram realizadas análises de inchamento em fluido plasmático simulado (SBF – Simulated body fluid). O SBF é uma solução com concentração iônica próxima à do plasma sanguíneo humano, à temperatura de 36,7 °C e pH de 7,35, que foi primeiramente produzida por Kokubo e colaboradores [Kokubo, 1991] para avaliar alterações e reações deste em uma superfície de vidro cerâmico bioativo.

A Figura 4.3 mostra as curvas médias das triplicadas feitas para avaliar o grau de inchamento dos hidrogéis nanocompósitos a 22 °C.

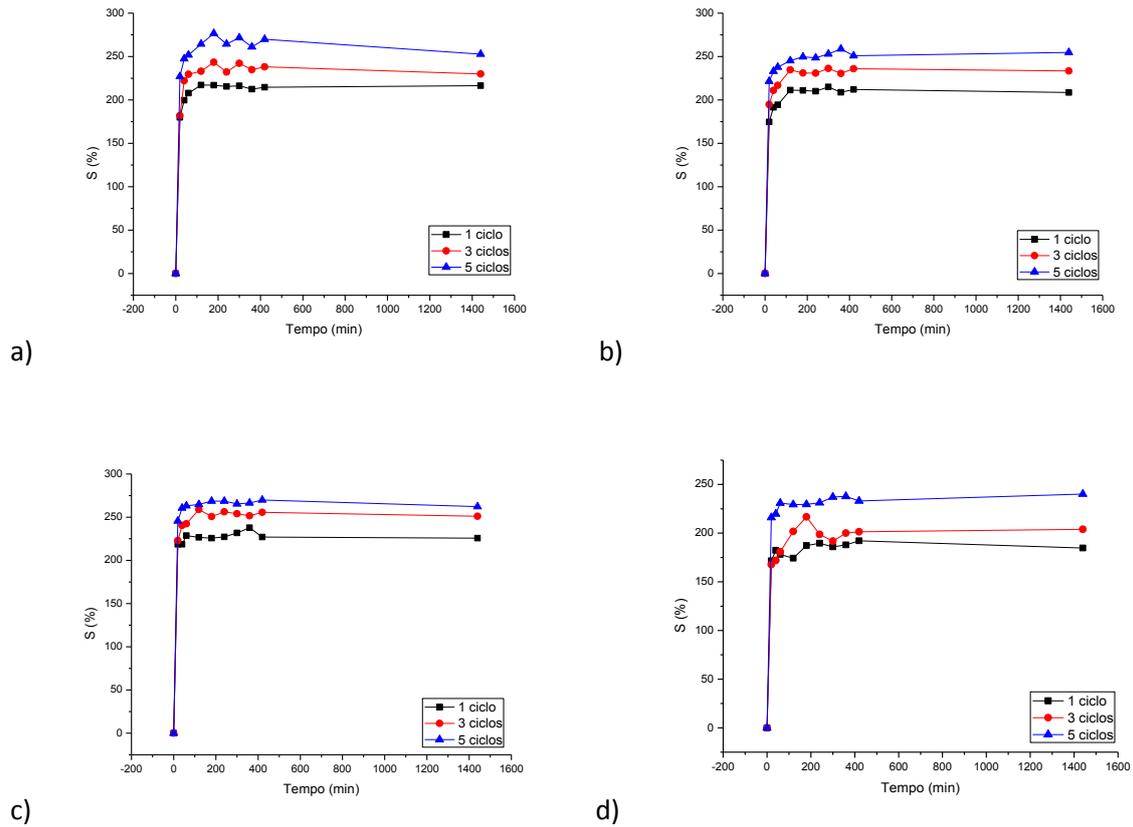


FIGURA 4.3: Cinética de inchamento dos hidrogéis nanocompósitos: a) sem sepiolita; b) com 1% de sepiolita; c) com 2,5% de sepiolita e d) com 5 % de sepiolita.

A partir da Figura 4.3 pode-se construir um gráfico para analisar o que acontece com o inchamento quando se aumenta a porcentagem de nanopartícula no hidrogel, como podemos ver na Figura 4.4.

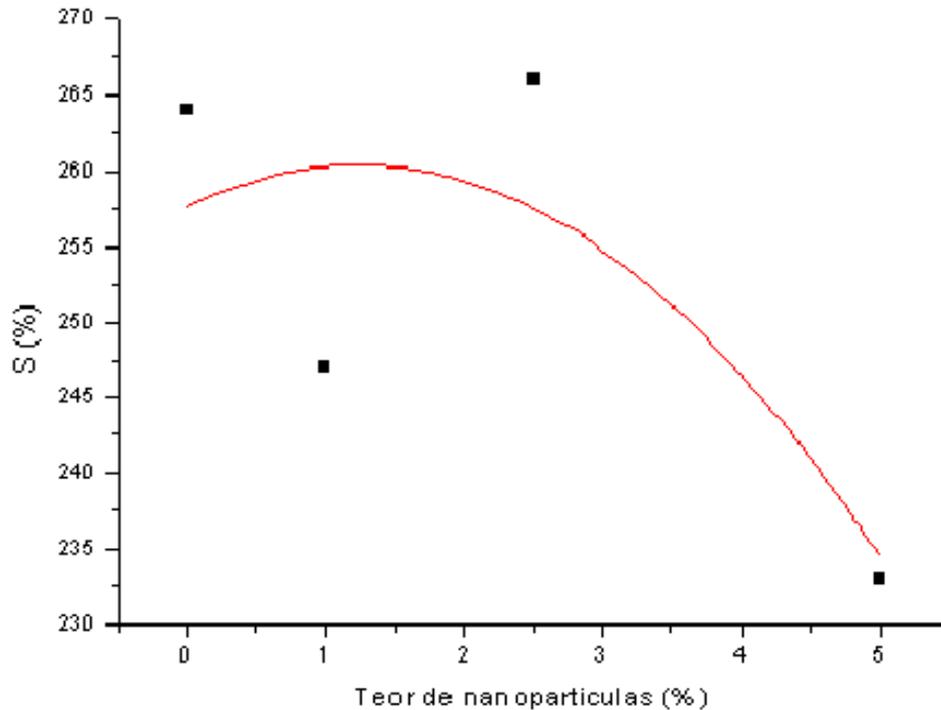


FIGURA 4.4: Dependência do inchamento dos hidrogéis no equilíbrio com o teor de nanopartículas para 5 ciclos.

O inchamento do hidrogel sem nanopartículas ficou em torno de 264% em SBF; quando acrescenta-se 1% de SEP na matriz polimérica, o inchamento diminui devido ao elevado grau de dispersão das nanopartículas diminuindo o volume livre do polímero; quando aumenta-se o teor de SEP para 2,5% há uma aglomeração da argila aumentando a hidrofiliicidade do material; com 5%, há a presença de grandes aglomerados de SEP que tornam-se obstáculos para a difusão de água e diminuem muito o volume livre da membrana, diminuindo consideravelmente seu inchamento.

A Tabela 4.1 apresenta os parâmetros dos mecanismos de sorção de SBF nos hidrogéis, onde a letra “P” significa hidrogel de PVA puro, os números 1, 2,5 e 5 são as porcentagens de SEP nas amostras e C1, C3 e C5 são as quantidades de ciclos de criogelificação, 1, 3 e 5 respectivamente, feitos nas amostras.

TABELA 4.1: Parâmetros dos mecanismos de sorção de SBF nos hidrogéis nanocompósitos.

Amostra	N	Mecanismo	Coefficiente de difusão ($10^{-8} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$)
P – C1	0,33	Fickiano	3,1
P – C3	0,31	Fickiano	1,0
P – C5	0,29	Fickiano	0,6
1 – C1	0,34	Fickiano	2,0
1 – C3	0,32	Fickiano	1,6
1 – C5	0,30	Fickiano	1,5
2,5 – C1	0,32	Fickiano	0,5
2,5 – C3	0,30	Fickiano	0,5
2,5 – C5	0,29	Fickiano	0,7
5 – C1	0,36	Fickiano	1,1
5 – C3	0,35	Fickiano	0,3
5 – C5	0,31	Fickiano	0,4

O anexo I mostra como foi feito o cálculo do n a partir das curvas de inchamento. A Tabela 4.1 mostra que o n é menor que 0,5 e, assim, o mecanismo de difusão em todos os hidrogéis pode ser descrito como Fickiano. Pode-se notar que no geral o coeficiente de difusão (D) diminui com o aumento dos ciclos de criogelificação, pois, como será discutido mais adiante na seção 4.2, o grau de cristalinidade aumenta, diminuindo os caminhos difusionais. Quando acrescentado 1% de SEP no hidrogel, seu D diminui quando comparado com o hidrogel puro, pela dispersão das nanopartículas na fase amorfa. A mesma tendência acontece com 2,5% de SEP. Os pequenos aglomerados que estão na fase amorfa diminuem os caminhos difusionais do nanocompósito. Já para o hidrogel com 5% de nanopartícula, o D aumenta em relação ao de 2,5%, pois os aglomerados são maiores fazendo com que a SEP fique menos dispersa e, assim, a fase amorfa esteja mais disponível.

4.3 - Capacidade de retenção polimérica

Após os ensaios de inchamento foi feito o teste de retenção polimérica, com as soluções remanescentes daquela análise, com o objetivo de avaliar a qualidade da rede tridimensional obtida. Os hidrogéis ficaram imersos na solução por 24 horas e em um gel polimérico inchado a mobilidade molecular das cadeias é alta devido ao efeito plastificante do solvente, mesmo estando abaixo de sua temperatura de transição vítrea. Assim, as cadeias que não fazem parte da rede reticulada reparam do hidrogel em algum momento, alcançando a solução. Então se conseguimos medir o teor de polímero liberado em solução, podemos qualificar a capacidade de retenção da microestrutura das amostras.

A Figura 4.5 apresenta as curvas de absorção obtidas na região do visível para todas as amostras de hidrogéis.

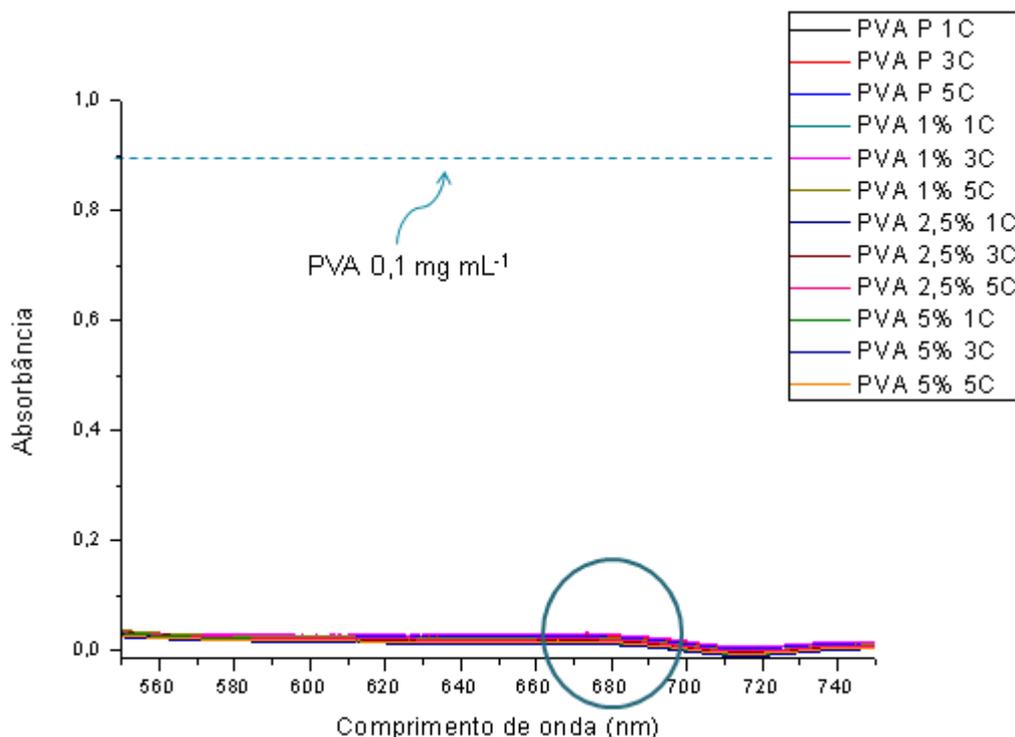


FIGURA 4.5: Espectro de UV-Vis das amostras.

Cascone e colaboradores calcularam em 3% a perda de PVA, em criogéis de PVA contendo quitosana, a partir de uma solução de PVA $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ para o comprimento de onda 680 nm. Para que as amostras sejam biocompatíveis o valor obtido deve ser menor ou igual a 3%. Os resultados obtidos mostram que os

hidrogéis com SEP, como pontos adicionais de reticulação, apresentam uma elevada capacidade de retenção polimérica, visto que as absorvâncias são menores do que 0,04.

4.4 - Análise de calorimetria diferencial exploratória – DSC

As análises de DSC foram necessárias para estabelecer o grau de cristalinidade das amostras, além de ser possível o cálculo das entalpias de vaporização e de fusão cristalina da água contida no hidrogel, suas respectivas temperaturas de vaporização e fusão.

A Tabela 4.2 apresenta os parâmetros térmicos obtidos por DSC para as amostras, onde C1, C3 e C5 correspondem ao número de ciclos feitos na amostra, 1 ciclo, 3 ciclos e 5 ciclos, respectivamente e o número que está a frente de “PVA” é o teor de nanopartícula incorporada na amostra.

TABELA 4.2 Parâmetros térmicos obtidos por DSC para os hidrogéis.

	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_g (°C)	ΔH_v (J/g)	T_v (°C)	X_c
PVA-C1	225,8	66,2	66,4	99,7	130,5	44,1
PVA-C3	226,3	69,7	61,6	81,2	130,7	46,5
PVA-C5	227,2	77,6	68,0	73,3	130,3	51,7
PVA-1-C1	230,3	51,5	76,5	68,9	131,0	34,4
PVA-1-C3	227,8	53,4	72,6	64,3	131,2	35,6
PVA-1-C5	229,9	57,1	74,1	59,4	134,7	38,1
PVA-2,5-C1	226,6	41,7	83,0	82,9	118,6	27,8
PVA-2,5-C3	227,7	38,7	83,1	97,5	109,5	25,8
PVA-2,5-C5	228,9	40,7	81,8	88,0	121,6	27,2
PVA-5-C1	227,3	40,0	80,5	125,2	112,7	26,7
PVA-5-C3	228,2	45,4	80,6	119,1	101,5	30,2
PVA-5-C5	229,0	44,5	81,3	90,2	110,5	29,7

A temperatura de fusão cristalina não é alterada com o aumento da SEP, indicando que não há interação nanopartícula-polímero no nível das lamelas cristalinas, com exceção da amostra com 1% de SEP e um ciclo que teve um aumento de cerca de 5 °C. Para as amostras puras e com 1% de teor de SEP, nota-se um aumento do ΔH_m com o aumento do número de ciclos, evidenciando o aumento da quantidade de cristais formados à medida que mais ciclos de criogelificação são feitos na amostra, o que está de acordo com os resultados encontrados por Willcox [Willcox, 2000].

O grau de cristalinidade foi calculado a partir da Equação 4.1.

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \quad (4.1)$$

onde ΔH_m^0 é a entalpia de fusão cristalina para o PVA 100% cristalino ($\Delta H_m^0 = 150,0 \text{ J g}^{-1}$ [Willcox, 2000]). Nota-se que para as amostras de 3 e 5 ciclos há um ligeiro aumento do grau de cristalinidade com o aumento do teor de SEP, indicando que os ciclos também influenciam a cristalização, apesar da sepiolita causar desordem no sistema polimérico. Aparentemente os aglomerados de nanopartícula tornam-se obstáculos para o crescimento dos cristais, pois as cadeias de PVA tem uma restrição em sua mobilidade, diminuindo o número de cadeias cristalizáveis e, assim, diminuindo a cristalinidade do material.

Pode-se notar que a Tg aumenta com o aumento do número de ciclos mostrando que a interação SEP-PVA aumenta a rigidez da fase amorfa da amostra, o que está de acordo com a literatura, pois a presença de cargas de origem inorgânica tende a diminuir a mobilidade dos segmentos das cadeias poliméricas aumentando, conseqüentemente, a Tg [Nielsen, 1974].

Sobre a vaporização da água observa-se uma diminuição na entalpia com o aumento do número de ciclos para cada amostra e na Tv com o aumento do teor de nanopartícula. Este comportamento pode ser resultado das interações SEP-PVA que diminuem a quantidade de polímero disponível para interagir com a água.

A Figura 4.6 mostra as dependências da Tg e do Xc descritos anteriormente em relação ao teor de nanopartículas incorporadas nas matrizes de PVA.

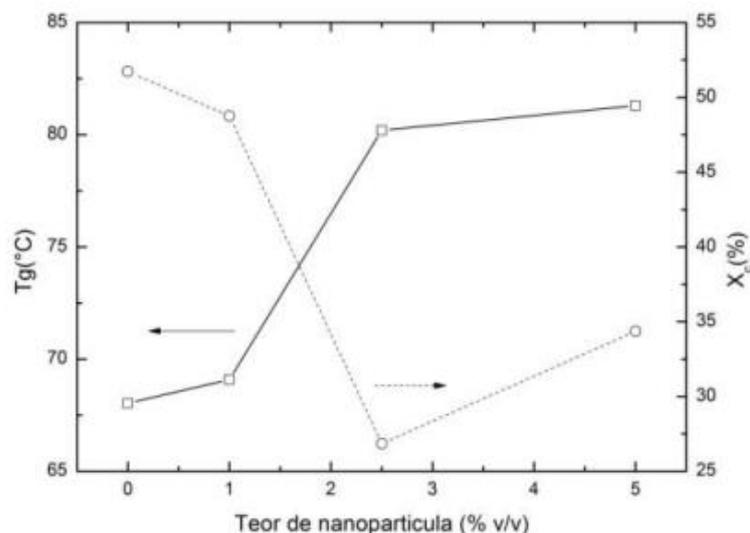


FIGURA 4.6: Comparação entre a temperatura de transição vítrea e o grau de cristalinidade dos hidrogéis nanocompósitos em função do teor de nanopartícula.

4.5 - Difração de raios-X – DRX

Os perfis de raios-X observados na Figura 4.7, mostram uma forte difração no pico observado em $2\theta = 6,9^\circ$ correspondente ao plano cristalográfico (1 1 0) da sepiolita. Este plano corresponde aos poros internos das agulhas da zeólita que não podem ser modificados [Viçosa, 2009]. Porém, não é possível calcular o grau de cristalinidade das amostras de hidrogel contendo sepiolita, pois os picos dos planos (0 6 0), equivalente a $2\theta = 19,75^\circ$, e (1 3 1), equivalente a $2\theta = 20,65^\circ$ da sepiolita se sobrepõem aos planos (1 0 1) e (1 0 $\bar{1}$) ($2\theta = 19,5$ e $20,1^\circ$), respectivamente, do PVA.

Então os resultados obtidos serão utilizados para avaliar se há mudanças na rede cristalina do polímero.

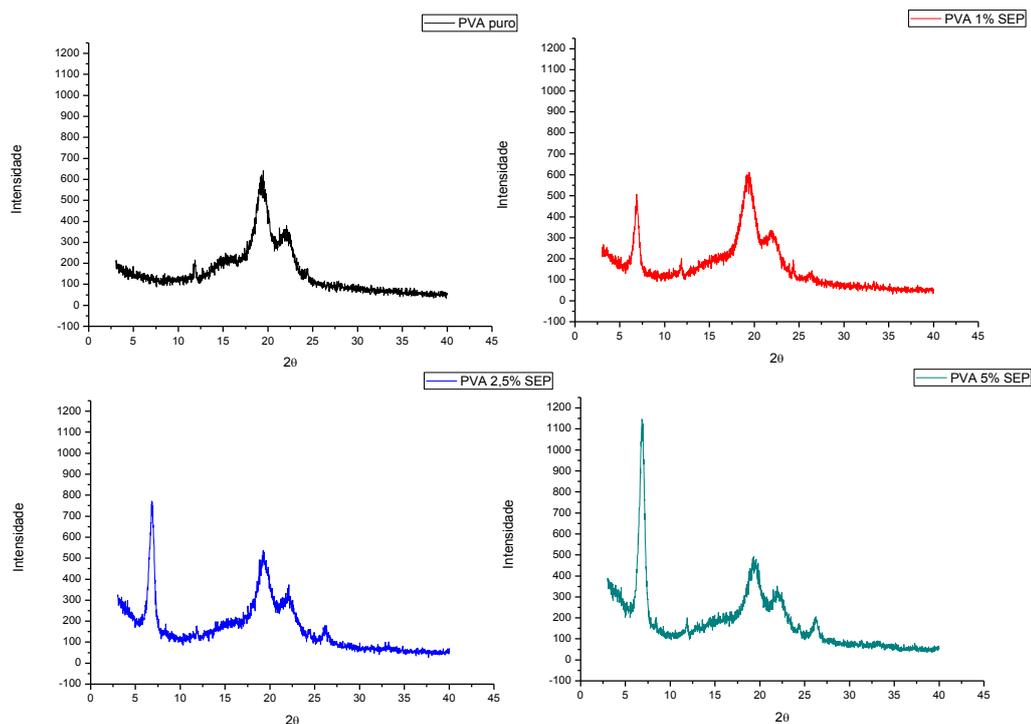


FIGURA 4.7: Curvas de difração para os hidrogéis produzidos para 5 ciclos.

Através das curvas de difração é possível observar o aumento da intensidade do plano de difração da SEP com o aumento de sua porcentagem nas amostras. Também é possível observar uma distorção da rede cristalina do PVA evidenciada pelo pico em aproximadamente $2\theta = 26,2^\circ$. Há apenas uma distorção e

não o surgimento de um plano cristalino no polímero, pois, como mostra a Tabela 4.2, o grau de cristalinidade diminui com o aumento da porcentagem da SEP. Se o grau de cristalinidade aumentasse poderia ter ocorrido o surgimento de um novo plano cristalino. No Anexo II é possível observar o DRX para a SEP pura que mostra os picos descritos acima.

4.6 - Análise termogravimétrica – TGA

As Figuras 4.8 e 4.10 apresentam as curvas de TGA e DTGA, respectivamente, para os hidrogéis obtidos.

As curvas de TGA mostram que a adição de SEP na matriz polimérica não altera o perfil de desidratação dos hidrogéis.

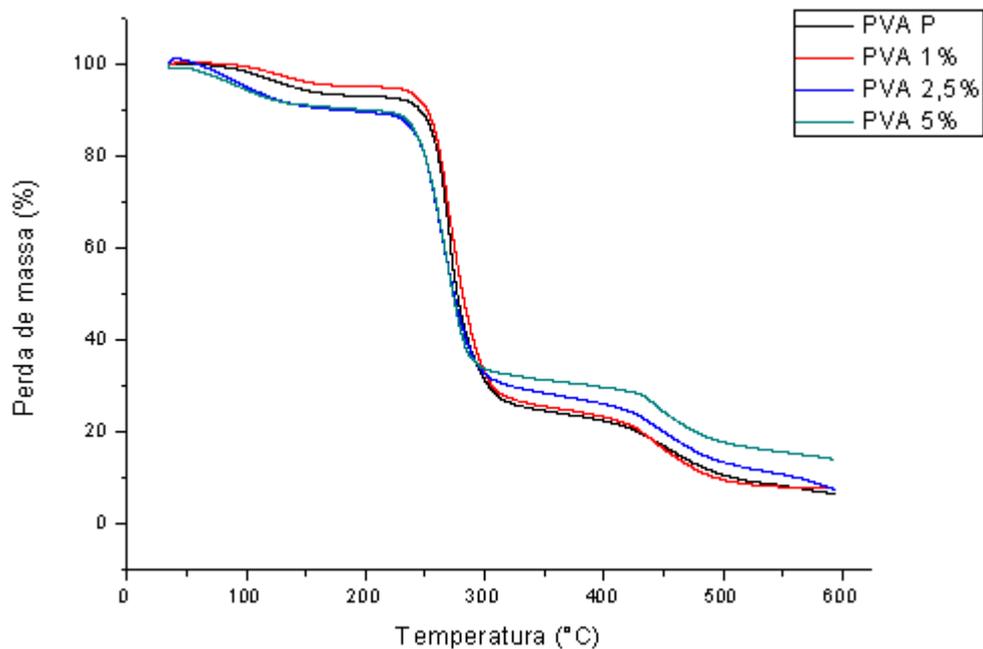


FIGURA 4.8: Curvas de TGA para os hidrogéis nanocompósitos.

Como pode-se observar, os hidrogéis possuem três estágios de decomposição. O primeiro estágio, entre 50 e 200°C, é devido à perda de umidade da membrana. O segundo estágio, entre 200 e 400°C, é resultante da desidratação do PVA. A Figura 4.9 apresenta a reação de desidratação.



FIGURA 4.9: Mecanismo de desidratação do PVA [Finch, 1973].

O terceiro estágio, acima de 400 °C é associado à degradação, principalmente de hidrocarbonetos (alcanos e alcenos).

A Tabela 4.3 mostra as porcentagens perdidas durante cada estágio para cada amostra.

TABELA 4.3: Perda de massa das amostras durante os processos descritos.

Amostra	Perda de umidade (%)	Desidratação do PVA (%)	Degradação de hidrocarbonetos (%)	Resíduo (%)
PVA puro	5	71	14	2
PVA 1% SEP	5	66	16	5
PVA 2,5% SEP	11	59	16	2
PVA 5% SEP	10	58	14	6

Através da Tabela 4.3, pode-se notar um aumento da porcentagem de perda de umidade com o aumento da quantidade de sepiolita incorporada na matriz polimérica. Isso se deve pela interação SEP-água; quando acrescenta-se 1% de SEP, nota-se um pequeno aumento da quantidade de água na amostra; com 2,5% é o maior aumento, visto que tem-se uma maior quantidade de SEP na membrana; Com a adição de 5% de SEP, observa-se aglomerados maiores da nanopartícula, como foi discutido no tópico 4.2, fazendo com que exista uma menor área disponível para o contato nanopartícula-água, diminuindo a quantidade de umidade liberada neste primeiro estágio de decomposição da amostra.

Já a desidratação do PVA diminui com a adição da SEP e isso pode ser devido às interações SEP-PVA que se dão através das hidroxilas presentes no polímero. Para a degradação dos hidrocarbonetos formados não há significativa mudança nas porcentagens obtidas visto que não há mais água nem hidroxilas para

a SEP interagir, portanto a porcentagem de nanopartícula adicionada não mostra diferenças neste estágio.

Para este sistema a avaliação do resíduo não é efetiva, pois as análises não são feitas totalmente em ar sintético e sua taxa de aquecimento é apenas exploratória, fazendo com que todos os alcanos e alcenos formados não volatilizem por completo; porém os dados de DRX presentes na seção 4.5 mostram que os teores de SEP são quantitativos, ou seja, aumentam com o aumento da porcentagem nas amostras.

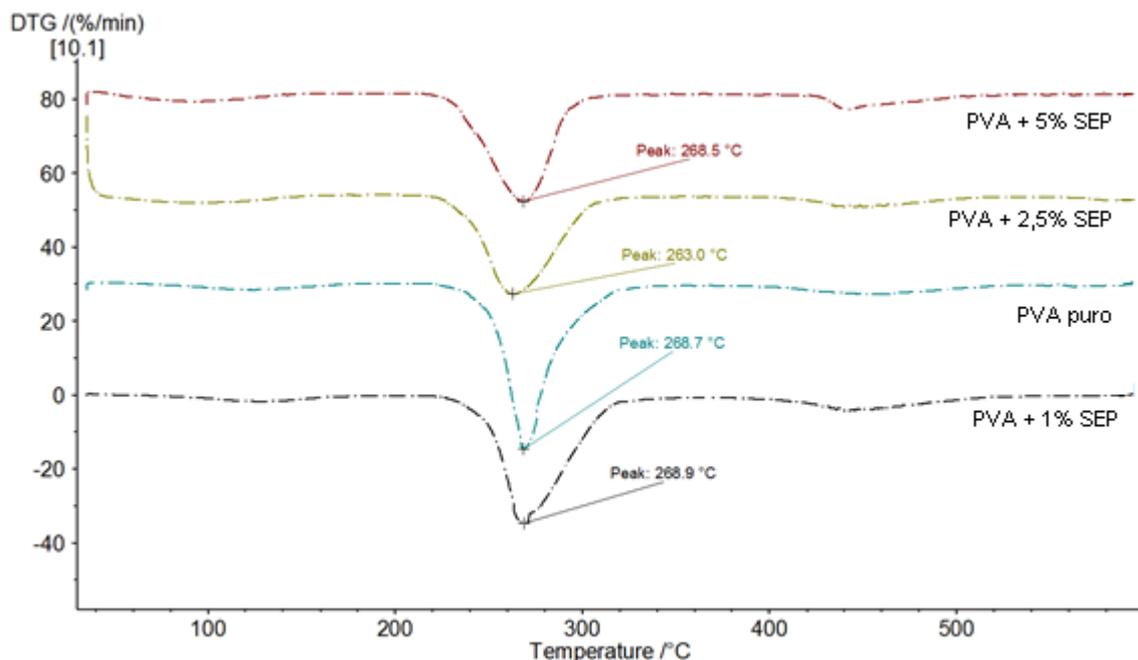


FIGURA 4.10: Curvas de DTGAs dos hidrogéis nanocompósitos.

O pico associado à desidratação do PVA mostra que a presença de SEP não aumenta a estabilidade térmica das membranas, visto que ocorre uma variação muito pequena na temperatura do pico ($\sim 268^{\circ}\text{C}$) em função do teor de argila incorporada. Segundo Gilman e colaboradores, a presença de montimorilonita aumenta a estabilidade térmica dos sistemas poliméricos quando comparados aos sistemas sem a nanopartícula [Gilman, 2000]. Porém, para as amostras isso não foi observado, pois a sepiolita é acicular. Logo, a morfologia e a área superficial da nanoargila podem influenciar a resistência térmica da matriz polimérica.

A Tabela 4.4 também evidencia que não houve alteração na estabilidade térmica dos materiais com a adição de SEP, pois com 50% de perda de massa a temperatura não varia muito (a maior variação foi para a amostra com 1% de SEP quando comparadas com a membrana de PVA puro). Também não é observada grande variação para o primeiro “onset” avaliado (temperatura de degradação das cadeias maiores do polímero). O segundo “onset” (temperatura de degradação de cadeias menores de alcanos e alcenos formados na primeira degradação) apresenta uma grande variação e esta aumenta com o aumento do teor de SEP na amostra. Isso se deve ao fato de que a presença de SEP se torna uma barreira para a saída de voláteis e das cadeias menores da amostra. Quanto maior a quantidade de SEP, maiores são os obstáculos e, conseqüentemente, maiores as temperatura de degradação das amostras.

TABELA 4.4: Temperaturas a 10 e 50% de degradação da amostra e onset das degradações.

Amostra	T 10%	T 50%	“Onset” 1	“Onset” 2
PVA puro	251,1	271,7	253,2	387,3
PVA 1%	243,3	278,3	250,9	407,0
PVA 2,5%	134,5	268,8	238,3	414,9
PVA 5%	197,9	273,3	248,1	433,5

4.7 - Planejamento fatorial

Através do grau de cristalinidade e da porcentagem de inchamento, podemos diminuir o número de amostras fazendo uma análise quimiométrica dos dados obtidos. O objetivo é obter a amostra com maior porcentagem de inchamento (aumento intrínseco da biocompatibilidade) e maior grau de cristalinidade (maior resistência mecânica). Para isso foi utilizado um planejamento fatorial, que servirá para a otimização do problema, e os dados obtidos anteriormente [Filho, 2015].

Assim 27 experimentos foram realizados (três porcentagens de SEP e três ciclos diferentes, cada um em triplicata). A Tabela 4.5 mostra os experimentos que foram feitos e as respostas obtidas.

TABELA 4.5: Condições experimentais do planejamento fatorial realizado.

Experimento	SEP		Ciclos		Respostas (%)	
	Real	Cod	Real	Cod	Cristalinidade	Inchamento
1	1	-1	1	-1	36,47	190,14
2	1	-1	1	-1	32,66	194,79
3	1	-1	1	-1	33,95	240,86
4	1	-1	3	0	40,98	243,59
5	1	-1	3	0	31,67	247,04
6	1	-1	3	0	34,20	209,33
7	1	-1	5	1	48,76	262,63
8	1	-1	5	1	35,40	242,63
9	1	-1	5	1	30,09	259,02
10	2,5	-0,25	1	-1	28,85	213,79
11	2,5	-0,25	1	-1	27,24	221,70
12	2,5	-0,25	1	-1	27,37	241,71
13	2,5	-0,25	3	0	23,62	259,96
14	2,5	-0,25	3	0	25,03	239,63
15	2,5	-0,25	3	0	28,69	253,52
16	2,5	-0,25	5	1	26,84	275,59
17	2,5	-0,25	5	1	26,58	248,86
18	2,5	-0,25	5	1	28,05	262,23
19	5	1	1	-1	29,11	187,25
20	5	1	1	-1	28,54	190,48
21	5	1	1	-1	22,41	176,31
22	5	1	3	0	30,11	199,50
23	5	1	3	0	30,66	191,65
24	5	1	3	0	29,95	220,67
25	5	1	5	1	34,36	237,97
26	5	1	5	1	28,27	241,93
27	5	1	5	1	26,41	240,69

Como as condições originais não podem ser utilizadas devido à diferença na quantidade de ciclos e na porcentagem de sepiolita é necessário

efetuar uma normalização, ou codificação (Cod) das variáveis. Nesta codificação é empregada a Equação 4.2.

$$x_c = \frac{x_0 - P_c}{\Delta/2} \quad (4.2)$$

onde x_c é a condição codificada, x_0 é a condição original, P_c é a média das variáveis menor e maior (1 e 5 para ambos os casos) e Δ é a diferença entre os valores originais dos níveis 1 e -1 (o nível 1 será igual a 5 para ambos os casos, pois temos 5% de SEP e 1 ciclo e para o nível -1 isso também acontece, porém com o menor valor que, no caso, é 1). Por exemplo, no caso do experimento 10 o valor codificado para a SEP será calculado como mostra a Equação 4.3.

$$x_c = \frac{2,5 - \frac{(1+5)}{2}}{\frac{(5-1)}{2}} = -0,25 \quad (4.3)$$

Com os experimentos descritos, é possível obter um modelo empírico com quatro coeficientes: b_0 (constante), b_1 e b_2 (lineares) e b_{12} (interação de segunda ordem), como mostra a Tabela 4.6.

TABELA 4.6: Matriz obtida a partir do modelo empírico.

Matriz			
X			
b0	b1	b2	b12
1	-1	-1	1
1	-1	-1	1
1	-1	-1	1
1	-1	0	0
1	-1	0	0
1	-1	0	0
1	-1	1	-1
1	-1	1	-1
1	-1	1	-1
1	-0,25	-1	0,25
1	-0,25	-1	0,25
1	-0,25	-1	0,25
1	-0,25	0	0
1	-0,25	0	0
1	-0,25	0	0
1	-0,25	1	-0,25
1	-0,25	1	-0,25
1	-0,25	1	-0,25
1	1	-1	-1
1	1	-1	-1
1	1	-1	-1
1	1	0	0
1	1	0	0
1	1	0	0
1	1	1	1
1	1	1	1
1	1	1	1

onde b_0 é igual a um para todos os experimentos, b_1 é a codificação feita para a SEP, b_2 é a codificação para o número de ciclos e b_{12} é a multiplicação destes dois últimos.

Uma vez obtida a matriz de codificação, pode-se usar o programa Octave para calcular os modelos de regressão. Para isso, precisamos da Matriz X (Tabela 4.6), das respostas, que no caso são o grau de cristalinidade e a porcentagem de inchamento, da soma quadrática do erro puro relacionada à triplicata efetuada e dos graus de liberdade dos experimentos. A Tabela 4.7 mostra os cálculos feitos para se obter todos os coeficientes citados.

TABELA 4.7: Cálculos para obtenção do erro quadrático puro e dos graus de liberdade.

d1	d2	D	Média	(erro²)	G.L.
0,5335	0,1393	0,2726	0,3584	0,0073	2
0,3889	0,1861	0,2690	0,3584	0,0079	
0,4379	0,6501	0,5336	0,3584	0,0306	
0,7047	0,6777	0,6911	0,5257	0,0273	2
0,3514	0,7123	0,5003	0,5257	0,0006	
0,4474	0,3326	0,3857	0,5257	0,0195	
1	0,8694	0,9324	0,6663	0,0708	2
0,4929	0,6679	0,5738	0,6663	0,0085	
0,2914	0,8331	0,4927	0,6663	0,0301	
0,2444	0,3775	0,3037	0,3151	0,0001	2
0,1833	0,4572	0,2894	0,3151	0,0006	
0,1882	0,6586	0,3521	0,3151	0,0013	
0,0459	0,8424	0,1966	0,2930	0,0092	2
0,0994	0,6377	0,2518	0,2930	0,0016	
0,2383	0,7776	0,4305	0,2930	0,0189	
0,1681	1	0,4100	0,3750	0,0012	2
0,1582	0,7307	0,3400	0,3750	0,0012	
0,2140	0,8653	0,4303	0,3750	0,0030	
0,2542	0,1102	0,1673	0,1165	0,0025	2
0,2326	0,1427	0,1822	0,1165	0,0043	
0	0	0	0,1165	0,0135	
0,2922	0,2336	0,2612	0,2795	0,0003	2
0,3130	0,1544	0,2199	0,2795	0,0035	
0,2861	0,4467	0,3575	0,2795	0,0060	
0,4535	0,6210	0,5307	0,4092	0,0147	2
0,2223	0,6609	0,3833	0,4092	0,0006	
0,1518	0,6484	0,3137	0,4092	0,0091	
		SSPE	0,295643	DF	18

onde d1 é a normalização dos graus de cristalinidade, d2 é a normalização para as porcentagens de inchamento, D é a média entre d1 e d2, “média” é a média da

triplicata de cada experimento, (erro^2) é D menos a “média” elevado ao quadrado e G.L. são os graus de liberdade de cada experimento (como são triplicatas temos $3 - 1 = 2$).

A soma quadrática do erro puro é o somatório da coluna (erro^2) e o grau de liberdade é o somatório dos graus de liberdade da coluna G.L..

Como todos os parâmetros de entrada para o Octave foram obtidos, utilizou-se a função “regression2”, para fazer uma avaliação do modelo proposto.

Como saída, a função dará duas tabelas: a tabela ANOVA (Tabela 4.8) e a tabela de coeficientes (Tabela 4.9).

TABELA 4.8: Tabela ANOVA dada como resposta pelo programa octave.

	Soma	Graus de	Média	Testes	F tabelado
	Quadrática	Liberdade	Quadrática	F	(95%)
Regressão	0.4817	3	0.1605	9,3442	3,0279
Resíduo	0.3995	23	0.0173		
Total	0.8813	26	0.0339		
Erro puro	0.2956	18	0.0164		
Falta de ajuste	0.1039	5	0.0207	1,2654	2,7728
R²	0.5466	R	0.7393		
R² máximo	0.6645	R máximo	0.8152		

A partir da Tabela 4.8, pode-se notar que o F calculado pelo programa não é muito maior do que o F tabelado com 95% de confiança (ele deveria ser pelo menos 10 vezes maior), então o modelo não é excelente e é necessária uma avaliação dos coeficientes b para ver se algum deles é insignificante. Para isso observa-se a Tabela 4.9.

TABELA 4.9: Análise dos coeficientes b.

	Coeficientes	Limite inferior	Limite superior	Erro
b0	0.3633	0.2858	0.4407	0.0774
b1	-0.1168	-0.2102	-0.0234	0.0933
b2	0.1136	0.0187	0.2084	0.0948
b12	0.0053	-0.0109	0.1197	0.1143

Agora é necessário analisar os limites inferiores e superiores de cada coeficiente, pois se algum deles passa pelo zero ele é insignificante para o modelo. Neste caso, o coeficiente b12 passa pelo zero e pode ser retirado do modelo para que ele seja recalculado.

A nova matriz nada mais é do que a matriz X, mostrada na Tabela 4.6, sem a coluna b12. A tabela ANOVA recalculada pelo Octave ficou como mostra a Tabela 4.10.

TABELA 4.10: Tabela ANOVA recalculada pelo Octave.

	Soma	Graus de	Média	Testes F	F
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		tabelado
					(95%)
Regressão	0.4814	2	0.2407	14,4461	3,4028
Resíduo	0.3999	24	0.0166		
Total	0.8813	26	0.0339		
Erro puro	0.2956	18	0.1642	1,0586	2,6613
Falta de ajuste	0.1043	6	0.0173		
R²	0.5462	R	0.7390		
R² máximo	0.6646	R máximo	0.8152		

A partir da nova Tabela ANOVA pode-se notar um aumento do F calculado pelo programa. Isso mostra que este modelo é melhor que o anterior, mas

ainda não é bom, então analisou-se os coeficientes obtidos para ver se algum deles é insignificante, Tabela 4.11.

TABELA 4.11: Novos coeficientes b calculados pelo Octave.

	Coeficientes	Limite inferior	Limite superior	erro
b0	0.3633	0.2978	0.4289	0.0655
b1	-0.1168	-0.1959	-0.0377	0.0790
b2	0.1132	0.0332	0.1931	0.0798

Como pode-se notar todos os coeficientes são significantes, portanto não tem como melhorar o modelo proposto. Assim podemos utilizar o Template, para calcular a superfície de resposta. Neste template são necessários os valores dos coeficientes encontrados (a coluna “coeficientes” da Tabela 4.11) e os dados reais e normalizados das respostas (porcentagem de inchamento e grau de cristalinidade). A imagem formada pelo template pode ser observada na Figura 4.11.

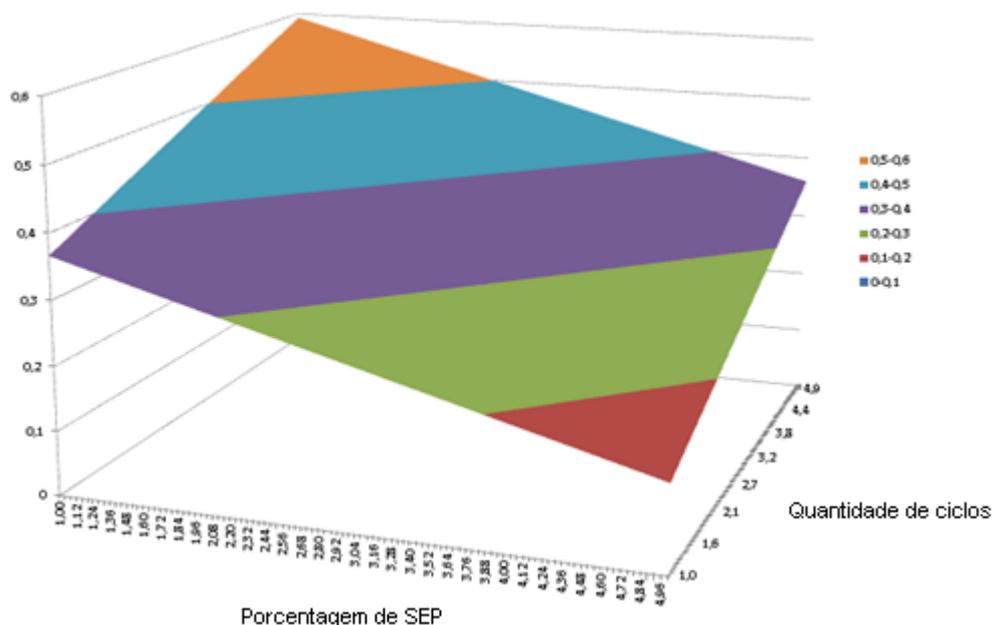


FIGURA 4.11: Superfície de resposta obtida.

Através da superfície de resposta pode-se ver que o máximo está localizado onde a porcentagem de SEP é 1% e a quantidade de ciclos é igual a 5.

Portanto tem-se maior grau de cristalinidade e maior porcentagem de inchamento quando incorporados 1% de sepiolita na membrana e fazemos 5 ciclos de criogelificação.

A partir deste ponto todas as análises serão feitas com este tipo de amostra (SEP 1% e 5 ciclos) e com a membrana de PVA puro para fins de comparação.

4.8 - Estado da água no interior dos hidrogéis

O estudo da água presente nos hidrogéis é importante, pois pode-se determinar a permeação total de fármacos no hidrogel e as características de interações nanocompósito-água ajudando no desenvolvimento dos hidrogéis.

A água presente nos hidrogéis pode existir de forma livre ou associada. Quando a membrana começa a absorver água, primeiramente ocorre a hidratação dos grupos hidroxila da matriz polimérica (água primária, Figura 4.12). Em função das ligações hidrogênio, a água primária não possui as características físico-químicas da água pura, que solidifica a 0°C, por exemplo. As moléculas de água que continuam difundindo pelo polímero passam a interagir com a água primária e formam uma segunda camada de água (água secundária ou água solvatada).

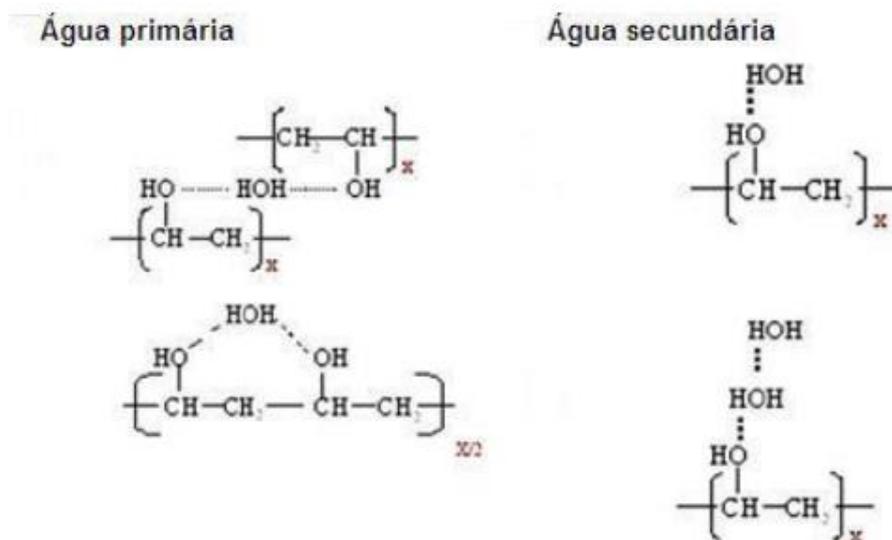


FIGURA 4.12: Esquema das estruturas das águas de hidratação no PVA [Li, 2005].

O uso do DSC para as determinações dos estados da água baseia-se no fato de que a água primária não congela/funde, a água livre congela/funde a 0°C e a água secundária possui outra temperatura de fusão/cristalização. A análise do estado da água é interessante do ponto de vista qualitativo, permitindo uma análise rápida dentre os diferentes componentes do sistema.

As Figuras 4.13 – 4.16 mostram as curvas de DSC obtidas para a água deionizada, para os hidrogéis nanocompósitos, para os hidrogéis hidratados em solução de sulfato de paromomicina e para solução de paromomicina com SEP, respectivamente.

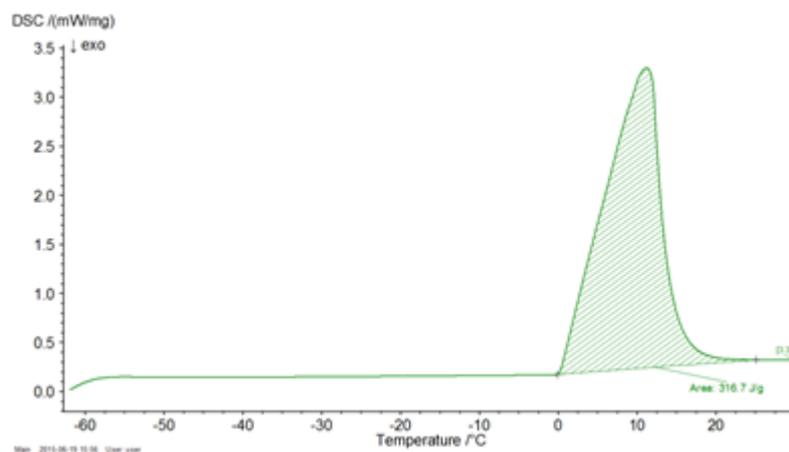


FIGURA 4.13: Curva de DSC para a água deionizada.

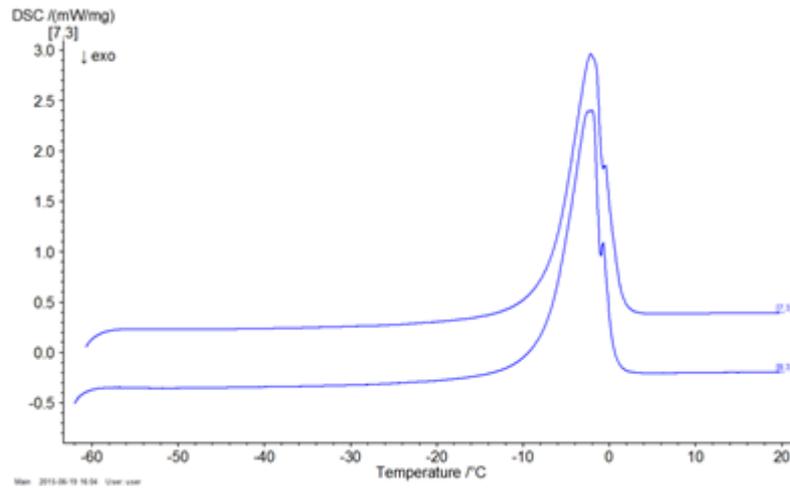


FIGURA 4.14: curva de DSC para o PVA puro (curva de baixo) e PVA com 1% de SEP (curva de cima).

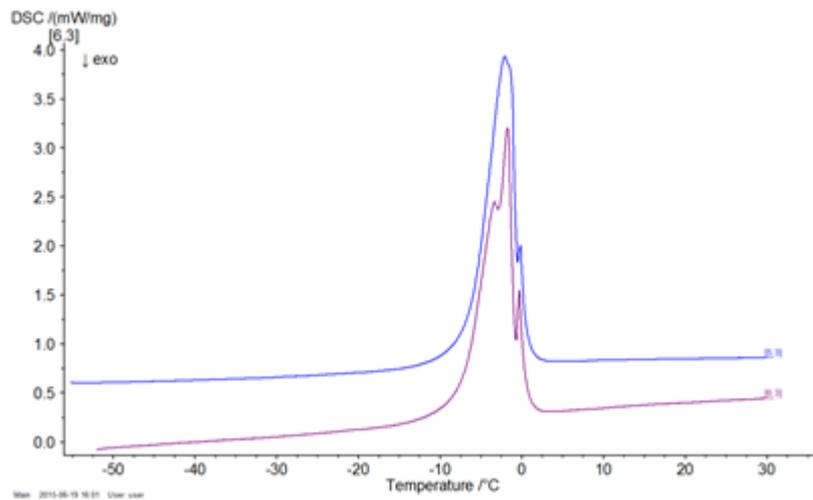


FIGURA 4.15: Curvas de DSC para PVA puro (curva de baixo) e PVA com 1% de SEP (curva de cima) inchadas em solução de sulfato de paromomicina.

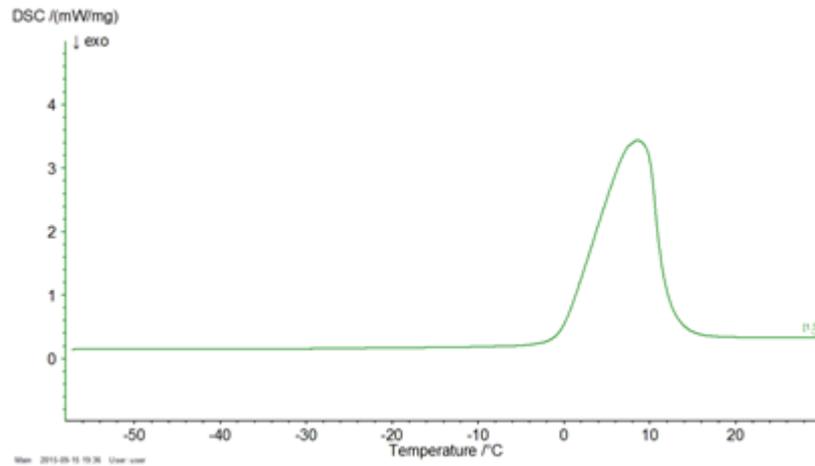


FIGURA 4.16: Curva de DSC para solução de paromomicina com sepiolita.

Como é possível observar, a curva para PVA puro e PVA com nanopartícula apresentam o mesmo perfil de fusão, apresentando dois tipos de água diferentes. Pode-se ver duas curvas distintas, uma começando por volta de -20°C e outra em 0°C . Não é possível a distinção de três tipos de água, pois a água primária perde suas características físico-químicas, como foi descrito na seção 2.8. Já para os hidrogéis inchados em solução com paromomicina é possível observar três picos na amostra de PVA puro, evidenciando que a água interage com a paromomicina de forma diferente do polímero. Este terceiro pico não aparece na amostra com SEP provavelmente devido às interações PVA-SEP-água serem mais fortes do que a interação água-paromomicina. Para a confirmação desta afirmação, foi feito um DSC de uma solução de SEP com paromomicina, que aparece na Figura 4.16. É possível observar que a água diminuiu seu ponto de fusão para valores abaixo de 0°C .

A Tabela 4.12 apresenta os resultados obtidos através dos dados de estado da água.

TABELA 4.12: Dados sobre o estado da água obtidos através do DSC.

Amostra	Temperaturas dos picos (°C)			Entalpia (J g ⁻¹)	Teor de água secundária (%)	Área absoluta
	Pico 1	Pico 2	Pico 3			
Água destilada	11,2	-	-	317,4	-	25,8
PVA puro	-0,4	0	-	163,7	279,6	15,2
PVA 1% SEP	-1,2	0	-	173,7	258,5	15,4
PVA P + PARO	-3,2	-1,8	0	152,2	190,2	12,7
PVA 1 + PARO	-2,1	0	-	165,5	56,4	14,0
PARO + SEP	8,6	-	-	302,6	-	25,3

As temperaturas dos picos evidenciam a presença de água secundária e água de inchamento nas amostras de PVA puro e com SEP e para a amostra de PVA com SEP e sulfato de paromomicina. Já a amostra de PVA puro com sulfato de paromomicina apresenta três picos, evidenciando a presença de um terceiro tipo de água, provavelmente da interação da água com o fármaco utilizado.

Através das entalpias é possível observar que existe uma interação PVA-água, evidenciada pela diminuição da entalpia da água; pode-se notar, que existe interação PVA-SEP, pois a entalpia diminui quando comparada à entalpia da amostra de PVA puro, ou seja, existe maior quantidade de água livre quando a nanopartícula está presente na membrana, mostrando que as interações se dão pelas hidroxilas presentes no polímero. Quando acrescenta-se o sulfato de paromomicina, a entalpia diminui um pouco mais, mostrando que há interação do medicamento com as águas presentes na matriz. Quando compara-se a entalpia da mistura fármaco-SEP, nota-se que esta é menor que a entalpia da água destilada, mostrando que há interação entre o fármaco e a sepiolita com a água.

O teor de água secundária foi calculado utilizando-se a fórmula apresentada na seção 3.3.1.6. Nota-se uma diminuição da quantidade de água secundária presente com o inchamento feito em solução de paromomicina. Isso pode ser explicado pelas interações do fármaco com a matriz polimérica, fazendo com que uma menor quantidade de água interagisse com este.

4.9 - Hemocompatibilidade *in vitro*

Os hidrogéis poliméricos sempre estiveram sob pesquisa para aplicações biomédicas devido a sua alta retenção de água, grau de hidrofiliidade e propriedades mecânicas adequadas. Eles foram os primeiros biomateriais projetados para uso no corpo humano. Em 1960 iniciou-se a pesquisa moderna com hidrogéis com a síntese de géis de poli (hidroxietil metacrilato – PHEMA) por Wichterle e Lim [Wichterle, 1960]. Segundo Kokabi [Kokabi, 2007], em 1989, Rosiak implementou o uso dos hidrogéis como material básico para a fabricação de curativos. Estão presentes em outras aplicações biomédicas, tais como próteses vasculares [Leitão, 2013] e membranas para diálise [Lay, 1991].

A biocompatibilidade pode ser definida como a habilidade de um material ser compatível com tecidos vivos, em especial, o corpo humano. Estes materiais são desenvolvidos especificamente em função da aplicação a que são destinados e precisam obedecer a um amplo número de parâmetros de qualidade e segurança. Um deles é a hemocompatibilidade, que está relacionada com as interações particulares entre a superfície do material com o sangue, como a formação de trombos (coagulação sanguínea) e a lise das células sanguíneas, que podem ser fatais para o paciente submetido aos implantes.

Como esta é uma propriedade de importância fundamental em muitas aplicações biomédicas, a melhoria das propriedades de hemocompatibilidade de biomateriais tem sido foco de muitas pesquisas. Em 1977, Peppas e Merrill avaliaram a utilização de PVA em aplicações em que a principal questão era a hemocompatibilidade. As propriedades físicas e de superfície foram examinadas e sua importância em várias aplicações biomédicas foi então comprovada [Peppas, 1977].

Ao contrário da biocompatibilidade, o termo hemocompatibilidade não está bem definido [Balan, 2014]. Labarre [Labarre, 2001] definiu uma superfície hemocompatível como “uma superfície capaz de manter os processos de coagulação e inflamação sob controle em sua interface quando em contato com sangue, em dadas condições hemodinâmicas”. Por outro lado, Gorbet e Sefton [Gorbet, 2004] levam em consideração apenas a resposta trombótica causada pelo material quando em contato com o sangue. Ambos os casos levam em consideração

o processo de coagulação. O mecanismo de coagulação, também chamado de cascata de coagulação, pode ser uma resposta do organismo a um trauma causado aos tecidos e vasos sanguíneos ou à presença de um corpo exógeno [Dee, 2002].

4.9.1 - Teste de hemólise

Para avaliar a biocompatibilidade dos filmes obtidos, recorreu-se ao estudo *in vitro* da hemocompatibilidade seguindo o procedimento da norma ASTM F 756-00 [Norma ASTM F 756-00, 2008]. De acordo com esta norma, os materiais podem ser classificados em três diferentes categorias de acordo com seu grau de hemólise (liberação da hemoglobina de eritrócitos completamente ou parcialmente danificados). Materiais com porcentagem de hemólise acima de 5% são considerados hemolíticos, materiais que possuem grau de hemólise entre 5% e 2% são classificados como ligeiramente hemolíticos e quando os materiais apresentam porcentagem de hemólise abaixo de 2% são considerados materiais não hemolíticos.

Mesmo que os materiais biocompatíveis não devam ser hemolíticos, na prática alguns dispositivos causam hemólise. Portanto, quando o grau de hemólise é alto é necessário levar em consideração se o benefício do material se sobrepõe aos valores de hemólise em limites aceitáveis [Mohy Eldin, 2012]. Foi mostrado anteriormente por Peppas [Peppas, 1977] que o PVA é um hidrogel biocompatível e tem grande potencial para uso em materiais biomédicos.

A Figura 4.17 mostra a razão de hemólise (%) para a amostra de PVA puro e de PVA com 1% de SEP. Quanto maior o valor da razão, maior a quantidade de eritrócitos danificados.

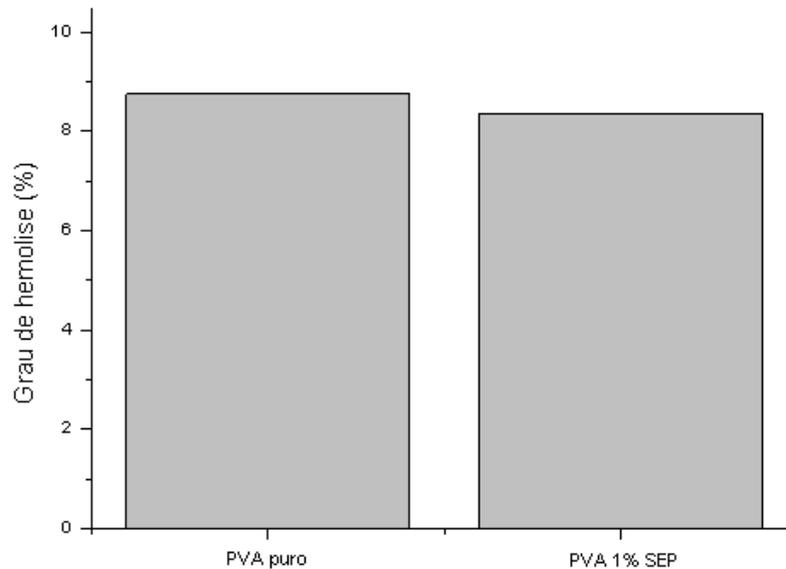


FIGURA 4.17: Grau de hemólise observado nos hidrogéis.

Os resultados mostram que a presença da argila causa uma pequena diminuição no processo de hemólise quando comparado com o hidrogel de PVA puro. Os hidrogéis apresentam um alto grau de hemólise (8%), porém este resultado não afetaria a eficácia de um *patch* polimérico de uso externo. O processo de lise da hemácia ocorre na sua superfície e se dá pela diferença na tensão superficial. Uma vez que as hemácias são mantidas estáveis em função do meio (tampão) qualquer processo de hemólise é associado à interação PVA-hemácia. Logo a SEP leva a uma diminuição da tensão superficial nas hemácias.

4.9.2 - Adsorção de albumina bovina sérica – BSA

A compatibilidade sanguínea também é regida pelas proteínas que são adsorvidas na superfície do material. Independente das propriedades das superfícies, quando um material entra em contato com o sangue há a adsorção de proteínas em sua superfície (Figura 4.18) [Balan, 2014]. Ainda segundo Balan, as proteínas podem interagir com a superfície via interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou por ligações hidrogênio. Labarre mostra que após a adsorção de proteínas de menor massa molecular, elas são substituídas por proteínas com maior massa molecular e maior afinidade com a superfície (efeito Vroman) [Labarre, 2001] e a camada de proteínas adsorvidas é reconhecida por receptores ativos das plaquetas.

As reações que seguem são representadas pela adesão plaquetária e subsequente formação de trombos [Balan, 2014], que será avaliado adiante.

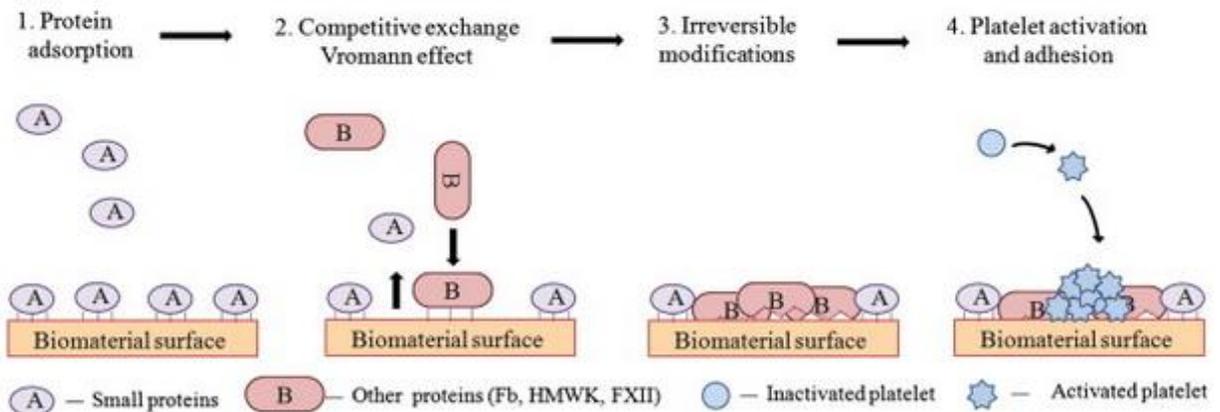


FIGURA 4.18: Esquema da adsorção de proteínas na superfície de materiais.

A albumina bovina sérica (BSA) possui massa de, aproximadamente, 65 kD e a albumina humana sérica (HSA) de 67 kD. As albuminas são as principais proteínas constituintes do sangue, representando cerca de 60% das proteínas [Carter, 1994]. Ela está envolvida em vários fenômenos físicos como portadora de proteínas para ácidos graxos, metais, colesterol, biles, hormônios e fármacos [Butnaru, 2012]. BSA é predominantemente carregada com cargas negativas [Carter, 1994; Noinville, 2006].

A Figura 4.19 mostra o teor de BSA adsorvida pela superfície do hidrogel puro de PVA e do hidrogel nanocompósito. Como pode ser observado, os hidrogéis com nanopartículas apresentam uma maior capacidade de adsorção da proteína. Importante lembrar que a argila é catiônica, justificando o maior teor de BSA adsorvida no hidrogel nanocompósito. Salzman e colaboradores mostraram que a capacidade de adsorção de proteínas plasmáticas pela superfície do material é inversamente proporcional à sua hidrofiliçidade. Visto que a hidrofiliçidade das membranas diminui com a adição de SEP, isto pode ser confirmado (ver seção 4.2) [Salzman, 1981].

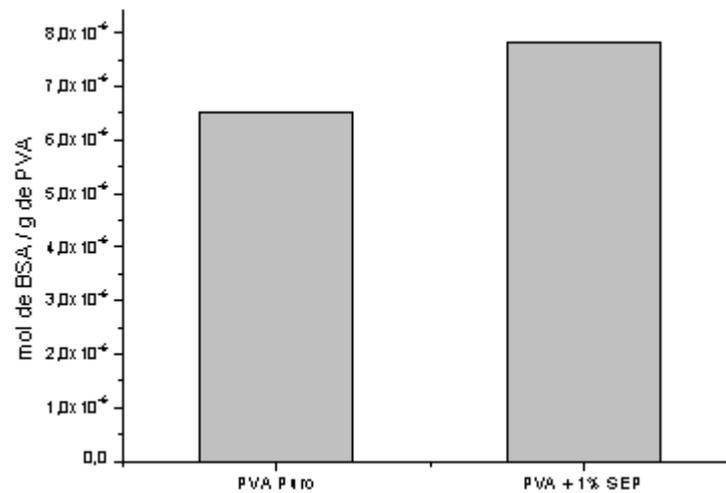


FIGURA 4.19: Capacidade de adsorção de BSA pelos hidrogéis.

4.9.3 - Formação de trombos

As análises de coagulação sanguínea (formação de trombos) são os testes mais utilizados para avaliar a hemocompatibilidade de um material. [Mbeh, 2015]. A coagulação é um fenômeno que resulta da ativação da cascata de coagulação.

Trombócitos são células que circulam no sangue e começam a se unir quando reconhecem uma veia com algum tipo de dano. Eles possuem um formato de pequenas placas quando estão desativados. Quando os trombócitos recebem o sinal de que o vaso está danificado eles vão até a área e se tornam ativos. Para isso eles “crescem” tentáculos [Williams, 2014], como mostra a Figura 4.18.

A Figura 4.20 mostra a razão de hemólise para amostras de PVA puro e de nanocompósito. Este primeiro teste foi feito em triplicata biológica, sendo que dois animais (2 e 3) eram da mesma espécie (Canchim) e cresceram no mesmo habitat.

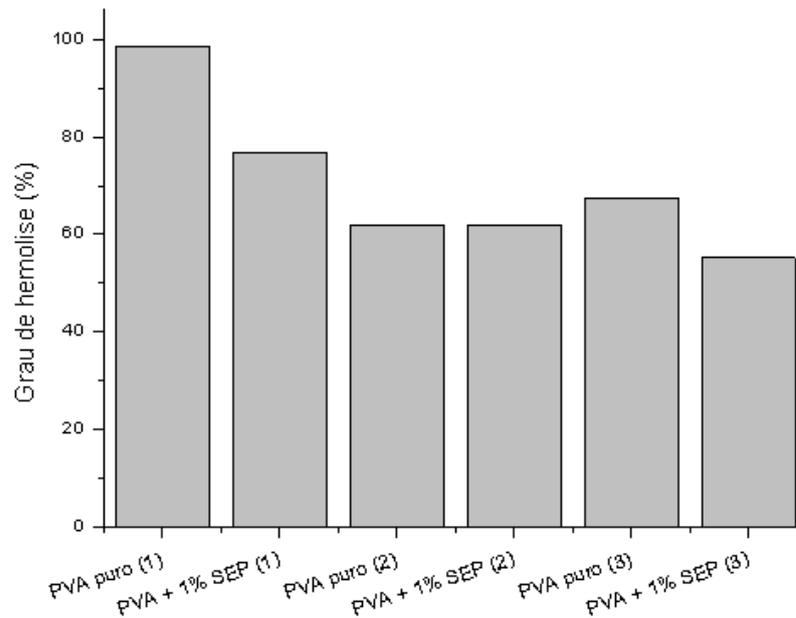


FIGURA 4.20: Grau de hemólise para os hidrogéis.

Pode-se notar que a presença de argila diminui o grau de hemólise. Neste caso, quanto maior o grau de hemólise melhor é a amostra, do ponto de vista da trombogenicidade, visto que a formação de trombos é menor. Porém os graus de hemólise para todas as amostras estão muito acima dos 5% descritos na literatura [Norma ASTM F 756-00, 2008]. Também podemos notar que o tipo de sangue influencia a análise. Enquanto os sangues doados pela Embrapa (2 e 3) tiveram um grau de hemólise abaixo de 70% o sangue doado pela Siltomac está acima deste valor.

Com o intuito de reavaliar a formação de trombos, pois as análises de hemólise para os sangues doados tinham sido muito elevadas, outros testes foram feitos com sangue de outro animal e os resultados obtidos podem ser vistos na Figura 4.21.

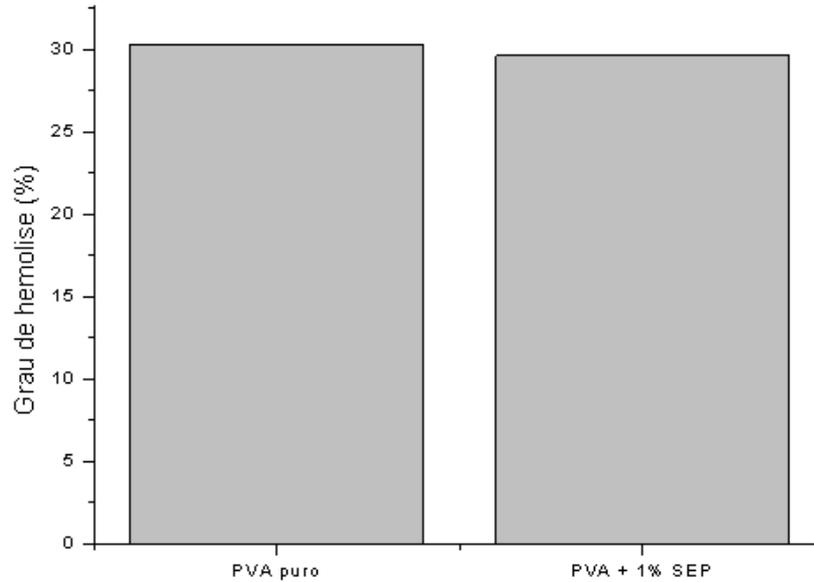


FIGURA 4.21: Reavaliação do grau de hemólise para os hidrogéis.

O grau de hemólise continua alto, apesar de ter diminuído consideravelmente, e pode-se notar que a SEP altera ligeiramente a formação de trombos na superfície da membrana, isso provavelmente se deve à sua superfície catiônica em contato com o íon Ca^{2+} , que desencadeia a cascata de coagulação, fazendo com que ocorra uma repulsão e o nanocompósito forme uma maior quantidade de trombos do que o hidrogel puro.

4.10 - Liberação do fármaco

Sistemas de liberação controlada de fármacos são formas farmacêuticas capazes de modificar o local e a taxa de liberação dos ativos no organismo, fazendo com que a concentração plasmática esteja em nível adequado e que a localização das moléculas ativas esteja em maior quantidade no local prejudicado pela doença [Villanova, 2010].

Em sistemas de liberação convencionais há desperdício da dose aplicada, pois apenas uma fração do princípio ativo atinge seu alvo e os custos, devido à necessidade de aumentar a quantidade de fármaco empregada, são mais elevados [Dash, 2012; Zamboni, 2008]. Assim o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada tem sido de grande interesse na área médica e farmacêutica,

pois possibilitam a redução dos custos e o aumento da aceitabilidade do tratamento pelo paciente, além de torná-lo mais eficaz e seguro.

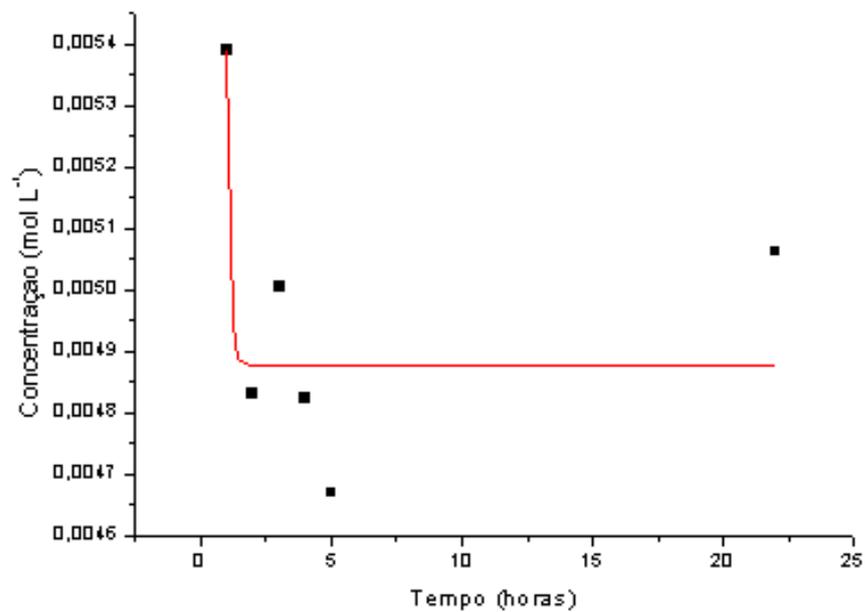
A liberação do fármaco envolve vários processos, como a penetração de água no dispositivo de liberação, degradação do polímero e/ou erosão da matriz polimérica, difusão do fármaco para o meio biológico, entre outros [Carbinatto, 2010].

O processo de liberação de um fármaco, assim como a taxa de degradação do material constituinte da matriz, depende de uma série de fatores, dentre eles: o tipo de dispositivo desenvolvido, seu tamanho e morfologia, a estrutura da matriz que contém o fármaco, as propriedades químicas relacionadas ao agente terapêutico, os materiais utilizados na formulação e a via de administração empregada, uma vez que o local de administração também influencia no perfil de liberação do fármaco devido às diferentes condições do meio, como pH e atividade enzimática [Francis, 2011; Freiberg, 2004].

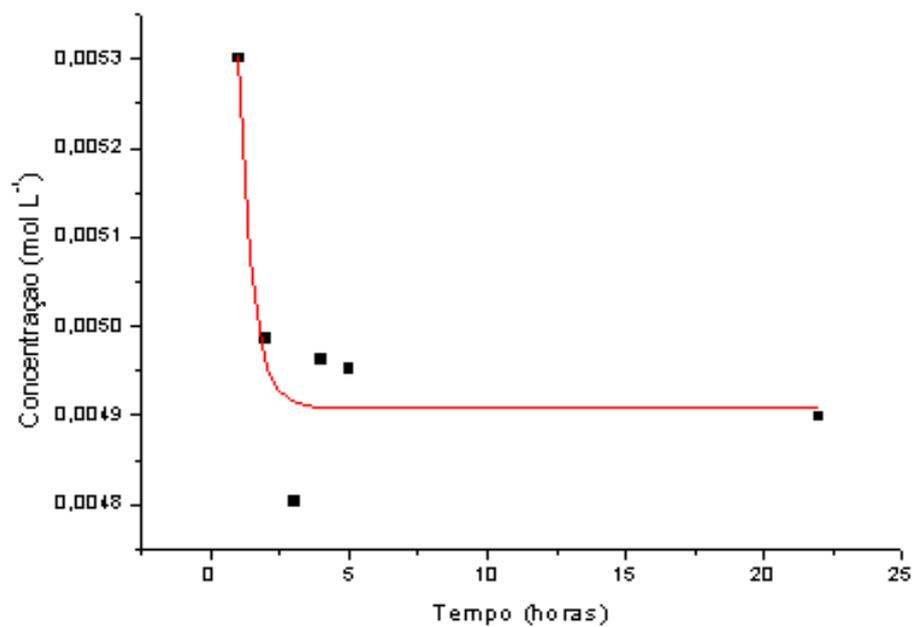
Um perfil de liberação ideal proporciona uma liberação de ativos constante com o tempo. Mas, geralmente os perfis de liberação envolvem um primeiro processo denominado efeito “burst”, que se caracteriza pela liberação inicial do agente ativo que está adsorvido na superfície externa da partícula, e um segundo processo, caracterizado por taxas de liberação aproximadamente constantes que dependem da degradação da matriz e/ou da difusão do ativo, sendo esta possível de ocorrer através de poros presentes na matriz constituinte do dispositivo de liberação [Freiberg, 2004].

A liberação de fármacos solúveis em água de matrizes de hidrogel envolve a absorção de água e a sua desorção da matriz polimérica via mecanismos de difusão controlada por inchamento, ou seja, a água penetra no hidrogel contendo o medicamento por mecanismos de difusão, a droga dissolvida pela água difunde através do hidrogel até o meio externo. Esta difusão e o inchamento geralmente não seguem o mecanismo de difusão Fickiana. A existência da relaxação molecular junto com a difusão podem ser os responsáveis por este comportamento [Lee, 1985].

A Figura 4.22 mostra as médias das triplicatas das concentrações liberadas do fármaco pelos sistemas poliméricos testados.



a)



b)

FIGURA 4.22: Concentração de paromomicina nos sistemas: a) PVA puro; b) PVA + 1% SEP.

Pode-se observar uma diminuição da concentração do fármaco com o tempo para ambos os sistemas estudados. Para comparação foi realizado um teste de difusão de Kirk-Bauer em placas para analisar a suscetibilidade da bactéria *Staphylococcus epidermidis* ao fármaco liberado.

A Figura 4.23 mostra como ficaram as placas na primeira hora e na segunda hora de liberação.

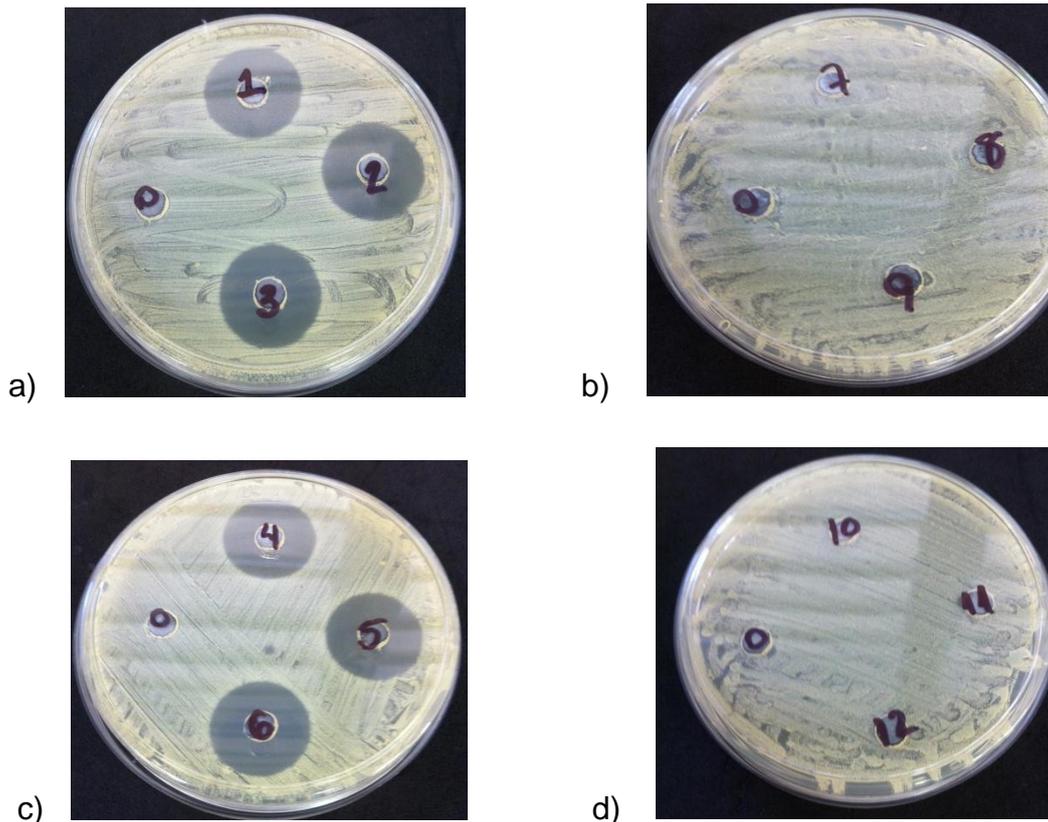


FIGURA 4.23: Teste de sensibilidade aos antimicrobianos: a) e b) primeira hora e segunda hora, respectivamente, de liberação de paromomicina para hidrogel de PVA puro; c) e d) primeira hora e segunda hora de liberação para hidrogel com 1% de SEP.

Como pode-se notar apenas a primeira hora de liberação obteve concentração mínima para inibir a proliferação da bactéria através da placa, para a membrana pura e para a com nanopartícula. Isso pode ser explicado pelo efeito Burst; após isso não foi mais obtida concentração mínima inibitória (MIC) do medicamento liberado que, para o caso da paromomicina, é $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ou $1,40 \cdot 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para o sistema apresentado na literatura [Santanam, 1976]. Porém seria necessário um estudo detalhado da liberação dos hidrogéis em estudo para que fosse avaliada a MIC neste caso, pois há interação da paromomicina com os sistemas, como apresentado na seção 4.8. Para as horas subsequentes não foi observada formação do halo inibitório.

Segundo o guia de testes de suscetibilidade [Rosco, 2008] a paromomicina possui uma afinidade química próxima da neomicina, portanto ela

pode ser avaliada através deste antibiótico que também é um aminoglicosídeo. Ainda segundo o guia o tamanho do halo de inibição para a neomicina quando é menor que 20 mm a bactéria é resistente; entre 21-24 mm é intermediário e acima de 25 mm ela é suscetível ao antibiótico. A Tabela 4.13 apresenta a medida dos halos apresentados na Figura 4.23.

TABELA 4.13: Halos formados pela liberação da paromomicina.

	Amostra	Halo de inibição (mm)
PVA puro	1	23
	2	23
	3	21
PVA + 1% SEP	4	22
	5	23
	6	21

Os resultados obtidos mostram que a bactéria foi resistente ao antibiótico de maneira intermediária. A técnica de difusão em poços é de fácil reprodutibilidade, pois sabemos exatamente quanto de antibiótico foi colocado em cada poço. Assim os resultados apresentados são confiáveis.

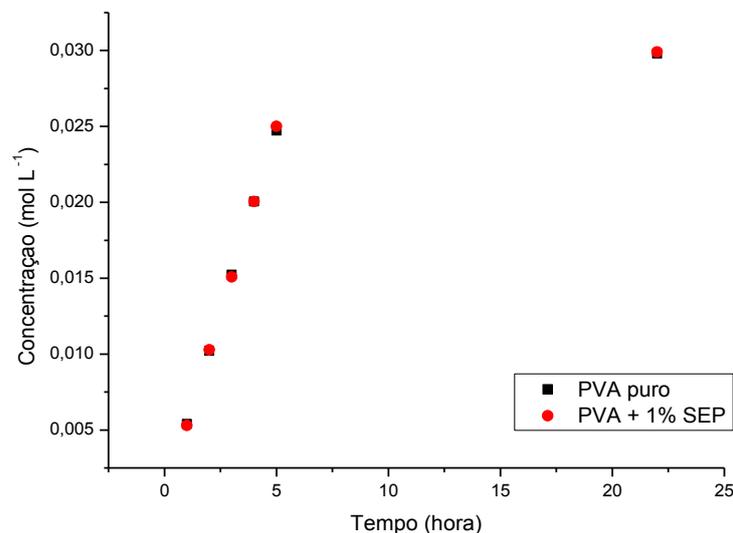


FIGURA 4.24: Liberação acumulada da paromomicina.

A Figura 4.24 mostra a liberação contínua da paromomicina. Pode-se notar que a SEP não altera o perfil da liberação Conforme os dados do inchamento

previamente apresentados, por se tratar de um processo Fickiano, a presença da SEP afeta mais o transporte da água do que o do fármaco.

5 - Conclusões

1. De acordo com os resultados deste trabalho, foram obtidas membranas de poli(álcool vinílico) contendo diferentes teores (1; 2,5 e 5%) de nanopartículas de sepiolita. Estes hidrogéis foram preparados com 1, 3 e 5 ciclos de criogelificação a partir de dispersão aquosa da argila.
2. As análises de difração de raios-X apresentam diferentes intensidades no pico $2\theta = 6,9^\circ$, referente ao plano cristalográfico (1 1 0) da sepiolita, mostrando sua incorporação nas diferentes matrizes poliméricas.
3. Os resultados de inchamento mostraram que quanto maior a quantidade de ciclos de criogelificação, maior será a porcentagem de inchamento da membrana em estudo.
4. As análises de calorimetria diferencial exploratória mostraram que quanto maior a quantidade de ciclos de criogelificação, maior o grau de cristalinidade da amostra.
5. A partir dos resultados das análises térmicas, pode-se notar que a presença dos diferentes teores de nanopartícula não leva a alteração dos perfis de degradação das amostras e não aumenta a estabilidade térmica do material produzido. Além disso, foi possível notar que a presença da sepiolita aumenta a rigidez da fase amorfa da amostra, comprovando que a presença de cargas inorgânicas tende a diminuir a mobilidade dos segmentos das cadeias poliméricas.
6. Foi feita uma análise quimiométrica dos dados para obter-se a amostra com maior grau de inchamento para aumento intrínseco da biocompatibilidade e maior grau de cristalinidade para maior resistência mecânica das membranas. A amostra com 1% de sepiolita e 5 ciclos de criogelificação apresentou máxima resposta para ambos.
7. Os resultados obtidos através do estudo do estado da água presente nos hidrogéis evidencia a presença de diferentes tipos de água que congelam/fundem a temperaturas diferentes da água deionizada, mostrando que existem diferentes interações entre o PVA, a SEP e o sulfato de paromomicina.
8. Os sistemas estudados se mostraram hemocompatíveis. Devido à superfície catiônica da argila, o grau de hemólise e a formação de trombos diminuem

com a incorporação desta; já a capacidade de adsorção de proteínas aumenta nos hidrogéis nanocompósitos quando comparados ao hidrogel puro. Mesmo apresentando valores de hemólise da ordem de 8%, estes resultados não afetariam a eficácia de um *patch* polimérico de uso externo.

9. Os testes de liberação do sulfato de paromomicina mostraram que os hidrogéis atuaram como dispositivo de liberação controlada e que a nanopartícula de sepiolita não altera o perfil de liberação do fármaco pela matriz polimérica.
10. Frente aos objetivos propostos no início desta investigação, pode-se concluir que hidrogéis criogelificados de PVA apresentam uma boa resposta à liberação do sulfato de paromomicina. Foi possível verificar que a presença da nanopartícula de sepiolita leva a um controle sobre a morfologia e a capacidade de transporte de água, sem alterar o perfil de liberação do fármaco. Portanto este sistema pode ser considerado viável para o desenvolvimento futuro de dispositivos tópicos para terapêutica da leishmaniose cutânea.

6 - Referências bibliográficas

AGUIAR, M. R.; NOVAES, A. C. “Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos”. *Quim. Nova*, **25**: 1145–1154, 2002.

ALKAN, M.; BENLIKAYA, R. “Poly(vinyl alcohol) Nanocomposites with Sepiolite and Heat-Treated Sepiolites”. *J. Appl. Polym. Sci.* , 3764–3774, 2009.

ARANHA, I. B.; LUCAS, E. F. “Poli(álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo”. *Polímeros*, 11 (4): 174–181, 2001.

ASHFORD, R. W. “The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses”. *Int. J. Parasitol.*, **30**: 1269–1281, 2000.

BAJPAI, A.K.; SHUKLA, S. K.; BHANU, S.; KANKANE, S. “Responsive polymers in controlled drug delivery”. *Prog. Polym. Sci.* , **33**: 1088–1118, 2008.

BALAN, V.; VERESTIUC, L. “Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review”. *Eur. Polym. J.*, **53**: 171–188, 2014.

BARRET, M. P; CROFT, S. L. “Management of trypanosomiasis and leishmaniasis”. *Brit. Med. Bull.*, **104**: 175–196, 2012.

BROMBERG, L. E.; RON, E. S. “Temperature-responsive gels and thermogelling polymer matrices for protein and peptide delivery”. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **31**: 197–221, 1998.

BUTNARU, M.; BREDETEAN, O. MACOCINSCHI, D.; DIMITRIU, C. D.; KNIELING, L.; HARABAGIU, V. Polyurethane – Chapter 10: Biocompatibility and Biological Performance of the Improved Polyurethane Membranes for Medical Applications. Romania: Intech, 2012. 480 p.

CANAL, T.; PEPPAS, N. A. “Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks”. *J. Biomed. Mater. Res.*, 23 (10): 1183–1983, 1989.

CARBINATTO, F. M. Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Dissertação de mestrado. 111 p. Araraquara, 2010.

CARRADO, K. A.; THIYAGARAJAN, P., ELDER, D. L. “Polyvinyl alcohol-clay complexes formed by direct synthesis”. *Clay. Clay. Miner.* , **44**: 506–514, 1996.

CARRETERO, M. I. “Clay minerals and their beneficial effects upon human health”. *Appl. Clay Sci.* , **21**: 155 – 163, 2002.

- CASCONE, M.G., MALTINTI, S., BARBANI, N. "Effect of chitosan and dextran on the properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels. *J. Mater. Sci-Mater. M.*, **10**: 431–435, 1999.
- CARTER, D. C.; HO, J. X. "Structure of serum albumin." *Adv. Protein Chem.*, **45**: 153–203, 1994.
- COELHO, A. C.; SANTOS, P. S. "Argilas especiais: o que são, caracterização e propriedades". *Quim. Nova*, 30 (1): 146–152, 2007.
- CRANK, J. "Mathematics of diffusion". Oxford: Oxford University Press, 1975. 414 p.
- CRUISE, G. M.; SHARP, D. S.; HUBBELL, J. A. "Characterization of permeability and network structure of interfacially photopolymerized poly(ethylene glycol) diacrylate hydrogels". *Biomaterials*, 19(14):1287–1294 , 1998.
- DASH, T. K.; KONKIMALLA, V. B. "Poly-ε-caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review". *J. Control. Release.*, 158: 15–33, 2012.
- DEE, K. C., PULEO, D. A., BIZIOS, R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. 1st Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 248 p.
- DEPS, P.D.; VIANA, M. C.; FALQUETO, A.; DIETZE, R. "Avaliação comparativa da eficácia e toxicidade do antimoniato de N-metil-glucamina e do Estibogluconato de Sódio BP88® no tratamento da leishmaniose cutânea localizada". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **33**: 535–543, 2000.
- DESJEUX, P. "The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **95**: 239–243, 2001.
- DINARVAND, R.; D'EMANUELE, A. "The use of thermoresponsive hydrogels for on-off release of molecules". *J. Control. Release*, 36 (3): 221–227, 1995.
- FICEK, B. J.; PEPPAS, N. A. "Novel preparation of poly (vinyl alcohol) microparticles without crosslinking agent for controlled drug delivery of proteins". *J. Control. Release*, **21**: 259–264, 1993.
- FILHO, E. R. P. *Planejamento fatorial em química: Maximizando a obtenção de resultados*. São Carlos: EdUFSCar, 2015. 88 p.
- FINCH, C. A. *Polyvinyl alcohol, properties and applications*. New York: Wiley, 1973. 622 p.
- FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz. *As leishmanioses*. Laboratório de Imunomodulação, Departamento de Protozoologia – IOC/FIOCRUZ, 2007. Disponível em: <<http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/tratamento.htm>>. Acesso em maio/2015.
- FRAGA, V. F. "Derivatização da pentamidina". Porto Alegre, 2007, 36 p.

FRANCIS, L.; MENG, D.; KNOWLES, J.; KESHAYARZ, T.; BOCCACCINI, A. R.; ROY, I. "Controlled Delivery of Gentamicin Using Poly(3-hydroxybutyrate) Microspheres". *Int. J. Mol. Sci.*, **12**: 4294–4314, 2011.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. "Polymer microspheres for controlled drug release". *Int. J. Pharm.*, **282**: 1–18, 2004.

GILMAN, J. W.; KASHIWAGI, T. *Polymer-layered silicate nanocomposites with conventional flame retardants. Polymer-clay nanocomposites*. Chichester: John Wiley & Sons, 2000. 349 p. p. 193–206.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. "American cutaneous leishmaniasis". *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **36**: 71–80, 2003.

GOMES, S. F. O.; NUNAN, E. A.; FERREIRA, L. A. M. "Influence of the formulation type (o/w, w/o/w emulsions and ointment) on the topical delivery of paromomycin". *Braz. J. Pharm. Sci.*, **40** (3): 345–352, 2004.

GORBET, M. B.; SEFTON, M. V. "Biomaterial-associated thrombosis: roles of coagulation factors, complement, platelets and leukocytes". *Biomaterials*, **25**: 5681–5703, 2004.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. "Hydrogel nanoparticles in drug delivery". *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **60**: 1638–1649, 2008.

HARAGUCHI, K.; TAKEHISA, T.; SIMON, F. "Effects of clay content on the properties of nanocomposite hydrogels composed of poly (N-isopropylacrlamide) and clay". *Macromolecules*, **35**: 10162–10171, 2002.

HASSAN, C. M.; STEWART, J. E.; PEPPAS, N. A. "Diffusional characteristics of freeze/thawed poly(vinyl alcohol) hydrogels: Applications to protein controlled release from multilaminate devices". *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **49**: 161–165, 2000.

HICKEY, A. S.; PEPPAS, N. A. "Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques". *J. Membrane Sci.* **107**: 229–237, 1995.

HOFFMAN, A. S. "Hydrogels for biomedical applications." *Adv. Drug. Deliver. Ver.*, **43**: 3–12, 2002.

ISHIHARA, K.; KOBAYASHI, M.; SHIONOHARA, I. "Control of insulin permeation through a polymer membrane with responsive function for glucose". *Makromol. Chem.*, **4**: 327–331, 1983.

KIKUCHI, A.; OKANO, T. "Pulsatile drug release control using hydrogels". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54** (1): 53–77, 2002.

- KILLEEN, D.; FRYDRYCH, M.; CHEN, B. "Porous poly(vinyl alcohol)/sepiolite bone scaffolds: Preparation, structure and mechanical properties". *Mater. Sci. Eng.*, 32(4): 749–757, 2012.
- KOKUBO, T. "Bioactive glass ceramics: properties and applications". *Biomaterials*, 12: 155–163, 1991.
- KOKABI, M.; SIROUSAZAR, M.; HASSAN, Z. M. "PVA–clay nanocomposite hydrogels for wound dressing". *Eur. Polym. J.*, 43(3): 773–781, 2007.
- LABARRE, D. "Improving blood compatibility of polymeric surfaces". *Trends Biomater. Artif. Organs*, 15: 1–3, 2001.
- LAY, J. Y.; CHEN, Y. C.; HSU, K. Y. "Nylon4/PVA blend membrane for dialysis". *J. Appl. Polym. Sci.*, 43: 1795–1804, 1991.
- LEE, P. I. "Kinetics of drug release from hydrogel matrices". *J. Control. Release*, 2: 277–288, 1985.
- LEITÃO, A. F.; GAMA, M. "Polímeros e próteses vasculares". *Soc. Port. Biotec.* 4(2): 9–11, 2013.
- LI, J. K.; WANG, N.; WU, X. S. "Poly(vinyl alcohol) nanoparticles prepared by freezing–thawing process for protein/peptide drug delivery". *J. Control. Release*, 56: 117–126, 1998.
- LI, W.; XUE, F. CHENG, R. "States of water in partially swollen poly(vinyl alcohol hydrogels)". *Polymer*, 46: 12026–12031, 2005.
- LIN, C. C.; METTERS, A. T. "Hydrogels in controlled release formulations: network design and mathematical modeling". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 58 (12-13): 1379-1408, 2006.
- LÓPPEZ-JARAMILLO, P.; RYCIÓN, M. Y.; GARCÍA, R. G.; SILVA, S. Y.; SMITH, E.; KAMPEERAPAPPUN, P.; GARCÍA, C.; SMITH, D. J.; LÓPEZ, M.; VÉLEZ, I. D. " A controlled, randomized-blinded clinical trial to assess the efficacy of a nitric oxide releasing *patch* in the treatment of cutaneous leishmaniasis by *leishmania (v.) panamensis*". *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 83(1): 97–101, 2010.
- LOZINSKI, V. I.; GALAEV, I. Y.; PLIEVA, F. M.; SAVINA, I. N.; JUNGVID, H.; MATTIASSON, B. "Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest". *Trends Biotechnol.* 21: 445-451, 2003.
- LUZ, A. B.; ALMEIDA, S. L. M. Atapulgita e sepiolita. *Rochas & Minerais Industriais: Usos e Especificações Rochas e Minerais Industriais*. Rio de Janeiro, 2005 p. 201–215.

MACHADO-COELHO, G. L. L.; CAIAFFA, W. T.; GENARO, O.; MAGALHÃES, P. A.; MAYRINK, W. "Risk factors for mucosal manifestations of American cutaneous leishmaniasis". *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **99**: 55–61, 2005.

MASSAO NAMBU. "Freeze-dried poliviny alcohol gel". CI 523-309.000. Japanese patent N° 4,472,542. 18 Set. 1984. Official Gazette of the United States and Trademark.

MATIN R. N. "Cutaneous Leishmaniasis – treatment options in children". *Brit. J. Dermatol.* , **172**: 844, 2015.

MBEH, M. A.; NASCIMENTO, R. O. Shape memory polymers for medical applications – Biocompatibility of shape-memory polymers for biomedical applications. Cambridge: Woodhead publishing, 2015. 301 p. p. 77–90

Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª Edição. Ed. Ministério da Saúde, 2007. 182 p.

MIYATA, T.; URAGAMI, T.; NAKAMAE, K. "Biomolecule-sensitive hydrogels". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 54 (1): 79–98, 2002.

MOHY ELDIN, M.S.; SOLIMAN, E.A.; HASHEM, A.I.; TAMER, T.M. Biopolymer Modifications for Biomedical Applications, Infrared Spectroscopy - Life and Biomedical Sciences. Croácia: InTech, 2012. 368 p.

MOREIRA, K. D. Efeito Do Polímero Hidratassolo Sobre Propriedades Físico-Químicas Em Solução Nutritiva No Desenvolvimento Da Cebolinha (*Allium Fistulosum* L.). Maranhão, 2011. p. 15–17.

NIELSEN, L. E. Mechanical properties of polymers and composites, vol. 2. New York: Marcel Dekker, 1974. 556 p. p. 379–452.

NOINVILLE, S.; REVAULT, M. Conformations of Proteins Adsorbed at Liquid–Solid Interfaces. In *Proteins at Liquid – Solid Interfaces (Principle and Practice)* Berlin: Springer, 2006. p. 119–150.

NORMA ASTM F 756-00 (2008): Standard practice for assessment of haemolytic properties of materials. American Standard for Testing Materials.

OLIVEIRA, M. J. A. "Obtenção de membranas de hidrogéis para tratamento alternativo da leishmaniose tegumentar". 2013. 141. Tese. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN, São Paulo. 2013.

OKAY, O.; LOZINSKY V. I. *Polymeric Cryogels: Macroporous Gels with Remarkable Properties*. Russia: Springer, 2014. v. 263.

PARANHOS, C. M. *Preparo E Caracterização De Hidrogéis Nanocompósitos Baseados Em Poli(Álcool Vinílico)*. Rio de Janeiro, Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano – UFRJ, 2007. Tese de doutorado, 187 p.

PARANHOS, C. M.; SOARES, B. G.; OLIVEIRA, R. N.; PESSAN, L. A. "Poly(vinyl alcohol)/clay-based nanocomposite hydrogels: swelling behavior and characterization". *Macromol. Mater. Eng.* , **292**: 620–626, 2007.

PARANHOS, C. M.; GOMES, A. C. O.; PESSAN, L. A. "Poly(vinyl alcohol)/sulfonated polyester hydrogels produced by freezing and thawing technique: preparation and characterization". *Mater. Res.* , **10**: 43–46, 2007.

PARANHOS, C. M.; GOMES, A. C. O.; PESSAN, L. A. *Preparo e caracterização de membranas poliméricas de matriz mista nanocompósito baseadas em policarbonato*, 10., 2009. Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu: Congresso Brasileiro de Polímeros, 2009. 9 p.

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

PEPPAS, N. A.; STAUFFEF, S. R. "Review Article Reinforced uncrosslinked poly (vinyl alcohol) gels produced by cyclic freezing-thawing processes: a short review" *J. Control. Release.*, **16**: 305-310, 1991.

PHILLIPS, M. A., STANLEY, S. L. "Quimioterapia das infecções por protozoários. In: Goodman e Gilman: *As bases farmacológicas da terapêutica*". Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2006. p. 941–961.

PINES, E.; PRINS, W. "Structure-property relations of thermoreversible macromolecular hydrogels". *Macromolecules.*, 6(6): 888–895, 1973.

PING, Z. H.; NGUYEN, Q. T.; CHEN, S. M.; ZHOU, J. Q.; DING, Y. D. "States of water in diferente hydrophilic polymers – DSC and FTIR studies". *Polymer*, **42**: 8461–8467, 2001.

QIU, Y.; PARK, K. "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **53**: 321–339, 2001.

RICCIARDI, R.; MANGIAPIA, G.; CELSO, F. L.; PADUANO, L.; TRIOLO, R.; AURIEMMA, F.; ROSA, C.; LAUPRÊTRE, F. "Structural organization of poly(vinyl alcohol) hydrogels obtained by freezing and thawing techniques: a SANS study". *Chem. Mater.*, 17(5): 1183–1189, 2005.

ROSCO DIAGNÓSTICA. *User's guide neo-sensitabs™ susceptibility testing*. 19th ed. 2007. 170 p.

RYAN, J.A. "Colorimetric determination of gentamicin, kanamycin, tobramycin, and amikacin aminoglycosides with 2,4-dinitrofluorobenzene". *J. Pharm. Sci.*, 73 (9): 1301, 1984.

SALAH, A. B.; MESSAOUD, N. B.; GUEDRI, E.; ZAATOUR, A.; ALAYA, N. B.; BETTAIEB, J.; GHARBI, A.; HAMIDA, N. B.; CHLIF, S.; ABDELHAMIB, K.; AHMADI, Z. E.; LOUZIR, H.; MOKNI, M.; MORIZOT, G.; BUFFET, P.; SMITH, P. L.; KOPYDLOWSKI, K. M.; KREISHMAN-DEITRICK, M.; SMITH, K. S.; NIELSEN, C. J.; ULLMAN, D. R.; NORWOOD, J. A.; THOME, G. D.; MCCARTHY, W. F.; ADAMS, R. C.; RICE, R. M.; TANG, D.; BERMAN, J.; RANSOM, J.; MAGILL, A. J.; GROGL, M. "Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis". *New Engl. J. Med.*, 7: 524–532, 2013.

SALZMAN, E. W.; BRIER-RUSSEL, D.; LINDON, J.; MERRILL, E. W. *Platelets and artificial surfaces: the effects of drugs in Interactions between platelets and vessel walls* Born. London: The Royal Society, 1981. p. 173–182.

SANTANAM, P.; KAYSER, F. H. "Tobramycin Adenylyltransferase: A New Aminoglycoside-Inactivating Enzyme from *Staphylococcus epidermidis*". *J. Infect. Dis.*, 134: 33–39, 1976.

SANTOS, A. M.; NORONHA, E. F.; FERREIRA, L. A. M.; CARRANZA-TAMAYO, C. O.; CUPOLILLO, E.; ROMERO, G. A. S. "Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente". *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, 41(5): 444–448, 2008.

SEPIOLITA. Instituto Nacional e de Tecnologías Educativas y de Formación del Profesorado, Governo de España. Disponível em <<http://platea.pntic.mec.es/~cmarti3/INSTAL/TOLSA/mineral.htm>>. Acesso em maio/2015.

SERAFIM, M. C.; GOBBI, C. M. S.; MILANESE, F. E.; BARBOSA, L. H.; MILANESE, M. E. B. "A utilização da forma farmacêutica transdérmica como possibilidade terapêutica na medicina antroposófica". *Arte Med. Ampl.*, 33 (4): 153–159, 2013.

SHAKYA, A. K.; HOLMDAHL, R.; NANDAKUMAR, K. S.; KUMAR, A. "Polymeric cryogels are biocompatible, and their biodegradation is independent of oxidative radicals". *J. Biomed. Mater. Res.*, 102(10): 3409–3418, 2013.

Sigma-Aldrich: Reagentes bioquímicos, 2004-2005. São Paulo, 2004. p. 1538.

Situação epidemiológica – dados. Disponível em <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>>. Acesso em Jun/2015

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. "Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos" *Rev. Bras. Cienc. Farm.* 40 (2): 139–149, 2004.

SOSA, N.; CAPITÁN, Z.; NIETO, J.; CALZADA, J.; PAZ, H.; SPADAFORA, C.; KREISHAMN-DEITRICK, N.; KOPYDLOWSKI, K.; ULLMAN, D.; MCCARTHY, W. F.; RANSOM, J.; BERMAN, J.; SCOTT, C.; GROGL, M. "Randomized, Double-Blinded, Phase 2 Trial of WR 279,396 (Paromomycin and Gentamicin) for Cutaneous Leishmaniasis in Panama". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 89(3): 557–563, 2013.

STAUFFER, S. R.; PEPPAS, N. A. "Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cyclic processing". *Polymer*, 33(18): 3932–3936, 1992.

STAMATIALIS, D. F.; PAPPENBURG, B. J.; GIRONÉS, M.; SAIFUL, S.; BETTAHALLI, S. N. M.; SCHMITMEIER, S.; WESSLINGM. "Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering". *J. Membrane Sci.*, **308**: 1–34, 2008.

SVS/MS – Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde. Situação epidemiológica das zoonoses de interesse para a saúde pública. Boletim Eletrônico Epidemiológico, Ano 10, número 2, 2010. Disponível em <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf>. Acesso em jun/2015.

USP - Pharmacopeial Forum 36(6), 2010. Disponível em <http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/antibioticsMicrobialAssays.pdf>. Acesso em abr/2015.

VERA, C. R. C. Síntesis de hidrogeles interpenetrados en base a acrilammida para la recuperación de metales en aguas. 2012. 126 p. Dissertação. Universidad de Simón Bolívar, Sartenejas. 2012.

VIÇOSA, A. L.; GOMES, A. C. O.; SOARES, B. G.; PARANHOS, C. M. "Effect of sepiolite on the physical properties and swelling behavior of rifampicin-loaded nanocomposite hydrogels". *Express Polym. Lett.*, 3(8): 518–524, 2009.

VILLANOVA, J. C. O.; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. "Aplicações Farmacêuticas de Polímeros". *Polímeros*, 20 (1): 51–64, 2010.

WICHTERLE, O.; LIM, D. "Hydrophilic Gels for Biological Use". *Nature*, **185**: 117–188, 1960.

WILLIAMS, M. Heart and vascular institute - Johns Hopkins Medicine. Disponível em <http://www.hopkinsmedicine.org/heart_vascular_institute/clinical_services/centers_excellence/womens_cardiovascular_health_center/patient_information/health_topics/p_latelets.html>. Acesso em set/2015.

WILLCOX, P. J.; HOWIE, D. W.; SCHMIDT-ROHR, K.; HOAGLAND, D. A.; GIDO, S. P.; PUDJIJANTO, S.; KLEINER, L. W.; VENKATRAMAN, S. "Microstructure of

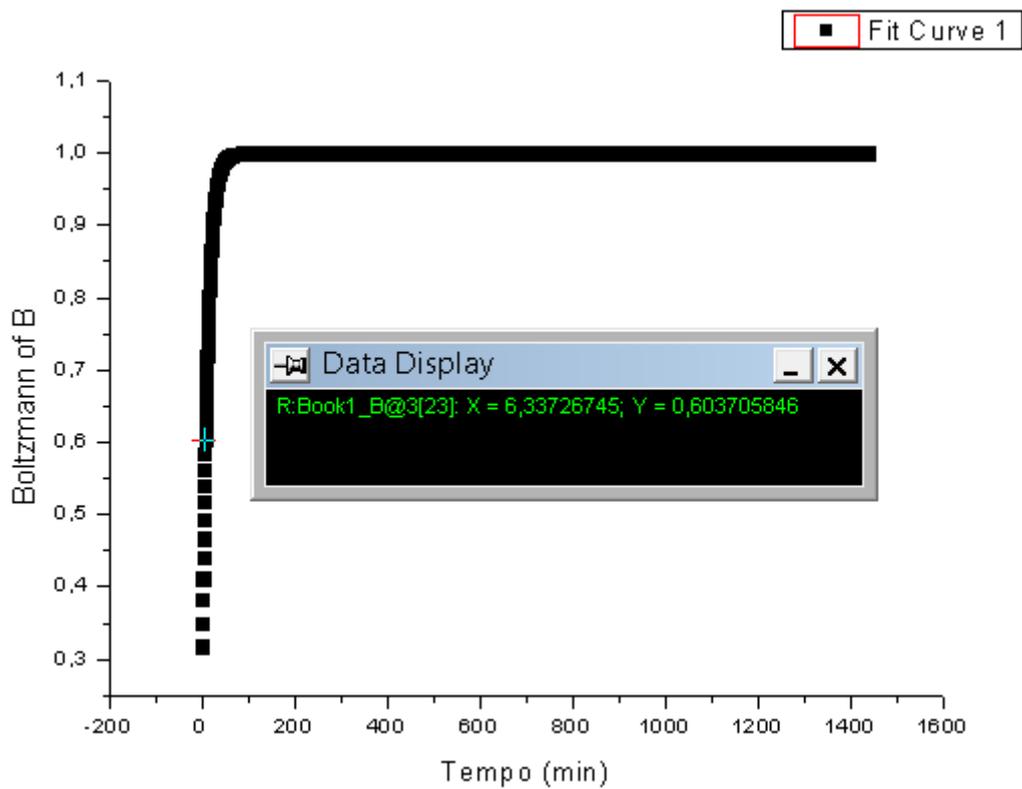
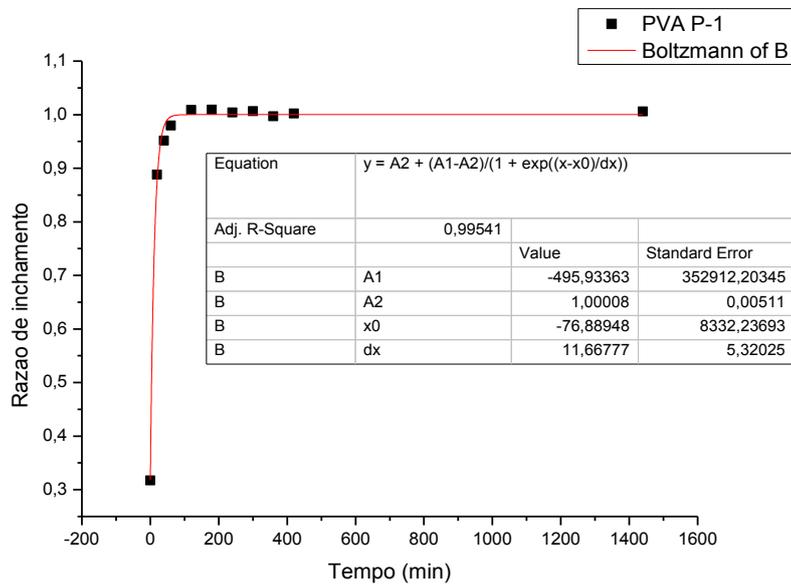
poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by freeze/thaw cycling”. *J. Polym. Sci. Pol. Phys.*, **37**(24): 3438–3454, 2000.

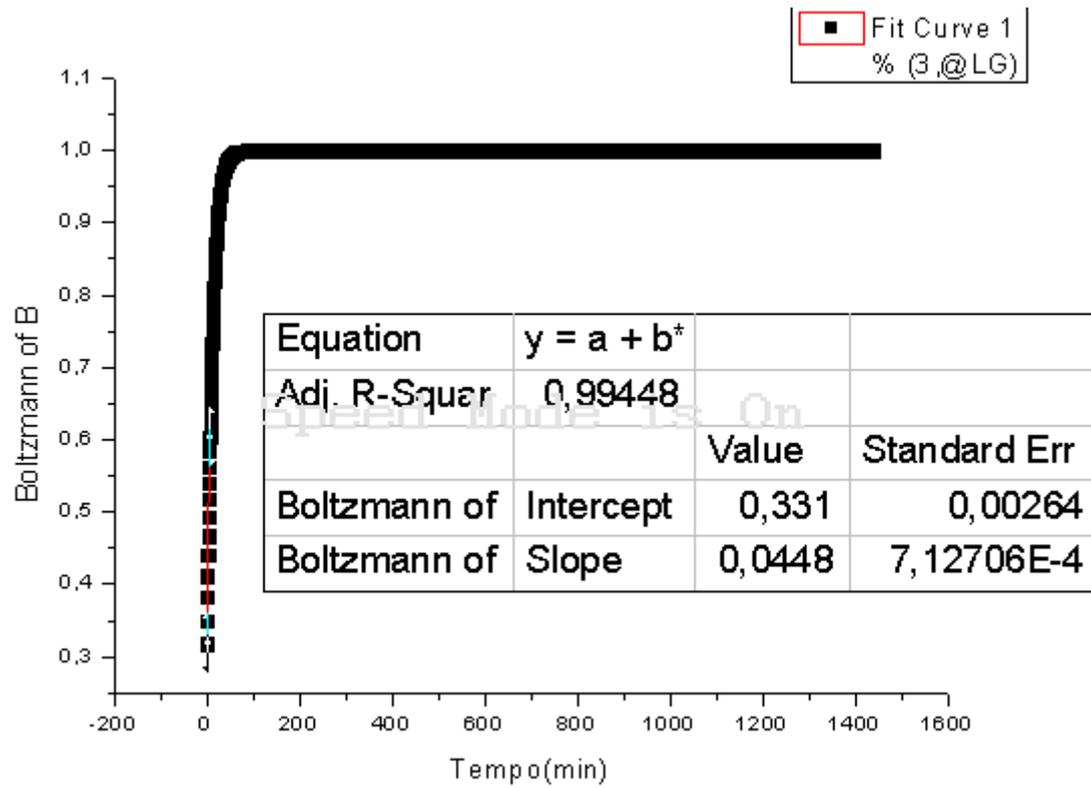
WHO – World Health Organization. Neglected tropical diseases, hidden successes, emerging opportunities. WHO/HTM/NTD, 2009. Disponível em <http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241598705_eng.pdf>. Acesso em maio/2015.

YU, Y. H.; LIN, C. Y.; YEH, J. M.; LIN, W. H. “Preparation and properties of poly(vinyl alcohol) – clay nanocomposite materials”. *Polymer*, **44**: 3553–3560, 2003.

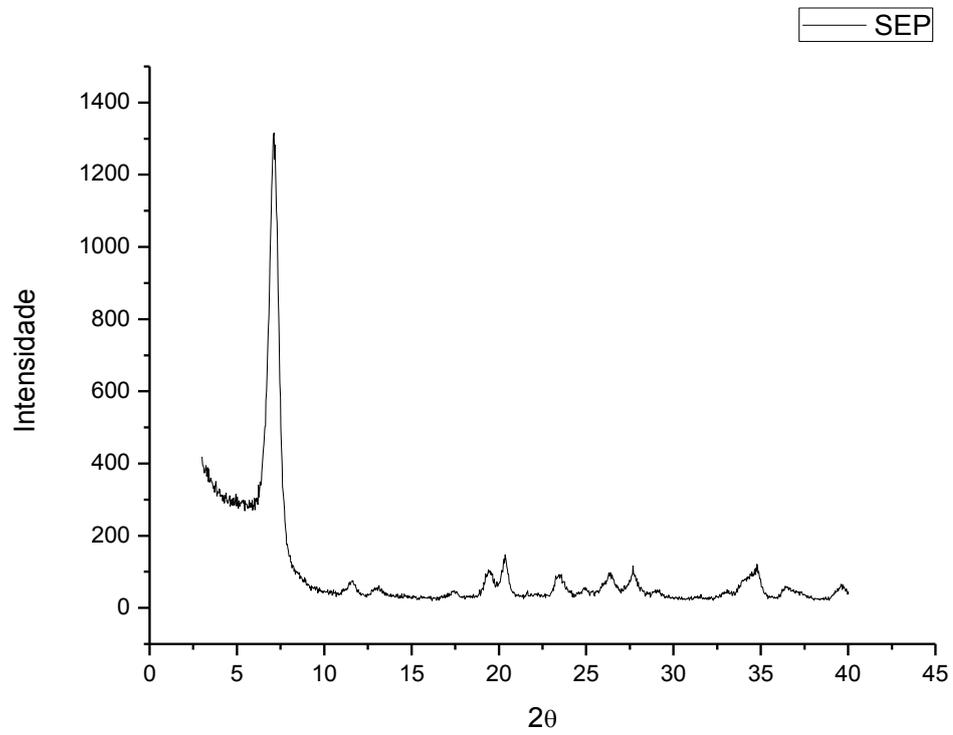
ZAMBONI, W. C. “Concept and Clinical Evaluation of Carrier-Mediated Anticancer Agents”. *Onconologist*, **13**: 248–260, 2008.

Anexo I - Cálculo do parâmetro n





Anexo II - DRX de Sepiolita pura



Anexo III - Curva de calibração para o sulfato de paromomicina

