

INTRODUÇÃO

Os polímeros tornaram-se importantíssimos para aplicação em engenharia de materiais bem como sua utilização na medicina e na indústria farmacêutica.

Na medicina os polímeros têm aplicações indispensáveis, desde um pequeno frasco, destinado a coleta para exames clínicos, até membranas poliméricas que fazem o papel de tecido humano artificial.

A indústria farmacêutica utiliza os polímeros sintéticos para encapsulamento de fármacos desde 1949, com a patente do microencapsulamento pelo processo Wurster. Em 1953 foi desenvolvido o encapsulamento de líquidos e, durante as décadas de 50 e 60, ocorreu um grande avanço no desenvolvimento de sistemas microencapsulados para a liberação controlada de fármacos. Também foram projetadas, no século passado, células artificiais contendo em seu interior enzimas ou agentes biologicamente ativos imobilizados e que apresentavam características controladas de difusão, para aplicações em transfusões de sangue, sistemas artificiais de desintoxicação (rins artificiais) e células artificiais do fígado. Tais células foram preparadas em laboratório usando materiais sintéticos ou biológicos, por Chang e colaboradores em 1957¹. Cada célula consiste em uma membrana ultrafina esférica que envolve o material biologicamente ativo. A membrana separa os conteúdos do ambiente externo. As enzimas biologicamente ativas envolvidas por estas células podem ser liberadas e, posteriormente, reagirem com o meio biológico com a finalidade de gerar alterações desejadas nesse meio.

As membranas utilizadas em sistemas de liberação controlada, como os citados anteriormente, são polímeros biodegradáveis e biocompatíveis.

A composição da membrana, a permeabilidade e outras características podem variar, obtendo-se um grande alcance e controle da liberação dos agentes ativos.

No interior das membranas podem ser inseridos quaisquer combinações de enzimas, sistemas multienzimáticos, co-fatores de regeneração de sistemas de enzimas, extratos de células, células inteiras, proteínas, absorventes, materiais magnéticos, antígenos, anticorpos,

vacinas, hormônios, sistemas multicompartimentais, e outros materiais², que possam desempenhar uma atividade por um período prolongado.

A liberação controlada de fármacos ocorre quando um polímero natural ou sintético for combinado com um fármaco, ou outro agente ativo, de tal maneira que haja liberação do material bioativo de forma previamente projetada. A liberação do agente ativo pode ser constante por um longo período, pode ser cíclica durante um longo prazo, ou pode ser provocada pelo ambiente ou por outros eventos externos. Em todos esses casos, a finalidade do controle de liberação de droga é conseguir terapias mais eficazes para os fármacos que apresentem citotoxicidade. Outras vantagens de usar sistemas de liberação controlada são a manutenção dos níveis de concentração do fármaco dentro de uma taxa desejada, a necessidade de poucas administrações, o uso otimizado do fármaco aplicado, e melhorar a reação do paciente.

Enquanto as vantagens da utilização de sistemas de liberação controlada se mostram significativas, as possíveis desvantagens não podem ser ignoradas. A toxicidade ou a incompatibilidade biológica dos polímeros usados, os produtos da degradação do polímero, a cirurgia requerida para implantar ou remover o sistema (se for o caso), a possibilidade do desconforto do paciente motivada pelo dispositivo de liberação, e o custo mais elevado da liberação controlada quando comparado com os sistemas de formulações farmacêuticas tradicionais devem ser levados em conta quando um projeto de liberação controlada de fármacos for elaborado³.

O objetivo inicial dos sistemas de liberação controlada foi conseguir um perfil de liberação que produzisse um nível elevado do fármaco no sangue durante um longo período de tempo. Com os comprimidos ou injeções tradicionais, o nível do fármaco no sangue segue o perfil mostrado na Figura 1a, em que o nível se eleva depois de cada administração e então diminuições ocorrem até a dose seguinte. O ponto crítico da administração tradicional de fármacos é a manutenção do nível do agente no sangue entre um valor máximo, que possa representar um nível tóxico, e um valor mínimo, abaixo daquele em que o fármaco se torna ineficaz. Em sistemas de liberação controlada de fármacos projetados para a administração de agentes ativos por longo tempo, a concentração do agente no sangue segue o perfil mostrado na Figura 1b, constante, entre o máximo e o mínimo, por um período de tempo prolongado. Dependendo da formulação e da aplicação, os períodos de liberação poderão ser de horas,

meses ou até mesmo anos.

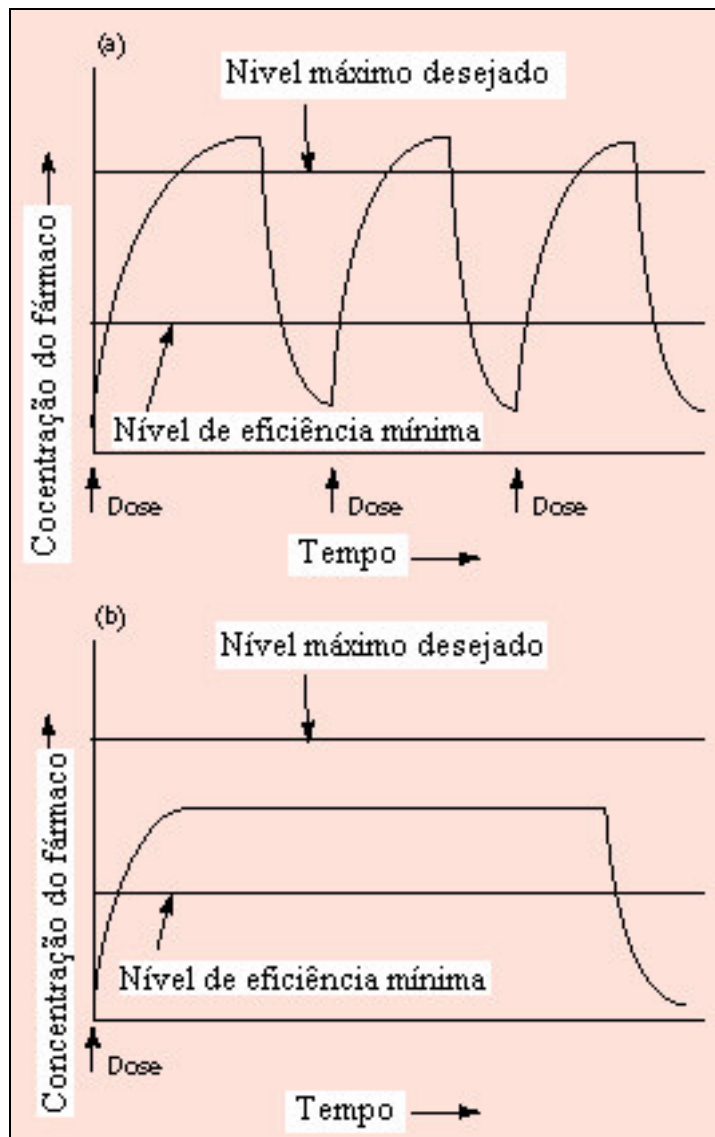


Figura 1- Nível do fármaco no sangue em função do tempo para dosagem tradicional (a) e sistema de liberação controlada (b).

Quando as formulações orais ou injetáveis tradicionais do fármaco não puderem ser usadas devido à ação tóxica do componente bioativo, a utilização de sistemas de liberação controlada é o mais indicado. O sistema ideal de liberação de fármacos deve ser inerte, biologicamente compatível, mecanicamente adequado, confortável para o paciente, capaz de propiciar o transporte elevado da droga, seguro em relação à liberação acidental, simples de

administrar e de remover e de fácil fabricação e esterilização⁴.

Nos últimos anos, as formulações da liberação controlada de fármacos e os polímeros usados nestes sistemas tornaram-se muito mais sofisticados, com a habilidade de prolongar os períodos de liberação eficaz para cada agente ativo. Por exemplo, sistemas atuais de liberação controlada de fármacos podem responder às mudanças do ambiente biológico e liberar ou reter fármacos de acordo com estas mudanças. Além disso, os materiais foram desenvolvidos de maneira a conduzirem ao “sistema alvo” da liberação, em que uma formulação particular pode ser dirigida à célula, ao tecido, ou ao local específico no qual o composto bioativo deve ser liberado⁵.

No final da década de 60 e durante início da década de 70 foram realizados diversos estudos sobre polímeros biodegradáveis derivados de ácido lático e glicólico para a aplicação em seres vivos. Os resultados mostraram que eles proporcionam boas propriedades mecânicas, baixa capacidade alergênica, baixa toxicidade, excelente compatibilidade biológica e uma cinética previsível de degradação. Estas qualificações despertaram interesses para suas possíveis aplicações em tecnologia farmacêutica. Tais substâncias obtiveram a aprovação pela Food and Drug Administration (FDA-EUA) para a utilização como sistema de liberação controlada de fármacos⁶.

Desde o início da década de 90 o grupo de pesquisa em biomateriais da Universidade Federal de Itajubá tem sintetizado e estudado as características biocompatíveis de polímeros derivados da acrilamida, particularmente o poli (N,N'- dimetilacrilamida-co-vinilpirrolidona) (PDMAm-co-VP). O copolímero sintetizado, além de suas propriedades hidrofílicas, possui baixa citotoxicidade permitindo projetar sistemas de liberação controlada por dissolução da membrana polimérica.

Uma aplicação na área médica desse copolímero PDMAm-co-VP, sugerida por este trabalho, é a liberação de agentes bioativos com propriedades antitumorais com material para aplicação no tratamento de câncer.

Um composto natural bioativo com relação às suas propriedades antitumorais é a crotoxina. Ela é a principal neurotoxina presente nos venenos das serpentes da América do Sul (*Crotalus durissus terrificus*)⁷.

A ação da crotoxina tem sido objeto de estudo por parte de médicos e bioquímicos com a finalidade de inibição, redução e/ou extinção de tumores. As principais dificuldades

encontradas pelos pesquisadores durante o tratamento de pacientes contra o câncer, utilizando a crotoxina, é a necessidade da aplicação de injeções diárias e o risco das doses atingirem níveis tóxicos. Tais dificuldades poderão ser eliminadas quando um sistema de liberação controlada da crotoxina tiver sido convenientemente projetado e testado em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

1.1 A crotoxina.

A crotoxina (CT) é a principal neurotoxina presente nos venenos das serpentes da América do Sul (*Crotalus durissus terrificus*) e representa quase 50 % do peso seco do veneno sendo a primeira neurotoxina animal a ser purificada e cristalizada⁸. Demonstrou-se que esta toxina tem atividade de fosfolipase; exerce sua ação fisiológica por bloqueio da transmissão neuromuscular; seus efeitos são principalmente pré-sinápticos, causando uma modificação típica dos neurotransmissores liberados dos terminais nervosos. Efeitos similares são observados com outras neurotoxinas de serpentes que possuem atividade de fosfolipase A₂⁹.

A crotoxina é formada por duas diferentes subunidades, componentes A (ácida) e B (básica), sendo que somente a última apresenta atividade enzimática. O componente B é formado por uma única cadeia polimérica de 123 aminoácidos e sua seqüência é similar a de outras fosfolipasas A₂ do pâncreas de mamíferos ou de venenos de serpentes¹⁰. A subunidade A, denominada crotapotina, consiste de três cadeias polipeptídicas ligadas por pontes de dissulfeto, e suas seqüências de aminoácidos são homólogas a várias partes da fosfolipase A₂ não-tóxica do veneno crotalídeo¹¹. As duas subunidades da crotoxina de maneira sinérgica. A subunidade B tem uma baixa toxicidade, mas apresenta alta atividade enzimática e a subunidade A é desprovida das duas atividades (tóxica e enzimática), porém quando ambas estão associadas, o complexo apresenta uma toxicidade aproximadamente 10 vezes maior do que quando isoladas⁷.

A quimioterapia convencional para tratamento de tumores gera efeitos colaterais ríspidos e muito freqüentes, por isso tem estimulado a busca de novos compostos capazes de combater a proliferação incontrolada de células tumorais por mecanismos citostáticos e citolíticos. Esta busca tem sido direcionada para produtos naturais, uma das fontes mais abundantes de compostos com alta atividade biológica. As toxinas de origem vegetal, microbiana ou animal são particularmente interessantes, devido à sua forte atividade

farmacológica e sua seletividade pelo sítio de ação¹².

Os venenos de serpentes possuem atividades citotóxicas sobre algumas células de tumores in vitro, apesar dos estudos de sua atividade antitumoral em cobaias animais serem bastante limitados¹². Os venenos de cobras contêm uma quantidade importante de peptídeos básicos, não enzimáticos, com peso molecular em torno de 6,8 kDa¹³, chamados geralmente cardiotoxinas que possuem atividade citolítica sobre uma grande variedade de células tumorais e não tumorais, que podem ter utilidade terapêutica.

A observação de que a atividade citotóxica do veneno de uma cobra (*Naja Nigricollis*) era maior do que se podia esperar a partir da quantidade de cardiotoxina contida no veneno, incentivou a identificação e purificação da citotoxicidade da fosfolipase. As fosfolipases A₂ são componentes comuns dos venenos ofídicos. São proteínas globulares compactas, com um peso molecular em torno de 14 kDa, e apresentam um alto grau de similaridade na seqüência de aminoácidos e nas estruturas secundárias e terciárias¹⁴. Estas enzimas catalisam a hidrólise estereoespecífica e dependente do Ca₂⁺, da união do ácido graxo na posição 2 e dos 3-sn-fosfolicéridos, dando como produtos um ácido graxo livre e o 1-acil fosfolicérido ou lisofosfolípido¹². Se bem que todas catalisam a mesma reação, e os resíduos de aminoácidos que constituem o sítio (responsáveis pela atividade enzimática) são conservados, e possuem um alto grau de homologia nas estruturas primária, secundária e terciária. Esta grande família de proteínas homólogas apresenta uma grande variedade de efeitos farmacológicos. Podem possuir neurotoxicidade, miotoxicidade, atividade hemolítica, anticoagulante, carditóxica, edematígena, convulsivante etc. Algumas possuem apenas uma ou duas dessas atividades. Atualmente, ainda não são conhecidos quais elementos estruturais podem responder por cada uma destas atividades farmacológicas¹⁵. Por outro lado, em muitos casos não parece haver correlação entre a atividade catalítica e a ação farmacológica, o que se leva a postular a existência de sítios específicos da proteína determinantes para certos efeitos farmacológicos, diferentes do sítio ativo¹⁶. Um problema similar ocorre com atividade citotóxica. Porém, a incubação de células com fosfolipase A₂ (PLA₂) podem produzir hidrólise dos fosfolipídeos das membranas celulares. Em consequência disso, nem todas as fosfolipases A₂ de venenos de serpentes podem apresentar atividades citotóxicas¹⁷, mas ainda não são conhecidos os elementos estruturais responsáveis por esta atividade.

O complexo crotoxina, a fosfolipase A₂ neurotóxica do veneno da *Crotalus Durissus*

Terrificus (Cascavel sul-americana) exibe atividade citotóxica in vitro sobre numerosas formas de tumores celulares de origem humana¹⁸. O efeito citotóxico da toxina existente apresenta certa seletividade sobre alguns tipos de células de tumores, pois logo após a incubação com 10 g/mL de crotoxina, foi produzida a morte de todas as células Hs87 T (carcinoma ductal mamária de origem humana) e Lu-1 (adenocarcinoma pulmonar de origem humana), considerando que, 20% dos fibroblastos 3T3 e 45% dos queratinócitos normais humanos tornaram-se viáveis. A atividade citotóxica desta toxina foi avaliada pelo Programa de desenvolvimentos terapêuticos do National Cancer Institute (NSC 624244) sobre uma grande variedade de células de tumores de origem humana e foi observada uma atividade marcante sobre as melanomas e carcinomas pulmonares. A análise do perfil da especificidade do programa apresentou resultado significativamente diferente de outros mecanismos de ação citotóxicas conhecidas, sugerindo um mecanismo de ação peculiar¹⁹. Entretanto, o mecanismo da toxina não está bem definido, parece depender da presença de um conjunto de elementos estruturais nas membranas das células brancas, que determinam a ligação da toxina e subsequente hidrólise dos fosfolipídeos da membrana, produzindo a morte celular. Desta forma, o complexo crotoxina (CT) se difere dos outros agentes citotóxicos porque:

- não requer modificações para aumentar sua seletividade;
- exerce atividade citotóxica no nível da membrana celular;
- não interage com o DNA e também não é inibidor enzimático.

A Figura 2 ilustra a atividade biológica da CT. Neste caso, a bioatividade desta proteína é associada à dissociação da enzima PLA₂ em duas subunidades A e B.

Estudos recentes têm sugerido que a crotoxina possui uma atividade antineoplásica intrínseca devido à capacidade das enzimas PLA₂ em se ligarem células tumorais específicas. Desta maneira, as células tumorais parecem possuir receptores para a crotoxina. Neste caso, a ligação da enzima PLA₂ à célula tumoral levaria à hidrólise enzimática do fosfolipídeo de membrana, resultando assim na morte da célula cancerígena.

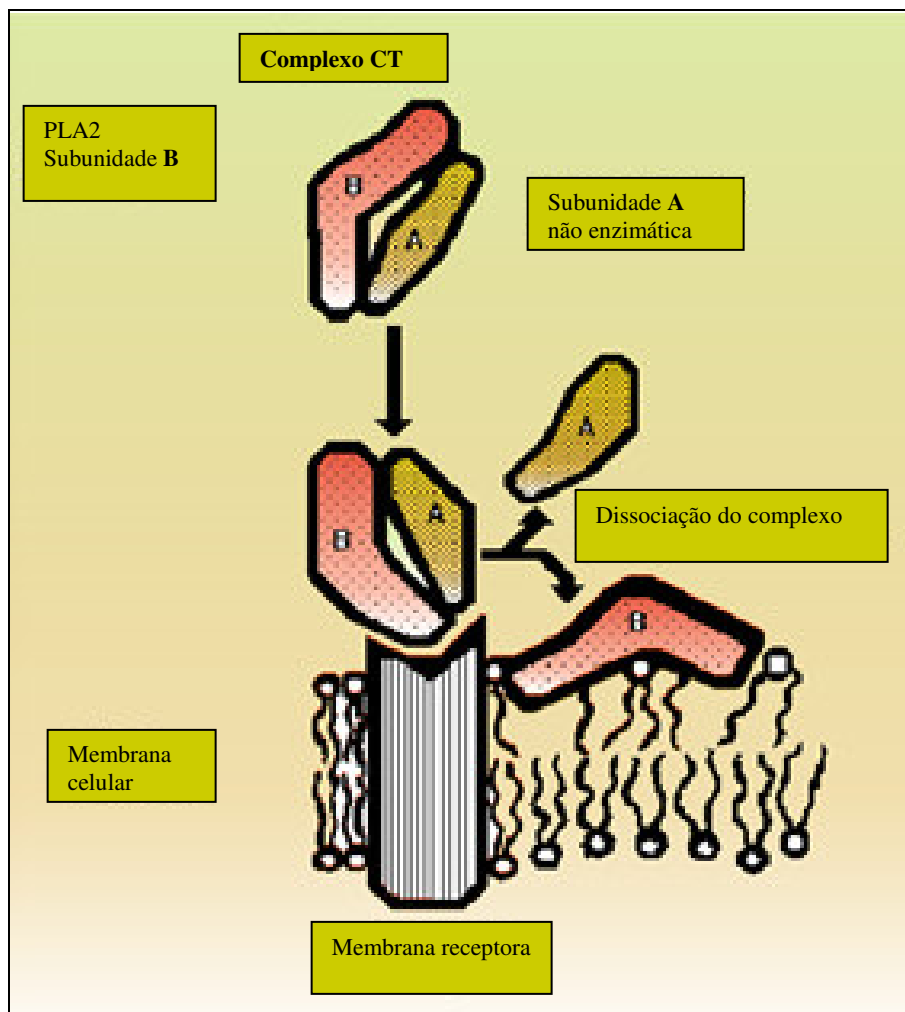


Figura 2 – Representação da atividade biológica da crotoxina²².

Estudos têm apontado efeitos antitumorais significativos da crotoxina relativamente a agentes quimioterápicos tradicionais, sendo observadas na literatura duas patentes registradas por pesquisadores brasileiros²⁰⁻²¹. A Tabela 1 mostra os resultados obtidos da atividade antitumoral da crotoxina comparativamente a alguns agentes quimioterápicos de uso corrente na prática clínica.

Duas patentes foram observadas na literatura para a aplicação da crotoxina como agente antitumoral. A possibilidade de produzir citotoxicidade nas células malignas pela ligação de uma fosfolipase A₂ específica e a subsequente hidrólise da membrana, constituindo um enfoque antitumoral.

Tabela 1- Atividade antitumoral da crotoxina comparativamente a quimioterápicos clássicos. Os resultados referem-se a resultados pré-clínicos *in vivo* em carcinoma de Lewis (Lewis lung Carcinoma)

Nome do Fármaco	Dose (mg.kg ⁻¹)	Inibição do crescimento
Ciclofosfamida	180	100 %
Cisplatina	2,4	98 %
Crotoxina	4,5-6,5	84 %
Metotrexato	65	87 %
	1,8	60 %
Adriamicina	3	65
Vincristina	0,14	54
Melfalane	3,0	53 %
Vinblastina	0,25	28 %

1.1.1 – A estrutura da crotoxina

A crotoxina é um complexo não covalente com um peso molecular de 24 kDa, formado por duas subunidades diferentes: uma ácida (sub-unidade A, ~9,5 kDa) e uma básica (subunidade B, ~14,5 kDa). A subunidade B possui apenas uma cadeia peptídica de 123 resíduos de aminoácidos, com sete pontes dissulfurosas. É uma fosfolipase A₂ básica pouco tóxica e a seqüência de aminoácidos da isoforma mais abundante. A subunidade A é formada por três cadeias peptídicas unidas por sete pontes dissulfurosas não é tóxica e necessita de atividade enzimática¹⁵.

Ambas subunidades apresentam seqüência de aminoácidos similares às outras fosfolipases A₂ não tóxicas, porque só a subunidade B possui atividade enzimática.

A estrutura tridimensional tem sido modelada por estudos de difração de raio-X sobre a base da homologia estrutural observada nas estruturas das fosfolipases A₂ das classes I/II. A subunidade B segue o planejamento canônico da família I/II da fosfolipase A₂, com duas hélices maiores, antiparalelas, unidas por pontes dissulfurosas como ponto estrutural rígido, ao qual se une o laço da ligação Ca²⁺, o segmento C-terminal e um segmento de conformação entrelaçado por pontes dissulfurosas. A posição da hélice N-terminal é estabilizada por múltiplos contatos com a -wing e o corpo da proteína. Os resíduos altamente conservados do sítio ativo encontram-se reunidos nas hélices maiores e interagem com o “laço de Ca²⁺” através do resíduo Asp 49.

A estrutura da subunidade A tem sido modelada por superposição dos resíduos homólogos no acoplamento canônico. Se bem que não possui atividade catalítica, a maior parte dos resíduos de sítio ativos é conservada. Sem dúvida, a ausência do segmento N-terminal, responsável pela interação com as cadeias apolares dos fosfolipídeos e de isolar o sítio ativo do contato com o solvente, provavelmente impede a ligação bem como a atividade enzimática²².

1.1.2. A viabilidade da aplicação da crotoxina em tratamentos de câncer.

Após estudos feitos sobre as propriedades funcionais do complexo crotoxina, a ligação da crotoxina e a citotoxicidade, um possível “sítio específico” para a crotoxina na membrana das células tumorais, farmacocinética em animais e aplicações em pacientes humanos em fase I²³. Foi estabelecido que a administração diária de crotoxina com a dose máxima tolerada pode ser aplicada sem risco de toxicidade severa para o paciente. As únicas manifestações de toxicidade presentes foram neurológicas, consistindo de paralisias reversíveis e limitadas aos músculos extra-oculares, resultando em diplopia e ptose palpebral, que desapareceram no curso do tratamento sem ajuste da dose e incrementos transientes nos níveis plasmáticos de amino-transferase e creatina quinase, consistentes com as atividades neuro e miotóxicas da crotoxina e não foram observadas evidências de toxicidade hemoatopoiética, hepática ou renal.

Para a crotoxina, a literatura indica que doses superiores a 0,21 mg/m² geram efeitos neurotóxicos.

Foram determinados os parâmetros farmacocinéticos da crotoxina injetada por via intramuscular que permitem concluir que 24 horas após a injeção a toxina havia sido virtualmente eliminada, porque não ocorreram efeitos tóxicos residuais ou toxicidade cumulativa no curso do tratamento. Aproximadamente, 3 % da dose da toxina foram eliminados nas três primeiras horas através da urina. O restante foi desagregado e absorvido como aminoácidos.

Para as doses aplicadas, 83 % dos pacientes sentiram um marcado efeito analgésico e um melhor estado geral. O efeito analgésico, em alguns casos, foi muito marcante (por exemplo, um paciente que padecia de um carcinoma anal com invasão pélvica e recebia opiáceos a fim de controlar a dor, abandonou a morfina depois de duas semanas de tratamento

com crotoxina). Este efeito inesperado, não depende da evolução da enfermidade e por si merece um estudo mais detalhado.

De 23 pacientes tratados com crotoxina, foram observados quatro casos, nos quais os quadros clínicos permaneceram estáveis. Três pacientes com carcinoma na tiróide, carcinoma retal e fibro-sarcoma apresentaram respostas parciais e objetivamente medíveis com redução de 50 % no tamanho das lesões. Como consequência da redução do tamanho, o paciente com carcinoma retal pôde ser operado.

Finalmente um paciente com carcinoma mamário, metástases ósseas e múltiplas metástases pulmonares apresentou uma resposta completa, ou seja, houve regressão total do tumor primário e das metástases, que se manteve seis meses após a suspensão do tratamento. Este resultado é bastante surpreendente para um estudo clínico em fase I e constitui uma forte evidência da atividade antitumoral que esta toxina apresenta.

Considerando-se os efeitos colaterais associados à utilização dos quimioterápicos no tratamento do câncer, a busca de sistemas de liberação controlada que sejam mais eficazes no combate à doença é de fundamental importância.

A utilização de polímeros hidrofílicos é uma alternativa comumente utilizada pela farmacotécnica para a obtenção de sistemas de liberação controlada de fármacos do tipo erosível.

1.2 – Poli (N,N' dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona)

As macromoléculas solúveis em água têm despertado a atenção e vêm sendo alvo de investigações pelo motivo de possíveis aplicações em medicina e biotecnologia. Para aplicações clínicas a completa solubilidade do conjugado polímero-fármaco em água é muito desejada, principalmente, no caso de administração intravenosa. Outro fator de grande importância desse tipo de sistema é a facilitação da distribuição do fármaco no sistema de circulação central do corpo.

Vários polímeros solúveis em água, a maioria derivada de polímeros acrílicos e vinílicos, estão sendo investigados para uso como carreadores de fármacos.

Uma série de copolímeros tem sido preparada por De Queiroz e colaboradores no Departamento de Físico-Química da Universidade Federal de Itajubá através de

copolimerização radicalar de N-vinil-2-pirrolidona (VP) e N,N'-dimetilacrilamida (DMAm) (Figura 3) com composições estruturais diferentes²⁴.

O copolímero aleatório originado, o poli (N,N'- dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) ou poli (VP-DMAm), apresentou variações nas concentrações dos monômeros identificadas por ressonância magnética nuclear (NMR).

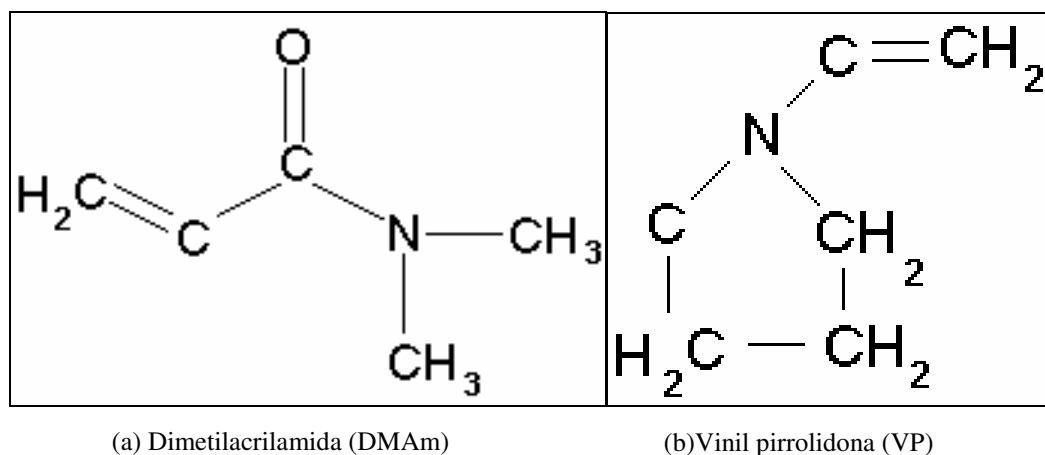


Figura 3 – Monômeros formadores do copolímero PDMAm-co-VP.

O poli (N,N', dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona), é um copolímero hidrofílico, intumescível e inicialmente vítreo, características, estas, desejáveis de um sistema de liberação controlada. Neste sentido a liberação do princípio bioativo do (N,N', dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) deverá ocorrer após o intumescimento da membrana polimérica causada pela difusão de fluido fisiológico no copolímero até uma concentração crítica, provocando, assim, o início do desentrelaçamento das cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a liberação do biocomposto contido em seu interior. As Figuras 4 e 5 ilustram o processo da liberação de compostos bioativos por desentrelaçamento das cadeias poliméricas²⁵.



Figura 4 –Esquema das configurações macromoleculares dos polímeros hidrofílicos durante o processo de liberação do fármaco.

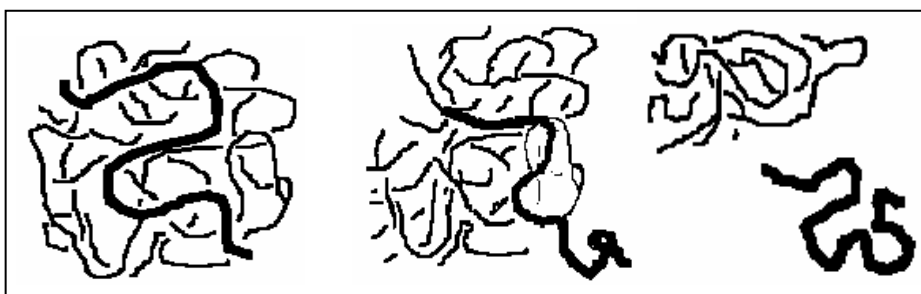


Figura 5 – Representação do desentrelaçamento da cadeia polimérica²⁵.

Neste sentido é esperado um período no qual a taxa de liberação se torne estável, como previsto anteriormente por Narasimhan e Peppas²⁵, sendo tal intervalo de tempo dependente da espessura da camada gel formada devido ao intumescimento do polímero. A camada gel formada continua sofrendo intumescimento e, simultaneamente, também sofre dissolução. Os dois processos “competem” entre si e a liberação do agente ativo é controlada pela relação entre o intumescimento e a dissolução do polímero. Ocorrem três etapas durante o processo de liberação. Inicialmente a taxa de intumescimento é maior que a velocidade de dissolução, em seguida, as duas taxas se mantêm em equilíbrio durante um certo intervalo de tempo e, finalmente, a dissolução supera o intumescimento. A partir desse momento a camada gel se desfaz totalmente e toda a massa do agente ativo terá sido liberada.²⁵

O perfil da variação da espessura da camada gel nos sistemas de liberação controlada por dissolução está representado na Figura 6.

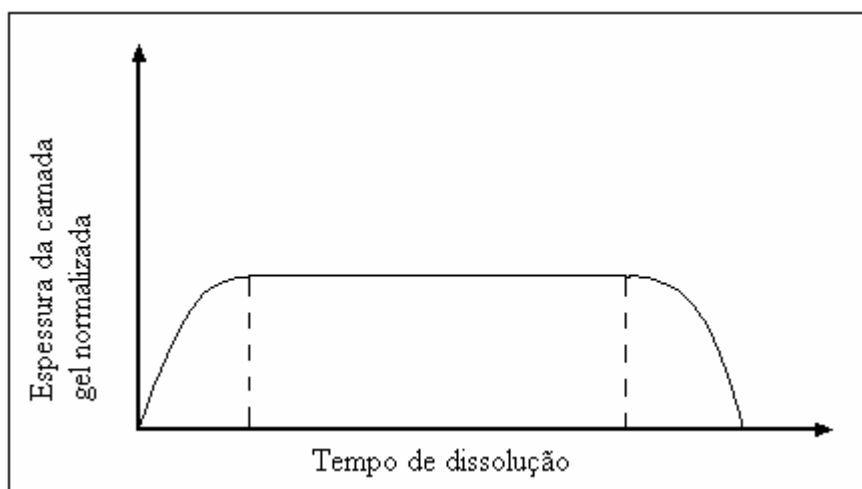


Figura 6 – Representação teórica da variação da espessura da camada gel em função do tempo de dissolução de um polímero hidrofílico²⁵.

1.3. Objetivos desta dissertação.

Os objetivos desta dissertação são:

- ✓ desenvolver um sistema de liberação controlada para a crotoxina (CT) baseado no polímero hidrofílico poli (N,N'- dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) (PDMAm-co-VP);
- ✓ determinar os parâmetros específicos de desentrelaçamento deste copolímero utilizando fluido fisiológico de acordo com a teoria da reptação.

Visando atingir os objetivos deste trabalho, o polímero PDMAm-co-VP foi sintetizado via copolimerização radicalar e a fração de VP no copolímero foi determinada por ressonância magnética nuclear de prótons ($^1\text{H-NMR}$). O bioconjugado PDMAm-co-VP/CT foi obtido pela técnica da co-precipitação. A liberação do composto bioativo (CT) do copolímero foi estudada por técnicas radioisotópicas, levando-se em consideração a teoria da reptação e a lei de Fick.

O POLÍMERO E SUA ESTRUTURA MOLECULAR

A estrutura molecular é a forma de disposição das unidades estruturais do polímero (monômeros) dentro de uma macromolécula. Esta disposição exerce uma influência significativa nas características físicas dos polímeros e, portanto, foram desenvolvidas técnicas de controle de síntese dessas macromoléculas, podendo ser monitoradas várias possibilidades estruturais de acordo com as características físico-químicas desejadas²⁶. As estruturas poliméricas podem ser classificadas em primária, secundária, terciária e quaternária.

2.1. Estrutura Macromolecular.

2.1.1 Estrutura primária.

Para polímeros, as características moleculares dos monômeros são determinantes, de modo que, com base na estrutura destes, podem ser preditas propriedades e bem como o desempenho dos materiais poliméricos sintetizados. A forma de polimerização também pode interferir na estrutura de um polímero. Um mesmo monômero pode dar origem a materiais poliméricos com características físicas diferentes.

A estrutura primária é a maneira pela qual os monômeros se encontram dispostos na cadeia macromolecular e se baseia em três fatores: constituição química, ordenamento dos segmentos e configurações das macromoléculas.²⁷ São quatro os tipos de estruturas primárias básicas: polímeros lineares, ciclo lineares, ramificados e copolímeros.

Os polímeros lineares são aqueles nos quais os monômeros estão dispostos em apenas uma cadeia (Figura 7). A presença de grupos com densidade eletrônica elevada ou grupos hidrofóbicos, promove a formação de ligações de hidrogênio, ou interações de van Der Waals. Neste caso, os grupos hidrofóbicos não são favoráveis à liberação controlada de agente bioativo a partir da dissolução polimérica, porque estes grupos dificultam a absorção de fluido

fisiológico, fator fundamental para início do desentrelaçamento das cadeias poliméricas (dissolução da membrana polimérica).

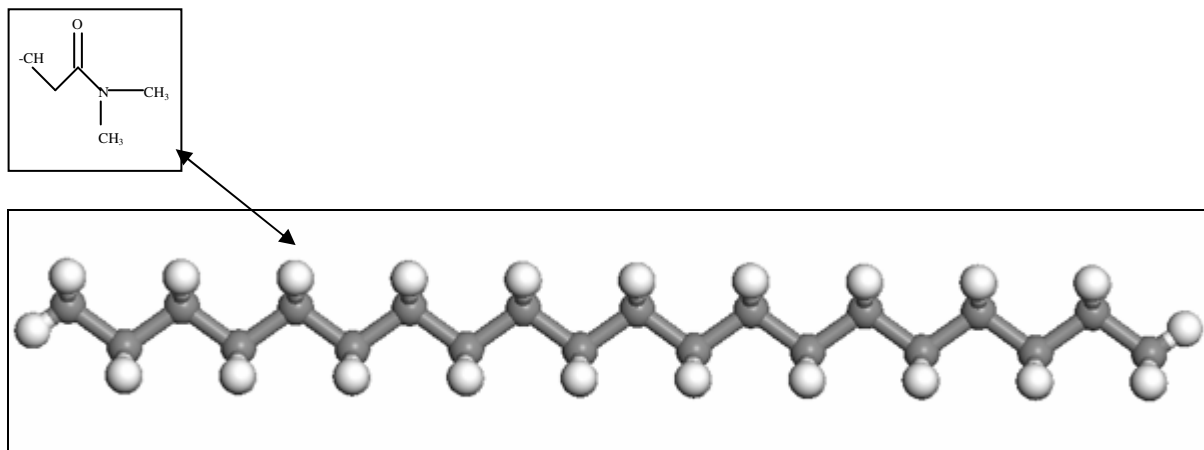


Figura 7 – Representação esquemática de uma cadeia linear de PDMAm.

Os polímeros que apresentam ramificações laterais ligadas na cadeia principal, como mostrado na Figura 8, são considerados ramificados. As ramificações fazem parte da molécula da cadeia principal, devido ao surgimento de reações paralelas durante a síntese do polímero. As ramificações dificultam a aproximação das cadeias poliméricas e, em consequência disso, os polímeros são menos densos.

Os polímeros ramificados têm sido importante objeto de pesquisa para a área farmacêutica, tanto para aplicações como transporte de drogas quanto em biossensores.

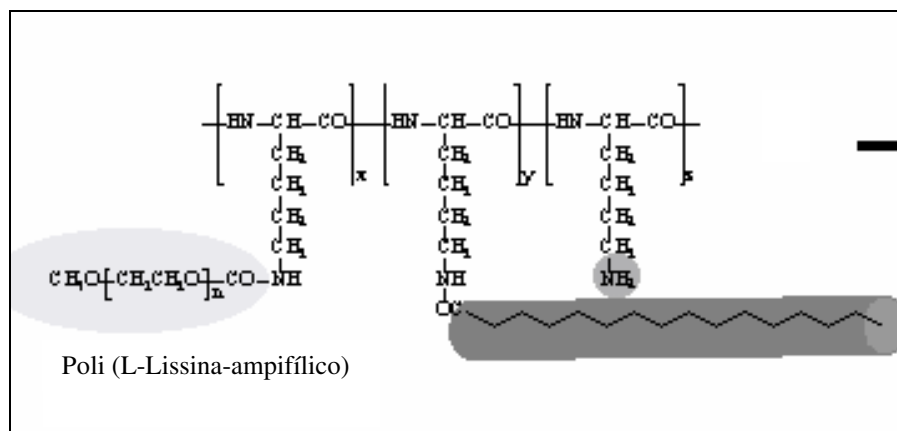


Figura 8 - Representação esquemática do polímero ramificado poli (L-lissina-ampifílico).

Um polímero constituído por mais de uma unidade química estrutural (monômero) será denominado copolímero. Os monômeros que dão origem ao polímero são chamados co-monômeros.

Os copolímeros podem ser alternados, em bloco, aleatórios, ou randômicos e enxertados. Os copolímeros alternados apresentam alternância seqüenciada entre os monômeros que constituem a cadeia polimérica. Os copolímeros em bloco por sua vez possuem em sua constituição de cadeia, os co-monômeros que se encontram organizados em blocos alternados de monômeros. Os copolímeros aleatórios ou randômicos não apresentam uma seqüência definida.

Copolímeros de enxerto apresentam ramificações partindo da cadeia principal da macromolécula e, essas ramificações, não são grandes o bastante a ponto de serem consideradas novas cadeias. A Figura 9 representa os tipos de copolímeros mencionados neste texto.

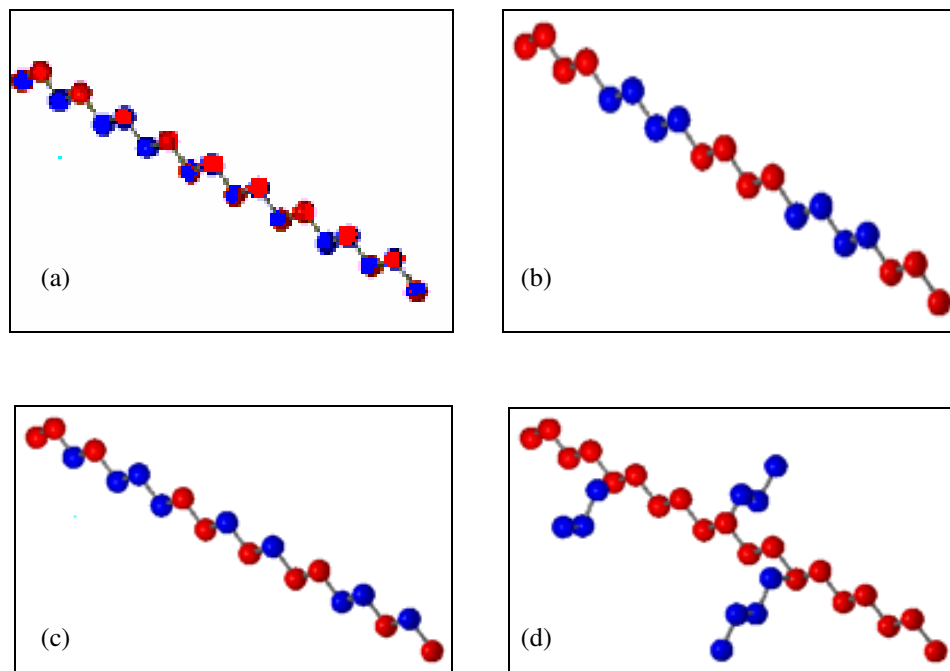


Figura 9 – Esquema representativo de copolímero alternado (a), copolímero em bloco (b), copolímero aleatório de polietileno e polipropileno (c) e copolímero de enxerto (d).

2.1.2. Configurações poliméricas (Taticidade)

Para polímeros com mais de um grupo de átomos ligados à cadeia principal, a regularidade e a simetria do grupo lateral podem exercer influência sobre as propriedades macroscópicas finais do material ²⁷.

As configurações das cadeias poliméricas são as maneiras possíveis de ocorrência das ligações entre os monômeros, podendo ocorrer três tipos diferentes, ilustrados na Figura 10.

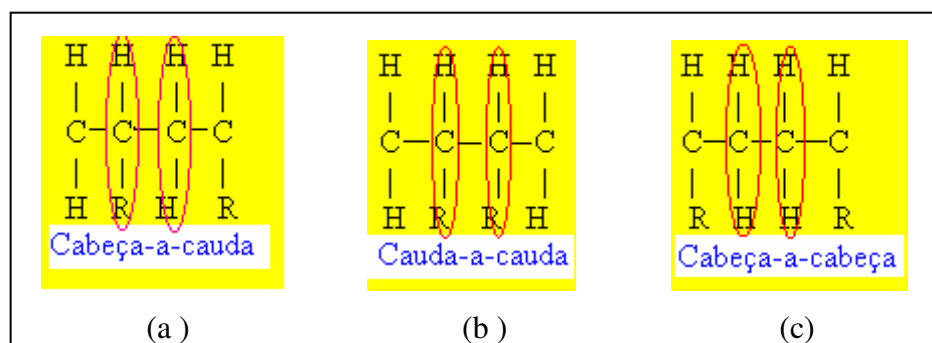


Figura 10 – Representação de possíveis formas de configurações poliméricas. Onde **R** representa um átomo ou grupo de átomos diferente do hidrogênio.

Quando o arranjo da configuração polimérica se dá como na Figura 10a em que a extremidade anterior de um mero se liga a extremidade posterior de outro mero, esta configuração é denominada cabeça-a-cauda. Quando o arranjo é tal que ocorrem ligações entre as partes posteriores dos meros (Figura 10 b) a configuração é chamada de cauda-a-cauda e no caso da ligação entre partes anteriores dos meros o nome dado à conformação é cabeça-a-cabeça (Figura 10c).

Quanto à estereorregularidade ou taticidade, ou seja, quanto à orientação dos grupos funcionais R (radicais que substituem o hidrogênio) em relação ao plano formado pela cadeia principal (em zigue-zague, devido à ligação sp^3) de um polímero supostamente linear em que os átomos estão ligados entre si numa mesma ordem (“cabeça-cauda”), são encontradas três configurações a saber: isotática (Figura 11a), sindiotática (Figura 11b) e atática (Figura 11c). Na isotática, todos os grupos radicais estão posicionados no mesmo lado da cadeia. Na configuração sindiotática, os grupos radicais encontram-se em lados alternados da cadeia. Na configuração atática, o posicionamento dos grupos laterais é aleatório.

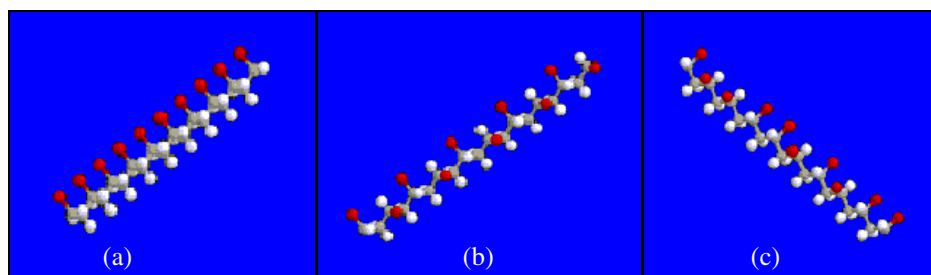


Figura 11 – Configuração isotática (a) – sindiotática (b) – atática (c)
(as esferas vermelhas representam os grupos laterais)

Um polímero específico não apresenta apenas uma dessas configurações, porém uma delas deve ser predominante. Este fato ocorre devido ao método de polimerização empregado. Macromoléculas compostas com mesmo monômero, porém com configurações diferentes, têm propriedades físico-químicas diferentes.

2.1.3. Estruturas: secundária, terciária e quaternária.

A estrutura secundária de um polímero refere-se à disposição espacial da macromolécula. Como esta molécula se dispõe de acordo com as diversas conformações possíveis causadas pelas rotações das ligações de carbono, ou seja, como uma cadeia se posiciona em relação ao seu eixo principal. Em outras palavras, a estrutura secundária seria a maneira pela qual a cadeia polimérica forma um novelo (Figura 12)²⁸.

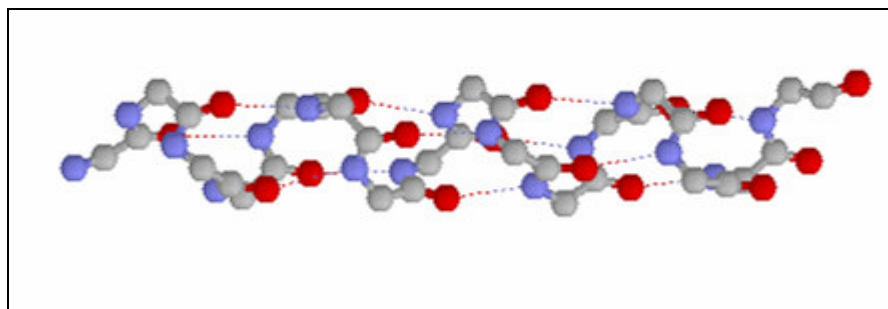


Figura 12 – Representação esquemática de estrutura secundária de uma cadeia Polimérica²⁸.

A estrutura terciária é a forma de organização espacial da estrutura secundária, ou seja, a formação do novelo pela cadeia polimérica ao “enrolar-se” em torno de si próprio

(Figura 13).

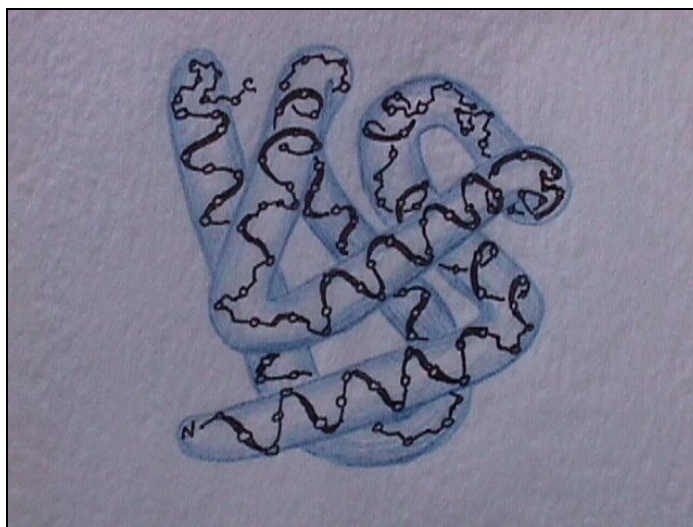


Figura 13 – Estrutura terciária de cadeia polimérica²⁸.

A estrutura quaternária é maneira pela qual vários novos interagem entre si formando os entrelaçamentos da rede polimérica, portanto, o novo formado é a estrutura quaternária de cadeias poliméricas (Figura 14). Na estrutura quaternária as cadeias poliméricas podem apresentar ligações cruzadas ou simplesmente estarem entrelaçadas umas às outras.²⁸

A dissolução de cadeias poliméricas entrelaçadas é estudada e dirigida pela teoria da reptação. Teoria esta, introduzida por De Gennes, tem se tornado uma ferramenta básica aplicada à dinâmica de polímeros²⁹. O conceito de reptação explica como uma cadeia flexível pode movimentar entre obstáculos impenetráveis formados pelos entrelaçamentos das cadeias vizinhas. O caminho possível para o deslocamento da cadeia dentro do novo recebe o nome de tubo de confinamento ou tubo de reptação e faz com que a macromolécula exiba um movimento sinuoso como o de uma cobra, por isso tal teoria recebeu o nome de reptação.

Originalmente, a teoria da reptação foi proposta para o entendimento da difusão de um polímero através de um gel; atualmente é utilizada também para analisar a dinâmica de polímeros em soluções densas³⁰. O poli (N,N'- dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona), objeto deste estudo, apresenta macromoléculas entrelaçadas sem ligações, propiciando assim a reptação de suas cadeias.

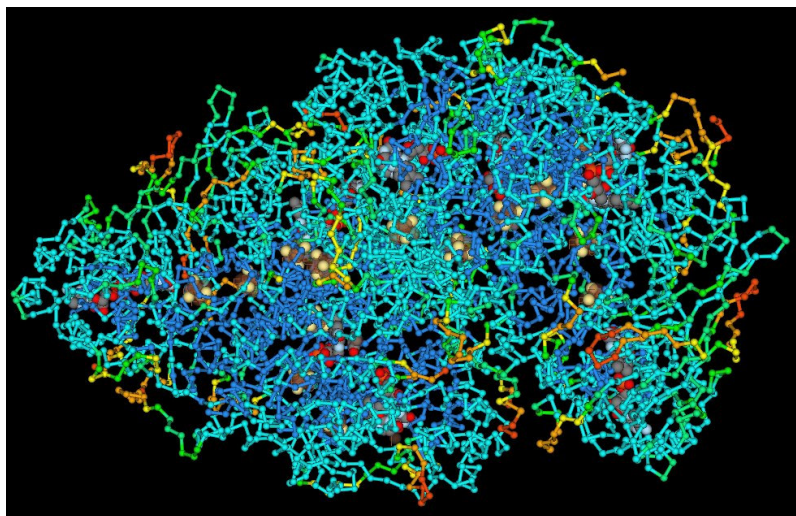


Figura 14 – Representação computacional de um novelo polimérico aleatório formado por cadeias polipeptídicas.

É importante salientar que neste trabalho foi dada maior ênfase à estrutura primária, devido a grande influência dessa estrutura para a formação do novelo e posterior desentrelaçamento, ou seja, para o desenvolvimento do movimento da cadeia dentro do “tubo de confinamento”.

2.2. A massa molecular de um polímero e polidispersão.

É fato conhecido que o peso molecular de um polímero exerce uma influência significativa em suas propriedades físicas.

A massa molecular é a medida dos tamanhos das macromoléculas e quanto maiores elas forem, maior será a extensão pela qual agem as forças de atração intermoleculares e maiores serão os efeitos do entrelaçamento entre as cadeias. Estes são os fenômenos que interferem nas características viscoelásticas dos polímeros. Isto está representado na Figura 15.

As massas moleculares comumente determinados para polímeros são a massa molecular numérica média, a massa ponderal média e a massa molecular viscosimétrica média. Para determinarmos qualquer uma das três, é necessário que o polímero seja solúvel em seu solvente ideal (vide capítulo 3)²⁷.

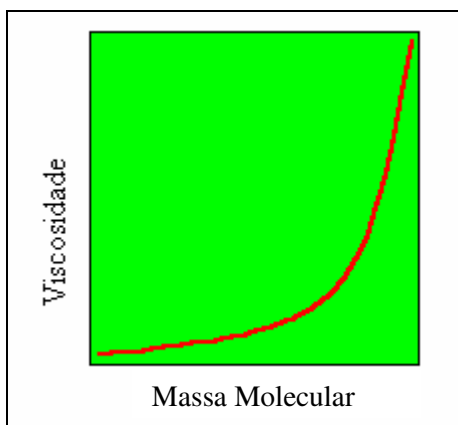


Figura 15 - Representação da relação entre a viscosidade e a massa molecular de um polímero.

A massa molecular numérico médio depende do número de moléculas do polímero presentes na solução, para qualquer estrutura ou tamanho; ela é determinada pela equação²⁷⁻²⁸:

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i} \quad (1)$$

Sendo, \bar{M}_n a massa molecular numérica média, M_i é a massa molecular de moléculas da classe i e n_i é o número de moléculas da classe i .

A massa molecular ponderal média depende do número e do peso das macromoléculas presentes na solução, qualquer que seja a sua estrutura ou tamanho; é dada pela equação²⁶:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i^2}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i} \quad (2)$$

sendo, \bar{M}_w a massa molecular ponderal média, M_i é a massa molecular de moléculas da classe i e n_i é o número de moléculas da classe i .

A massa molecular viscosimétrica média depende do número, da massa e também da forma das macromoléculas presentes na solução, qualquer que seja a sua estrutura ou tamanho; pode ser calculado fazendo-se:

$$\bar{M}_v = \frac{\left[\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i^{1+a} \right]^{1/a}}{\sum_{i=1}^{\infty} n_i M_i} \quad (3)$$

sendo, \bar{M}_v é a massa molecular viscosimétrica média, M_i é a massa molecular de moléculas da classe i , n_i é o número de moléculas da classe i e a é uma constante dependente do polímero, do solvente e da temperatura.

Normalmente, o valor do peso ponderal médio é maior que o valor do peso numérico médio e é mais expressivo para o estudo de polímeros, porque valoriza a característica dominante das macromoléculas, seu tamanho. Esses valores serão idênticos quando os pesos de todas as moléculas forem iguais.

Tabela 2 – Valores típicos de polidispersividade para as macromoléculas sintéticas ²⁹.

Tipo de polímero	Faixa M_w/M_n
Polímeros monodispersos hipotéticos.	1,000
Polímeros monodispersos reais (“polímeros vivos”)	1,01 - 1,05
Polímeros obtidos pelo processo de polimerização em cadeia, terminação por combinação.	1,5
Polímeros obtidos pelo processo de polimerização em cadeia, terminação por desproporcinamento.	2,0
Polímeros obtidos pelo processo de polimerização em etapas.	2,0
Polímeros vinílicos, altas conversões.	2,0 - 5,0
Polímeros produzidos com autoaceleração	5,0 – 10,0
Polímeros obtidos pelo processo de polimerização em cadeia, terminação por coordenação.	8,0 – 30,0
Polímeros ramificados	20,0 – 50,0

A razão M_w/M_n , denominada índice de polidispersão será tanto maior quanto maior for a discrepância entre os pesos macromoleculares. Quando a composição do material for uniforme

($M_w/M_n = 1$), o material é considerado monodisperso. Quando há uma variação nos pesos moleculares das cadeias poliméricas, o material é considerado polidisperso ($M_w/M_n > 1$).

Uma grande preocupação dos estudos farmacêuticos além da citotoxicidade dos polímeros biodegradáveis utilizados em sistemas de liberação controlada é o peso macromolecular. Os polímeros aplicados nestes sistemas devem ser facilmente excretados. Para que tal fato ocorra o peso molecular dos polímeros utilizados não deve ultrapassar o valor 20 kDa, caso contrário tais materiais poderiam não ser dialisados causando nefrite e mesmo necrose dos rins.

POLÍMEROS E CONFORMAÇÃO MACROMOLECULAR

3.1. Introdução.

Cadeias poliméricas são constituídas por átomos que estão ligados por ligações covalentes. Estas ligações são normalmente capazes de girar, criando grande número de possíveis conformações. Portanto, elas não apresentam forma definida.

A conformação de cadeias poliméricas corresponde à disposição espacial destas cadeias, gerada pela liberdade de movimentos rotacionais das ligações químicas. Ela interfere na elasticidade, na flexibilidade e nas dimensões do polímero e, por isso, é importante para o estudo da dinâmica de um polímero em solução.

O movimento da cadeia dentro do tubo de confinamento só é possível por causa das várias conformações assumidas pela macromolécula durante o seu movimento, inclusive a sinuosidade do deslocamento da cadeia ocorre de acordo com a rotação das ligações de carbono. Portanto é de grande importância o entendimento das possíveis conformações de uma cadeia polimérica como instrumento para elucidar o movimento de reptação da molécula polimérica dentro da rede de entrelaçamentos.

3.2 – Cadeias ideais.

Em uma cadeia polimérica ideal as interações entre os segmentos da cadeia têm a mesma intensidade das interações entre estes segmentos e o solvente para uma dada temperatura³¹.

Uma cadeia ideal (ou a cadeia livremente articulada) é o modelo mais simples para descrição de um polímero. Supõe-se somente um polímero como um caminho aleatório e negligencia-se qualquer tipo de interação entre monômeros. Embora seja simples, sua generalidade nos proporciona introspecções sobre a física dos polímeros. Neste modelo, cada monômero é um segmento rígido com comprimento fixo l , e sua orientação é completamente

independente das orientações e das posições de monômeros vizinhos, até o ponto em que dois monômeros podem co-existir no mesmo lugar ³¹.

Para esse modelo, a energia do polímero independe da sua forma e, portanto, para o equilíbrio termodinâmico todas as formas de disposição da cadeia são igualmente prováveis, conforme a distribuição de Maxwell-Boltzman. Sua relevância é limitada, de maneira uniforme, à escala macroscópica, pelo fato de não considerar o volume excluído pelos monômeros.

A forma espacial de uma molécula é uma propriedade dinâmica. Nas cadeias poliméricas este dinamismo só existe a temperaturas superiores à temperatura de transição vítrea.

A flexibilidade de uma cadeia ideal depende das possibilidades conformacionais dessa cadeia e das possibilidades rotacionais permitidas pelo tipo de ligação entre os átomos. Favorecendo, assim, a adaptação da cadeia ao espaço disponível e às tensões que atuam sobre ela devido a interações entre segmentos dela e partículas do solvente.

As conformações das cadeias poliméricas são importantes no estado vítreo (abaixo da temperatura de transição vítrea (T_g)) e no estado “borrachoso” (definido nos elastômeros para temperaturas superiores a T_g), nos polímeros em soluções poliméricas³¹. Para cada sistema polímero-solvente existe uma temperatura θ na qual as interações entre os segmentos do polímero têm intensidades iguais às interações entre os segmentos do polímero e as moléculas do solvente e entre moléculas do solvente e moléculas do solvente. Para tal temperatura a cadeia polimérica tem um comportamento ideal e, portanto, recebe a denominação de cadeia Ideal. ³¹

Existem quatro tipos de cadeias ideais: Cadeias de segmentos livres (ou aleatória), cadeias com rotações livres e segmentos livres, cadeias com rotações restringidas e o modelo do estado isomérico rotacional de Flory.

3.2.1- Cadeia de segmentos livres ou cadeia aleatória

É aquela em que o comprimento das ligações entre unidades méricas é considerado constante ($l_1 = l_2 = l_3$), mas a disposição de cada monômero é aleatória (Cadeia Gaussiana)³² (Figura 16).

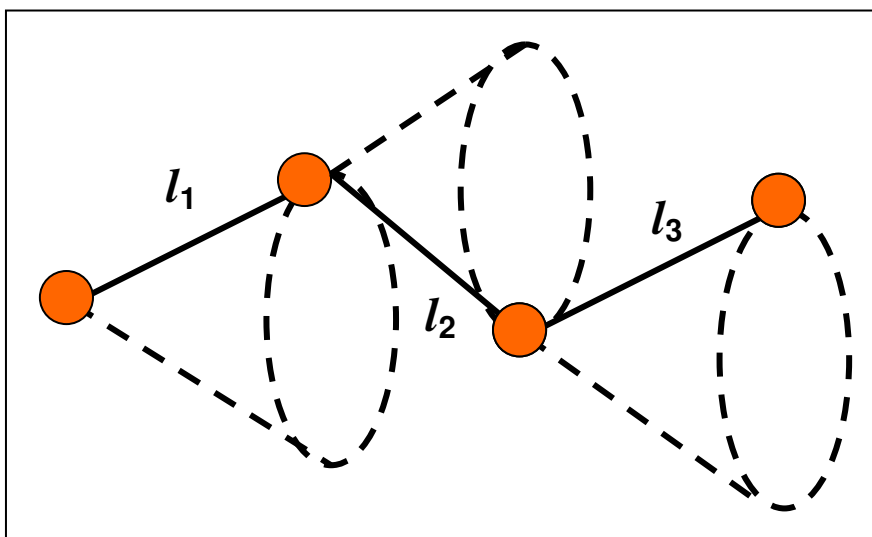


Figura 16 – Representação de uma cadeia de segmentos livres l_1, l_2, l_3 , representam o comprimento da ligação.

No modelo de cadeias ideais de segmentos livres N unidades métricas dão forma ao polímero, cujo comprimento total (L), é dado por:

$$L = N.l, \quad (1)$$

onde, N é o número de monômeros.

A distância entre extremidades representa a distância média entre o primeiro e o último segmento da macromolécula e varia entre um valor máximo e mínimo. O valor máximo ocorre quando as cadeias estão totalmente estendidas em uma configuração planar trans, onde o comprimento do contorno (r) pode ser determinado facilmente ($r = Nl$). O valor mínimo é aquele em que as extremidades ocupam posições coincidentes ($r = 0$).

Para uma cadeia de segmentos livres o vetor entre extremidades da cadeia polimérica será a soma dos vetores que representam as ligações entre os monômeros da cadeia (Figura 17)

$$\vec{r} = \sum_{i=1}^n \vec{r}_i = \sum_{i=1}^n l \cdot \vec{e}_i. \quad (2)$$

sendo \vec{e}_i o vetor unitário na direção da ligação i .

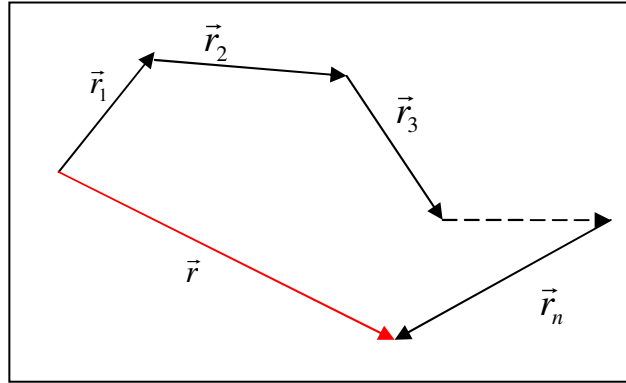
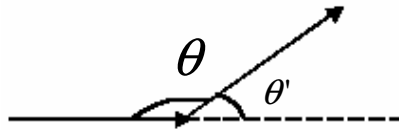


Figura 17 - Representação esquemática da distância entre extremidades de uma cadeia polimérica.

A distância média entre as extremidades poderá ser determinada através de³¹:

$$\langle \vec{r}^2 \rangle^{\frac{1}{2}} = \left(\sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \right)^{\frac{1}{2}} = \left(\sum_{i=1}^n \vec{r}_i \cdot \vec{r}_i + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \right)^{\frac{1}{2}} \quad (3)$$

Sendo:



A distancia entre extremidades pode ser determinada através de:

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = l^2 \begin{bmatrix} \cos \theta'_{11} + & \cos \theta'_{12} + & \cdots + & \cos \theta'_{1n} + \\ \cos \theta'_{21} + & \cos \theta'_{22} + & \cdots + & \cos \theta'_{2n} \\ \vdots + & \vdots + & \vdots + & \vdots + \\ \cos \theta'_{n1} & \cos \theta'_{n2} & \cdots + & \cos \theta'_{nn} \end{bmatrix} = \sum_{i=1}^n \vec{r}_i \cdot \vec{r}_i l^2 \cos \theta'_{ii} + 2 \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n l^2 \cos \theta'_{ij} \quad (4)$$

Considerando a cadeia macromolecular polidispersa, todas com o mesmo número (n) de segmentos, ou seja, $\langle \cos \theta_{ij} \rangle = 0$ para $(i \neq j)$ e $\langle \cos \theta'_{ij} \rangle = 1$ para $i = j$, o valor médio quadrado da distância entre as extremidades de cada cadeia é dado por:

$$\langle \vec{r} \rangle^2 = l^2 \left[\begin{array}{cccc} \cos \theta'_{11} + & \cos \theta'_{12} + & \cdots + & \cos \theta'_{1n} + \\ \cos \theta'_{21} + & \cos \theta'_{22} + & \cdots + & \cos \theta'_{2n} \\ \vdots + & \vdots + & \vdots + & \vdots + \\ \cos \theta'_{n1} & \cos \theta'_{n2} & \cdots + & \cos \theta'_{nm} \end{array} \right] = nl^2$$

→ n termos

Assim, a distância entre as extremidades de uma cadeia de segmentos livre se tornará:

$$\langle \vec{r} \rangle = (\sqrt{n}) \cdot l \quad (5)$$

3.2.2 - Cadeias macromoleculares com rotações livres.

Neste tipo de cadeia os movimentos de rotação são limitados pelo ângulo de valência entre os segmentos adjacentes, mas qualquer posição, no cone de revolução, é permitida³¹ (Figura 18).

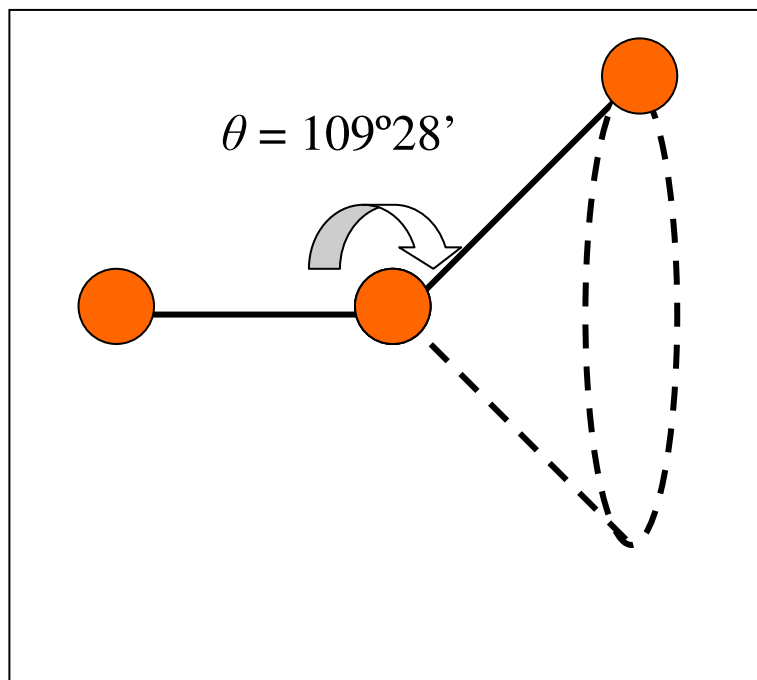


Figura 18 – Ângulo de limitação da rotação das ligações carbono-carbono.

Se forem consideradas as diversas posições das ligações uma a uma na seqüência i , $i+1$, $i+2$, $i+3$, onde i é a ligação entre os segmentos, será observada a disposição na Figura 19:

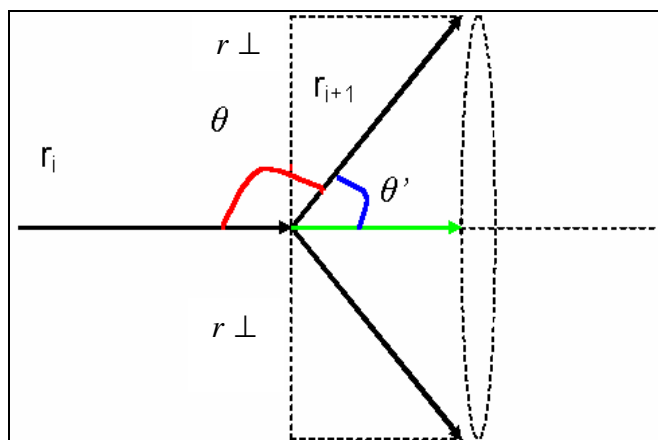


Figura 19 - Projeção da ligação i+1 na direção da ligação i (sendo, r_{\perp} projeções do vetor distância entre unidades monoméricas em coordenadas ortogonais).

Como os monômeros poderão ocupar qualquer posição na superfície do cone, a projeção da ligação **i+1**, na direção perpendicular à direção da ligação **i** será nula. e, portanto, obtém-se:

$$\langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_{i+1} \rangle = l.l \cos \theta' = l^2 \cos \theta' \quad (1)$$

A projeção da ligação i+2 na direção i+1 será (Figura 20)

$$l \cos \theta'$$

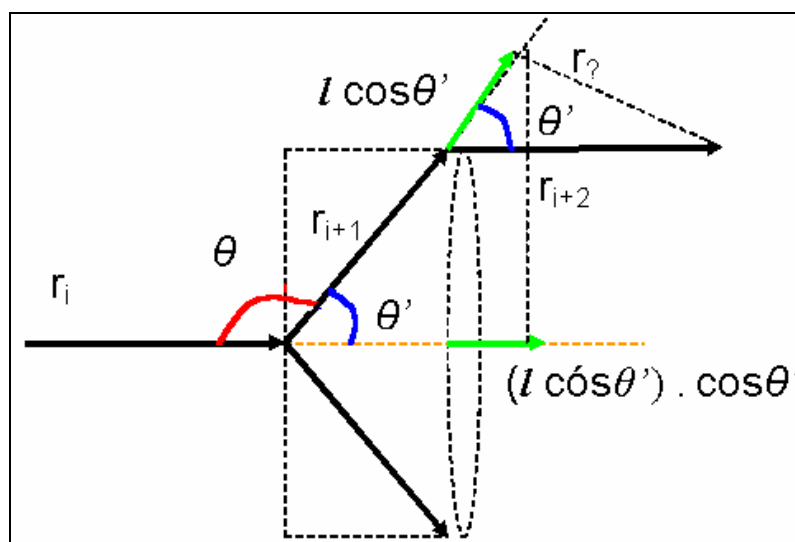


Figura 20 - Projeção das ligações i+1 e i+2 na direção da ligação i.

e:

$$\langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_{i+2} \rangle = l \cos \theta' \cdot l \cos \theta' = l^2 \cos^2 \theta' \quad (2)$$

Para as projeções de i+1, i+2, i+3 na ligação i resulta (Figura 21):

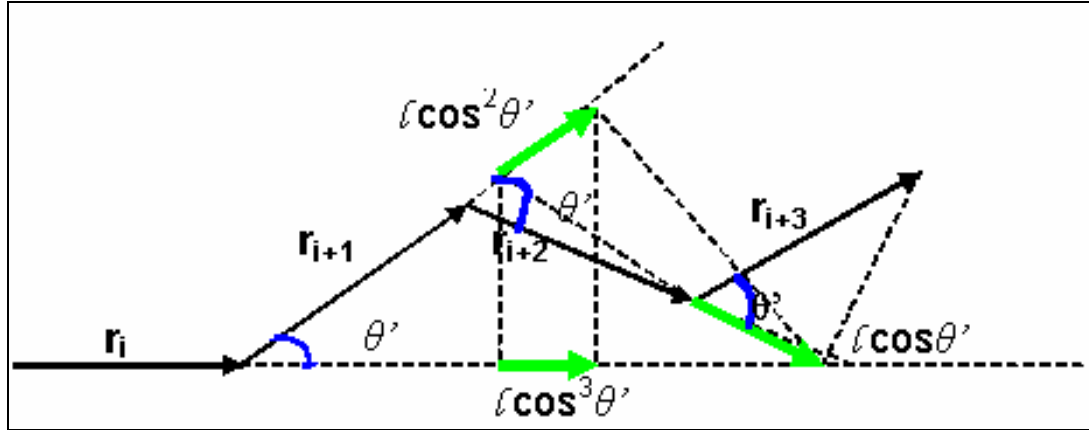


Figura 21 - Projeção das ligações i+1, i+2 e i+3 na direção de i.

Logo:

$$\langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_{i+3} \rangle = l \cos \theta' \cdot (l^2 \cos^2 \theta') = l^3 \cos^3 \theta' \quad (3)$$

Considerando (n+i) ligações e j = (n+i), a projeção do segmento j (j>i) é tanto menor quanto maior for a diferença (i-j), pois $\cos^{|j-i|}$ tende a zero quando $|j-i|$ tender a infinito.

Generalizando a projeção do segmento j na ligação i, é obtido:

$$\langle \vec{r}_i \cdot \vec{r}_j \rangle = l \cos^{|j-i|} \theta' \quad (4)$$

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = nl^2 \cdot \begin{bmatrix} 1+ & \cos \theta' & \cos^2 \theta' & \cos^{n-1} \theta' + \\ \cos \theta' + & 1+ & \cos \theta' & \cos^{n-2} \theta' + \\ \cos^2 \theta' & \cos \theta' & 1+ & \cos^{n-3} \theta' + \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \cos^{n-1} \theta' + & \cos^{n-2} \theta' + & \cos^{n-3} \theta' + & 1 \end{bmatrix}$$

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 + 2l^2 \{ (n-1)\cos\theta' + (n-2)\cos^2\theta' + [n(n-1)]\cos^{n-1}\theta' \cdot \cos\theta' \} \quad (5)$$

Para cadeias infinitas a expressão acima se reduz a

$$\langle r^2 \rangle = nl^2 \left(\frac{1 + \cos\theta'}{1 - \cos\theta'} \right) \quad (6),$$

Conseqüentemente, surge a razão característica da cadeia dada por:

$$C_\infty = \left(\frac{1 + \cos\theta'}{1 - \cos\theta'} \right) \quad (7)$$

A distância entre as extremidades de uma cadeia ideal pode ser obtida a partir de

$$\langle \vec{r} \rangle = (\sqrt{C_\infty n}) \cdot l \quad (8)$$

Para cadeias de segmentos livres $C_\infty = 1$.

3.2.3 - Cadeias poliméricas com rotações restringidas.

Para estas cadeias apenas algumas posições são ocupadas sobre o cone de revolução (Figura 22). As posições serão aquelas que permitem povoamento de estados de menor energia, trans ($\varphi = 0^\circ$), gauche+ ($\varphi = 120^\circ$) e gauche- ($\varphi = 240^\circ$)³¹.

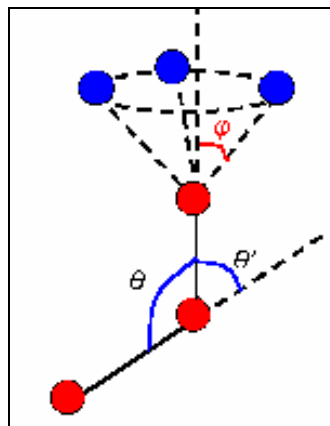


Figura 22 - Posições permitidas dos monômeros para uma cadeia com rotações restringidas.

Além do ângulo θ' observamos, de acordo com a Figura 22, o ângulo φ que determina a posição ocupada na superfície do cone. Assim é obtido

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = nl^2 \left(\frac{1 + \cos \theta'}{1 - \cos \theta'} \right) \left(\frac{\langle 1 - \cos \varphi \rangle}{\langle 1 + \cos \varphi \rangle} \right) \quad (1)$$

A razão característica será:

$$C_{\infty} = \left(\frac{\langle 1 - \cos \varphi \rangle}{\langle 1 + \cos \varphi \rangle} \right) \quad (2)$$

Com o intuito de simplificar este modelo só serão consideradas as interações entre uma ligação i e a ligação adjacente à qual ela se encontra associada (considera-se que as interações com outras ligações já foram computadas ao serem consideradas as interações com as cadeias adjacentes). Neste modelo de cadeias ideais cada ligação tem o seu sistema de coordenadas.

As componentes de um vetor no sistema de coordenadas que define a ligação $i+1$ (XYZ) podem ser transformadas em componentes do sistema de coordenadas ou sistema de coordenadas da ligação i (X'', Y'', Z'') (Figura 24). Inicialmente, é realizada a projeção do vetor $i+1$ na direção do vetor i , efetuando a rotação do plano YZ em torno do eixo X de um ângulo θ' para um novo sistema de eixos X', Y', Z' , em que Z' coincida com Z'' (do sistema de coordenadas da ligação i - Figura 23), depois é realizada nova rotação do sistema $X'Y'$ em torno do eixo Z' de um ângulo θ' até que o sistema de coordenadas coincida com o sistema XYZ da ligação i . Em seguida, faz-se a conversão do sistema X, Y, Z para o sistema X'', Y'', Z'' , a partir do produto de duas matrizes de rotação.

Para esta primeira rotação são obtidos

$$X' = X;$$

$$Y' = Y \cos \theta - Z \sin \theta;$$

$$Z' = Z \sin \theta + Y \cos \theta$$

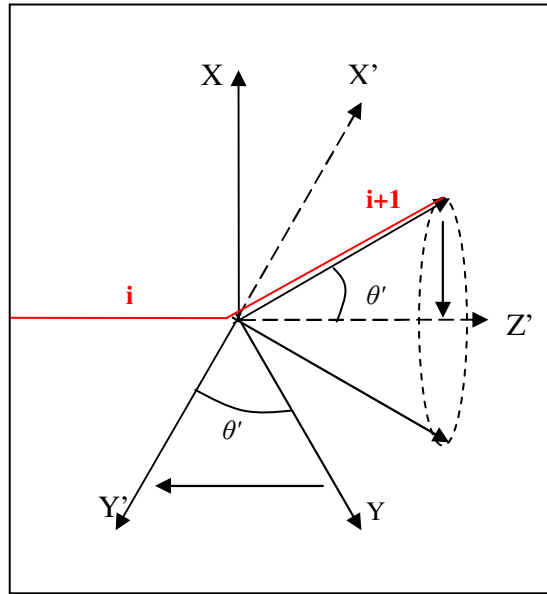


Figura 23 - Rotação do sistema XYZ de um ângulo θ' até coincidir com o sistema de coordenadas X'Y'Z'.

A segunda rotação produz:

$$Z'' = Z'$$

$$X'' = X' \cos \varphi - Y' \sin \varphi$$

$$Y'' = Y' \sin \varphi + X' \cos \varphi$$

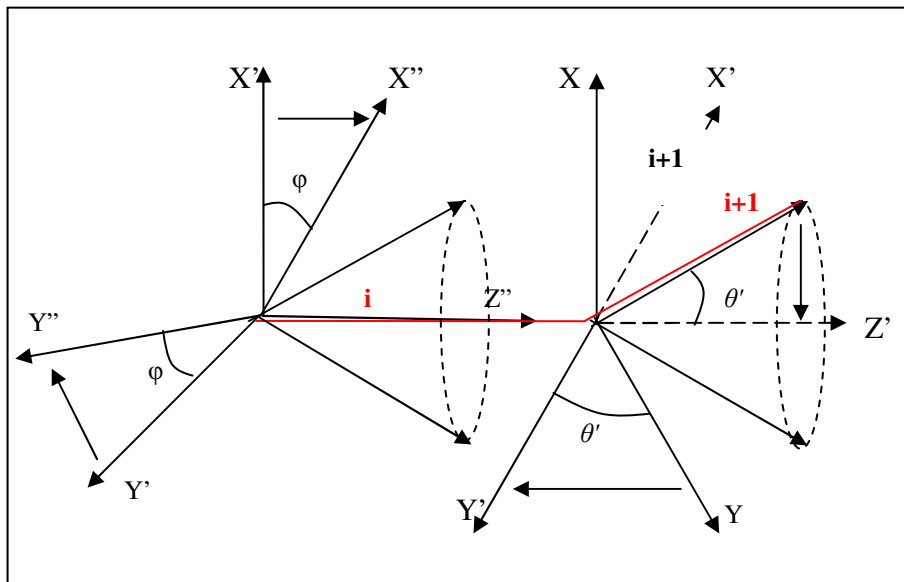


Figura 24 - Rotação do sistema X'Y'Z' de um ângulo φ .

Portanto a ligação i na ligação $i + 1$, é dada por:

$$\begin{bmatrix} X'' \\ Y'' \\ Z'' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \cos \varphi & -\text{sen} \varphi & 0 \\ \text{sen} \varphi & \cos \varphi & 0 \\ 0 & 0 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} 1 & 0 & 0 \\ 0 & \cos \theta' & -\text{sen} \theta' \\ 0 & \text{sen} \theta' & \cos \theta' \end{bmatrix} \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} = T \begin{bmatrix} X \\ Y \\ Z \end{bmatrix} \quad (3)$$

sendo:

$$T = \begin{bmatrix} \cos \varphi & -\text{sen} \varphi \cos \theta' & \text{sen} \varphi \text{sen} \theta' \\ \text{sen} \varphi & \cos \varphi \cos \theta' & -\cos \varphi \text{sen} \theta' \\ 0 & \text{sen} \theta' & \cos \theta' \end{bmatrix} \quad (4)$$

No sistema de coordenadas da ligação i , o vetor \mathbf{r}_i é dado por

$$\vec{r} = \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ l \end{bmatrix} \cdot \vec{e}_i \quad (5)$$

Para vetores com componentes no mesmo sistema de coordenadas o produto escalar de r_1 com r_2 é:

$$\vec{r}_1 \cdot \vec{r}_2 = l \vec{e}_1 \cdot l \vec{e}_2 = l^2 [e_{1X} \cdot e_{1Y} \cdot e_{1Z}] \cdot \begin{bmatrix} e_{2X} \\ e_{2Y} \\ e_{2Z} \end{bmatrix} \quad (6)$$

Para vetores com componentes em sistemas de coordenadas distintos $\vec{r}^2 = l T^2 e_2$

no sistema de coordenadas de \mathbf{r}_1 e $\vec{r}_1 \cdot \vec{r}_2 = l e_1^T T e_2$.

$$\langle \vec{r}^2 \rangle = \begin{bmatrix} 1 + e_1^T T^2 e_2 + e_1^T T^3 e_3 + \dots e_1^T T^{n-1} e_{n-1} + \\ e_2^T T e_1 + 1 + e_2^T T^2 e_3 + \dots e_2^T T^{n-2} e_{n-2} + \\ e_3^T T^2 e_1 + e_3^T T e_2 + 1 + \dots e_3^T T^{n-3} e_{n-3} \\ \vdots \\ e_n^T T^{n-1} e_{n-1} + e_n^T T^{n-2} e_{n-2} + e_n^T T^{n-3} e_{n-3} + \dots 1 \end{bmatrix},$$

sendo os vetores e_i idênticos (0,0,1).

$$\langle \vec{r}^2 \rangle \approx nl^2 + 2l^2 \sum_{i=1}^{n-1} (n-i) \vec{e}_i^T \langle T \rangle^i \vec{e}_i \quad (7)$$

Quando $n \rightarrow \infty$ tem-se o resultado idêntico ao anterior

$$\langle \vec{r}^2 \rangle \approx nl^2 + 2nl^2 \vec{e}_i^T \langle T \rangle \left(\frac{\langle T \rangle}{1 - \langle T \rangle} \right) \vec{e}_i \quad (8)$$

Para o caso de moléculas em que o potencial de rotação é simétrico em torno de 180° , a média dos termos em $\sin\varphi$ anula-se e a seguinte expressão pode ser obtida

$$\langle \vec{r}^2 \rangle \approx nl^2 \left(\frac{1 + \cos\theta'}{1 - \cos\theta'} \right) \left(\frac{1 - \langle \cos\varphi \rangle}{1 + \langle \cos\varphi \rangle} \right) \quad (9)$$

3.2.4 – Modelo do estado isomérico rotacional

Neste modelo os diferentes estados conformacionais são ocupados porque as barreiras energéticas entre conformações são suficientemente elevadas e os mínimos de energia bem definidos, com diferenças de energia entre si pouco significativas³¹.

A função de distribuição dos ângulos de torção é dada por

$$n(\varphi) = \frac{e^{-U(\varphi)/kT}}{\int_0^{2\pi} e^{-U(\varphi)/kT} d\varphi},$$

sendo

$$\langle \cos\varphi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \cos\varphi \cdot e^{-U(\varphi)/kT} d\varphi}{\int_0^{2\pi} e^{-U(\varphi)/kT} d\varphi}, \quad (1)$$

sendo, U a energia referente à posição ocupada (gauche+, gauche- ou trans).

A aproximação do modelo das rotações restringidas ao estado isomérico rotacional pode ser determinada como segue:

$$\langle \cos \varphi \rangle = \frac{\cos \varphi_{G+} e^{-U_G/kT} + \cos \varphi_T e^{-U_T/kT} + \cos \varphi_{G-} e^{-U_G/kT}}{e^{-U_G/kT} + e^{-U_T/kT} + e^{-U_G/kT}} \quad (2)$$

Neste modelo são consideradas as interações entre as ligações adjacentes e os pesos estatísticos dos diferentes estados conformacionais. Considerando o estado da ligação $i-1:\alpha$ e o estado da ligação $i:\beta$, o peso estatístico da ligação i para uma conformação $\alpha\beta$ será

$$u_{\alpha\beta,i} = e^{-U_{\alpha,\beta,i}/k_B T}$$

A definição de uma matriz dos pesos estatísticos é dada por³¹

$$[u] = \begin{bmatrix} u^{TT} & u^{TG+} & u^{TG-} \\ u^{G+T} & u^{G+G+} & u^{G+G-} \\ u^{G-T} & u^{G-G+} & u^{G-G-} \end{bmatrix}$$

A distância entre as extremidades da cadeia poderá ser calculada por

$$\langle \vec{r} \rangle = nl^2 + 2nl^2 A^* \cdot \frac{T\lambda}{I - DT} \cdot AI \quad (3)$$

sendo, D a matriz diagonal das matrizes de $[u]$, I a matriz identidade, λ são os valores próprios da matriz u , A^* e A são as matrizes usadas para o cálculo da média do produto de matrizes de uma cadeia infinita.

O resultado da Equação (3) é dado por

$$\langle r^2 \rangle = (6,7 \pm 0,2).nl^2$$

3.2.5. Raio de giração.

A distância entre extremidades de cadeias poliméricas é difícil de ser medida. Portanto, o raio de giração, R_g , freqüentemente é usado, pois pode ser medido pela técnica de espalhamento de luz²⁵. O raio de giração de um polímero é ilustrado na Figura 25.

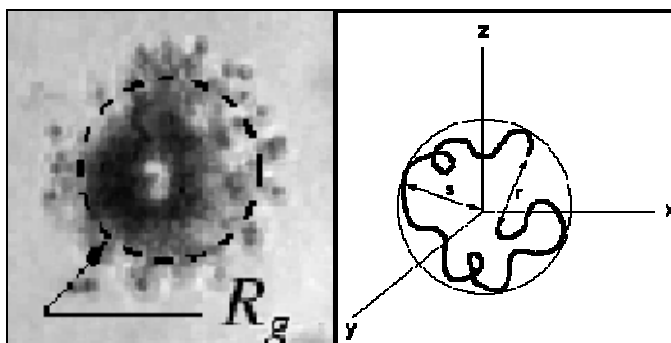


Figura 25 – Representação do raio de giração de uma cadeia polimérica.

O raio de giração é um parâmetro que caracteriza o tamanho de uma partícula. Para uma partícula constituída de elementos de massa m_i , cada uma localizada a uma distância s_i do centro de massa, o raio de giração, s , é definido como o quadrado da distância média ao centro de massa, s_i^2 , para a massa de todos os elementos de massa. Determina-se o raio de giração por

$$R_g = \left(\frac{\sum_i m_i s_i^2}{\sum_i m_i} \right) \quad (1)$$

Para partículas não rígidas (cadeias poliméricas) o raio de giração é a média de todas as conformações possíveis, sendo dada por

$$R_g = \langle s^2 \rangle^{1/2} = \frac{\left\langle \sum_i m_i s_i^2 \right\rangle^{1/2}}{\left\langle \sum_i m_i \right\rangle^{1/2}} \quad (2)$$

sendo, s a distância entre o centro de massa e a posição da partícula em dado instante, como ilustrado pela Figura 26 .

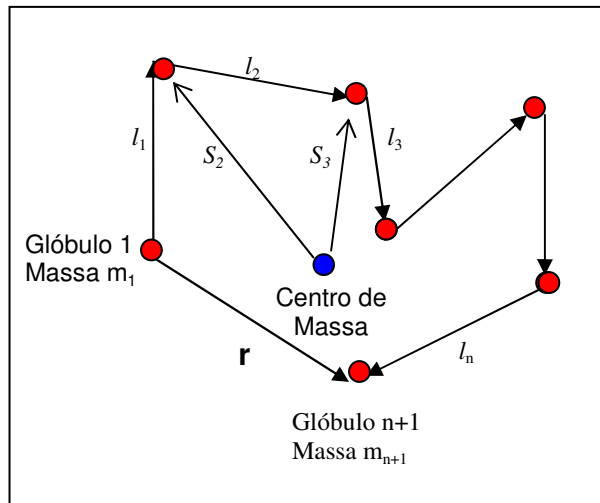


Figura 26 – Distância entre os elementos de massa e o centro de massa (s).

Para cadeias ideais R_g é dado por

$$R_g = \left(\frac{\langle r^2 \rangle}{6} \right)^{1/2} \quad (3)$$

Para as cadeias ideais, as interações entre as unidades méricas e entre unidades da cadeia e moléculas do solvente são desprezadas, mas para melhor entender os conceitos de desentrelaçamento e movimento de reptação há necessidade de considerar estas interações. Quando tais fatores são levados em conta a cadeia deixa de ser considerada um modelo ideal e passa à condição de cadeia real. Por isso, a seguir faremos o estudo do comportamento de cadeias reais em soluções poliméricas.

3.3 – Cadeias reais.

As cadeias poliméricas reais são macromoléculas nas quais as interações entre seus monômeros devem ser analisadas levando em conta o volume excluído³². Isto causa uma redução nas possibilidades conformacionais da cadeia e conduz a um caminho aleatório no qual a cadeia evita a si mesma, sendo que tal caminho apresenta conformações estatísticas diferentes às dos caminhos aleatórios simples das cadeias ideais.

Para um bom conhecimento sobre o comportamento de cadeias poliméricas reais e interações entre cadeias e solventes em soluções, devem ser entendidos o conceito de volume excluído e a Teoria de Flory para bons e maus solventes. O conceito do volume excluído explica como ocorre formação do tubo de confinamento e a Teoria de Flory interpreta o relacionamento entre o polímero e o solvente, fator importante para o entendimento do intumescimento do polímero, fenômeno muito importante para este estudo. Neste sentido, tais conceitos teóricos serão esclarecidos nos itens 3.3.1 e 3.3.2.

3.3.1. Volume excluído.

O volume excluído de uma macromolécula é o volume da qual uma macromolécula em uma solução diluída, efetivamente, exclui todas as outras macromoléculas. Há alguns anos, Ogston apresentou o tratamento teórico dos efeitos do volume excluído³³, no qual uma proteína era modelada como uma partícula esférica e um polímero ou cadeia polimérica como uma haste rígida ou como uma esfera; estes dois últimos modelos foram selecionados como aproximações mais apropriadas, modelo da cadeia enovelada. Quando usado, o modelo negligencia a curvatura da cadeia; isto é presumivelmente possível quando a cadeia interage com muitas esferas pequenas.(Figura 27).

O Volume excluído V_{12} pode ser definido como o volume efetivo de uma solução que, estritamente por razões espaciais, não está disponível para partículas da espécie 1 como resultado da introdução de partículas da espécie 2.³⁴ De acordo com esta definição: se N_1 V_{total} partículas da espécie 1 são distribuídas aleatoriamente por todo volume, V_{total} , então a introdução de uma partícula da espécie 2 causa uma exclusão média de partículas do tipo 1. Neste caso o volume excluído (V_{ex}) pela presença da partícula 2 em relação a todas as partículas 1 é dado por³⁴

$$V_{ex} = N_1 \cdot V_{12} \quad (1)$$

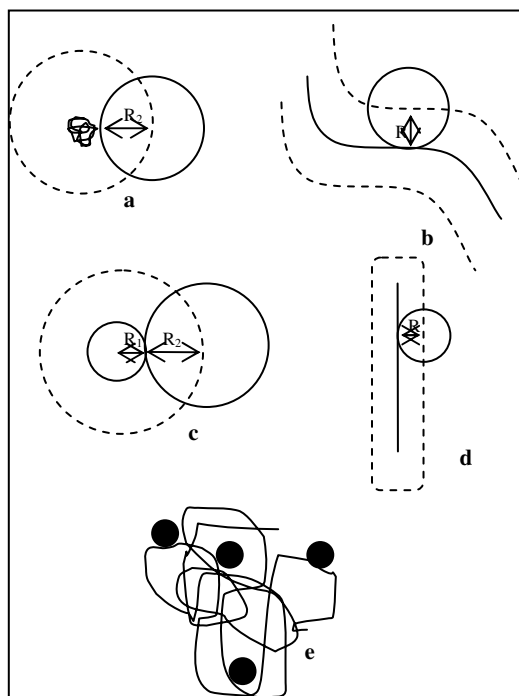


Figura 27 – Exclusão mútua de moléculas poliméricas e partículas esféricas³³. Cada curva pontilhada indica o volume dentro do qual o centro de uma esfera não pode ser localizado em presença de outra partícula. Quando as dimensões médias de uma molécula polimérica forem relativamente pequenas comparadas à esfera (a), quando ela puder ser representada razoavelmente como uma esfera (b). Quando a curvatura média da superfície polimérica for menor que a da superfície da esfera (c), se o polímero puder ser considerado com uma partícula em forma de haste (d). Quando nenhuma dessas simulações for válida (e), estas simulações são menos apropriadas.

Para o simples caso da exclusão de esferas da série 1 por outras esferas da série 2, o volume excluído é o volume da solução onde o centro da esfera não pode ser colocado na presença da outra e é igual ao co-volume de duas esferas e, também, pode ser o volume da esfera com raio igual à soma dos raios das duas esferas 1 e 2 (Figura 27).

Para duas esferas, o volume excluído (V_{12}) é definido por

$$V_{12} = \left(\frac{4\pi}{3} \right) (R_1 + R_2)^3. \quad (2)$$

O co-volume independe da espécie excluída escolhida; geralmente o volume excluído é

independente da escolha e, portanto:

$$V_{12} = V_{21}$$

A determinação do volume excluído de um par de partículas com formas diferentes, usando princípios geométricos, é efetuado escolhendo, inicialmente, uma ou outra como partícula excluída. Considera-se, também, a exclusão que resulta em um deslocamento de uma partícula de comprimento infinitesimal (Figura 27 (d)). Ele é facilmente visto como uma esfera e uma haste muito fina, onde o volume excluído é dado por:

$$V_{12} = \pi R_2^2 L_1 + \frac{4}{3} \pi R_2^3, \quad (3)$$

sendo o volume do cilindro dado por $\pi R_2^2 L_1$ de comprimento igual ao da haste (L_1) e com raio igual ao raio R_2 da esfera, mais o volume da esfera $\frac{4}{3} \pi R_2^3$.

Escolhendo a esfera como a partícula excluída, pareceria que o volume total, onde o centro da haste não pudesse ser posicionado, após a introdução da esfera, fosse igual ao volume da esfera. Entretanto, este não é igual ao volume excluído definido acima, porque o volume não excluído da haste obstrui o posicionamento da esfera não orientada aleatoriamente: dependendo da orientação, a haste poderá ser excluída quando o seu centro de massa estiver acima da metade do comprimento da haste longe da superfície da haste. O efetivo volume excluído deve, neste caso, ser calculado como uma soma ou integral da perda de probabilidade direcional do volume total e será, então, igual ao volume calculado considerando a haste como partícula excluída.

O volume excluído compreende a região que a esfera não poderá ocupar devido à conformação da macromolécula. Entretanto, quando comparado com os valores experimentais, deveria ser uma média de todas as possíveis conformações da cadeia polimérica. Primeiro pode-se alternativamente calcular o volume proibido para cadeias poliméricas pela presença de uma partícula esférica. Em tal caso, devem ser consideradas as perdas das liberdades direcionais e conformacionais da cadeia, somadas a todas as possibilidades de deslocamento de um elemento selecionado da cadeia.

O volume excluído depende das energias de Helmotz e de Gibbs, da mistura entre polímero e solvente, da natureza termodinâmica do solvente, e não é uma medida do volume

geométrico da macromolécula.

Finalmente, o volume excluído, segundo Flory, pode ser determinado considerando dois segmentos poliméricos separados por uma distância r ³⁵. A energia potencial de interação entre eles será $U(r)$ e, então, o volume excluído pela cadeia polimérica será

$$V_{Ex} = \int_0^{\infty} \left[1 - e^{\left(\frac{U(r)}{k_B T} \right)} \right] 4\pi r^2 dr \quad (4)$$

O efeito do volume excluído pode ser notado com a variação das concentrações do polímero e do solvente na solução. Com o aumento da concentração do polímero o espaço disponível para que a cadeia macromolecular movimente reduz devido à exclusão do volume causada por ela própria e pelas moléculas do solvente sobre suas unidades méricas. Neste sentido, o raio de giração, o comprimento da cadeia polimérica e a taxa de autodifusão decrescem, enquanto o tempo de relaxação aumenta. Qualquer variação na concentração do solvente não afeta as dimensões da cadeia polimérica.

3.3.2 – Teoria de Flory para polímeros em bons e maus solventes.

A teoria de Flory considera a entropia da mistura um fator que restringe a conformação e, portanto, restringe a distância entre extremidades da cadeia. Uma cadeia completamente estirada poderá assumir apenas uma conformação, porém em movimento aleatório poderá assumir um número muito grande de conformações, ou seja, no segundo caso o sistema (cadeia polimérica) apresenta uma entropia maior do que na primeira situação.

Uma cadeia dissolvida em bom solvente tenderá a expandir formando um novelo com conformação Gaussiana, pois foi observada por Flory a existência de uma tendência natural apresentada pela cadeia polimérica em aumentar o número de pontos de contato com solvente. Entretanto, quando ela se expande perde entropia contrariando a segunda lei da termodinâmica.³⁶

O argumento usado por Flory para explicar esse fato está relacionado à energia livre do sistema, $G = H - TS$. Como G é uma função da distância entre as extremidades da cadeia (r), foi considerada a existência de um valor de r que minimiza G . Em uma mistura

polímero/solvente a energia livre do sistema segundo Flory é dada por ³⁵

$$\frac{\Delta G_m}{k_B T} = \phi_1 \phi_2 \chi + \phi_1 \ln \phi_1 + \frac{\phi_2}{r} \ln \phi_2, \quad (1)$$

sendo, G_m a energia livre da mistura, ϕ_1 a fração de volume do solvente, ϕ_2 a fração de volume do polímero, k_B é a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, χ o parâmetro de Flory e r é a distância entre as extremidades da cadeia polimérica.

A contribuição do polímero para a energia livre do sistema é dada por:

$$G_2 = \left(\phi_2 \chi + \frac{\phi_2}{r} \ln \phi_2 \right) \quad (2)$$

A entropia da cadeia pode ser calculada através da expressão

$$S(r) = -k_B \frac{r^2}{\langle r^2 \rangle} \rightarrow -TS(r) = k_B T \frac{r^2}{\langle r^2 \rangle}, \quad (3)$$

sendo $S(r)$ a entropia da cadeia polimérica em função da distância entre suas extremidades, k_B a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta e $\langle r^2 \rangle$ o quadrado da distância média entre as extremidades da cadeia.

Considerando que a energia gerada pelo contato entre polímero e solvente seja nula e que a energia causada pela interação entre cadeias poliméricas seja $c k_B T$ de valor positivo, o número de contatos entre polímeros será dado por

$$N \cdot \frac{N}{r^3} \quad (4)$$

A entalpia do sistema, então, será:

$$H = c k_B T \frac{N^2}{r^3} \quad (5)$$

A energia livre será dada por:

$$\frac{G}{k_B T} = c \cdot \frac{N^2}{r^3} + \frac{r^2}{N l^2} \rightarrow \frac{\partial G}{\partial r} = 0, \quad -3c \frac{N^2}{r^4} + \frac{2r}{N l^2} = 0 \quad (6)$$

$$r \approx N^{\frac{3}{5}}$$

sendo N o número de unidades métricas da cadeia polimérica.

Para cadeia de $N = 10.000$, a expansão em bom solvente é considerável.

Para uma cadeia polimérica em mau solvente, Flory considerou um estado hipotético onde $T = 0$. Dessa maneira, a energia livre do sistema se resume à energia interna

$$G = H - TS \rightarrow G = H \quad (7)$$

Minimizando a energia, como no caso do limite considerado, o polímero evita o solvente completamente, formando um novelo bem denso devido a sua contração.

$$Nl^3 = r^3 \rightarrow r \approx N^{\frac{1}{3}} \quad (8)$$

A diferença do contato entre um polímero com um bom e um mau solvente é representada na Figura 28.



Figura 28 - Representação esquemática de um polímero do tipo novelo aleatório em bom solvente (a) e em mau solvente (b).

Portanto, o conhecimento dos parâmetros de solubilidade de polímeros e das propriedades de suas soluções é essencial para a seleção do solvente sendo: não-solvente, mau solvente ou bom solvente. Um *bom solvente* é aquele que dissolve qualquer quantidade de polímero numa faixa de temperatura compreendida entre seu ponto de fusão e seu ponto de ebulição. Enquanto que um *não-solvente* é o oposto, não dissolve ou mesmo intumescce (incha) um polímero. A adição gradativa de um não-solvente a uma solução de um determinado polímero num bom solvente provoca sua precipitação.

Em termos qualitativos, uma regra diferencia um bom solvente de um não-solvente: “igual dissolve igual”. Apesar de ser limitada, esta regra permite deduzir bons solventes para a maioria dos polímeros.

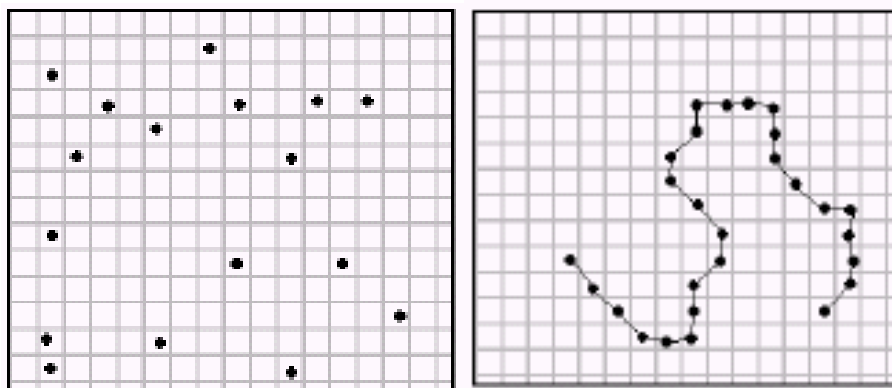
Não só o tipo de solvente e polímero influi no processo de solubilização como outras variáveis inerentes à estrutura do polímero contribuem significativamente na solubilidade do mesmo. A alta cristalinidade e altas massas moleculares têm efeito negativo, o que torna mais difícil a escolha de um solvente apropriado por este método empírico. Para dissolver um polímero é necessário que as interações entre os segmentos da cadeia polimérica e o solvente sejam maiores do que as interações entre as partículas do solvente e polímero-polímero. Em termos quantitativos, a dissolução vai ocorrer pela diminuição da energia livre do sistema³⁶

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (9)$$

O índice “m” indica o processo de mistura. Então, valores de negativos de ΔG_m favorecem a dissolução. O aumento de entropia naturalmente ocorre durante o processo de dissolução. Em um polímero no estado sólido, suas cadeias estão entrelaçadas, e os movimentos brownianos moleculares estão confinados à pequenos segmentos. Em solução, as cadeias se expandem e ganham liberdade para movimentos translacionais regidos pelas diferentes conformações que possam assumir. ΔS é função do peso molecular do polímero, e o cálculo teórico de ΔS é dado pela contribuição das diferentes conformações estatísticas que a cadeia macromolecular pode assumir em solução³⁵

$$\Omega = \Delta \ln k_B S \quad (10)$$

sendo K_B é a constante de Boltzman, e Ω é o número de possíveis conformações que a cadeia polimérica pode assumir. Um recurso muito utilizado para quantificar Ω se faz pela probabilidade de distribuição de segmentos poliméricos numa rede tridimensional (termodinâmica estatística). Nesta rede ou retículo, cada espaço pode ser preenchido por uma molécula de solvente ou por uma unidade da cadeia polimérica. Analisando a Figura 29, nota-se que um provável valor de Ω para solutos de baixo peso molecular é sempre muito maior do que para solutos poliméricos contendo o mesmo número de unidades. A probabilidade de S unidades de soluto, de baixo peso molecular, preencherem cada espaço da rede é maior do que no caso das unidades poliméricas. Isto se deve a união que existe entre as unidades do soluto polimérico, pois a probabilidade de fixar de uma unidade polimérica num determinado retículo é restringida pelas posições relativas das unidades vizinhas.



(a) Soluta monomérico/solvente (b) Soluta Polimérico/solvente

Figura 29 - Representação das possibilidades conformacionais de um soluto de baixo peso molecular (a) e de alto peso molecular (b)

Sendo ΔS_m geralmente pequeno, o termo relacionado a entalpia da Equação 1 tem que ser favorável para que a dissolução aconteça, e que é função da diferença das interações polímero-polímero e polímero-solvente ³⁷:

$$\Delta H_m = V_m \left[\left(\frac{\Delta H_{vap1}}{V_1} \right)^{\frac{1}{2}} - \left(\frac{\Delta H_{vap2}}{V_2} \right)^{\frac{1}{2}} \right]^2 \phi_1 \phi_2, \quad (11)$$

sendo, V_m representa o volume da mistura, V_1 é o volume do solvente, V_2 é o volume do polímero, ΔH_{vap1} e ΔH_{vap2} representam as entalpias de vaporização (ou seja, é a energia gasta para a separação infinita das moléculas constituintes de 1 e 2 respectivamente), ϕ_1 e ϕ_2 são frações volumétricas dos componentes solvente (1) e polímero (2). O termo $\Delta H/V$ representa a entalpia de vaporização por cm^3 . Este termo é conhecido como densidade de energia coesiva.

Na maioria dos casos, a entalpia de mistura, em sistemas polímero-solvente, é ligeiramente positiva, salvo os casos em que há uma forte interação de dipolos ou uma interação por ligação de hidrogênio entre os segmentos poliméricos e o solvente. Isto significa que a dissolução ocorre se os termos $\Delta H_{vap1}/V_1$ e $\Delta H_{vap2}/V_2$ apresentarem valores numéricos bem próximos.

A raiz quadrada da densidade de energia coesiva é conhecida como o Parâmetro de Solubilidade (δ), cuja unidade CGS é $(\text{cal}/\text{cm}^{-3})^{1/2}$, e SI é $(\text{J} \cdot \text{m}^{-3})^{1/2}$. Portanto, a miscibilidade de um polímero em um determinado solvente é avaliado quantitativamente pela diferença δ_1 -

δ_2 . O parâmetro de solubilidade de um solvente pode ser obtido através de sua entalpia de vaporização (ΔH_{vap}), segundo a Equação 12

$$\delta_1 = \left[\frac{(\Delta H_{vap} - RT)}{V_1} \right]^{\frac{1}{2}} \quad (12)$$

Para uma mistura de solventes, o parâmetro de solubilidade pode ser dado por

$$\delta_m = \frac{x_1 V_1 \delta_1 + x_2 V_2 \delta_2}{x_1 V_1 + x_2 V_2}, \quad (13)$$

sendo, “x” a fração molar e “V” o volume molar dos respectivos solventes. A Equação 13 só é válida para sistemas onde não ocorre variação de volume após a mistura (solução ideal).

Medidas absolutas de parâmetros de solubilidade para polímeros tornam-se impraticáveis, devido à impossibilidade de vaporização dos polímeros. Tais valores são obtidos por referência aos valores estabelecidos para os solventes. Neste caso faz-se teste de solubilidade de um determinado polímero em diferentes solventes com distintos valores de δ . O valor do parâmetro de solubilidade do polímero (δ) será de mesma magnitude do valor do solvente que apresentar uma maior interação com o polímero, ou através de uma média entre valores próximos referente a um conjunto de bons solventes.

Em viscosimetria de polímeros quanto maior a intensidade de interação polímero-solvente maior será o volume hidrodinâmico da partícula de polímero e, conseqüentemente, maior será a viscosidade intrínseca $[\eta]$. Portanto, medida de viscosidade intrínseca em diferentes solventes permite avaliar o valor de δ do polímero. Este valor é obtido através de um gráfico que relaciona a viscosidade intrínseca com valores de δ do solvente utilizado. A relação entre $[\eta]$ e δ é apresentada na Figura 30.

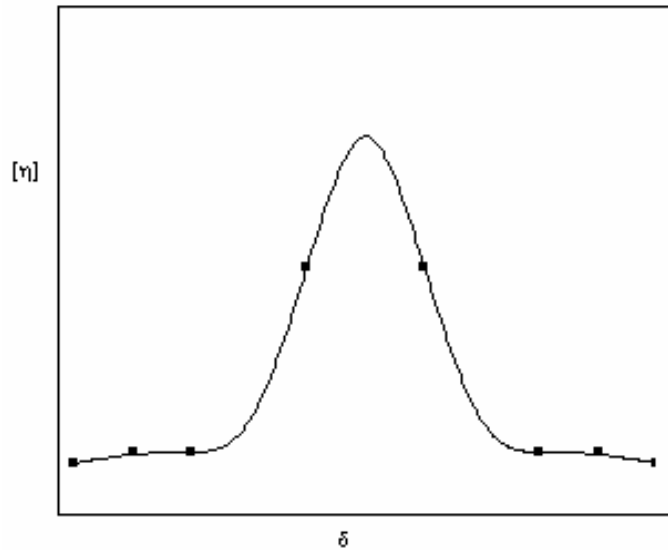


Figura 30 – Relação entre a viscosidade e o parâmetro de solubilidade de polímeros.

A solubilização do sistema (polímero/solvente) ocorre quando a energia livre de Gibbs sofre uma redução ou se mantém constante ³⁵

$$\Delta G_m = G_{12} - (G_1 + G_2) \leq 0, \quad (14)$$

sendo, G_1 a energia livre do solvente puro, G_2 é a energia livre do polímero puro e G_{12} a energia de Gibbs da mistura.

A análise da relação entre solvente e polímero pode ser feita a partir do parâmetro de Flory. Partindo da equação da variação da energia livre de uma solução polimérica, é possível determinar o parâmetro de interação entre polímero e solvente, através da Equação (15):

$$\Delta G_m = (N_1 \ln \phi_1 + N_2 \ln \phi_2 + N_1 \phi_2 \chi) RT, \quad (15)$$

sendo, n_1 é o número de mols do solvente, n_2 o número de mols do polímero, ϕ_1 é a fração de volume do solvente, ϕ_2 é a fração de volume do polímero, R é a constante dos gases ideais, T é a temperatura absoluta e χ é o parâmetro de Flory.

Efetuada a multiplicação por RT , no segundo membro da Equação (15), obtém-se

$$\Delta G_m = N_1 \ln \phi_1 RT + N_2 \ln \phi_2 RT + N_1 \phi_2 \chi RT \quad (16)$$

Na Equação (16) os dois primeiros termos do segundo membro correspondem à entropia do sistema, enquanto o terceiro está relacionado à entalpia. Portanto, podemos escrever as expressões para o calor de mistura da seguinte forma

$$\Delta H_m = N_1 \phi_2 (RT \chi) \quad (17)$$

$$\Delta H_m = V_m (N_1 + N_2) (\delta_1 - \delta_2)^2 \phi_1 \phi_2 \quad (18)$$

E, finalmente, igualando as duas expressões, determina-se o parâmetro de Flory, utilizando-se a definição de ϕ_1 como

$$\phi_1 = \frac{N_1 V_1}{V_m}, \quad (19)$$

logo, a expressão seguinte para χ pode ser obtida³⁸

$$\chi = \frac{V_1}{RT} (\delta_1 - \delta_2)^2 \quad (20)$$

As interações entre polímeros e solventes, descritas pelo parâmetro de Flory (χ), podem favorecer o enovelamento como um glóbulo quando seu valor for alto (Figura 28 (a)) ou intumescimento (Figura 28 (b)), quando este for pequeno. Na realidade ocorre “competição” entre três efeitos: para $\chi = 0,5$, os efeitos do volume excluído são equilibrados pelas interações entre polímero e solvente. Os efeitos elásticos conduzem a formação de um novelo aleatório com $\langle R^2 \rangle^{0,5} \sim IN^{0,5}$; quando $\chi < 0,5$, os efeitos do volume excluído são dominantes sobre as interações entre polímero e solvente, nesse caso os efeitos elásticos causam a formação de um novelo intumescido com $\langle R \rangle^{0,5} \sim IN^{0,5}$; finalmente, quando $\chi > 0,5$, as interações são dominantes sobre os efeitos do volume excluído e em conjunto com os efeitos elásticos conduzem a formação de um novelo bem denso como uma esfera.

Em se tratando de sistemas de liberação controlada baseado em polímeros hidrofílicos, o composto bioativo é liberado por reptação com posterior dissolução do bioconjugado CT/PDMAm-co-VP. Neste sentido, se torna primordial o conhecimento da dinâmica das

cadeias poliméricas entrelaçadas, bem como a maneira pela qual estas cadeias sofrem desentrelaçamento (dissolução), fenômeno descrito e analisado pela teoria da reptação. Portanto no próximo capítulo serão enfocadas a dinâmica das cadeias poliméricas e a teoria da reptação.

DINÂMICA DE CADEIAS POLIMÉRICAS E TEORIA DA REPTAÇÃO

O modelo de Rouse é uma descrição da dinâmica da cadeia polimérica dentro do tubo de reptação, ou seja, este modelo descreve como o movimento da macromolécula ocorrerá “motivado” pelas interações entre as unidades méricas da própria cadeia, entre cadeias diferentes e interações entre uma cadeia e o solvente.

A teoria da reptação, baseia-se na dinâmica de Rouse para cadeias entrelaçadas, o movimento das macromoléculas de PDMAm-co-VP durante a dissolução desse copolímero é, então, interpretada a partir do modelo de Rouse, tornando este modelo teórico muito importante para este trabalho, bem como para toda a área farmacêutica que aplica sistemas de liberação controlada por dissolução ou degradação da matriz polimérica.

4.1. Modelo de Rouse.

Existem vários modelos que explicam o comportamento de polímeros em solução. É necessário entender o modelo de Rouse para posteriormente compreender o modelo teórico de reptação.

Em seu modelo, Rouse atribui a movimentação da cadeia polimérica ao movimento Browniano, cuja característica principal é o movimento aleatório de partículas gerado pelas colisões com outras partículas ou por razões térmicas. Duas condições são primordiais para entendê-lo: as equações de Smoluchowski e de Langevin³⁹

Nas equações de Langevin é proposta a colocação em forma explícita de uma força do tipo aleatória (com dada distribuição probabilística) nas equações de movimento que regem o sistema em estudo³⁹. Dessa maneira, deve ser considerada a seguinte expressão:

$$\zeta = \frac{dx}{dt} = \frac{\partial U_{ex}}{\partial T} + f(t), \quad (1)$$

sendo ζ é o coeficiente de fricção do meio; U_{ex} é o potencial externo; $f(t)$ é a soma das forças

devido às colisões incessantes que sofrem as partículas pelas moléculas fluido. Pode-se conhecer a forma da função apontada na equação (1), ao se considerar uma função estocástica com uma distribuição do tipo gaussiana. A partir da Equação (1), é deduzida a equação para o espaço multifuncional. Tal equação pode determinar a evolução da função distribuição para o caso da equação de Smoluchowski que pode ser expressa por ³⁸

$$\frac{d}{dt} x_n = \sum_m L_{n,m} \left(\frac{\partial U}{\partial x_m} + f_m(t) \right) + \frac{1}{2} k_B T \sum_m \frac{\partial}{\partial x_m} L_{m,n}, \quad (2)$$

sendo, $L_{m,n}$ as componentes da matriz de mobilidade que relacionam a força sofrida por uma partícula com certa velocidade média v_n , dada por

$$v_n = \sum_m L_{m,n}(x) F_m, \quad (3)$$

sendo, v_n a velocidade média da partícula.

O modelo de Rouse é baseado no estudo dos polímeros em solução. As cadeias são representadas por esferas unidas entre si por molas (Figura 31).

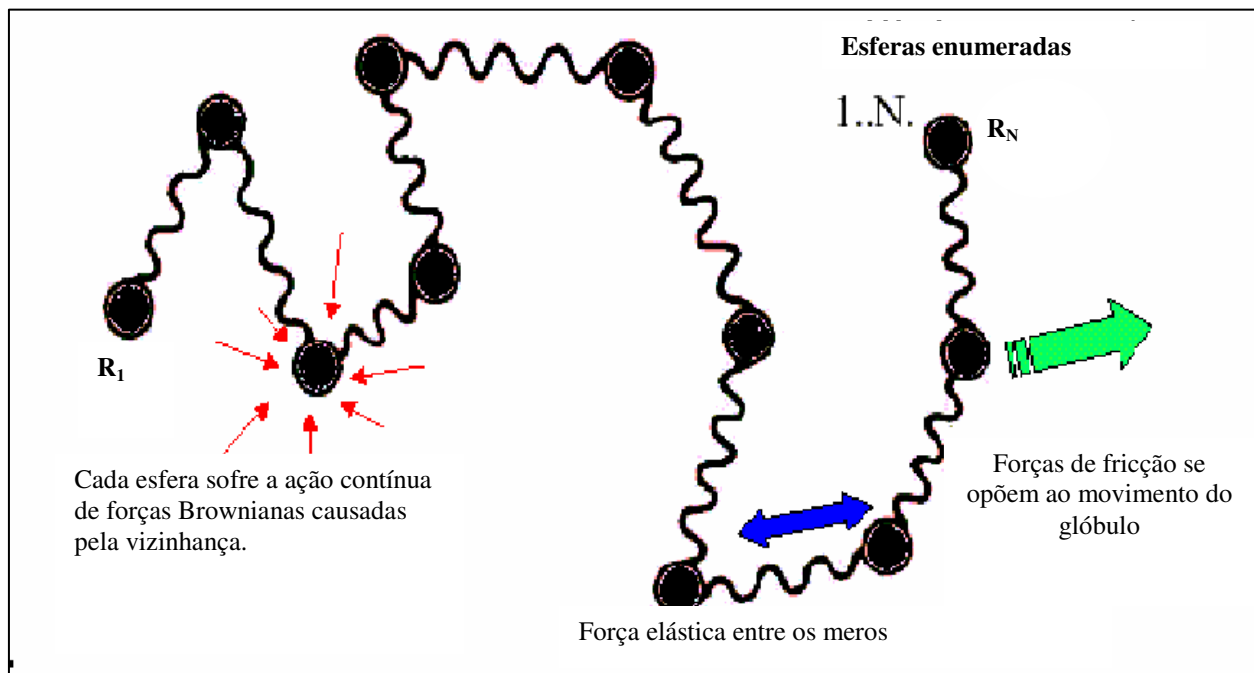


Figura 31 – Modelo de uma cadeia formada por esferas ligadas por molas.

Sendo r_n um vetor cujas componentes são as posições das esferas do polímero e aplicando-se a equação de Langevin a este novo sistema tem-se, a expressão ³⁹

$$\frac{\partial}{\partial t} r_n(t) = \sum_m H_{nm} \left(-\frac{\partial U_i}{\partial r_m} + f_m(t) \right) + \frac{1}{2} k_B T \sum_m \frac{\partial}{\partial r_m} H_{nm} \quad (4)$$

sendo, H_{nm} a tensão de mobilidade gerada pela interação entre as esferas do polímero e o solvente.

Este modelo despreza os efeitos associados à interação do volume excluído e às interações hidrodinâmicas. Sendo a tensão de mobilidade (H_{nm}) e o potencial de interação (U_i), dados por:

$$H_{nm} = \frac{l}{\zeta} \delta_{nm},$$

$$U_i = \frac{3k_B T}{2l^2} \sum_{n=2} (r_n - r_{n-1})^2,$$

sendo, l o comprimento característico da unidade métrica. Assim, para as esferas internos tem-se

$$\zeta \frac{dr_n}{dt} = -k_B (2r_n - r_{n+1} - r_{n-1}) + f_n \quad (5)$$

e para as esferas nos extremos da cadeia

$$\zeta \frac{dr_1}{dt} = -k_B (r_1 - r_2) + f_1, \quad \zeta \frac{dr_N}{dt} = -k_B (r_N - r_{N-1}) + f_N \quad (6)$$

Para macromoléculas podem ser usadas variáveis contínuas, portanto a equação que rege o sistema pode ser escrita como:

$$\zeta \frac{\partial r_n}{\partial t} = k_B \frac{\partial^2 r_n}{\partial n^2} + f_n \quad (7)$$

Para simplificar os cálculos, são definidas as variáveis normais da seguinte maneira:

$$X_p = \frac{1}{N} \int_0^N \cos\left(\frac{p\pi n}{N}\right) r_n(t) dn \quad p = 1, 2, 3, \dots \quad (8)$$

E a equação que rege todo o sistema é expressa por:

$$\zeta_p \frac{\partial}{\partial t} X_p = -k_p X_p + f_p,$$

$$\zeta_p = 2N\zeta,$$

$$k_p = \frac{2\pi^2 k p^2}{N} = \frac{6\pi k_B T}{Nl^2} p^2 \quad (9)$$

O vetor que representa a distância entre as extremidades da cadeia é dado por

$$Pt \equiv R_N(T) - R_0(t) = -4 \sum_{p=1,2,3,\dots} X_p(t) \quad (10)$$

A função correlação do tempo é definida pela relação a seguir

$$C_{AA}(t) = \langle A(t)A(0) \rangle \quad (11)$$

sendo, C_{AA} a correlação entre o vetor posição do final da cadeia para um dado instante de tempo t em relação à sua posição no instante 0.

A equação (11) dá uma idéia de como o valor da função Browniana se relaciona com seu valor no tempo zero. Para tempos suficientemente grandes, é possível demonstrar que ela equivale a tomar o produto separado de cada termo. Por outro lado no caso de haver um potencial do tipo harmônico (como o caso do potencial das molas) o valor dessa função

correlação será dado por

$$\langle x(t)x(0) \rangle = \frac{k_B T}{k} \exp(-t/\tau) \quad \tau = \frac{\zeta}{k} \quad (12)$$

Logo, aplicando estes últimos conceitos na Equação (11) é calculada a função correlação para a função término de cadeia:

$$\langle P(t)P(0) \rangle = 16 \sum_{p=1,2,3,\dots} \langle X_p(t)X_p(0) \rangle = Nb^2 \sum_{p=1,2,3,\dots} \frac{8}{p^2 \pi^2} \exp(-tp^2 / \tau_1) \quad (13)$$

Define-se o tempo de relaxação rotacional τ_r como o maior tempo de relaxação da função correlação do fim da cadeia. No caso estudado corresponde ao valor do tempo de relaxação para $p = 1$. Obtendo-se:

$$\tau_r = \tau_1 = \frac{\zeta N^2 b^2}{3\pi^2 k_B T} \quad (14)$$

Assim como o modelo de Rouse, o modelo de Zimm se mostra como outra teoria muito importante, servindo também como base para a teoria de reptação. Este modelo permite determinar o coeficiente de difusão da cadeia polimérica dentro do tubo de reptação.

4.2. Modelo de Zimm

O modelo de Zimm consiste de um sistema de partículas brownianas em solução, na qual elas interagem umas com as outras (Figura 30). Cada uma tem formato esférico e sua posição é definida pela distância até o seu centro de massa. Não há torque externo agindo sobre as partículas, portanto, as velocidades das partículas podem ser dadas por:

$$v_m = \sum H_{mn} f_n \quad (1)$$

sendo, H_{mn} denominada de mobilidade da matriz polimérica.

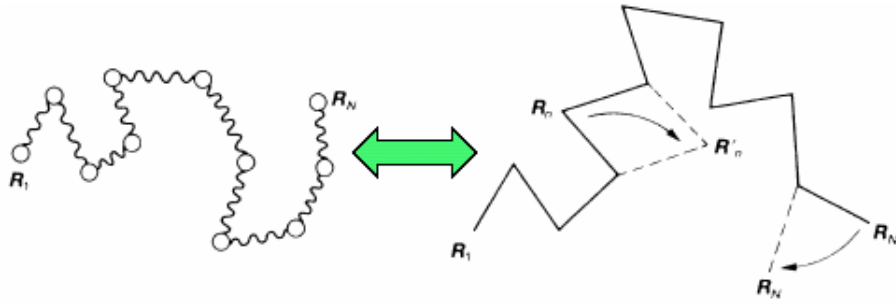


Figura 32 – Representação do movimento das cadeias poliméricas, segundo Zimm.

Em soluções muito diluídas a velocidade de uma partícula é determinada, somente pela força que age sobre esta, logo:

$$H_{mn} = \frac{I}{\zeta} \delta_{mn}, \quad (2)$$

sendo I a matriz unitária e $\zeta = 6\pi\eta_s l$ o coeficiente de fricção para a partícula e η_s viscosidade do solvente.

No limite do fluxo lento considerando que o fluido seja incompressível e a força inercial do fluido seja desprezível tem-se³⁸

$$H_{mn} = \frac{1}{8\pi\eta_s |\vec{r}_m - \vec{r}_n|} (\vec{e}_{mn} \vec{e}_{mn} + I), \quad \text{para } m \neq n \quad (3)$$

$$H_{mn} = \frac{I}{\zeta} \quad \text{para } m = n$$

sendo, \vec{r}_{mn} o vetor unitário na direção de r_{mn} denominado de tensor de Oseen. Aplicando o conceito de Zimm a equação de Langevin é escrita como

$$\frac{\partial r_m}{\partial t} = \sum H_{mn} \left(-\frac{\partial U}{\partial r_n} + f_m(t) \right) \quad (4)$$

Semelhante ao modelo de Rouse para θ -condições (condições ideais de temperatura) o potencial de interação pode ser considerado como:

$$U_i = \sum \frac{8}{2} \sum_{i=2}^N (r_i - r_{i-1})^2, \quad \text{com} \quad s = \frac{3k_B T}{l^2}, \quad (5)$$

A equação de Langevin é reescrita como

$$\frac{\partial r_m}{dt} = \sum_n H_{mn} \left(s \frac{\partial^2}{\partial j^2} r_n + f_n(t) \right) \quad (6)$$

Usando os limites contínuos para o número de unidades ao longo da cadeia. A Equação 6 foi deduzida primeiramente por Zimm e, por isso, recebe o seu nome.

A partir da Equação (2) é possível determinar o coeficiente de difusão de uma cadeia polimérica e o tempo de relaxação do polímero. Inicialmente, para o estado de equilíbrio substitui-se H_{mn} por $\langle H_{mn} \rangle_{eq}$:

$$\langle H_{mn} \rangle_{eq} = \frac{1}{6\pi\eta_s} \left\langle \frac{1}{|r_m - r_n|} \right\rangle_{eq}. \quad (7)$$

E ainda considerando que

$$\left\langle \frac{1}{|r_m - r_n|} \right\rangle_{eq} = \frac{l}{3}$$

e

$$\left\langle \frac{1}{|r_m - r_n|} \right\rangle_{eq} = \left(\frac{6}{\pi|m-n|} \right)^{1/2} \frac{1}{l}$$

a seguinte expressão para $\langle H_{mn} \rangle_{eq}$ pode ser obtida

$$\langle H_{mn} \rangle_{eq} = \frac{I}{(6\pi^3 |m-n|)^{1/2} \eta_s l} \quad (8)$$

Usando esta expressão para H_{mn} , primeiro pode ser resolvida a equação linear de Langevin e obter para o coeficiente de difusão (D) a seguinte equação:

$$D = \frac{8}{3} \frac{k_B T}{(6\pi^3 N)^{1/2} \eta_s l} = 0,196 \frac{k_B T}{\eta_s \langle R \rangle} \quad (9)$$

Por sua vez, o tempo de relaxação τ_r é dado por

$$\tau_r = \frac{\eta_s}{k_B T} \frac{(N^{1/2} l)^3}{(3\pi)^{1/2}} = 0,325 \frac{\eta_s \langle R \rangle^3}{k_B T} \quad (10)$$

As relações de dependência entre o coeficiente de difusão, tempo de relaxação e o peso molecular estão de acordo com observações experimentais, ou seja

$$D \cong M^{-1/2} \quad \text{e} \quad \tau_{rel} \cong M^{3/2}$$

O modelo de Zimm para um bom solvente considera para as interações de volume um potencial adicional na equação de Langevin, ou seja, a expressão para o potencial U , é dada por

$$U_1 = \frac{v}{k_B T} \sum_{mn} \delta(r_m - r_n) \quad (11)$$

Logo a expressão de Langevin para a velocidade média da cadeia é dada por

$$\frac{\partial r_m}{\partial t} = \sum_n H_{mn} \left(-\frac{\partial U}{\partial r_n} - \frac{\partial U_1}{\partial r_n} + f_n(t) \right) \quad (12)$$

Esta equação não é linear, entretanto ela pode ser resolvida em uma linearização para o caso considerado anteriormente. Primeiro, tem-se somente coeficientes modificados s e

$$\langle H_{mn} \rangle_{eq}$$

$$\left\langle \frac{1}{|r_m - r_n|} \right\rangle \approx \frac{1}{|m - n|^V l}, \quad (13)$$

sendo, V o parâmetro de Flory, $V = 3/5$ para um bom solvente.

A Equação 13 permite a definição do coeficiente de difusão (D) através da expressão:

$$D \cong \frac{k_B T}{N^{3/5} \eta_s l} = 0,203 \frac{k_B T}{\sqrt{6} \eta_s \langle R_g \rangle}, \quad (14)$$

sendo, k_B a constante de Boltzman, T a temperatura absoluta, N o número de unidades méricas η_s a viscosidade do solvente e R_g o raio de giração do polímero.

O tempo de relaxação é dado por

$$\tau_{rel} \cong \eta_s \frac{N^{9/5} l^3}{k_B T} \cong \frac{\eta_s \langle R_g \rangle^3}{k_B T} \quad (15)$$

Como pode ser observado para o bom e para o mal solvente podem ser usadas mesmas expressões para o tempo de relaxação e para o coeficiente de difusão.

$$D \cong \frac{k_B T}{\eta_s \langle R_g \rangle} \quad e \quad \tau_{rel} \cong \frac{\eta_s \langle R_g \rangle^3}{k_B T}$$

Os modelos de Rouse e Zimm são suficientes para materiais de peso molecular abaixo daquele causador de entrelaçamentos e como modelos básicos para comparação de soluções de polímeros com soluções de moléculas de baixo peso molecular. Acima do peso molecular de entrelaçamento e para a modificação de solução de semi-diluída a concentrada, as aproximações desses modelos não são suficientes. É necessário utilizar o modelo do tubo ou modelo da reptação que será discutido a seguir.

4.3. Reptação em polímeros em solução: difusão e tempo de reptação.

Em soluções concentradas cada cadeia tem uma grande quantidade de vizinhos e não pode mover facilmente, pois existe um impedimento causado pelos vizinhos.

Considerando todas as outras cadeias imobilizadas instantaneamente (Figura 33), o modelo da reptação analisa apenas o movimento de uma cadeia limitado pelas cadeias vizinhas. Dessa forma, a teoria da reptação considera o polímero, produto dos diferentes entrelaçamentos. A presença de outras cadeias poliméricas confina a cadeia analisada a um “tubo”, sendo pequenos deslizamentos ao longo desse tubo suas únicas possibilidades de movimento. E, mais importante, o movimento é sinuoso como de um réptil se deslocando (Figura 34), daí o nome reptação²⁹.

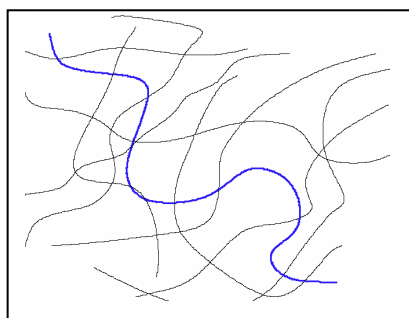


Figura 33 – Cadeias entrelaçadas, para a cadeia em azul será analisado seu movimento dentro do emaranhado de cadeias.

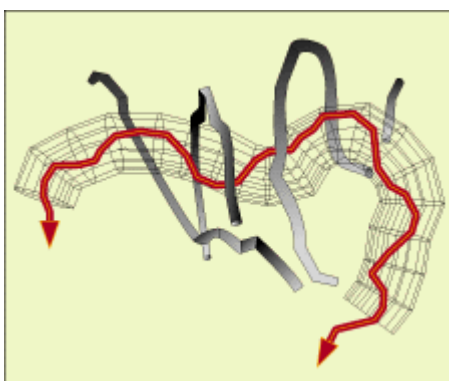


Figura 34 – Representação do movimento de uma cadeia polimérica por reptação através do tubo de confinamento.

No modelo do tubo a cadeia mantém o modelo de Rouse como dinâmica ao longo de um “caminho primitivo” (caminho permitido para a cadeia), enquanto a dinâmica é fortemente dificultada por este caminho primitivo devido ao entrelaçamento das cadeias.

O movimento de uma cadeia consiste em duas componentes discerníveis, as componentes normais para a cadeia de Rouse dentro do tubo de reptação, e os movimentos mais lentos para o tubo se renovar (tempo de renovação de tubo). O caminho do tubo de reptação é denominado o "caminho primitivo" para a cadeia. O caminho primitivo representa uma redefinição da cadeia, como no modelo de Rouse. Redefinido em termos de uma cadeia com unidades elásticas. Para o caminho primitivo a redefinição está baseada em um tempo mais longo do que o modelo de Rouse prediz para a dinâmica de não confinamento. Desde que o caminho primitivo seja a cadeia, embora renormalizada para a unidade de Rouse, ela exibe uma distribuição Gaussiana. Desta maneira a expressão que relaciona o comprimento do tubo de reptação R_0 e o número de unidades métricas dentro desse tubo N_R , pode ser escrita como

$$\frac{R_0}{l_0} = N_R^{\frac{1}{2}}, \quad (1)$$

sendo, R_0 a distância entre as extremidades da cadeia, l_0 o comprimento das ligações entre as unidades de Rouse, N_R é o número de unidades de Rouse, o expoente de 1/2 reflete 1/df e df é a massa-fractal da dimensão para a cadeia.

O número de unidades de Rouse na cadeia, N_R , é relacionado ao comprimento do caminho primitivo ao longo do contorno do tubo, l_{pr} , por,

$$N_R \approx a_{pr} l_{pr},$$

sendo que a_{pr} reflete a persistência do comprimento para caminho primitivo ou a rigidez do caminho primitivo.

Dentro do tubo de reptação a cadeia polimérica difunde ao longo do caminho primitivo seguindo a relação de Einstein³⁹

$$D' = \frac{k_B T}{\zeta_p}, \quad (2)$$

sendo D' é o coeficiente de difusão para a cadeia polimérica dentro do tubo ao longo do caminho primitivo, e ζ_p é o fator de fricção para a cadeia. Por definição não há nenhum entrelaçamento dentro do tubo, assim o resultado de Rouse pode ser usado,

$$\zeta_p = N_R \zeta_R \quad (3)$$

Logo,

$$D' = \frac{kT}{N_R \zeta_R} \quad (4)$$

O tempo para que a cadeia difunda completamente para fora do tubo de reptação é chamado "tempo de reptação", τ_r , como ilustrado na Figura 35 .

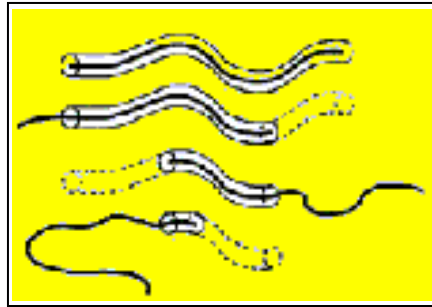


Figura 35 – Representação do movimento da cadeia através do tubo de confinamento.

O comprimento do tubo é comparado ao comprimento inteiro da cadeia polimérica (comprimento de contorno): Nl . Por definição o coeficiente de difusão é proporcional ao quadrado da distância atravessada (l_{pr}) dividido pelo tempo de travessia do tubo. Dessa maneira para um polímero atravessando o tubo de confinamento, tem-se a expressão

$$D \sim \frac{r^2}{t} \sim \frac{(Nl)^2}{\tau_r} \quad (5)$$

Comparando com a definição de Einstein (Equação (2)), obtém-se:

$$\frac{k_B T}{N \zeta_p} \sim \frac{N^2 l^2}{\tau_d} \quad (6)$$

Assim, o tempo de difusão da cadeia através do tubo será obtido por

$$\tau_r = \frac{N^2 l^2}{D'} \quad (7)$$

Dessa forma, tem-se

$$\tau_r = \zeta_R N_R^3 \quad (8)$$

O modelo de reptação prediz que o tempo de relaxamento e a viscosidade dependem do peso molecular elevado ao expoente 3. Porém, o valor observado experimentalmente³⁸ é 3,4. Este fato ocorre devido às modificações ocorridas no tubo de confinamento durante a travessia da cadeia polimérica, pois o tubo de confinamento se renova de acordo com o deslocamento da cadeia³⁸.

O tempo de difusão da cadeia polimérica, τ_r , é uma variável importante quando o sistema em estudo trata de um sistema de liberação controlada de fármacos. Neste caso, como o princípio bioativo será liberado da membrana polimérica a partir da dissolução do polímero. Portanto o tempo de liberação do fármaco será o mesmo da dissolução do polímero. Quando o tempo de reptação e o raio de giração da cadeia polimérica estudada estiverem determinados, será possível obter a taxa de desentrelaçamento do polímero através da equação

$$k_d = \frac{R_g}{\tau_r}, \quad (9)$$

sendo, k_d a taxa de dissolução do polímero, R_g o raio de giração do polímero e τ_d o tempo de dissolução do polímero.

Os sistemas de liberação controlada por dissolução da matriz polimérica contendo agente bioativo dependem significativamente das interações do polímero utilizado com o solvente. O movimento de reptação das cadeias macromoleculares iniciará quando a concentração de solvente no interior do bioconjugado apresentar um valor crítico, portanto, o estudo do transporte de solvente para o interior do sistema polímero/agente ativo torna-se, neste caso, muito importante e, então, a fenomenologia do transporte da difusão através de membranas de hidrogéis será abordada no próximo capítulo.

FENOMENOLOGIA DA DIFUSÃO EM MEMBRANAS DE HIDROGÉIS

5.1. Introdução

A dissolução do polímero ocorre a partir do instante que a tensão gerada pela interação entre as moléculas do solvente e as cadeias poliméricas atinge um valor capaz de provocar o início da reptação das macromoléculas. Portanto, a rapidez com que o polímero utilizado em sistemas controlados de liberação de fármacos sofre intumescimento torna-se, então, muito importante. Por esse motivo neste capítulo será revisada a fenomenologia da difusão em membranas de hidrogéis.

A difusão é o deslocamento espontâneo de matéria devido ao movimento das moléculas individuais (ou de átomos), ocorre nos sólidos, nos líquidos, nos gases, sendo causada pelo aquecimento, ou impulso, é um tipo de fenômeno de transporte. Pode ser considerado como o deslocamento de partículas de uma substância de um local de potencial químico mais alto para outra região de potencial químico mais baixo⁴⁰ (o potencial químico pode ser, na maioria dos casos de difusão, representado por uma diferença na concentração).

Este fenômeno ocorre como resultado da Segunda Lei da Termodinâmica, na qual os estados que a entropia (ou desordem) não estão em equilíbrio entre si sempre tendem a aumentar com o tempo (até que alcancem um equilíbrio). Como substâncias difundem de regiões de concentração mais alta a regiões de mais baixa concentração, elas vão de um estado de ordem mais alta para um estado de mais baixa ordem, conforme a Segunda Lei de Termodinâmica. Então, difusão é um processo espontâneo e natural. Inverter a difusão requereria um consumo de energia para contrariar a ordem mais alta do sistema e prevenir uma violação das leis da entropia. A difusão é um processo físico que não requer consumo de energia líquida. Em biologia celular, a difusão é descrita, freqüentemente, como uma forma de transporte passivo possibilitando que substâncias atravessem membranas como na Figura 36.

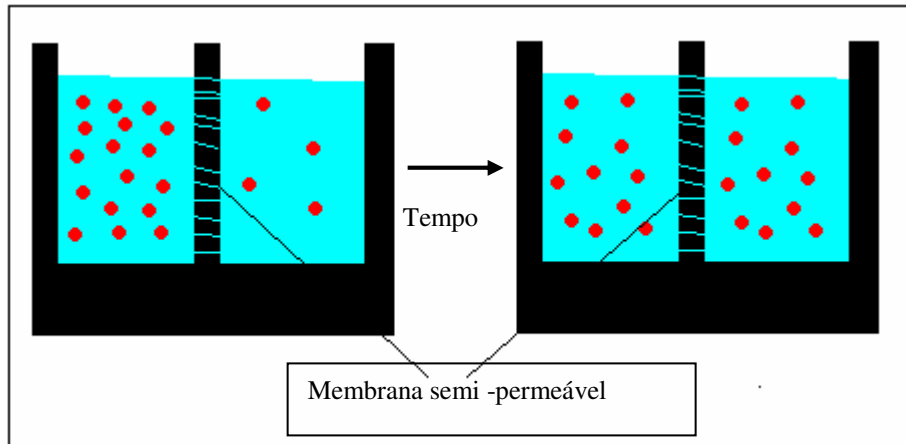


Figura 36 – Difusão através de membranas permeáveis.

Considerando um sistema unidirecional ou espécies de partículas que difundem em série, migrando a uma velocidade média v , a partir de um meio com concentração c , o fluxo correspondente (número de partículas que atravessam uma unidade de área por unidade de tempo) será dado por ⁴⁰

$$J = v.c. \quad (1)$$

Este fluxo é consequência da ação de uma força motriz F . A força motriz é gerada pelo gradiente de potencial químico. Em comum a outros tratamentos de movimentos de partículas, a relação entre a velocidade de difusão de uma molécula e a variação do potencial químico é definida por

$$v = -M_m \frac{\partial \mu}{\partial x} \quad (2)$$

sendo M_m a mobilidade molecular. O fluxo de moléculas é, então, dado por

$$J = -M_m C \frac{\partial \mu}{\partial x} \quad (3)$$

Para soluções ideais o potencial químico é dado por

$$\mu = G + RT \ln N \quad (4)$$

Diferenciando esta equação através da regra da cadeia, obtém-se

$$\frac{\partial \mu}{\partial x} = \frac{\partial \mu}{\partial X} \frac{\partial X}{\partial x}$$
$$\frac{\partial \mu}{\partial x} = \frac{RT}{X} \frac{\partial X}{\partial x} = \frac{RT}{C} \frac{\partial C}{\partial x}$$

Substituindo esta equação na Equação (3), obtém-se

$$J = -M_m RT \frac{\partial C}{\partial x}, \quad (5)$$

O qual é simplesmente a primeira lei de Fick com um coeficiente de difusão (D) igual MRT . Assim, a primeira lei de Fick se torna

$$J = -D \frac{dC}{dx} \quad (6)$$

O fluxo de partículas decresce com o gradiente de concentração (significado do sinal negativo). A equação de difusão é uma equação diferencial parcial não-linear que descreve as flutuações de densidade em um material que sofre difusão. Neste caso a equação de difusão é normalmente escrita como

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla \cdot D(C) \nabla C(\vec{r}, t), \quad (7)$$

sendo, C a concentração do material difundindo, t o tempo, D o coeficiente de difusão do sistema, e \vec{r} a coordenada de espaço.

A equação de difusão pode ser derivada de um modo direto da equação de continuidade de estados em que uma mudança na densidade em qualquer parte do sistema for ocasionada pela taxa de entrada e taxa de saída de material daquela parte do sistema. Neste caso o balanço de massa do sistema fornece

$$\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \cdot \vec{j} = 0, \quad (8)$$

sendo, \vec{j} o fluxo de matéria. A equação de difusão pode ser obtida a partir da contribuição das equações (5), (6) e (7) assumindo que o fluxo de matéria em qualquer parte do sistema seja proporcional ao gradiente de concentração local

$$\vec{j} = -D(C)\nabla C(\vec{r}, t) \quad (9)$$

A Segunda lei de Fick pode ser derivada da Primeira lei de Fick e do balanço de massa:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = -\frac{\partial}{\partial x} J = \frac{\partial}{\partial x} \left(\frac{\partial}{\partial x} C \right) \quad (10)$$

Considerando o coeficiente de difusão D constante, podem ser trocadas as ordens do diferenciando e efetuando a multiplicação na Equação (9), obtém-se a Segunda Lei de Fick:

$$\frac{\partial}{\partial x} \left(D \frac{\partial}{\partial x} C \right) = D \frac{\partial}{\partial x} \frac{\partial}{\partial x} C = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (11)$$

A Segunda Lei de Fick é usada em estudos de difusão não-constante ou continuamente variável, ou seja, quando a concentração da solução modifica-se em função do tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2}, \quad (12)$$

Sendo: C é a concentração nas dimensões [(quantidade de substância) comprimento⁻³], [mol m⁻³], t é o tempo[s], D é o coeficiente de difusão com dimensões [comprimento² tempo⁻¹], [m² s⁻¹] e x é a posição [comprimento], [m].

Para o caso de três dimensões a Segunda lei de Fick é dada por:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D\nabla^2 C, \quad (13)$$

sendo, ∇ o operador gradiente.

Em cálculo vetorial ∇ é um operador vetorial diferencial. Para um sistema tridimensional de coordenadas cartesianas (x,y,z) , ∇ pode ser definido como:

$$\nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right), \quad (14)$$

ou de forma alternativa:

$$\nabla = \vec{i} \frac{\partial}{\partial x} + \vec{j} \frac{\partial}{\partial y} + \vec{k} \frac{\partial}{\partial z} \quad (15)$$

sendo $\vec{i}, \vec{j}, \vec{k}$ o vetor unitário para cada dimensão.

Finalmente se o coeficiente de difusão não é uma constante, mas depende da concentração e/ou da coordenada, a Segunda a Lei de Fick se torna

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \nabla(D\nabla C) \quad (16)$$

5.2. Determinação experimental do coeficiente de difusão.

O estudo do transporte de água através de membrana polimérica hidrofílica pode ser tratado quantitativamente utilizando-se a 2ª lei de Fick, uma equação diferencial de ordem 2.

A absorção de água por membranas poliméricas foi proposta pela relação empírica ⁴¹

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n, \quad (17)$$

sendo k e n os parâmetros do sistema e M_t e M_∞ representam o aumento de massa estimada no tempo t e no equilíbrio, respectivamente.

Para resolver a Segunda Lei de Fick há a necessidade de utilizar as condições de contorno apropriadas. O método utilizado aqui é o da separação de variáveis acoplado à série de Fourier.

Inicialmente considera-se uma membrana semi-infinita de espessura $2h$ como mostrado na Figura 37

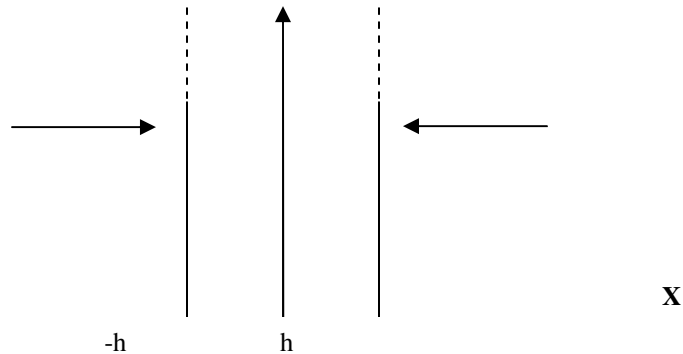


Figura 37 - Ilustração do percurso de um líquido na membrana polimérica.

As seguintes condições de contorno serão adotadas: $C(x, y) = 0, -h < x < h$ (condição inicial); $C(\pm h, t) = C_1$, a concentração nas fronteiras da membrana para todo $t \geq 0$.

O método consiste em propor uma solução para $C(x,t)$ na forma $M(x).N(t)$, com as funções dependendo respectivamente, apenas de x e t .

Derivando a Equação (17) e substituindo na equação da segunda Lei de Fick (Equação 13), obtém-se

$$M(x) \frac{dN}{dt} = \frac{Dd^2M}{dx^2} \cdot N(t). \quad (18)$$

Dividindo a equação (18) em ambos os membros por $D.M(x).N(t)$ pode-se escrever:

$$\frac{1}{DN(t)} \cdot \frac{dN(t)}{dt} = \frac{1}{M(x)} \cdot \frac{d^2M(x)}{dx^2}. \quad (19)$$

Como o primeiro membro da equação (14) depende só de t e o segundo membro apenas de x , a igualdade acima é verificada se ambos os membros forem constantes.

Esta constante $N(t) = 0$ será chamada de $-\omega^2$, propositalmente para simplificações futuras. Assim obtém-se:

$$\frac{1}{DN(t)} \cdot \frac{dN(t)}{dt} = -\omega^2,$$

Que também pode ser escrita como

$$\frac{dN(t)}{dt} + D\omega^2 \cdot N(t) = 0. \quad (20a)$$

Esta é uma equação diferencial ordinária linear, de ordem 1 e homogênea, cuja solução geral é $N(t) = e^{-\omega^2 Dt}$. Logo

$$\frac{1}{M(x)} \cdot \frac{d^2M(x)}{dx^2} = -\omega^2,$$

ou

$$\frac{d^2M(x)}{dx^2} + \omega^2 \cdot M(x) = 0. \quad (20b)$$

A Equação 20b é uma equação diferencial ordinária linear de ordem 2 e homogênea, cuja solução geral é $M(x) = a \cos \omega x + b \sin \omega x$, sendo a e b constantes a determinar a partir das condições de contorno. Composto as soluções de 20a e 20b obtém-se:

$$C(x,t) = (a \cos \omega x + b \sin \omega x) \cdot e^{-\omega^2 Dt} \quad (21)$$

Porém, apenas estas funções não satisfazem condições de contorno arbitrárias. Assim, de acordo com Fourier para condições de fronteiras não homogêneas deve-se propor uma solução da seguinte forma

$$C(x,t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x + b_n \sin \omega_n x) \cdot e^{-D\omega_n^2 t} \quad (-h < x < h \text{ e } t < 0) \quad (22)$$

As constantes a_n , b_n e $\omega_n = n\sqrt{2\pi/P}$, devem ser determinadas através das condições de contorno.

Devido a homogeneidade da membrana e a simetria da Figura 37 obtém-se que $C(-x,t) = C(x,t)$ para $-h \leq x \leq h$ e $t \leq 0$, conforme Figura 38. Assim, da Equação (22) tem-se

$$C(x,t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x + b_n \sin \omega_n x) \cdot e^{-D\omega_n^2 t},$$

$$C(-x,t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n(-x) + b_n \text{sen} \omega_n(-x)) \cdot e^{-D\omega_n^2 t} =$$

$$= a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x - b_n \text{sen} \omega_n x) \cdot e^{-D\omega_n^2 t}$$

Para a igualdade acima ser verdadeira para todo $-h \leq x \leq h, t \leq 0$, deve-se ter obrigatoriamente que $b_n=0$ para todo $n = 1,2,3,\dots$

Portanto a equação (22) torna-se

$$C(x,t) = a_0 + 2 \sum_{n=1}^{\infty} (a_n \cos \omega_n x) \cdot e^{-D\omega_n^2 t} \quad (23)$$

As condições de contorno para este problema são: C.C. | $C(x,0) = 0, -h < x < h$, condição inicial; e $C(\pm h,t) = C_1$, a concentração nas fronteiras da membrana para todo $t \geq 0$.

Para determinar o coeficiente a_1 e a constante P (período da função), deve-se fazer a extensão periódica par da condição inicial, isto é, estender o valor da concentração C_1 até $\pm 2h$, como demonstrado na Figura 38.

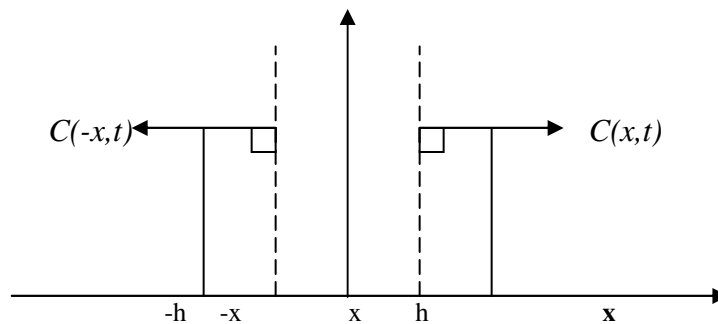


Figura 38 - Ilustração do comportamento da membrana quando esta é atravessada por um líquido permeante.

Logo, tem-se, após a extensão periódica par da condição inicial, ou seja, P é equivalente ao intervalo que vai de $-2h$ à $2h$. Esta imposição faz parte da técnica de Fourier. Sendo $P = 4h$.

Com esta condição inicial podem ser calculados os coeficientes a_n para $n = 1,2,3,\dots$ e como $C(x,0)$ é par e $P = 4h$ a partir da equação (23), obtém-se

$$a_n = \frac{1}{h} \int_h^{2h} C(y,0) \cdot \cos(n\pi / 2h) y \cdot dy, \quad (24)$$

$$a_n = \frac{1}{h} \int_h^{2h} C(y,0) \cdot \cos(n\pi / 2h) y \cdot dy = \frac{C_1 / h \text{sen}(n\pi / 2h) \cdot y^{2h}}{n\pi / 2h} \Big|_h^{2h},$$

$$a_n = \frac{2C_1}{\pi n} (\text{sen} n\pi - \text{sen} \frac{n\pi}{2}) = -\frac{2C_1}{\pi n} \cdot \text{sen} \frac{n\pi}{2}.$$

Os valores de a_n podem ser obtidos a partir da tabela da função seno. A tabela 3 apresenta o valor de seno de $(n\pi/2)$ para alguns valores de n .

Tabela 3 - Tabela de valores de seno de $(n\pi/2)$ obtidos de acordo com o gráfico da função seno

n	$\text{Sen}(n\pi/2)$
1	1
2	0
3	-1
4	0

De acordo com a tabela 3 vemos que $\text{sen}(n\pi/2)$ é diferente de zero somente para inteiros, ímpares e com sinal alternado.

Para a_0 tem-se

$$a_0 = \frac{1}{h} \int_h^{2h} C_1 dy = \frac{C_1}{h} \cdot y \Big|_h^{2h} = \frac{C_1}{h} \cdot (2h - h) = C_1.$$

Assim, obtém-se para a Equação (24)

$$C(x,t) = C_1 - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t}. \quad (25)$$

Analisando a Equação (25) observa-se que a concentração de saturação é obtida para $t \rightarrow \infty$, a qual vale

$$C(x,t) \longrightarrow C_1 \equiv C_{\infty}.$$

$t \rightarrow \infty$

Assim a Equação (25) assume a seguinte forma: (para $-h \leq x \leq h, t \geq 0$)

$$\frac{C(x, t)}{C_\infty} = 1 - \frac{4}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cos \frac{(2n-1)\pi x}{2h} \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t}. \quad (26)$$

A Equação (26) é a relação entre a concentração da solução dentro da membrana em uma posição x e em um instante t dividido pela concentração de saturação.

Para obtermos a concentração total $M(t)$ dentro da membrana, integra-se a equação (27) em x de $-h$ até h , obtendo-se

$$\begin{aligned} M(t) &= \int_{-h}^h C(y, t) dy = \int_{-h}^h \left\{ C_1 - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cdot \cos \left[\frac{(2n-1)\pi y}{2h} \right] \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \right\} dy = \\ &= \int_{-h}^h C_1 \cdot dy - \frac{4C_1}{\pi} \int_{-h}^h \left[\sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{2n-1} \cos \left(\frac{(2n-1)\pi y}{2h} \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \right) \cdot dy \right]. \quad (27) \end{aligned}$$

A integral do segundo membro da Equação 27 só poderá ser calculada se o símbolo de integral for invertido com o símbolo do somatório. A condição para isso é que a série dentro da integral convirja uniformemente no intervalo $[-h, h]$. Mas, a convergência uniforme

é garantida pela forma acima devido ao fator $e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t}$, portanto

$$M(t) = C_1 \cdot 2h - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \cdot \int_{-h}^h \cos \frac{(2n-1)\pi y}{2h} \cdot dy \quad (28)$$

Resolvendo a integral da Equação 28, obtém-se

$$\int_{-h}^h \cos \frac{(2n-1)\pi y}{2h} \pi y \cdot dy = 2 \int_0^h \cos \frac{(2n-1)\pi y}{2h} \pi y \cdot dy = 2 \operatorname{sen} \frac{(2n-1)\pi y}{2h} \pi y \Big|_0^h = \frac{4h}{(2n-1)\pi} \cdot (-1)^{n+1}$$

Substituindo o resultado da integral na Equação (28) pode-se escrever

$$M(t) = C_1 \cdot 2h - \frac{4C_1}{\pi} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{(-1)^{n+1}}{(2n-1)} \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \left(\frac{4h}{(2n-1)\pi} \right) \cdot (-1)^{n-1} =$$

$$C_1 \cdot 2h - \frac{16hC_1}{\pi^2} \sum_{n=1}^{\infty} \frac{1}{(2n-1)^2} \cdot e^{-D \left[\frac{(2n-1)\pi}{2h} \right]^2 t} \quad (29)$$

Através da Equação (29) observa-se que a concentração total satura para t tendendo ao infinito:

$$M(t) \xrightarrow[t \rightarrow \infty]{} C_1 \cdot 2h \equiv M_{\infty}$$

Logo, a Equação (29) pode ser escrita na forma

$$\frac{M_t}{M_{\infty}} = 1 - \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} e^{-D \left[\frac{(2n+1)\pi}{2h} \right]^2 t} \quad (30)$$

O coeficiente de difusão da solução através da membrana pode ser calculado em primeira aproximação tomando o primeiro termo da série da equação (30), assim teremos

$$1 - \frac{M_t}{M_{\infty}} = \frac{8}{\pi^2} \cdot e^{-D \left[\frac{\pi}{2h} \right]^2 t} \quad (31)$$

Tomando o logaritmo de ambos os membros tem-se

$$\ln \left(1 - \frac{M_t}{M_{\infty}} \right) = \ln \left(\frac{8}{\pi^2} \right) - \frac{D\pi^2 t}{(2h)^2} \quad (32)$$

De acordo com a equação (32), $\ln[1-(M_t/M_{\infty})]$ versus t deveria ser linear em tempos de difusão longos, podendo o coeficiente de difusão (D) ser calculado graficamente utilizando o

método dos mínimos quadrados. Determina-se o coeficiente de difusão, considerando que o coeficiente angular da reta (m) é dado por

$$D = -\frac{m2h^2}{\pi^2}. \quad (33)$$

Aplicando a propriedade dos logaritmos para o produto na equação (17), tem-se:

$$\log\left(\frac{M_t}{M_\infty}\right) = \log k + n \log t. \quad (34)$$

A Equação (31) representa a equação de uma reta no papel log x log e pode ser utilizada para se estimar o tipo de transporte (de acordo com valor de n).

O mecanismo de difusão em um polímero é fenômeno complexo que, a um nível microscópico, pode ser classificado em três categorias⁴¹.

1 - Difusão “Fickiana”, ou Caso I (Figura 39 - A) se refere ao processo no qual a taxa de difusão do solvente é muito menor que a taxa de relaxação das cadeias poliméricas devido a fatores estruturais e mecânicos. Neste mecanismo, o equilíbrio de sorção é rapidamente atingido. O processo de sorção é independente da cinética de intumescimento.

2 - Difusão não “Fickiana”, ou Caso II (Figura 39 - C) se refere ao processo no qual a taxa de difusão é maior que o processo simultâneo de relaxação das cadeias poliméricas. O processo de sorção é fortemente dependente da cinética de intumescimento.

3 - Difusão anômala (Figura 39 - B) se refere ao processo no qual a taxa de difusão do solvente é comparável à taxa de relaxação das cadeias poliméricas. Neste caso, o processo de difusão no solvente é afetado apenas pela presença de porosidades na matriz polimérica.

O tipo de transporte, n , pode ser classificado como:

1. Transporte Fickiano: a taxa de difusão do penetrante é muito menor que a mobilidade do segmento do polímero, ocorre para $n \approx 0,4$.
2. Transporte anômalo: a taxa de difusão do penetrante aproxima-se da mobilidade do segmento do polímero, ocorre para $0,5 < n < 1$.
3. Transporte não Fickiano: a taxa de transporte é igual a mobilidade do polímero, ocorre $n = 1$.

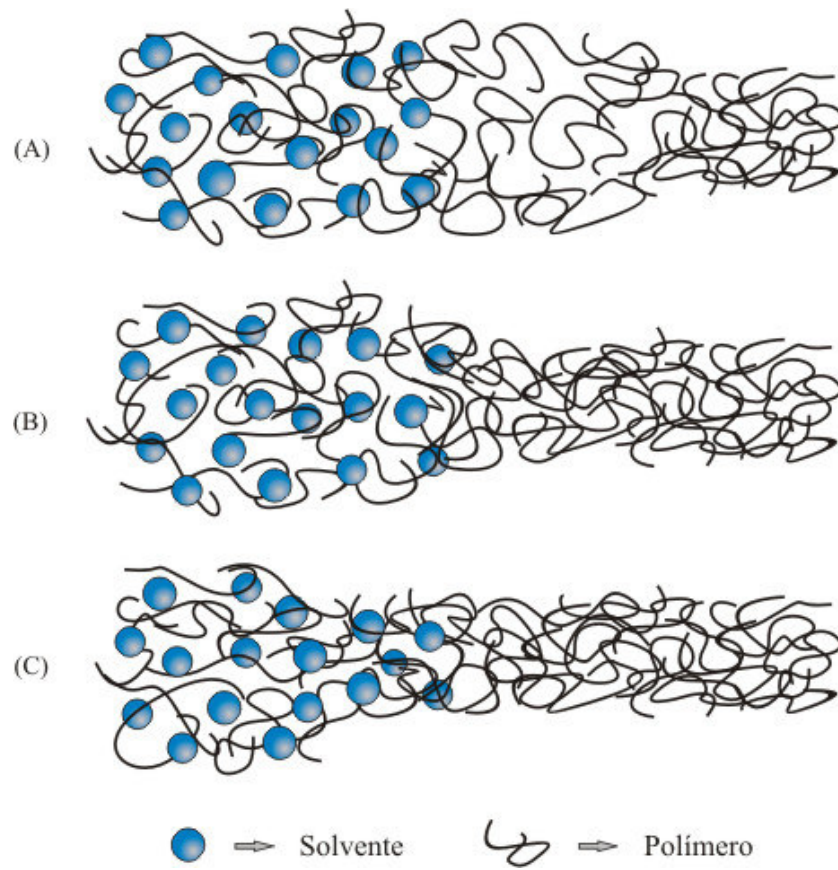


Figura 39 - Desenho esquemático do mecanismo de difusão “Fickiano” (A), anômalo (B) e não “Fickiano” (C).

MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Crotoxina: Marcação com ^{125}I .

A marcação da crotoxina com iodo-125 foi realizada utilizando uma modificação da técnica clássica de marcação com cloraminaT.⁴² A reação de marcação foi realizada a temperatura ambiente adicionando os reagentes seguintes:

- 5 μg de crotoxina, dissolvida em 10 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4).
- 20 μL de tampão fosfato de sódio 0,5 M (pH 7,4).
- 30 MBq (0,8 mCi) de radioisótopo
- 0,8 μg de cloramina T em 12 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4).
- 5 minutos de espera
- 1 μg de metabissulfito de sódio em 5 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4).
- 200 μg de iodeto de potássio em 200 μL de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 7,4) contendo 0,1 % de soro albumina bovina.

A mistura de marcação foi purificada em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-100), sendo a crotoxina marcada eluída em tampão fosfato de sódio 0,05 M contendo 0,1 % de soro albumina bovina e 0,1 % de azida sódica. O traçador foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.2. Síntese do Copolímero PDMAm-co-VP.

O copolímero poli (N,N'- dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) (PDMAm-co-VP) foi sintetizado por iniciação via radical livre através da decomposição técnica do iniciador 2,2 - azoisobutinintrila (AIBN, Fluka). O iniciador foi previamente purificado por cristalização em metanol. Após purificação, AIBN foi à baixa temperatura e protegido da luz. O ponto de fusão do AIBN purificado foi de $104\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Os monômeros N,N'- dimetil acrilamida (DMAm) e N- vinil-2-pirrolidona (VP) foram purificados por destilação a pressão reduzida.

A copolimerização para obtenção de PDMA-co-VP foi realizada a 70 °C com concentração de iniciador (AIBN) de $1,5 \cdot 10^{-5}$ mol.L⁻¹ em etanol com dissolvente. Após a reação de copolimerização (2 horas) o copolímero restante foi precipitado em um grande excesso de éter etílico, adicionando-se um pouco de HCl concentrado. O copolímero resultante foi seco sob vácuo até peso constante.

O copolímero obtido foi caracterizado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) e carbono 13 (¹³C-RMN). Os espectros RMN foram obtidos em espectrômetro Bucker AM-200 utilizando dimetilsulfóxido (DMSO-D₆) como dissolvente e tetrametil silano (TMS) como composto de referência interna. A composição do copolímero foi determinada a partir da integração dos picos correspondentes dos monômeros DMAm e VP nos espectros de ¹H-RMN.

6.2.1. Caracterização Físico-Química do bioconjugado PDMAm-co-VP.

6.2.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é reconhecidamente a técnica mais importante para a investigação ao nível molecular, permitindo obter informação estrutural e dinâmica para qualquer estado da matéria. Em particular, é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido. Ocupa, igualmente, um lugar saliente no campo da análise qualitativa e quantitativa, desde componentes em produtos alimentares, por exemplo, a fluidos biológicos e metabolitos em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo. A caracterização espacial do sinal RMN da água (juntamente com o desenvolvimento acelerado das capacidades de computação) permitiu, também, o desenvolvimento espetacular do domínio da imagem por ressonância magnética, hoje uma das técnicas imageológicas fundamentais em medicina e noutras áreas.

A ressonância magnética nuclear (RMN) é o estudo de transições entre os níveis de energia do núcleo quando colocado em um campo magnético⁴³. O núcleo do átomo é constituído de prótons e nêutrons. O princípio da espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) se baseia no fato de que núcleos com número ímpar de prótons, nêutrons ou

ambos terão um spin nuclear intrínseco, isto é; têm momentos angulares. Na Tabela 4 são apresentados alguns dos isótopos que possuem espectro de RMN.

Tabela 4- Número quântico de spin para vários núcleos atômicos.

Número de Prótons	Número de Nêutrons	Número Quântico de Spin	Exemplos
Par	Par	0	^{12}C , ^{16}O , ^{32}S
Ímpar	Par	1/2	^1H , ^{19}F , ^{31}P
Ímpar	Ímpar	3/2	^{11}B , ^{35}Cl , ^{79}Br
Par	Ímpar	1/2	^{13}C
Par	Ímpar	3/2	^{127}I
Par	Ímpar	5/2	^{17}O
Ímpar	Ímpar	1	^2H , ^{14}N

Quando elementos com número quântico de spin, como o hidrogênio, são expostos a um campo magnético estático, forte e homogêneo, os núcleos dos átomos se comportam como magnetos e seus *spins* se alinham na direção do campo aplicado (Figura 40a).

Rigorosamente, núcleos não apresentam spin, mas sim momento angular (exceção feita somente ao núcleo do isótopo 1 do hidrogênio, que é constituído de um único próton). Embora o spin possa ser considerado um momento angular, por terem ambos as mesmas unidades e serem tratados por um formalismo matemático e físico semelhante, nem sempre o oposto ocorre. O spin é intrínseco, ao passo que objetos compostos têm momentos angulares extrínsecos. Contudo, motivos históricos e continuados costumes levaram a esse abuso de linguagem, tolerado em textos não rigorosos. Um motivo a mais de complicação é o fato da moderna física de partículas considerar que certas partículas, antes pensadas como elementares (e, portanto possuindo spin), sejam compostas (próton e nêutron, compostos de quarks). Assim, fica um tanto impreciso o limite entre os casos onde se deva usar o termo spin e os casos onde se deva usar o termo momento angular.

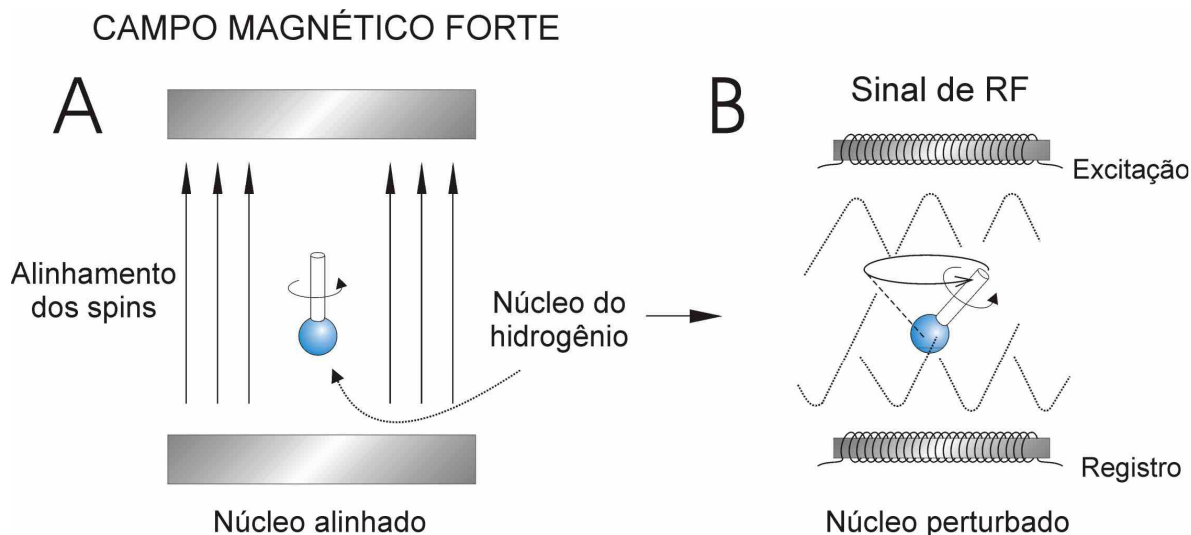


Figura 40 - O efeito de um campo magnético externo sobre o núcleo do hidrogênio.

O alinhamento dos spins dos núcleos pode ser perturbado por um pulso curto de ondas de rádio (RF) que serve para tirar os spins do núcleo de sua orientação paralela ao campo magnético e para fornecer a energia necessária para movimentos do tipo giroscópio dos spins dos núcleos, denominados de *precessão*. Quando o pulso RF é retirado, o núcleo tende a voltar para sua situação original e, assim fazendo, libera energia em forma de ondas de rádio (Figura 40b) A frequência dessas ondas de rádio são distintas para diferentes espécies de átomos, assim como para um dado átomo em diferentes meios químicos ou físicos. Portanto, os núcleos ressonantes tornam-se transmissores de ondas de rádio com frequências características e revelam sua presença no polímero pelos seus sinais RF.

Uma carga girando como a de um núcleo $^1\text{H}_1$ gera um campo magnético que tem um momento magnético ($^1\text{H}_1$) a ele associado. Tal núcleo pode ser considerado a barra de um ímã. Quando um campo magnético externo (H_0) é aplicado, o núcleo tenta alinhar seu momento magnético ao longo da direção do campo. O número quântico de spin do núcleo é designado por I , havendo $2I + 1$ orientações e correspondentes níveis de energia possíveis para um núcleo magnético relativo ao campo externo.

Um próton de $^1\text{H}_1$ tem um número quântico de spin $1/2$; tendo, portanto, 2 orientações possíveis, paralelo e antiparalelo ao campo magnético externo. Na ausência de um campo magnético, cada próton tem a mesma energia nuclear de spin e os spins são orientados em direções caóticas. Na presença de um campo magnético, os spins do próton são alinhados

paralelos ou antiparalelos ao campo, e a diferença de energia entre estas duas orientações (ΔE) é proporcional à intensidade do campo magnético externo, H_0 :

$$\Delta E = h\nu = \frac{h\gamma}{2\pi} H_0 \quad (1)$$

sendo γ = a razão giromagnética (uma constante para um dado núcleo), H_0 é a intensidade do campo magnético externo e h é a constante de Planck. Esta variação no espaçamento entre níveis de energia (E) como função da intensidade do campo aplicado (H_0) é mostrada na Figura 41.

De acordo com a Equação 1, quando prótons são colocados em um campo magnético que tem uma intensidade fixa, haverá uma frequência definida separando os dois níveis de energia. Na prática um campo de 14.100 Gauss requer uma frequência de 60 MHz de energia (da região de radiofrequência do espectro eletromagnético) para a transição entre as orientações. Em um campo de 23.500 Gauss, 100 MHz são necessários; para um campo de 47.000 G, 200 MHz são necessários. É importante notar que 60 MHz correspondem a uma quantidade muito pequena de energia ($6 \cdot 10^{-3} \text{ cal} \cdot \text{mol}^{-1}$), significando que o número de moléculas no estado fundamental é ligeiramente superior ao número de moléculas no estado excitado.

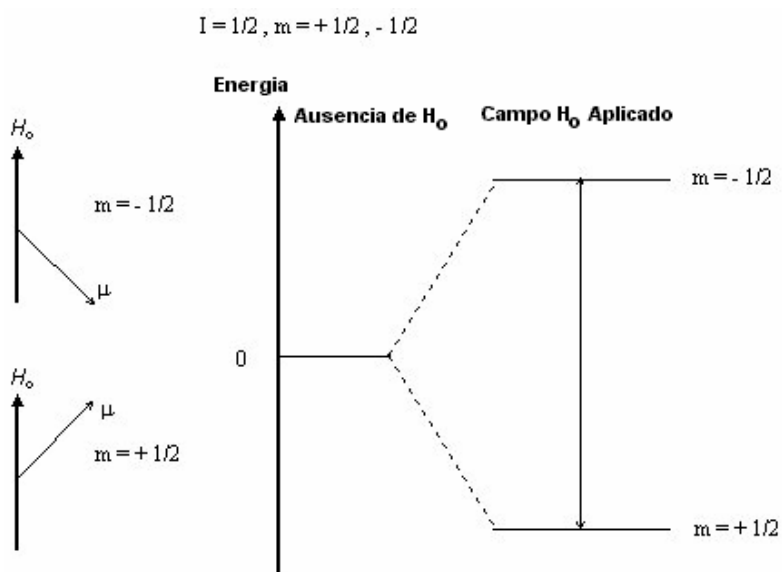


Figura 41- Separação dos níveis de energia de spin para um núcleo em função de um campo magnético externo (H_0).

Para obter-se um espectro RMN de uma amostra, esta é colocada no campo magnético no espectrômetro e um campo de radiofrequência é aplicado, passando-se uma corrente por uma espira que envolve a amostra (Figura 42). O campo magnético é aumentado aos poucos e a excitação ou oscilação dos núcleos de uma orientação para outra é detectada como uma tensão induzida, resultando na absorção de energia do campo de radiofrequência. Portanto, um espectro RMN é um gráfico de voltagem induzida contra a varredura do campo magnético. A área sob o pico depende do número total de núcleos que estão oscilando.

A energia absorvida por um núcleo pode ser liberada por relaxamento spin-spin, no qual a energia de spin é transferida a um núcleo vizinho, ou por relaxamento spin-rede, no qual a energia do spin é convertida em energia térmica. Os núcleos são, deste modo, excitados do estado de spin mais baixo ao mais alto por um campo de radiofrequência. Eles retornam espontaneamente ao estado de energia mais baixo para serem excitados novamente e assim por diante.

Se o núcleo de hidrogênio é parte de uma molécula e esta molécula é colocada em um campo magnético, o campo induz uma circulação de elétrons em torno do próton em um plano perpendicular ao campo externo. Esta carga circulante, por sua vez, gera um campo magnético induzido na região do núcleo que está geralmente oposta ao campo externo. Os elétrons que envolvem o próton são ditos blindarem o próton se o campo induzido se opõe ao campo externo, como apontado pela Figura 42. Neste caso, os elétrons blindam o núcleo dos efeitos do campo externo.

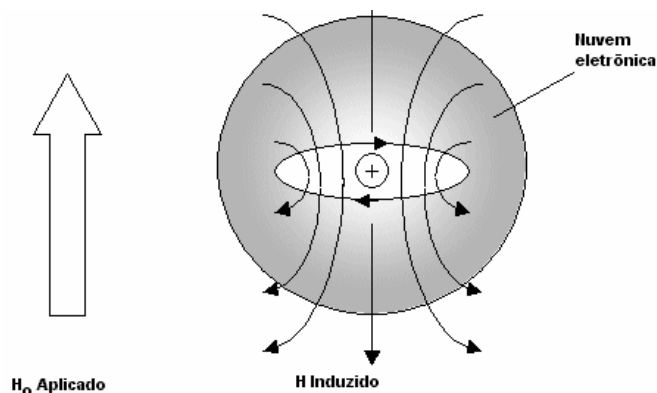


Figura 42 - Blindagem (H induzido) causada por elétrons circulando em torno do núcleo em plano perpendicular ao campo externo (H_0).

Por outro lado, os elétrons são ditos desblindarem o núcleo se o campo induzido aumenta o campo externo. Núcleos de hidrogênio em ambientes diferentes possuem densidades eletrônicas maiores ou menores em torno deles, e são blindados ou desblindados em proporções diferentes por elétrons que circulam. O resultado é que o próton é sujeito a um campo magnético líquido ou efetivo

$$H_{efetivo} = H_{externo} - H_{induzido}.$$

Quando ocorre a varredura do campo magnético, nem todos os prótons oscilam na mesma intensidade do campo. A intensidade do campo na qual oscilam depende de quanto eles são blindados, o que por sua vez, depende dos ambientes químicos.

Como o campo magnético efetivo, sentido pelo núcleo, é levemente afetado (perturbação essa geralmente medida em escala de partes por milhão) pelos débeis campos eletromagnéticos gerados pelos elétrons envolvidos nas ligações químicas (o chamado ambiente químico nas vizinhanças do núcleo em questão), cada núcleo responde diferentemente de acordo com sua localização no objeto em estudo, atuando assim como uma sonda sensível à estrutura onde se situa.

Pelo fato da blindagem ser dependente do ambiente químico, as intensidades de campo necessárias à absorção de energia por diferentes prótons são ditas serem deslocadas quimicamente em relação à algum padrão. O tetrametil silano (TMS), $(CH_3)_4Si$ é o padrão usual. Normalmente o TMS é dissolvido na amostra e usado como referência interna. O deslocamento químico de um certo núcleo de hidrogênio é a diferença entre a intensidade de campo na qual o próton absorve e a intensidade de campo na qual os prótons do padrão TMS absorvem. A escala delta (δ) tem sido utilizada em espectroscopia NMR como unidade de deslocamento químico. O deslocamento químico observado no espectro RMN (em unidades Hz) é dividido pela frequência (em Hz) do espectrômetro usado, fornecendo em partes por milhão (ppm)

$$\delta = \frac{\text{deslocamento observado (Hz)} \cdot 10^6}{\text{frequência do espectrômetro (Hz)}} \quad (\text{ppm}).$$

Neste trabalho, o copolímero aleatório PDMAm-co-VP foi caracterizado por espectroscopia de RMN de prótons ($^1\text{H-NMR}$) utilizando-se um equipamento Bruker 300 MHz do Instituto de Ciência e Tecnologia de Polímeros do “Consejo Superior de Investigación Científica” – ICTP/CSIC-Madri/Espanha, instituto este onde o orientador desta dissertação, prof. Álvaro A.A. de Queiroz é pesquisador visitante. As amostras do copolímero foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) sendo utilizado como referência interna o tetrametil silano (CH_3) $_4\text{Si}$. A Figura 43 ilustra os equipamentos de RMN utilizados neste trabalho.



(A)



(B)

Figura 43 - Equipamento de RMN Bruker 300 MHz (A) e Bruker 500 MHz (B) do ICTP/CSIC. Nota-se em (B) a introdução da amostra no equipamento de RMN.

6.2.1.2. Cromatografia de Permeação em gel

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma das técnicas analíticas mais eficazes e versáteis para o entendimento e predição do comportamento de polímeros. É, provavelmente, a única técnica capaz de caracterizar a massa molecular e o índice de dispersão de um polímero.

A GPC pode determinar parâmetros importantíssimos de um polímero como massa molecular numérica média, massa molecular ponderal média e, a principal característica, a

distribuição da massa molecular de um polímero. Estes valores são importantes, pois eles interferem em muitas propriedades físicas que caracterizam um polímero. Pequenas diferenças entre grupos medidas por esta técnica podem ser consideradas significativas para as propriedades finais e, portanto, para a aplicação do polímero. Algumas dessas propriedades são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Propriedades finais de polímeros influenciadas por sua massa molecular.

Resistência ao impacto	Resistência à adesão
Tempo de relaxação elastomérica	Tempo de cura
Fragilidade	Módulo de elasticidade
Flexibilidade	Viscosidade (fundido)
Resistência ao impacto	Dureza
Rigidez	Coefficiente de fricção
Resistência ao arrasto	Resistência à quebra por stress
Adesão	Resistência ao corte

Na cromatografia de permeação em gel (GPC) a separação de diferentes moléculas em solução é realizada com base na diferença do seu tamanho efetivo ou volume hidrodinâmico (Figura 44). A separação ocorre com a injeção da solução em fluxo contínuo de solvente que passa por géis altamente porosos. O fenômeno ocorre porque as moléculas com pesos moleculares menores entrarão nos poros menores mais facilmente, enquanto as maiores precisarão de menor tempo de eluição para percorrer a coluna. Essa técnica é utilizada principalmente para a determinação da massa molecular do polímero ⁴⁴.

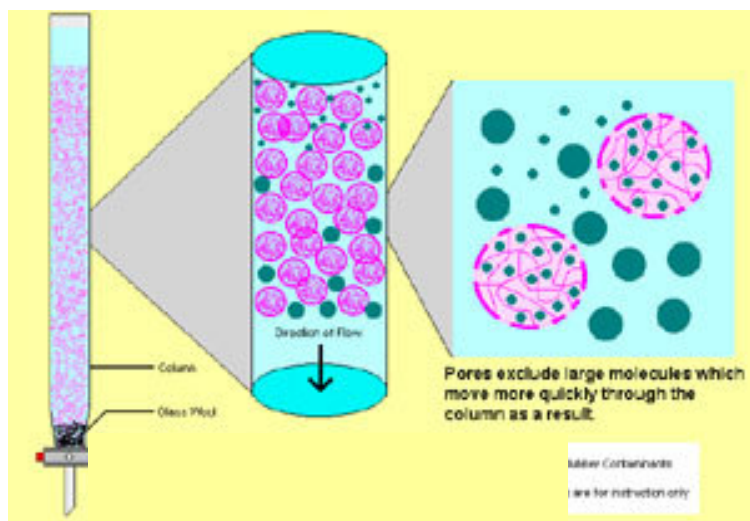


Figura 44 - Fundamento da técnica de GPC.

Tem sido utilizada como uma técnica relativamente rápida e segura para determinar a distribuição de massa molar (MWD) de polímeros. No equipamento de GPC, em geral, os padrões são escolhidos tendo em vista o polímero a ser analisado. Foi observado por Grubisic *et al.* que a separação por cromatografia era devida ao volume hidrodinâmico das macromoléculas e demonstrou-se a existência de uma correlação linear entre o volume de eluição de diferentes polímeros e o logaritmo do volume hidrodinâmico viscosimétrico $M[\eta]$, onde M é massa molar e $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, independente da composição química ou arquitetura.

O cromatógrafo usado foi o Waters GPC 717 (Figura 45) conectada à uma bomba HPLC modelo 515 e detector por índice de refração modelo 2410. As colunas utilizadas foram da Waters Styragel HT (7,8 X 300 mm) em série com colunas de Styragel Waters HR 4E (7,8 x 300 mm) e tamanho médio de partícula de 10 mm. A curva de calibração foi preparada a partir de amostras monodispersas de poliestireno (Polysciences) com pesos moleculares de 0,474 kD; 6,69 kD; 18,6 kD e 38 kD, respectivamente. A polidispersividade dos padrões foi menor que 1,1. Todas as soluções foram filtradas em membranas de acetato de celulose de tamanho de poro 0,22 μm antes da injeção. As amostras foram solubilizadas em água bidestilada e deionizada e injetadas no equipamento a um fluxo de 1 mL/min. Os cálculos foram feitos no programa Millennium GPC exportadas e rerepresentadas através do software Origin 5.0. A curva de calibração para cada eluente foi construída através do gráfico de Log M_w versus o volume eluído (V_e) para os padrões de poliestireno.



Figura 45 - Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 717 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/ SP.

6.3. Preparo do bioconjugado.

Uma massa de 1,0 g do copolímero foi previamente adicionada, com 5,0 mL de solução tampão fosfato-salina (PBS) pH 7,4 e mantido por 5 horas sob agitação à temperatura ambiente (25 °C) até dissolução total. A solução do copolímero foi adicionado de 2 µg de crotoxina iodada. O sistema foi mantido sob agitação durante 4 horas sob refrigeração (4 °C). A solução do bioconjugado CT/PDMAM-co-VP foi liofilizada e m seguida preparou-se pastilhas de 5 mm de diâmetro e 0,5 mm de espessura por prensagem isostática (5 ton de pressão).

6.4. Estudo da liberação de crotoxina do bioconjugado CT/PDMAM-co-VP.

As pastilhas do bioconjugado CT/PDMAM-co-VP obtidas como indicado no item 6.3 foram introduzidas em tubos contendo 10 mL de solução tampão PBS 7,4 a 37 °C. Alíquotas de 100 µL da solução tampão foram retiradas nos intervalos de tempo indicados na Tabela 5.

Tabela 6 – Intervalos de tempo pré-determinados para a retirada das amostras da solução contendo bioconjugado.

Tempo (s)	5	10	20	40	60	600	1800	2400	3600	7200
-----------	---	----	----	----	----	-----	------	------	------	------

A determinação quantitativa da massa de crotoxina liberada foi realizada em todas as alíquotas através da determinação da radioatividade das amostras.

Todas as determinações foram realizadas em sistema automático de contagem de radiação gama tipo “poço” de cristal de NaI (T1), de 3x3 polegadas e dotado de analisador de impulsos. A janela foi ajustada para incluir a energia de 1 keV do ^{125}I . Todas as contagens foram prolongadas o suficiente para reduzir o erro estatístico a menos de 1 %.

6.5. Estudo do inchamento e análise da dissolução do bioconjugado CT/PDMAm-co-VP.

As pastilhas do bioconjugado foram introduzidas em uma solução tampão PBS pH 7,4 a 37 °C. A análise do intumescimento e da dissolução do bioconjugado foi realizada utilizando-se a visão computacional. A Figura 46 ilustra o sistema utilizado neste trabalho para aquisição de imagens. A partir do instante em que a pastilha foi mergulhada na solução PBS, imagens começaram a serem adquiridas a cada 10 s, até que a dissolução completa do bioconjugado CT/PDMAm-co-VP.

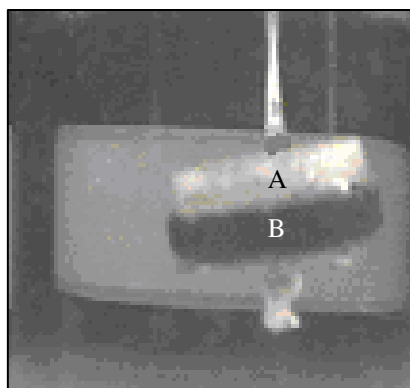


Figura 46 – Primeira imagem da pastilha submersa em solução PBS a 37 °C. (A) e (B) representam, respectivamente, a pastilha e o suporte.

As imagens obtidas foram automaticamente, convertidas para níveis de cinza. Após serem melhoradas com a aplicação do filtro mediano, foram segmentados e analisados (Figura 47) ⁴⁵.

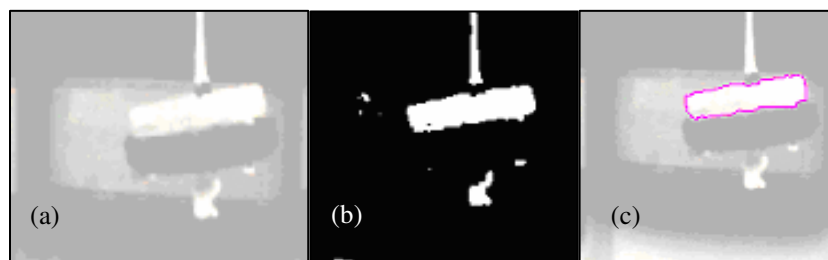


Figura 47 - Aplicação do filtro mediano (a). Imagem binária isolada com destaque para a identificação da pastilha (b). Isolamento e identificação da pastilha na imagem (c).

A Figura 47 mostra as fases do processo de detecção de bordas de uma imagem, em tempo real, pois a extração das seguintes características: perímetro e área; considerando a dimensão de um pixel, dada pela Figura 48.

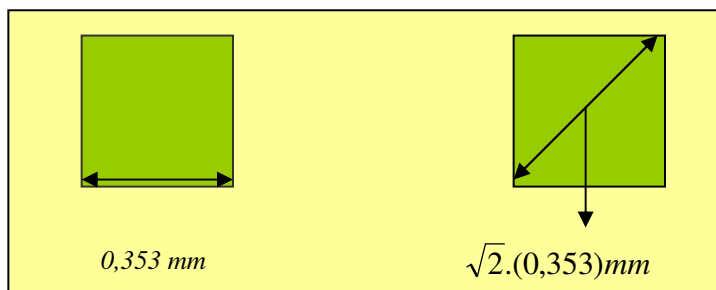


Figura 48 – Dimensões de um pixel.

As medidas de área foram utilizadas na análise da dinâmica da dissolução do bioconjugado CT/PDMAm-co-VP e, em seguida, o tempo total de dissolução da camada gel foi determinado. Neste caso, considera-se que o tempo de dissolução da camada de gel e o tempo de liberação do agente ativo sejam equivalentes, de acordo com Peppas²⁶. A utilização da visão computacional no acompanhamento do processo de intumescimento não constitui tarefa experimental simples. Porém, em se tratando do estudo do transporte de água em polímeros de elevada hidrofiliabilidade como o sistema PDMAm-co-VP utilizado neste trabalho, a visão computacional provou ser uma ferramenta versátil e de alta precisão relativa, quando comparada aos métodos gravimétricos. Neste sentido, os aspectos fundamentais do processo de aquisição de imagens bem como tratamento destas por técnicas de visão computacional são abordados no apêndice 1 deste trabalho⁴⁵.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1- Síntese e caracterização espectroscópica do copolímero PDMAm-co-VP

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um aumento significativo nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada. Neste sentido, uma grande variedade de sistemas, visando condicionar a velocidade e o local de liberação dos fármacos, tem sido objeto de estudo da indústria farmacêutica.

Entre os vários sistemas utilizados no projeto de sistemas de liberação controlada de fármacos estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre outros. A Figura 49 ilustra alguns dos sistemas de liberação controlada de princípios bioativos comumente utilizados pela indústria farmacêutica.

A utilização de sistemas matriciais constituídos por diversos tipos de polímeros é opção interessante para o projeto de sistemas de liberação controlada de fármacos devido às vantagens inerentes a estes sistemas como a versatilidade, eficácia, baixo custo e produção que recorre a equipamentos e técnicas convencionais. Além disso, a utilização de sistemas matriciais poliméricos permite a incorporação de quantidades relativamente elevadas de fármacos.

Do ponto de vista tecnológico, um sistema matricial polimérico pode ser definido como sistema que controla a liberação do princípio bioativo, disperso a nível molecular ou dissolvido num suporte resistente à desintegração (polímero ou agente formador da matriz).

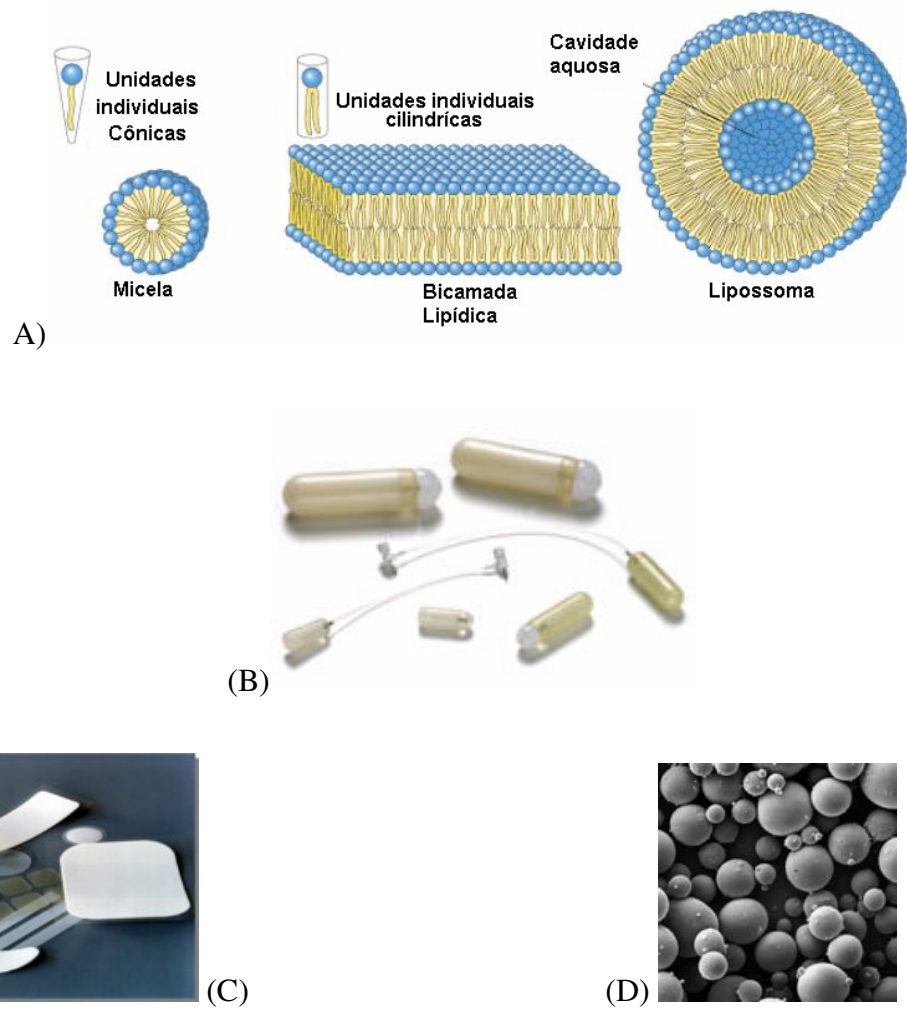


Figura 49- Estruturas poliméricas utilizadas no projeto de microesferas para a liberação controlada de fármacos: Lipossomas (A), bombas osmóticas (B), sistemas transdérmicos (C) e microesferas (D).

A utilização de um polímero no projeto de sistemas de liberação controlada de princípios bioativos deve levar em consideração a estrutura da matriz, a cinética de liberação (idealmente de ordem zero), os mecanismos para controlar a liberação (erosão, difusão, intumescimento), a natureza química e as propriedades dos materiais utilizados. A erosão, a difusão e o intumescimento das matrizes são os vários mecanismos pelos quais os sistemas matriciais poliméricos podem controlar a liberação das substâncias ativas. A predominância de

um destes mecanismos depende invariavelmente das propriedades do polímero empregado no sistema.

De um modo geral, quando as estruturas poliméricas entram em contacto com o fluido biológico podem sofrer inicialmente um inchamento seguido do processo de dissolução ou, podem sofrer um intumescimento seguido de erosão.

Geralmente, os polímeros a serem utilizados não reúnem todas as propriedades físicas e químicas desejadas para o projeto de um sistema de liberação controlada de fármacos. Em se tratando de homopolímeros, o número de restrições quanto às propriedades do material limitam significativamente seu emprego nos sistemas de liberação prolongada.

A obtenção de sistemas poliméricos híbridos quanto à sua composição química leva à obtenção de sistemas que podem reunir em uma única estrutura propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas, muitas vezes desejáveis nos sistemas de liberação controlada de princípios bioativos, capazes de controlar a liberação do fármaco, sustentar a ação terapêutica ao longo do tempo e/ou de liberar o fármaco ao nível de um determinado tecido ou órgão alvo; contribuindo significativamente para a qualidade de vida do paciente.

Dentro das várias opções de obtenção de sistemas poliméricos híbridos, os copolímeros são materiais versáteis e promissores para exercerem a função de um sistema de liberação controlada de princípios bioativos dada suas propriedades mistas relativamente à sua composição e estrutura química.

Neste trabalho foi realizada a copolimerização entre os monômeros N,N'-dimetilacrilamida (DMAm) e N-vinil-2-pirrolidona (VP) para a obtenção de uma matriz com propriedades hidrofílicas (VP) e hidrofóbicas (DMAm). As estruturas de tais monômeros são apresentadas na Figura 50.

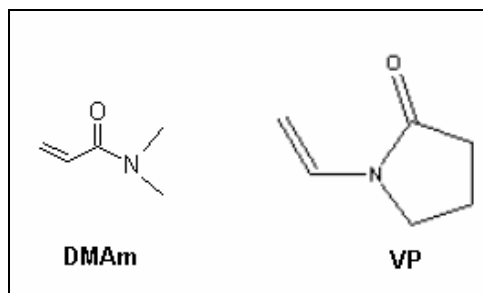


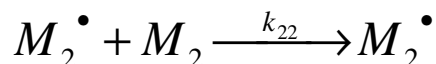
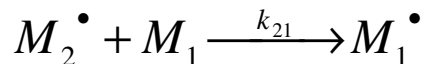
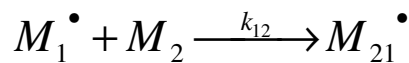
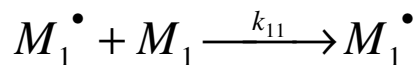
Figura 50 - Estrutura química dos monômeros DMAm e VP.

Ressalta-se que a polimerização do N-vinilpirrolidona foi recebida com grande ímpeto durante a Segunda Guerra Mundial, quando os alemães usaram soluções salinas do polímero como um substituto do plasma sangüíneo nos soldados feridos de suas tropas. O PVP, poli (vinilpirrolidona), possui um baixo grau de toxicidade e tem sido utilizado, também em cosméticos, adesivos, indústria têxtil, lentes de contato, e numa variedade de fármacos, incluindo a manufatura de materiais micro-encapsulados. Um complexo de PVP com iodo, denominado povidone[®], é um dos anti-sépticos mais utilizados pela área médica.

As reações de copolimerização radicalar ocorreram através das etapas fundamentais: Iniciação, Propagação e Terminação.

Na etapa de iniciação são gerados os radicais primários como consequência de uma decomposição térmica do iniciador. Estes radicais primários reagem com os monômeros formando radicais monoméricos capazes de continuar o crescimento pela adição de novas unidades méricas na etapa de propagação.

Se a reatividade da cadeia do radical em crescimento dependeu somente da natureza da unidade monomérica terminal que contém o radical livre o esquema cinético da etapa de propagação pode ser descrito por⁴⁶



sendo M_1^\bullet e M_2^\bullet representam os macro-radicaís em crescimento e k_{11} , k_{12} , k_{21} e k_{22} são as constantes de velocidade de propagação nas quais o primeiro sub-índice indica a natureza do

extremo do radical em crescimento e o segundo indica o tipo de monômero se adiciona à cadeia. As velocidades de consumo dos monômeros são dadas por:

$$-\frac{d[M_1]}{dt} = k_{11}[M_1\cdot][M_1] + k_{21}[M_2\cdot][M_1] \quad (1)$$

$$-\frac{d[M_2]}{dt} = k_{22}[M_2\cdot][M_2] + k_{12}[M_1\cdot][M_2] \quad (2)$$

Dividindo-se as equações anteriores entre si, obtém-se:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{k_{11}[M_1\cdot][M_1] + k_{21}[M_2\cdot][M_1]}{k_{22}[M_2\cdot][M_2] + k_{12}[M_1\cdot][M_2]} \quad (3)$$

Para poder eliminar as concentrações dos radicais $[M_1\cdot]$ e $[M_2\cdot]$ supõe-se que se cumprem as condições do estado estacionário para a concentração de cada tipo de radical ⁴⁷.

Supondo que a etapa de propagação seja alcançada rapidamente, um estado no qual a concentração total de radicais se mantém constante, as velocidades de interconversão serão iguais

$$k_{12}[M_1\cdot][M_2] = k_{21}[M_2\cdot][M_1] \quad (4)$$

Substituindo na equação (3), obtém-se

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{(k_{11}/k_{12})[M_1] + [M_2]}{(k_{22}/k_{21})[M_2] + [M_1]} \quad (5)$$

As relações entre as constantes de velocidade para os processos de homopropagação e propagação se denomina razão de reatividade dos monômeros correspondentes

$$r_1 = \frac{k_{11}}{k_{12}}, \quad r_2 = \frac{k_{22}}{k_{21}}. \quad (6)$$

A equação (5) se conhece como a equação de composição do copolímero e foi confirmada experimentalmente.⁴⁸

O espectro ¹H-RMN do copolímero PDMAm-co-VP é apresentado na Figura 51. Observa-se uma estreita faixa de deslocamento químico, entre 0 e 5 ppm. Os picos característicos das unidades méricas DMAm e VP são visíveis entre 2,0 ppm e 3,0 ppm, respectivamente.

Uma vez que os prótons correspondentes às unidades méricas que os prótons DMAm e VP são distinguíveis, a composição do copolímero PDMAm-co-VP pode ser calculada de acordo com a expressão

$$\frac{I_M}{I_T} = \frac{6f_1}{9f_1 + 9f_2}, \quad (7)$$

sendo, I_M a intensidade dos prótons metílicos, I_T a intensidade total de prótons, f_1 a concentração molar de DMAm e f_2 a concentração molar de VP.

O DMAm contém seis prótons os quais são bem separados do restante dos prótons.

Considerando $f_2 = 1 - f_1$ e substituindo na equação (7), a seguinte expressão foi obtida

$$f_1 = \frac{9}{6} \frac{I_M}{I_T}, \quad (8)$$

sendo, sendo f a fração do monômero no copolímero e I as integrais correspondentes aos picos de espectro de ¹H-RMN.

Os valores obtidos a partir da integração dos sinais de ¹H-RMN correspondentes são apresentados na tabela 6.

Conclui-se que a partir dos dados obtidos que os copolímeros PDMAm-co-VP sintetizados tendem a apresentar um conteúdo maior de DMAm que a proporção correspondente na alimentação do monômero.

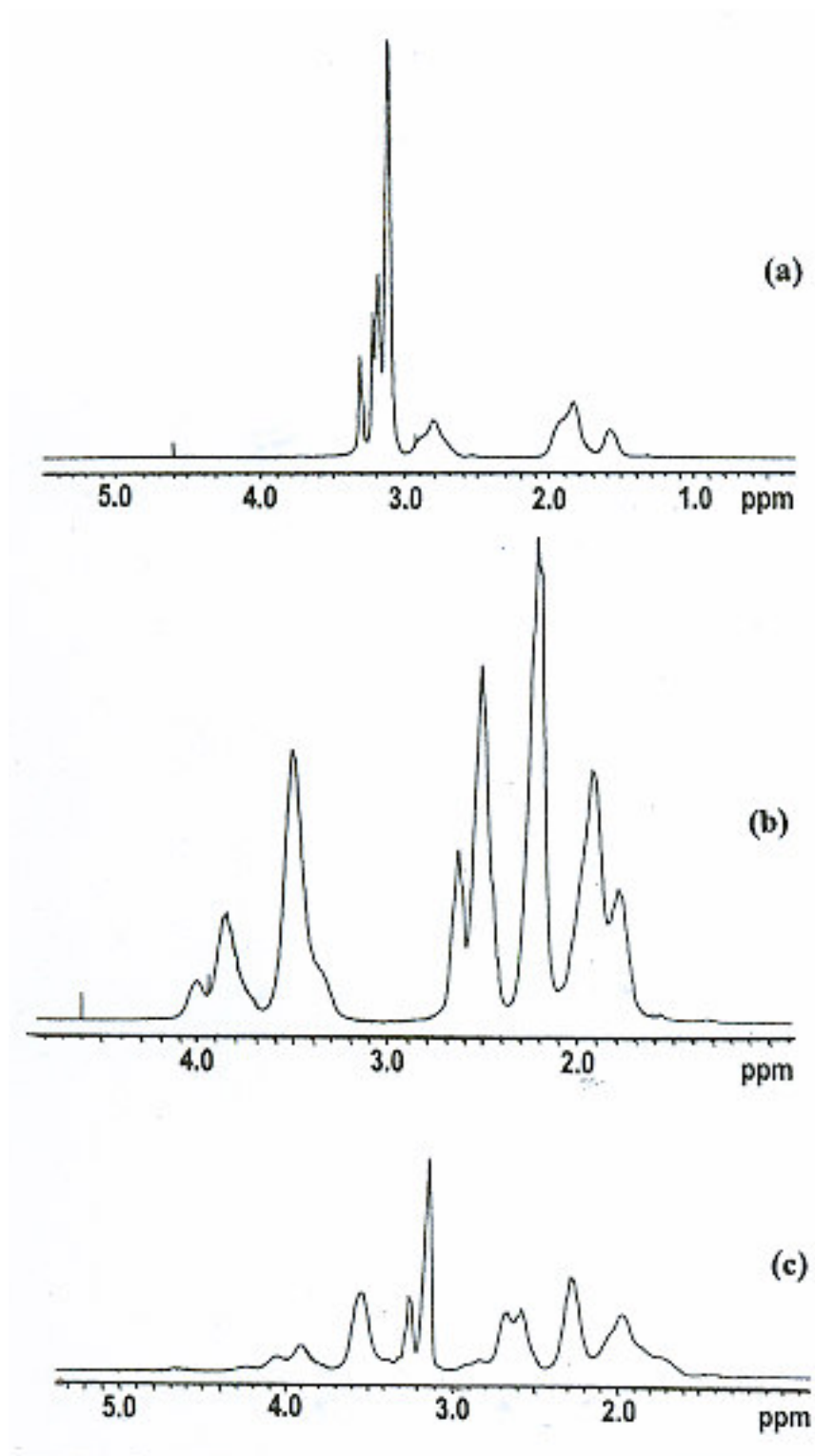


Figura 51 – O espectro ^1H – RMN (200 MHz) de PDMAm (a), PVP (b) e PDMAm-co-VP (c); $f_{\text{VP}} = f_{\text{DMAm}} = 1,05$. As medidas foram efetuadas à temperatura ambiente (25 °C).

Tabela 7 – Copolimerização de Vinil-2-pirrolidona e N,N'-dimetilacrilamida à temperatura de 50 °C; solvente: álcool etil; [AIBN]: $15 \cdot 10^{-2} \text{ mol.L}^{-1}$, precipitante: éter dietil .

Composição em fração molar na alimentação			Composição do copolímero em fração molar	
VP	DMAm	Conversão %	VP	DMAm
0,15	0,85	6,95	0,07	0,93
0,30	0,70	6,70	0,15	0,85
0,50	0,50	6,93	0,27	0,73
0,70	0,30	7,50	0,42	0,58
0,85	0,15	5,70	0,60	0,40

Para análise do comportamento cinético da reação de copolimerização, um gráfico de frações molares de DMAm no copolímero (f_1) em função fração molar de DMAm na alimentação é ilustrado na Figura 52. A curva obtida indica que a distribuição de unidades monoméricas é aleatória.

As taxas de reatividade dos monômeros DMAm e VP foram calculadas pelos métodos gráficos de Kelen –Tudos⁴⁹ . Kelen e Tudos (K-T) propuseram um método simples de avaliação gráfica das taxas de reatividade. Assim, a equação K-T usa a troca de variáveis para obter a melhor distribuição de pontos no intervalo de variação da abscissa. As variáveis definidas por K-T são

$$\eta = \frac{G}{\alpha + F} \quad \xi = \frac{F}{\alpha + F} \quad \alpha = (F_m F_n)^{\frac{1}{2}} \quad (9)$$

sendo,

$$G = \frac{f_1(2F_1 - 1)}{F_1(1 - f_1)}, \quad F = \frac{f_1^2(1 - F_1)}{F_1(1 - f_1)^2}$$

e

$$\alpha = (F_m F_n)^{\frac{1}{2}} \quad (10)$$

Os parâmetros F_m e F_n são os valores mais altos e mais baixos, respectivamente, para uma melhor distribuição dos pontos experimentais na faixa de variação de ξ , a qual se estende

0 ($F = 0$) para 1 ($F = \infty$). Assim, r_1 é o valor de η quando $\xi = 1$ e a interseção da reta $\eta = f(\xi)$ fornece $-r_2/a$. A reta é calculada de acordo com a técnica dos mínimos quadrados, bem como os intervalos de confiança.⁵⁰ Os valores de r_{DMAm} e r_{VP} obtidos foram $r_{DMAm} = 2,232$ e $r_{VP} = 0,186$, respectivamente (Figura 52). O valor r_{DMAm} demonstra que o radical $DMAm^\bullet$ tem uma tendência para atacar seus próprios monômeros relativamente aos monômeros de VP. Entretanto, o radical VP^\bullet prefere os monômeros de DMAM. Logo, o valor de $1/r_2$ é maior do que 1. Este tipo de comportamento do VP é observado em reações de polimerização de VP com acrilamida e seus derivados⁵¹⁻⁵².

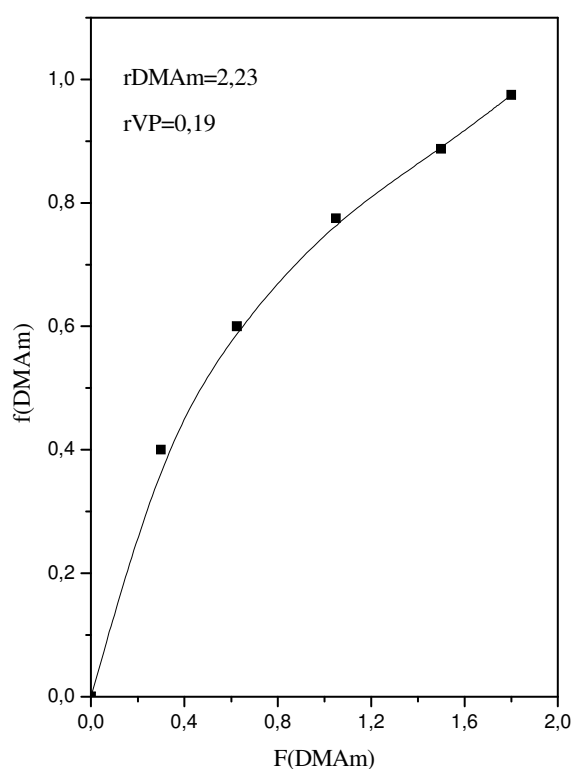


Figura 52 – Variação da composição do copolímero (f_{DMAm}) com a composição na alimentação (F_{DMAm}).

O produto de r_1 por r_2 permanece menor que 1, indicando que o sistema segue uma distribuição aleatória de unidades monoméricas. Os altos valores de r_{DMAm} indicam que a probabilidade de unidades de DMAM comporem o copolímero é muito maior que de VP e sendo o copolímero resultante rico em unidades de DMAM.

Em geral, a liberação de princípios bioativos de matrizes poliméricas sofrem influência do peso molecular do material, uma vez que o tempo de erosão da matriz é proporcional a M^3 .

A massa molecular de um polímero pode ser calculada se for conhecido o grau de polimerização da macromolécula.

O grau de polimerização do copolímero foi determinado através da razão entre as áreas dos picos referentes aos hidrogênios metílicos ligados ao PDMAm eo grupo CH₂ terminal de cadeia de acordo com

$$\bar{X}_n = \frac{A_{N(CH_3)_2}}{A_{CH_2} (lactona)}, \quad (11)$$

sendo, A a área da integração dos picos.

A massa molar numérico média foi estimada por

$$\bar{M}_n = X_n \cdot PM_{(un)}, \quad (12)$$

sendo PM_(un) a massa molar da unidade polimérica repetitiva.

A determinação da massa molar através da H¹-RMN é particularmente vantajosa para esses copolímeros de baixa massa molar, desde que se disponha de um espectro de RMN isento de ruídos devido a impurezas⁵³. A massa molar \bar{M}_n obtida para o copolímero PDMAm-co-VP foi de 16 kDa (por GPC = 15 kDa). Esta massa molecular é particularmente conveniente para a dialisação pelos rins, uma vez que estes órgãos têm capacidade de dialisarem cadeias poliméricas com massas moleculares menores ou iguais a 20 kDa.

7.2. Processo de hidratação do copolímero PDMAm-co-VP

O trabalho de investigação descrito nesta dissertação tem como objetivo não somente de sintetizar novos polímeros acrílicos e estudar sua microestrutura, mas também de preparar sistemas macromoleculares com potencial atividade farmacológica para atuar como sistemas de liberação do composto bioativo crotoxina. Neste caso, o composto bioativo está unido à matriz acrílica polimérica por meio de ligações fracas que podem ser atenuadas em condições fisiológicas.

Neste presente tópico é descrito o estudo dos processos de hidratação dos copolímeros PDMAm-co-VP em função de sua composição. Tais resultados permitirão conhecer a influência dos fenômenos de difusão e dissolução na liberação do composto bioativo.

O sistema conjugado polímero-fármaco controlado por difusão constitui um dos sistemas de liberação controlada mais simples no qual o agente bioativo é dissolvido no polímero inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante do processo⁵⁴. Neste caso, o polímero hidrofílico intumescer com o fluido fisiológico abaixando sua temperatura de transição vítrea (Tg) e tornando o material mais plástico. Deste modo, o fármaco contido na matriz pode se difundir para o meio externo.

O intumescimento do sistema PDMAm-co-VP foi estudado gravimetricamente onde, após a imersão de pastilhas de copolímero com diferentes composições de VP (% m/m) em soluções PBS pH 7,4 a 37 °C o percentual de água sorvida por grama de copolímero era calculado através de⁵⁵

$$H = \frac{G_f - G_t}{G_f} \cdot 100, \quad (13)$$

sendo, H o grau de hidratação (% peso), G_t é o peso da amostra seca e G_f o peso da amostra após a sorção de água.

Observa-se na Figura 53 uma dependência significativa da sorção de água pelo copolímero PDMAm-co-VP em função de sua composição. Verifica-se que, para percentuais de VP no copolímero superiores a 30% (m/m) a taxa de absorção de água é constante e igual a aproximadamente 20 g de água/g de copolímero.

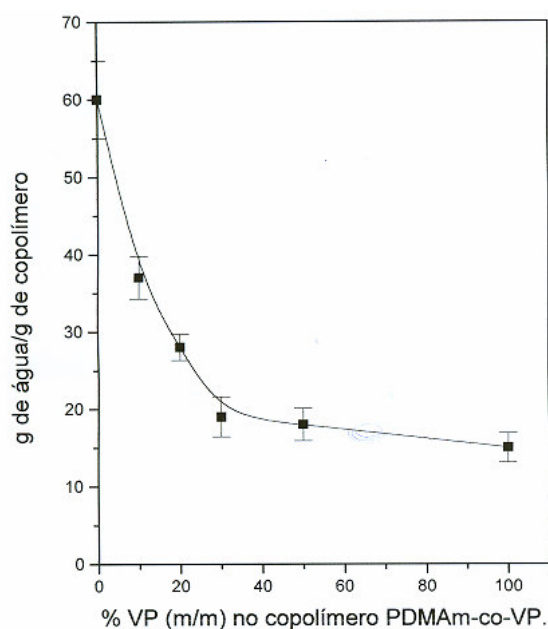


Figura 53 – Relação entre a concentração em massa de Vp no PDMAm-co-VP e a taxa de absorção de água para este copolímero.

A partir do estudo da absorção de água em função do tempo para o copolímero em DMAM-co-VP de composição $f_{VP} = 45 \%$, o expoente n da lei de Fick (Equação 17, Capítulo 5), foi calculado e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7.

Tabela 8 – Valores de n para a sorção de água pelo copolímero PDMAm-co-VP para diferentes temperaturas.

W_{VP}	n	T(K)
0	0,74	298
8	0,76	
17	0,84	
30	0,75	
45	0,75	
60	0,68	
100	0,81	
0	0,58	313
8	0,76	
17	0,72	
30	0,70	
45	0,70	
60	0,68	
100	0,68	
0	0,99	333
8	1,24	
17	1,04	
30	1,20	
45	1,08	
60	1,06	
100	1,08	

Os valores de n obtidos indicam um mecanismo de transporte Fickiano, enquanto $n = 1,00$ é sugestivo do caso de transporte tipo II. Na presente investigação, a 298 K e 313 K n varia entre 0,6 e 0,8 e ainda o mecanismo de transporte de água na matriz polimérica classificada como tipo anômalo, ou seja, ambas taxas de difusão do solvente e relaxação do polímero são comparáveis⁵⁶⁻⁵⁷.

A partir dos dados de intumescimento do copolímero PDMAm-co-VP em água (Equação 35, página 77) o coeficiente de difusão (D) pode ser calculado. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 54.

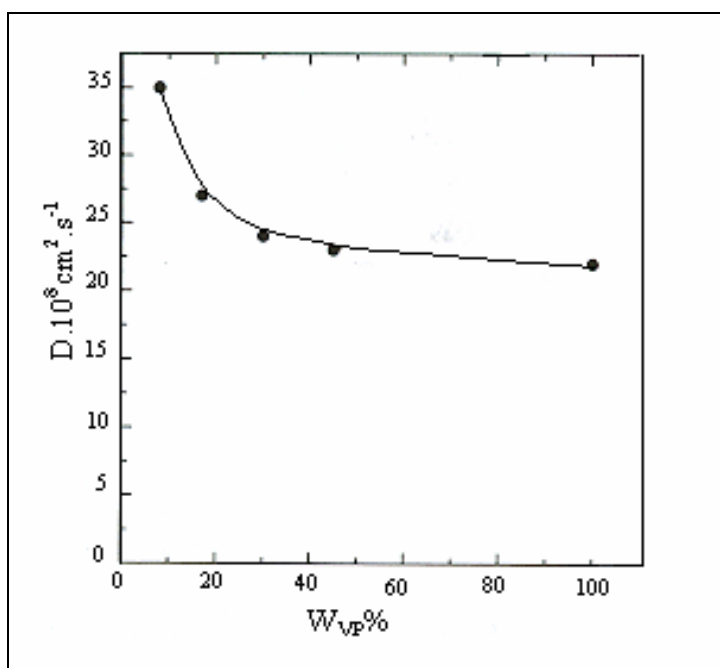


Figura 54 - Relação entre a concentração em massa de Vp no PDMAm-co-VP e o coeficiente de difusão de água para este copolímero.

Como está evidente nos dados da Figura 54, o nível de água absorvida decresce com o aumento no conteúdo de vinil pirrolidona (VP) nos copolímeros.

A energia de ativação, E_D , para o processo de difusão foi estimada da relação de Arrhenius⁵⁸

$$D = D_0 e^{-(E_D/RT)}, \quad (14)$$

sendo D_0 o fator pré – exponencial, R , a constante molar dos gases, T a temperatura absoluta e E_D é a energia de ativação requerida para produzir uma abertura entre os segmentos da cadeia polimérica grandes o bastante a fim de permitir a difusão da água.

Há um crescimento sistemático nos valores de E_D com o crescimento da concentração de VP nos copolímeros PDMAM-co-VP, como pode ser visto na Figura 55.

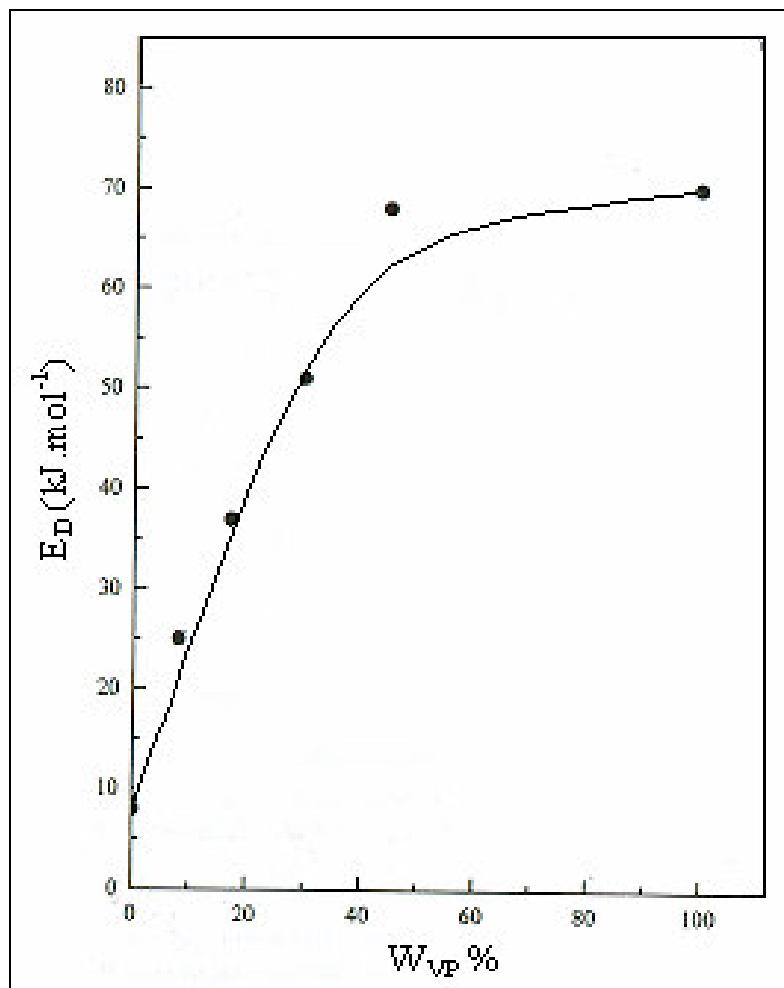


Figura 55 – Energia de ativação par difusão de água em copolímeros PDMAM-co-VP com diferentes composições de VP.

Portanto, a diminuição de D com o incremento de VP no copolímero PDMAM-co-VP indica uma diminuição nos graus de liberdade da molécula de água com o aumento da concentração de VP na matriz de PDMAM-co-VP.

Estes resultados poderiam ser explicados com base na teoria da abertura de Eyring de acordo com a qual a energia requerida para provocar a abertura na matriz polimérica para acomodar uma molécula é diretamente proporcional a E_D .⁵⁹ Assim, os maiores valores de E_D com o crescimento de VP no copolímero são interpretados em termos da dificuldade associada às forças intra e intermoleculares entre as unidades méricas DMAM e VP presentes no copolímero PDMAM-co-VP.

Em geral, a liberdade de princípios bioativos incorporados em matrizes poliméricas sofrem a influência não somente do peso, mas também da temperatura de transição vítrea (T_g). Durante o processo de sorção de água a matriz sofre uma transição do estado vítreo para o estado maleável, resultante da penetração da água que se comporta como um plastificante da matriz polimérica. As moléculas de água são de dimensões reduzidas e ficam retidas entre as cadeias poliméricas, afastando-as umas das outras, o que reduz as forças de atração intermoleculares polímero-polímero, aumentando a mobilidade das cadeias. Assim, quando um sistema matricial contém um polímero de intumescimento e entra em contato com a água ocorre mudança do estado vítreo (estado configuracional altamente emaranhado) para um estado maleável, o que está associado com o processo de intumescimento/relaxamento da matriz polimérica.

A fim de estudar a flexibilidade inerente das cadeias do copolímero e o efeito da composição micro-estrutural neste parâmetro, foi analisada a temperatura de transição vítrea do sistema PDMAM-co-VP.

As temperaturas de transição vítrea dos copolímeros PDMAM-co-VP (T_g), homoplímeros PVP (T_{g1}) e PDMAM (T_{g2}) em função das frações de VP no copolímero são mostradas na Figura 56. Os dados foram tratados com base na equação de Fox⁶⁰

$$\frac{1}{T_g} = W_1 \left[\frac{1}{T_{g1}} - \frac{1}{T_{g2}} \right] + \frac{1}{T_{g2}}. \quad (15)$$

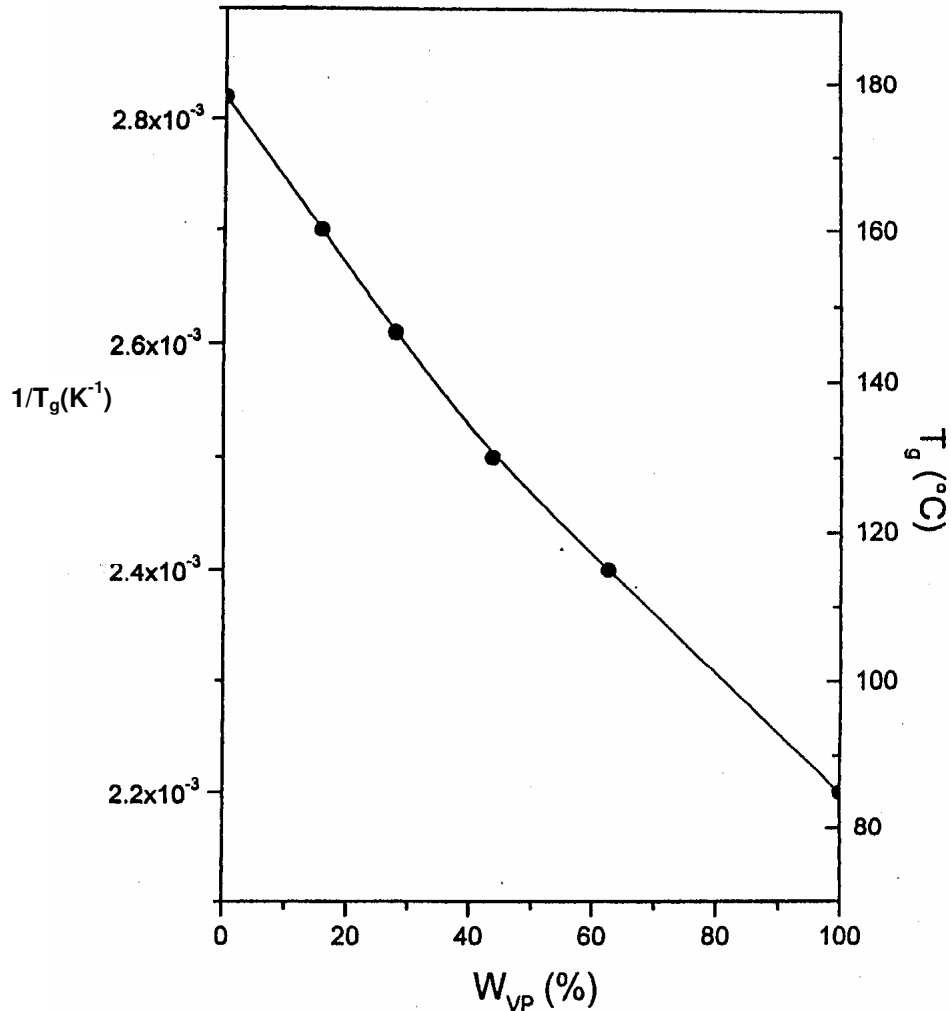


Figura 56 – Dependência das temperaturas de transição dos copolímeros em função da composição de VP.

É evidente que o equacionamento de Fox se comporta bem para estas séries de copolímeros, que indicam uma contribuição aditiva das unidades de DMAM para a flexibilidade da cadeia polimérica e, portanto as interações intramoleculares específicas entre unidades vizinhas de DMAM e VP observadas nos sistemas de hidratação são estabilizadas após o processo de hidratação se completar. E, em um estado vítreo seco ambos os componentes méricos não interagem especificamente e contribuem para a flexibilidade dos segmentos macromoleculares como simples componentes aditivos. Os copolímeros ricos em VP são menos flexíveis do que os sistemas ricos em DMAM. Um conhecimento dos valores de T_g pode ser utilizado na previsão das propriedades termodinâmicas superficiais do material polimérico⁶¹.

Deve-se observar que o copolímero PDMAm-co-VP como sistema de liberação controlada de fármacos devido à sua hidrofilicidade é ativado pela absorção de água sendo a liberação do composto bioativo controlada pela interação entre a água, o copolímero e o componente biológico. O elemento central do mecanismo de liberação é a formação da camada de gel à volta da matriz. Neste caso, o comportamento de intumescimento do copolímero hidrofílico PDMAm-co-VP, resultante de um processo de relaxamento das cadeias poliméricas quando em contato com o meio aquoso, é mecanicamente descrito pela formação de “frentes”, ou seja, o local da matriz no qual se verifica nítida mudança das condições físicas.^{62 – 63 – 64}

Levando-se em consideração a observação macroscópica do processo de intumescimento progredindo do centro para a matriz, identifica-se três frentes: a frente de intumescimento, a de difusão e a de erosão. Estas três frentes podem ser ilustradas pela Figura 57.

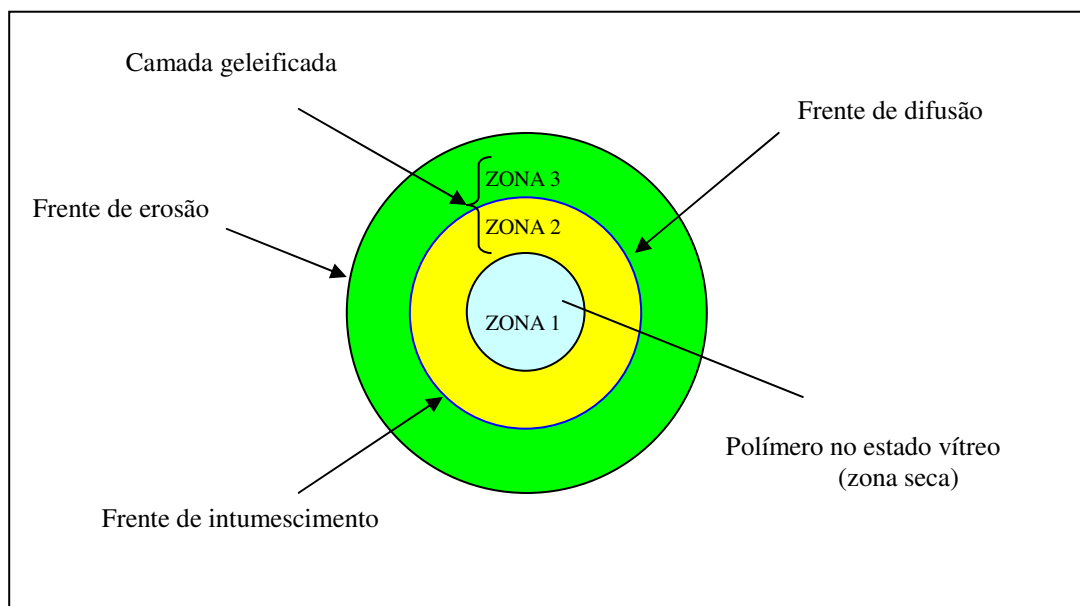


Figura 57 – Esquema ilustrativo das frentes de movimento (intumescimento, difusão e erosão) durante a liberação de um princípio bioativo a partir de um sistema matricial de PDMAm-co-VP: polímero no estado seco (zona 1), polímero no estado maleável (ou de gel) (zonas 2 e 3).

Uma frente de intumescimento corresponde à interface polímero no estado seco/camada geleificada (estado maleável) sendo na realidade a frente de penetração da água. O copolímero PDMAm-co-VP (45% de VP) presente na zona 1 encontra-se no estado seco, possuindo temperatura de transição vítrea de 125 °C, acima da temperatura fisiológica (37 °C). Nesta frente verifica-se a ocorrência dos fenômenos de hidratação da matriz, de intumescimento e a coalescência das partículas individuais do polímero. O intumescimento da matriz de PDMAm-co-VP pode ser atribuído à formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias do copolímero e a água. Quando a água penetra no PDMAm-co-VP sólido, funciona como agente plastificante, inserindo-se nas ligações de hidrogênio existentes entre as cadeias poliméricas adjacentes. À medida que aumentam as interações água/polímero, as forças de interação entre as cadeias poliméricas diminuem. A água que penetra no sistema preenche os espaços entre as cadeias poliméricas e difunde-se para as regiões mais cristalinas do polímero “forçando” a separação das cadeias poliméricas restantes. Conseqüentemente as cadeias ganham liberdade rotacional e começam a ocupar mais espaço, ficando no estado solvatado. Este novo sistema (PDMAm-co-VP hidratado) possui temperatura de transição vítrea, inferior à temperatura experimental, apresentando-se no estado maleável. Zona 1, a mobilidade macromolecular é muito baixa, conduzindo a baixas taxas de difusão da água.

A segunda frente, chamada frente de difusão, situa-se entre a frente de intumescimento e a frente de erosão na camada geleificada. Da camada de gel fazem parte duas zonas distintas 2 e 3 (Figura 57). A principal diferença entre estas zonas é o estado de dissolução do fármaco. Na zona 2. O fármaco está presente no estado não dissolvido, podendo, alguma parte dele, existir simultaneamente na forma dissolvida. Na zona 3, o fármaco encontra-se dissolvido. Assim, a frente de difusão relaciona-se com a velocidade de dissolução do fármaco. O fármaco dissolvido difunde-se em direção à frente de erosão.

Uma terceira frente, ou frente de erosão estabelece simplesmente a ligação entre a superfície da matriz e o meio de dissolução e corresponde à interface camada de gel/meio de dissolução (água ou solução tampão). Nesta zona da estrutura matricial verifica-se o afastamento e a solubilização das cadeias poliméricas e a subsequente liberação do fármaco.

Nas zonas 2 e 3 a mobilidade das cadeias poliméricas sofre um incremento acentuado, quando comparada com a zona 1, conduzindo a velocidades de difusão da água muito mais elevadas, da mesma ordem de grandeza da água pura ($10^{-2} \text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).⁶⁵

A posição destas frentes na matriz polimérica pode ser medida, permitindo calcular importantes parâmetros do processo de intumescimento/dissolução tais como a velocidade de penetração da água e a velocidade de erosão da matriz polimérica.⁶⁵

A comprovação da existência de uma fase cristalina no bioconjugado PDMAm-co-VP/CT foi analisada neste trabalho por difratometria de raios X (DRX). Utilizando-se a DRX, pôde-se constatar que o copolímero PDMAm-co-VP exibe um padrão cristalográfico semicristalino, apresentando picos de cristalinidade para 2θ entre 20° e 40° (Figura 58).

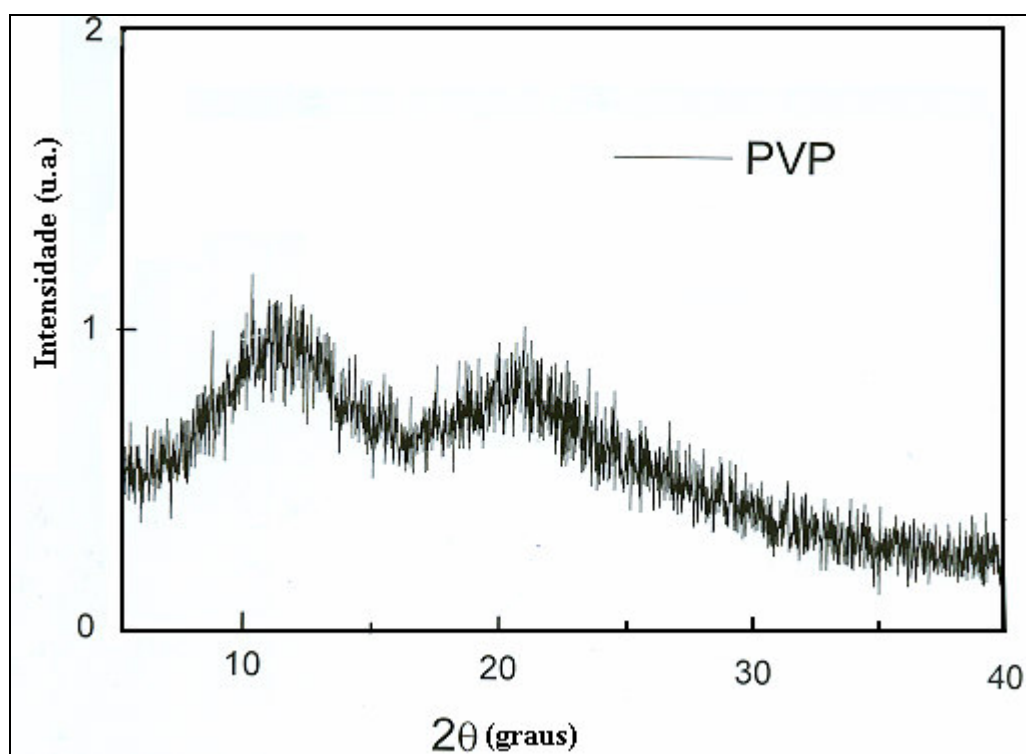


Figura 58 – Difratograma de raio X (DRX) para o PDMAm-co-VP, apresentando picos de cristalinidade para 2θ entre 20° e 40° .

Por ser um copolímero hidrofílico linear, os efeitos do PDMAm-co-VP se manifestou principalmente pela capacidade de, após hidratação, intumescer e formar uma camada gelatinosa à superfície da membrana/pastilha. Esta funciona como uma barreira à rápida liberação do fármaco, controlando quer a penetração de água, quer a velocidade de liberação da substância ativa⁶⁶. A velocidade de penetração de água no sistema matricial condiciona o modo de liberação do fármaco. Para concentrações muito elevadas as cadeias lineares de PDMAm-co-VP formam um emaranhado, originando uma camada gelatinosa bastante

consistente. Em concentrações muito baixas, estes géis apresentam viscosidades muito baixas, permitindo a liberação quase imediata do princípio bioativo.

A velocidade de liberação do fármaco de polímeros hidrofílicos pode estar condicionada por um ou mais dos seguintes mecanismos cinéticos ⁶⁶⁻⁶⁷:

- a) Transporte do meio de dissolução para a matriz polimérica;
- b) Intumescimento do polímero com formação de uma camada de gel.
- c) Difusão do fármaco através da camada do polímero intumescido;
- d) Erosão do polímero intumescido.

As várias fases envolvidas nas etapas de liberação controlada de princípios bioativos a partir de uma matriz de PDMAm-co-VP pode ser ilustrado através da Figura 59.

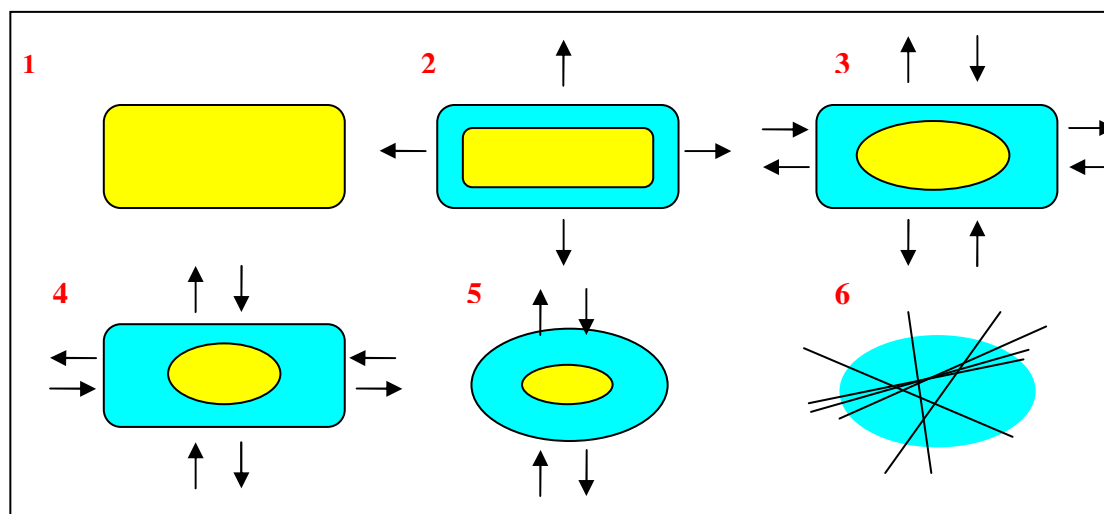


Figura 59 - Possíveis alterações observadas no sistema matricial hidrofílico PDMAm-co-VP com o intumescimento em solução fisiológica sofrem erosão: matriz no estado seco (1), início da hidratação e intumescimento da matriz (2), aumento da hidratação e intumescimento da matriz com diminuição do núcleo seco e início da erosão das cadeias poliméricas (3-4), aumento da erosão das cadeias poliméricas (5) e separação das cadeias poliméricas com liberação rápida do fármaco restante (6).

A movimentação da frente, anteriormente descrita, condiciona toda a dinâmica relacionada com a formação, a estrutura e a espessura da camada de gel. Durante a liberação do fármaco, a camada gelatinosa é exposta a mudanças contínuas da sua estrutura e espessura.

A espessura da camada de gel é definida pela frente de erosão e pela frente de intumescimento. A espessura da camada é função da quantidade de água que penetra no

sistema, da taxa de desintegração das cadeias poliméricas e da transferência, em termos de massa, do fármaco e do polímero do sistema para o meio de dissolução.

Numa fase inicial (a), verifica-se um aumento rápido da espessura da camada de gel, pois a taxa de absorção de água é superior à desintegração das cadeias de polímero, com seu conseqüente intumescimento. A penetração do solvente é o mecanismo mais rápido.

Numa segunda fase (b), à medida que o núcleo seco se desidrata, verificam-se pequenas mudanças na densidade da camada de gel, existindo uma sincronização entre os fenômenos de intumescimento e a taxa de desintegração das cadeias poliméricas.

Numa fase final (c), quando todo polímero está hidratado na forma gelatinosa, ocorre apenas a desintegração das suas cadeias poliméricas; neste caso, o fenômeno de dispersão prevalece em relação aos outros fenômenos e a espessura da camada de gel diminui até desaparecer completamente a matriz geleificada.

Com relação à mudança na estrutura da camada de gel, as cadeias poliméricas passam pelos três tipos diferentes de rearranjos especiais representados na Figura 60. Obviamente, a difusão do fármaco é feita pelo tipo de configuração molecular.⁶⁸⁻⁶⁹

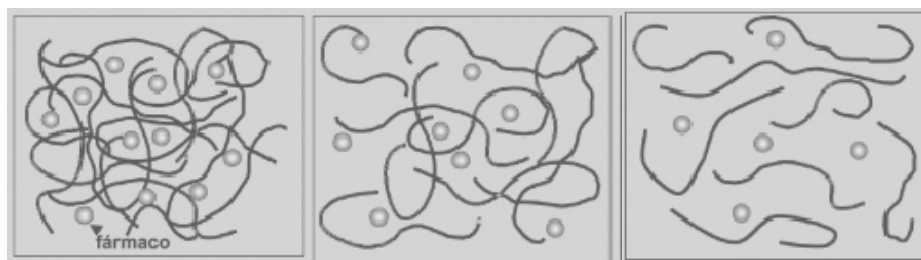


Figura 60 – Configurações macromoleculares de polímeros hidrofílicos durante o processo de dissolução do fármaco sistema matricial. Fase inicial (1), segunda fase (2) e fase final (3).

O processo de dissolução do copolímero PDMAm-co-VP no nível microscópico foi analisado através da visão computacional. Neste caso avaliou-se o intervalo de tempo necessário para intumescimento e dissolução total da camada de gel⁷⁰.

Os resultados obtidos para a dissolução da camada de gel são apresentados nas Figuras 61a e 61b. Observa-se inicialmente, na Figura 61, um rápido intumescimento, superior à taxa de dissolução do copolímero (aumento na área da pastilha) para o intervalo de tempo de 40 s, de 40s a 8,6 min a camada de gel apresenta área constante (equilíbrio entre as taxas de

intumescimento e dissolução) e a partir deste estágio de equilíbrio, a taxa de dissolução supera a taxa de intumescimento, ocorrendo uma redução significativa da camada de gel.

Aos 42 minutos e 10 segundos foi observada a depleção total da camada de gel, restando, a partir de então, a fração cristalina do copolímero PDMAm-co-VP.

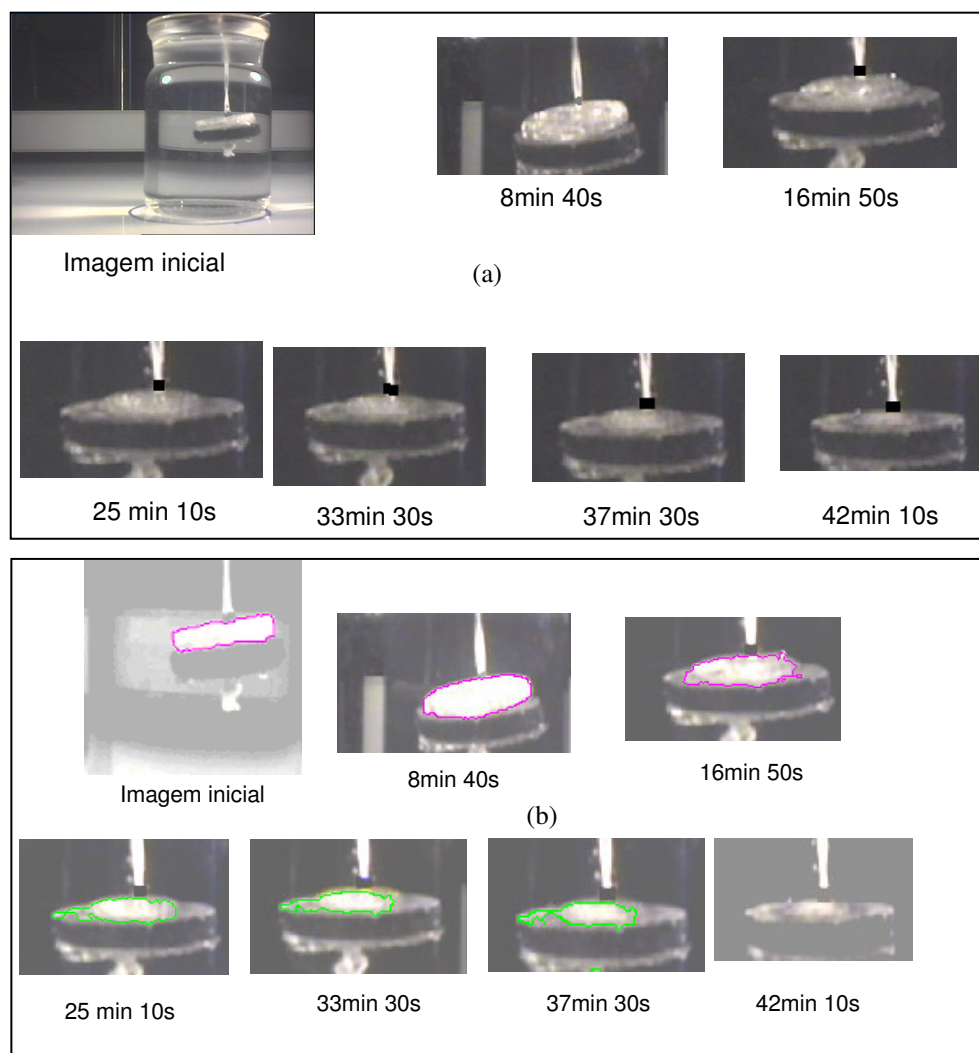


Figura 61 – Aquisição de imagens referentes ao processo de intumescimento e dissolução da camada de gel do copolímero PDMAm-co-VP. (Temperatura: 37 °C, solução PBS pH 7,4)

Após tratamento por visão computacional as micrografias representadas na Figura 61 foram interpretadas graficamente através da Figura 62. Neste sentido observa-se claramente a existência de três regiões bem definidas. A região I caracteriza pelo intumescimento do copolímero PDMAm-co-VP superior à dissolução até que ambas estas taxas se equilibram. Na

região II (Figura 62) observa-se dissolução da camada de gel com conseqüente erosão da matriz polimérica apresentando intensidade superior ao intumescimento. Nesta região ocorre o desentrelaçamento do novelo polimérico seguido da liberação do princípio bioativo. Finalmente, a região III caracteriza a dissolução total da camada de gel evidenciando a existência de uma fração cristalina no copolímero PDMAm-co-VP.

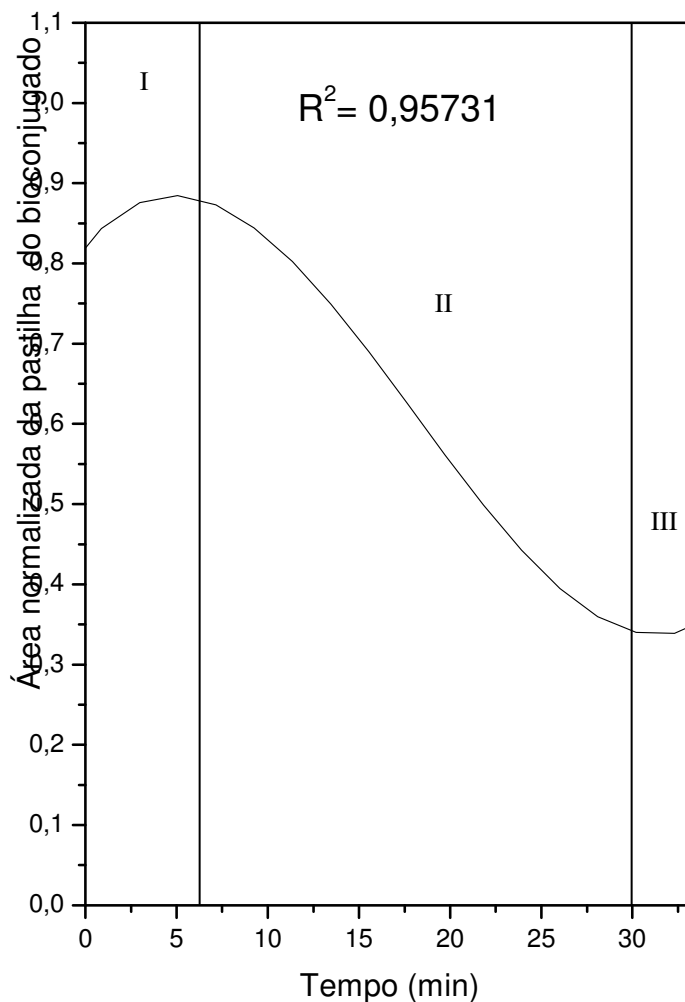


Figura 62 – Representação gráfica de tendência da variação da pastilha de bioconjugado PDMAm-co-VP em função do tempo (foi realizado ajuste polinomial de grau 3)

A partir dos dados obtidos com relação à camada de gel, formada pelo sistema PDMAm-co-VP/CT/água, através da visão computacional e considerando que a espessura da camada de gel poderá governar a liberação da crotoxina, foi possível notar que o tempo de

dissolução da camada geleificada encontrado foi de 42,17 min. Isto significa que a liberação da crotoxina será rápida se comparada com outros sistemas em que os tempos de liberação chegam a atingir meses ou, até mesmo, anos.

7.3. Estudo da liberação *In vitro* da crotoxina

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa atualmente uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares que pode contribuir significativamente para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação controlada de princípios bioativos animais ou vegetais oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas de dosagem convencional. Neste sentido, as seguintes vantagens podem ser apontadas com relação à utilização da técnica de liberação controlada de fármacos na indústria farmacêutica:

- i) Maior eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada do fármaco, a partir da degradação da matriz polimérica;
- ii) Diminuição significativa da toxicidade e maior tempo de permanência na circulação;
- iii) Natureza e composição dos veículos variada e, ao contrário do que se poderia esperar, não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco;
- iv) Administração segura (sem reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses);
- v) Direcionamento a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas;
- vi) Tanto substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas podem ser incorporadas.

Os sistemas poliméricos de liberação controlada por difusão são os mais comuns e dois tipos são descritos. No primeiro, o agente bioativo (fármaco) forma uma partícula interna (caroço) envolvida por uma barreira de difusão inerte. Estes sistemas incluem membranas, cápsulas, nanocápsulas, lipossomas e fibras ocas. O segundo tipo é um sólido monolítico no qual o agente ativo é disperso ou dissolvido em um polímero inerte e a difusão do fármaco é a

etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero. Neste sentido, para que ocorra a difusão, o polímero deve se intumescer no fluido fisiológico o que leva ao abaixamento da temperatura de transição vítrea (T_g) e tornado o material mais plástico. Deste modo, o fármaco contido na matriz pode se difundir para o meio externo.

O tipo de transporte da crotoxina do copolímero PDMAm-co-VP, calculado de acordo com a lei de Fick foram $n_a = 0,76$ e $n_b = 0,71$. Para ambos os casos o tipo transporte indicado pelo valor de n é anômalo, sugerindo uma interação entre o biopolímero (CT) e o copolímero PDMAm-co-VP.

A Figura 63 ilustra a fração de liberação da crotoxina da matriz de PDMAm-co-VP em função do tempo, a temperatura constante 37 °C para duas amostras de bioconjugado com concentrações de CT 2,5 pg de crotoxina/g de PDMAm-co-VP e 1 pg de crotoxina/g de PDMAm-co-VP, respectivamente.

A taxa de liberação constante de crotoxina pode ser determinada a partir da inclinação da região das curvas 63 (a) e 63 (b) que apresenta cinética de primeira ordem. Os valores das taxas obtidos para o intervalo em que a liberação se deu de forma constante foram $q_a = 4,55 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}/\text{min}$ e $q_b = 1,441 \cdot 10^{-8} \mu\text{g}/\text{min}$. Foi possível notar que a pastilha com maior concentração de crotoxina apresentou maior taxa de liberação. Este fato ocorreu provavelmente, porque o sistema PDMAm-co-VP/CT apresentava maior concentração de polímero e, por este motivo, de acordo com a teoria da reptação, as cadeias poliméricas precisaram percorrer uma distância maior dentro dos novelos (maiores) para se desentrelaçarem totalmente. Além disso, o sistema deve apresentar uma pressão interna mais acentuada, motivada por uma maior concentração, provocando, dessa forma, maior velocidade de dissolução do sistema e conseqüentemente, maior taxa de liberação do componente bioativo.

A liberação controlada de CT da matriz de PDMAm-co-VP parece estar associada à concentração de CT presente na matriz polimérica. Esta observação parece indicar a presença de interações intermoleculares entre o copolímero PDMAm-co-VP e o princípio bioativo (CT).

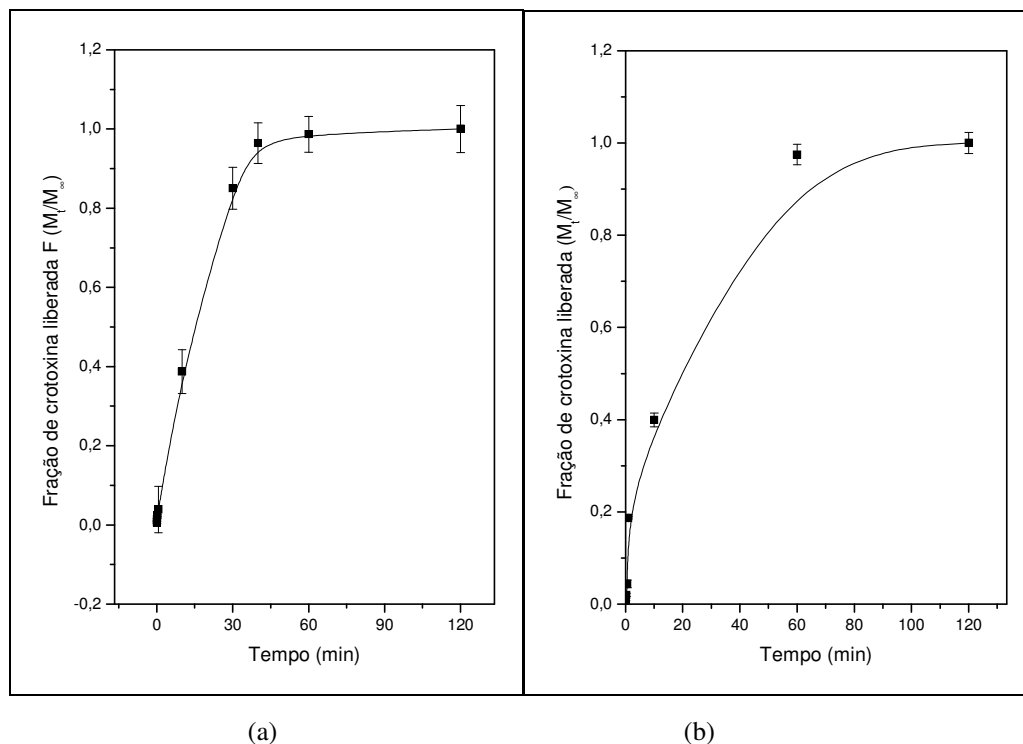


Figura 63 – Fração de crotoxina liberada em função do tempo de dissolução do sistema. Amostra com concentração de $2,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$ de crotoxina por g de DPMAM-co-VP (a); Amostra com concentração de $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{g}$ de crotoxina por g de DPMAM-co-VP (b). % de VP no copolímero = 45%, temperatura = 37 °C, solução PBS, pH 7,4.

É fato conhecido da literatura que o PVP exibe uma série de interações com moléculas pequenas em solução e que formam complexos com variedades dessas moléculas. Estes estudos têm mostrado que ambas interações hidrofóbicas e eletrostáticas do anel íon lactona podem existir em soluções aquosas. Na presença de doadores de hidrogênio tais como água, o mesomerismo na unidade métrica VP pode ser ilustrado na Figura 64⁷¹.

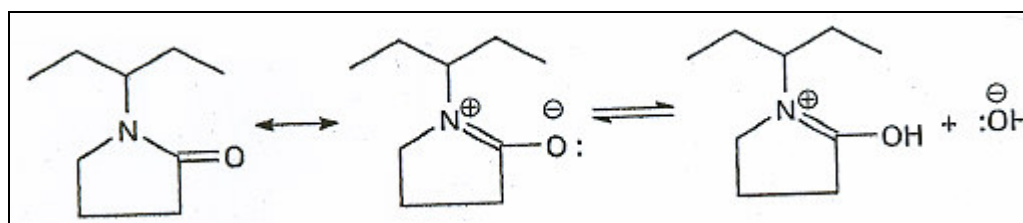


Figura 64 – Mesomerismo na unidade métrica VP.

Existindo o efeito mesomérico no copolímero PDMAm-co-VP poderia haver a formação de um complexo de transferência de carga com a proteína CT.^{72 - 73} Neste caso um complexo entre o PDMAm-co-VP e a CT poderia ser formado por associação entre a proteína e a macromolécula sintética via complexos π - σ ou π - π , freqüentemente chamados de interações de transferência de carga ou do tipo elétron doador – receptor.^{74 - 75} As interações de transferência de carga dos aminoácidos aromáticos protéicos com polímeros sintéticos têm sido estudadas e estas interações vêm sendo apontadas como interações de transferência de cargas.

7.4. Determinação dos parâmetros k_d , R_g , τ_r e D' para o sistema PDMAm-co-VP.

Para que o perfil de um sistema de liberação controlada por dissolução seja bem delineado é necessária a determinação da taxa de dissolução da matriz (k_d), do raio de giração do polímero, do tempo de reptação e o coeficiente de reptação, portanto com a finalidade de estabelecer o perfil da liberação da crotoxina do sistema PDMAm-co-VP, tais parâmetros foram calculados.

Inicialmente foi determinada a taxa de dissolução da camada de gel, a partir da espessura desta camada e do tempo de dissolução da mesma. A espessura da camada de gel e o tempo de dissolução foram determinados através da visão computacional, obtendo-se os valores $l = 0,27$ mm (espessura da camada de gel) e $t_d = 42$ min (tempo de dissolução). Então, a taxa de dissolução foi determinada pela expressão

$$k_d = \frac{l}{t_d}, \quad (1)$$

sendo, k_d a taxa de dissolução do copolímero PDMAm-co-VP, l a espessura da camada de gel e t_d o tempo de dissolução.

A taxa de dissolução obtida para o sistema estudado foi $k_d = 1,07 \cdot 10^{-7}$ m/s.

Conhecendo-se o peso molecular ponderal médio do PDMAm-co-VP ($M_w = 18$ kDa), tornou-se possível determinar o raio de giração da macromolécula, aplicando-se a relação⁷⁶

$$R_g = kM_w^{0,6}, \quad (2)$$

sendo M_w o peso molecular ponderal médio do copolímero, R_g o raio de giração e k é uma constante característica do sistema ($k = 1,35 \cdot 10^{-11}$ m/Da para o sistema PDMAM-co-PV/água). O peso molecular ponderal médio determinado a partir da cromatografia de permeação em gel é de 18 kDa. O raio de giração pode ser então calculado acusando o valor de 4,8 nm.

Para determinar o tempo de reptação das cadeias de PDMAM-co-VP, foi aplicada a equação⁷⁷

$$k_d = \frac{R_g}{\tau_r}, \quad (3)$$

sendo, R_g o raio de giração e τ_r o tempo de reptação do polímero.

O tempo de reptação obtido para o PDMAM-co-VP foi $\tau_r = 4,5 \cdot 10^{-2}$ s.

O coeficiente de reptação para o sistema estudado foi determinado através da equação⁷⁸:

$$D' = \frac{1}{6} \frac{R_g^2}{\tau_r}, \quad (4)$$

sendo, D' o coeficiente de reptação, R_g o raio de giração e τ_r o tempo de reptação ou tempo de dissolução.

O valor de D' encontrado foi $8,53 \cdot 10^{-17}$ m².s⁻¹.

E, finalmente conhecendo-se o tempo de reptação e o raio de giração para o copolímero estudado, a taxa de dissolução do PDMAM-co-VP aplicando-se foi obtida aplicando-se a expressão

$$k_d = \frac{R_g}{\tau_d}. \quad (5)$$

Os valores determinados para o raio de giração, para o coeficiente de difusão, para o tempo de reptação e para a taxa de desentrelaçamento do PDMAM-co-VP estão de acordo com a literatura e indicam que este copolímero pode ser aplicado em sistemas de liberação controlada rápida, ou seja, para aplicação em situações nas quais o princípio ativo seja rapidamente liberado, mas que o controle de liberação proporcionado por este sistema evite

doses acima do limite tóxico tolerado. E, portanto, os resultados obtidos são promissores para o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada por dissolução da matriz polimérica.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho pode-se concluir que:

- 1) O sistema PDMAm-co-VP pode ser preparado com diferentes porcentuais de hidrofiliicidade em função da composição de VP no copolímero;
- 2) A temperatura de transição vítrea foi dependente da composição do copolímero;
- 3) O copolímero obtido apresentou um peso molecular numérico médio de 16 kDa, perfeitamente dialisável pelos rins;
- 4) A fenomenologia do transporte de água na matriz PDMAm-co-VP indicou um mecanismo anômalo quando sob a luz da lei de Fick;
- 5) O estudo da liberação controlada da matriz de poli (dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) indicou taxa de liberação de crotoxina constante durante 42 minutos, governada pela dissolução da camada de gel. Dessa forma, o sistema PDMAm-co-VP/CT mostrou-se capaz de evitar que doses de crotoxina administradas sejam totalmente absorvidas em curto intervalo de tempo, sendo assim, se revelou um material promissor para aplicação em sistema de liberação controlada erodível;
- 6) Os parâmetros (da teoria da reptação) obtidos para o sistema PDMAm-co-VP foram $\tau_r = 4,5 \cdot 10^{-2}$ s (tempo de reptação); $R_g = 4,8$ nm (raio de giração); $k_d = 1,07 \cdot 10^{-7}$ m/s (taxa de desentrelaçamento) e $D' = 5,12 \cdot 10^{-16}$ m².s⁻¹. Estes valores estão de acordo com os resultados obtidos pela literatura;
- 7) A visão computacional demonstrou ser ferramenta útil para análise de sistemas de liberação controlada de fármacos do tipo erodível. Neste caso o tempo de dissolução pode ser observado em tempo real.

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A evolução dos casos de câncer no mundo forma um quadro cada vez mais sombrio. De acordo com projeções divulgadas pela Sociedade do Câncer dos Estados Unidos e pela União Internacional contra o Câncer, com apoio da Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 1 bilhão de pessoas perderão suas vidas por motivo de câncer neste século. É fato conhecido que as infecções são responsáveis por 1,9 milhão de casos anuais de câncer, ou equivalente a 18% de todos os diagnósticos. Ressalta-se que o agente mais perigoso é a bactéria *Helicobacter pylori*, que causa 5,6% de todos os tipos de câncer, resume o relatório da OMS.

Mas, não é somente a evolução do câncer no mundo que é preocupante. A farmoquímica traz à luz novos medicamentos que geram esperança para milhões de pacientes com novas técnicas de tratar a doença através do bloqueio dos vasos sanguíneos que irrigam tumores a exemplo de inúmeros medicamentos existentes no mercado tais como o Avastin, Erbitux, Herceptin, Rituxan, Tarceva, entre outros. Entretanto, é fato também conhecido que os tratamentos quimioterápicos do câncer são todos muito caros, chegando muitas vezes a custar cerca de U\$ 90 por dia ou U\$ 31 mil por ano.

Economistas especializados em sistemas de saúde dizem que a elevação dos custos dos novos tratamentos para o câncer e de outros medicamentos colocarão questões difíceis para médicos e autoridades num futuro não muito distante.

Para as companhias farmacêuticas há muitos fatores envolvidos no preço de seus medicamentos, entre eles o alto custo da pesquisa e desenvolvimento, os processos de fabricação complexos e caros, e o valor que os remédios oferecem aos pacientes. Mas, é fato conhecido também que existe um exagero considerável por parte destas indústrias quando expõem seus investimentos milionários para o desenvolvimento de novos fármacos. Boa parte do investimento que declaram é marketing para justificar os preços absurdos de seus produtos quando estes chegam ao mercado nacional.

O Brasil, oitava economia mundial, com 8 511 864 km² de extensão e com a maior reserva de oxigênio do mundo, tem segundo o censo de 2001, 170 milhões de habitantes, dos quais 32% vivem abaixo da linha de pobreza. Neste sentido, o desenvolvimento de fármacos economicamente acessíveis à população de baixa renda de nosso país deve se tornar uma premissa fundamental de nossas universidades e institutos de pesquisa. Temos pesquisadores competentes e institutos de pesquisas/universidades avançadas com uma vantagem significativamente competitiva relativamente a outras áreas do mundo, que é a nossa biodiversidade.

A crotoxina, uma toxina produzida por serpentes, parece despontar como uma molécula promissora no tratamento do câncer. Mas, como qualquer quimioterápico possui uma toxicidade considerável para o ser humano.

A utilização de polímeros biocompatíveis como transportadores de princípios bioativos para o projeto de sistemas de liberação controlada de fármacos pode contribuir significativamente para diminuir toxicidade de agentes antitumorais, uma vez que estes compostos são na sua maioria, desprovidos de seletividade.

Os elevados custos dos quimioterápicos impostos pelas indústrias farmacêuticas que excluem a população de baixa renda de nosso país é um desafio que deve ser vencido. Neste trabalho utilizamos o copolímero PDMAm-co-VP como transportador da crotoxina, uma toxina de serpentes com atividade antitumoral. Aliado à bioquímica, a química de materiais pode ser um importante aliado no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos de menor toxicidade para o ser humano.

Espera-se que esta dissertação forneça as ferramentas iniciais para o desenvolvimento de sistemas simples e versáteis quanto ao seu tipo de aplicação na área oncológica. O escopo do presente trabalho e, obviamente, também o binômio tempo/instrumentação nos priva de respostas a um conjunto de perguntas que surgiram após as respectivas análises dos resultados obtidos e que apresentamos aqui como as perspectivas ou sugestões para trabalhos futuros:

- 1) Utilizar as possíveis interações entre o copolímero PDMAm-co-VP e a proteína SK utilizando o dicróismo circular e a espectroscopia vibracional;

- 2) Analisar o mecanismo de transporte da crotoxina através da ressonância magnética nuclear de imagem para uma melhor compreensão da formação da camada de gel;
- 3) Medir experimentalmente o raio de giração do copolímero PDMAm-co-VP por técnicas de espalhamento de nêutrons;
- 4) Estudar a genotoxicidade do bioconjugado PDMAm-co-VP/CT;
- 5) Analisar a bioatividade do bioconjugado por técnicas *in-vitro* e *in vivo*.

Cada sugestão futura proposta acima tem como objetivo responder a perguntas altamente específicas e, cujas respostas contribuirão fortemente para o total domínio da tecnologia de síntese de macromoléculas sintéticas transportadoras de compostos bioativos. Acreditamos que as perguntas merecem respostas não somente para a satisfação intelectual, mas procurando também contribuir para que nossas universidades depositem seus “olhares” sobre àqueles que são nossa mais nobre motivação de existência acadêmica: os EXCLUÍDOS de nossa sociedade.

REFERÊNCIAS

- [1] CHANG, T.M.S. Artificial cells with emphasis on bioencapsulation in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, v. 1, p. 267–295, 1995.
- [2] CHANG, T.M. al., Biomedical Applications of Artificial. *Biomedic Engineering*, v. 8, n. 8, p. 334-339, 1973.
- [3] Heller J, "Controlled Drug Release from Poly(ortho esters) - A Surface Eroding Polymer", *J. Controlled Release*, v. 2, p. 167–177, 1985.
- [4] BENITA, S. (ed), *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, New York, Marcel Dekker, 1996.
- [5] DOMB, A.J. (ed), *Polymeric Site-Specific Pharmacotherapy*, Chichester, UK, Wiley, 1994.
- [6] VERT, M.; LI, S.; Garreau, H. "More About the Degradation of LA/GA-derived Matrices in Aqueous Media," *Journal of Controlled Release*, v. 16, p. 15–26, 1991.
- [7] VARANDA A.V.; GIANINI M.J.S.M. Bioquímica de Venenos de Serpentes. In: VARANDA A.V.; GIANINI M.J.S.M. *Venenos animais. Uma visão integrada*. Rio de Janeiro, Editora de Publicações científicas Ltda 1994, v. 14, p. 205-219.
- [8] MARQUES M.A.; CUPO P.; HERING S.E. Acidente Crotálico. In: SCHVARTSMAN S. *Plantas venenosas e animais peçonhentos*, Savier Editora de Livros Médicos Ltda, São Paulo, 1992, P. 161-163.
- [9] ABE, T.; ALEMÃ, S.; MILDERRI, R. Isolate and characterization of presynaptically acting neurotoxin from the venom of Bungarus snakes. *Europe Journa of Biochemistry*, v. 80, p. 1-12, 1977.
- [10] AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS R.V.; KRUGGEL, W.G. A complete aminacid sequence for the basic subunit of crotoxin. *Archives of Biochemistry and Biphysics*, v. 249: p. 296-300, 1986.
- [11] AIRD, S.D.; KAISER, I.I.; LEWIS R.V.; KRUGGEL, W.G. Rattlesnake presynaptic neurotoxins primary structure evolutionary origin of the acidic subunit. *Biochemistry*, v. 24, p. 7054-7058, 1985.

- [12] STOCKER, K.F.(Ed) (1990) *Medical use of snake venom proteins*. CRC Press. Boca Raton.
- [13] HARVEY, A. L. Cardiotoxins from cobra venoms: Possible mechanism of action. *Journal of Toxinology and Toxicology Review*. v. 4,p. 41-69, 1985.
- [14] VERHEIJI, H.M.; Slotboom, A.J.; De Hass, G. H. B Structure and function of phospholipase A2. *Rev. Physiology Biochemistry Pharmacology*. V. 91, p. 91-203, 1981.
- [15] VAN DEENEN, L.L.M.; De Haas, G.H. The substrate specificity of phospholipase A2 *Biochimical Biophysics Acta*, V. 70, p. 538-553, 1963.
- [16] KINI, R.M., Evans, H.S. A model to explain the pharmacological effects of snake Venom phospholipases A2. *Toxicon*, v. 27, p. 613-635, 1989.
- [17] OWNBY, C.L.; SELISTRE A., H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*, v. 37, p. 411-445, 1999.
- [18] RUDD, C.J.; VISKATIS, L.J.; VIDAL, J.C.; ETCHEVENY, M.A. In Vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumor and a normal human keratinocyte cell lines *Invest. New Drugs*, v. 12, p. 183-184, 1994.
- [19] Newman, R.A.; Vidal, J.C.; Viskatis, L.J.; Johnson, J.I.; Etcheverry. VRCTC-310, a novel compound of purified animal toxin separates antitumor efficacy from neurotoxicity. *Investigate New Drugs*, v. 11, p. 151-159, 1993.
- [20] USPTO 5,164,196; "Crotoxin complex as cytotoxic agent", Inventors: GJH Plata, ACosta, CM Vidal and JC Vidal, *Assignee Ventech Research Inc.*, Issued in November 1992.
- [21] USPTO 5,232,911; "Mixture of a non-covalent heterodimer complex and a basic amphiphatic peptide as a cytotoxic agent", Inventor: JC Vidal, Assignee: Ventech Research Inc. Issued in 1993.
- [22] MSCARENHAS, Y.P.; STOUTEN, P.F.W.; BELTRAN, J. R.; LAURE, C.J.; VRIEND, G. Structure-funtion relationship for the highly toxic crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*. *Europe Biphysics Journal*, v. 21, p. 199-205, 1992.
- [23] CURA, J. E.; BLANZACO, P. D.; CURA, M. A.; DINÁPOLI, H. A.; DE ROOT, A. R.; VIDAL, J. C. (1999). Pharmacokinetics of crotoxin in human patients. *Clinical Cancer Research*, V. 8, p. 1033-1041, 2002
- [24] DE QUEIROZ A.A.A.; GALLARDO M.A.; RÓMAN, J.S., Vinyl-N,N'-dimethylacrylamide water-soluble copolymers: synthesis, physical-chemical prporties and proteic interactions, *Biomaterials*, v. 21, p. 1631-1643, 2000.
- [25] NARASIMHAN, B.; PEPPAS, N.A. Molecular analysis of drug delivery systems controlled by dissolution of the polymer carrier. *Journal of Pharmaceutical Sciences.*,

- New York, v. 86, n. 3, p. 297-304, 1997.
- [26] MANO, E.B. *Introdução a Polímeros*, São Paulo, SP, 1972, Edgard Blucher, 1998
- [27] CALISTER W.D., “Características, Aplicações, e o Processamento dos Polímeros”. In: CALISTER W.D. *CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS: UMA INTRODUÇÃO*, Rio de Janeiro, RJ, Ed. LTC, 2002, p. 315-331.
- [28] Fruton, J.S. Early theories of protein structure. *Annual. N.Y. Academic Science.*, v. 325, p. 1-18, 1979.
- [29] DE GENNES, P.G., *Journal Chemical Physics*, v.55, p.572,1971.
- [30] LODGE, T.P., ROTSTEIN, N.A., PRAGER, S. *Advances Chemical Physics LXXIX*, ed.: Prigogine and Rice, Wiley 1990.
- [31] MARTINS J.A., *Conformações de cadeias em polímeros*, Ciência de Polímeros I, Departamento de Engenharia de Polímeros, Universidade do Minho – 2003/2004.
- [32] YUBERO L.A.M., *Simulación Numérica de Propiedades Conformacionales y Estructuras Ordenadas en Sistemas Poliméricos*, 1997, Tese (doutorado) - Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Física, Universidad Complutense de Madrid, Espanha.
- [33] OGSTON A. G., The spaces in a uniform random suspension of fibres. *Trans. Faraday Society.*, v. 54, p. 1754 1958.
- [34] OGSTON A. G., On the interaction of solute molecules with porous networks. *Journal of Physics and Chemistry*. v. 74, dp. 668, 1970.
- [35] FLORY P.J., *Principles of Polymer Chemistry*, Cornell University, New York, 1953.
- [36] BUMAN, R.P., *Introdução ao equilíbrio termodinâmico*; traduzido por : Eurico C. F. e Cecchini, R.G. Dgar Blücher, 1972.
- [37] SANTOS E. M., Determinação do Parâmetro de Solubilidade de Poliuretanos de PBLH. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 10, n. 2, p. 64-69, 2000.
- [38] STROBL G.R., *Chapetr 6 “The Physics of Polymers”*, 2’nd Ed. Springer, NY, 1997.
- [39] SALINAS S. R. A., Einstein e a teoria do movimento browniano. *Revista Brasileira do Ensino de Física*, v. 27, n.2, 263-269, 2005
- [40]. PHILIBERT, J., “Las equations de La diffusion”. In: *Difusão de materiais*, vol. 1, 9-16, 1996, Editora REM, Ouro Preto MG.
- [41] VALDIR T.S., *Utilização de polímeros hidrofílicos em processos biotecnológicos*,

Dissertação (Mestrado), 2003, Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais.

- [42] T RIBELA, M.T.C.P.; BIANCO, A.C., BARTOLINI, P., The use of recombinant human thyrotropin produced by Chinese Hamster Ovary Cells for the preparation of immunoassay reagents, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:249-256, 1996.
- [43] KLEIN, I. Ressonância Nuclear Magnética em Químicas, Departamento de Química Geral e Inorgânica, Instituto de Química de Araraquara – UNESP, 1987, disponível em <http://inorgan221.iq.unesp.br/quimgeral/nmr87/rmn87.htm>. Acesso em setembro de 2006.
- [44] Separação de Compostos por Cromatografia disponível em <http://members.tripod.com/alkimia/cromatografia.htm>. Acesso em setembro de 2006.
- [45]. SDNEI, B. A. VISART – *Visão artificial para uso industrial: Um sistema abrangente*, 1992. Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, São Paulo.
- [46] ELIAS H.G. *Macromolecules*. New York, Wiley Interscience, 1973.
- [47] Ham G.H. *Vinyl polymerization*. New York, Dekker, 1967.
- [48] BRANDRUP J., IMMAGUT E.H. *Polymer Handbook*. New York, Wiley Interscience, 975 2ª Ed.
- [49] KELEN, T.; TUDOS, F. Analysis of the linear methods for determining copolymerization reactivity ratios. A new improved linear graphic method. *Journal Macromolecules Science Chemistry*. V. A9, p. 1-27, 1975.
- [50] TUDOS, F. KELEN, F.; Turcsanyi, B.; KENNEDY, J.P. Analysis of the linear methods for determining copolymerization reactivity ratios. VI VI. A comprehensive reexamination oxonium íon copolymerizations. *Journal of Polymer Chemistry*, v.12, p. 1119-1132, 1981.
- [51] TUDOS F.; KELEN T; .TURCSANYI, B.; Confidence intervals for polymerization reactivity ratios determined by Kelen Tüdös method. *Polymers Bull*, v. 2, p. 71-76, 1980.
- [52]. SINGH, P.; SAWHNEY, H.K.; Studies on copolymerization of acrylamide and N-vinylpyrrolidone. *JMS Pure Appl Chem* 1994; A31(5):613-27.
- [53] NOGUCHI, H. *Macromolecules Rapid Communication*, v. 3, p.185, 1992.
- [54] PEPPAS, N.A. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. Boca Raton (EUA), CRC Press, 1987.

- [55] OKSANEN C., ZOGRAFI G. Molecular mobility in mixtures of absorbed water and solid poly(vinylpyrrolidone). *Pharm Res*, v. 10, n. 6, p. 791-799, 1999.
- [56] FRISH H.L. Sorption and transport in glassy polymers-a review. *Polymer Engineer Science*, p. 20, n. 1, p. 2-13, 1980.
- [57] ROWLAND S.P. *Water in polymers*. Washington, DC:ACS, 1980.
- [58] ARVANITOYANNIS I.; BIANSHARD M.V. Anionic copolymers of octanelactam with lauro lactam (nylon 8/12 copolymers). VII. Study of diffusion and permeation of gases in undrawn and uniaxially drawn (conditioned at different relative humidities) polyamide films. *Journal of Applied Polymers Science*, v. 47, p. 51-59, 1993.
- [59] EWALINSKI B.J.; EYRING, H.; REESCE, C.E. Diffusion and membrane permeability. *Journal of Physics Colloids Chemistry*, v. 53, p. 1426-1451, 1949.
- [60] VAN KREVLIN D.W. *Properties of polymers their correlations with chemical structure: their numerical estimation and prediction from additive group contributions*. New York: Elsevier, 1990.
- [61] DE QUEIROZ, A.A.A.; BRRAK, E.R.; DE CASTRO, S.C. Thermodynamic analysis of the Surface of biomaterials. *Journal of Molecular Structures (Theochemical)*, v. 394, p. 271-279, 1997.
- [62] BETTINI, R.; COLOMBO, P.; MASSIMO, G.; SANTI, P.; CATELLANI, P.L.; PEPPAS, N.A. Moving fronts and drug release from hydrophilic matrices. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS. 21.,7 Nice, France, 1994. *Proceedings*. Deerfield: Controlled Release Society, 1994. v. 21, p. 19-20
- [63] BETTINI, R., COLOMBO, P., PEPPAS, N.A. Drug concentration profiles during release from hydrophilic matrices. INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS. 24., Stockholm, Sweden, 1997. *Proceedings*. Deerfield: Controlled Release Society, 1997. v. 24, p. 635-636.
- [64] BETTINI, R., PEPPAS, N.A., COLOMBO, P. Polymer relaxation in swellable matrices contributes to drug release". INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CONTROLLED RELEASE OF BIOACTIVE MATERIALS. 25., Las Vegas, Nevada, USA, 1998.
- [65] BURI, P. Définition et classification des systèmes matriciels. *S. T. P. Pharma.*, v. 3, p. 193-199, 1987.
- [66] COLOMBO, BETTINI R., PEPPAS N.A. observation of swelling process and diffusion front during swelling in hydroxyl propyl methylcellulose matrices containing a soluble drug *Journal of Controlled Release*, v. 61, n. 1-2, p. 83-81,1999.

- [67] RANJA RAO, K.V., Devi K.P. Swelling Controlled Release Systems: recent development and application. Int. *Journal of Pharmacy Science*, v. 48, n. 1-3, p. 3, 1988.
- [68] BURI, P.; DOELKER, E. Formulation des comprimés à libération prolongée II. Matrices hydrophiles. *Pharm. Acta Helv.*, Amsterdam, v. 55, n. 7-8, p. 189-197, 1980.
- [69] COLOMBO, P.; BETTINI, R.; MASSIMO, G.; CATELLANI, P.L.; SANTI, P.; EPPAS, N.A. Drug diffusion front movement is important in drug release control from swellable matrix tablets. *J. Pharm. Sci.*, New York, v. 84, n. 8, p. 991-997, 1995.
- [70] ANTONSEN, K.P.; GOMBOTZ, W.R.; HOFFMAN, A.S. Attempts to stabilize a monoclonal antibody with water soluble synthetic polymers of varying hydrophobicity. *Journal of Biomaterials Science: Polymers*, v. 6, n. 1, p. 55-65, 1994.
- [71] PORATH, J. Exploration in to the field of charge-transfer adsorption. *Journal of Chromatography*, v. 159, p. 13-24, 1978.
- [72] JENNISSSEN, H.P.; Demiroglou A.; Base-atom recondition in protein adsorption to alkyl agaroses. *Journal of chromatography*, v. 597, p.93-100, 1992.
- [73] KIMERITICI, M.; GOK, E.; ATES S. Protein adsorption behavior of ionogenic poly(HEMA) membranes: a fluorescence study. *Journal of Biomaterials Science: Polymer*, v. 6, n. 5, p. 425-433, 1994.
- [74] JENNISSSEN, H.P.; DEMIROLOU, A. Base-atom recondition im protein adsorption to alkyl agaroeses, *Journal of chromatography*, v. 597, p. 93-100, 1992.
- [75] KIREMITICI, M.; GOK, E.; ATES, S. Protein adsorption behavior of ionogenic poly(HEMA) membranes: a fluorescence study. *Journal of biomaterials Science: Polymer Ed*, v. 6, n. 5, p. 425-433, 1994.
- [76]. SUN, S.F. *Physical Chemistry of macromolecules*, New York, Jhon Wiley & Sons, 1994.
- [77]. NARASIMHAN, B.; PEPPAS N.A. On Importance of Chain Reptation in Models of Dissolution of Glassy Polymers, *Macromolecules*, v. 29, p. 3283 – 3291, 1996.
- [78]. NARASIMHAN B.; PEPPAS N.A. Disentanglement and Reptation During Dissolution of Rubbery Polymers: *Journal of Polymer Science: Part B: Polymer Physics*, v. 34, p. 947- 961, 1996.

TÓPICOS DE VISÃO COMPUTACIONAL

1 Introdução

Sistemas de visão computacional são de grande importância para muitas atividades industriais e científicas.

Pode-se caracterizar a complexidade das tarefas de um sistema de visão artificial, como o mostrado na Figura 1. Nesta figura, observa-se que o grau de complexidade das tarefas está relacionado às operações com imagens em cores, em níveis de cinza e em preto e branco (binárias), localizadas nos planos y, x e z, respectivamente⁴⁵.

Essencialmente, sistemas de visão artificial operam no plano $y = 0$, isto é, eles são limitados aos níveis de cinza e não podem lidar com imagens em cores. Tarefas de complexidades substanciais podem ser resolvidas com esses sistemas, contanto que a imagem visualizada possa ser limiarizada, resultando em uma imagem binária.

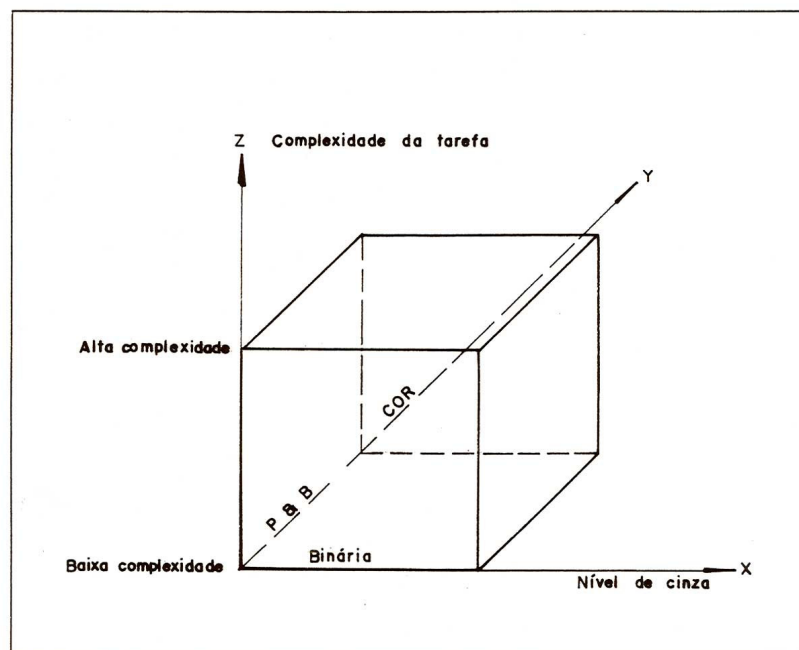


Figura 1 - Dimensões de um sistema de visão artificial⁴⁵.

Normalmente, a dificuldade em visão computacional está associada ao fato de que várias tarefas industriais e científicas não recaem sobre o eixo z e variações na reflexão da luz, de objeto para objeto, normalmente complicam a tarefa e a segmentação bem como a separação de objeto e fundo, geralmente, não é resolvida por simples limiarização.

Os olhos humanos formam imagem de um objeto, na qual as variações mínimas de cores são devidas às diferenças nos comprimentos de ondas, da luz refletida pelo objeto que atinge o sistema ótico do homem. Um sistema ótico de visão computacional forma uma imagem discreta, ou seja, cada comprimento de onda é interpretado como um número variando de 0 a 255, onde qualquer nuance será detectada e informada bit a bit. O programa específico transformará este código numérico em imagem, com cor pré-definida representada, pelo pixel (ponto unitário de formação da imagem na tela do monitor do computador). Cada pixel receberá um valor discreto e o conjunto de pixels da tela formará a imagem recebida da fonte.

1.2. Aquisição e processamento de imagens.

O sensor do sistema coleta a luz refletida, tipicamente através de lentes, e a converte em sinal elétrico usando alvo fotosensitivo. A imagem é então gerada como uma tela bidimensional, similar àquela formada pelas câmeras de televisão, ou como uma tabela unidimensional formada por operações de varredura na imagem, uma linha por vez.

As câmeras de estado sólido vêm se tornando muito populares em sistemas de visão artificial. Esses sensores são fabricados sobre chips de silício e contêm uma tabela unidimensional ou bidimensional, de pequenos elementos fotosensitivos de grande exatidão. Quando a luz passando através da lente, incide na tabela, cada detector converte a porção de luz que ele recebe em um sinal elétrico analógico. A imagem é então quebrada em pixels e armazenada como uma tabela de elementos individuais. Câmeras de estado sólido, normalmente, possuem uma área de visão de 512 x 512 pixels ou maior. Veja Figura 2.

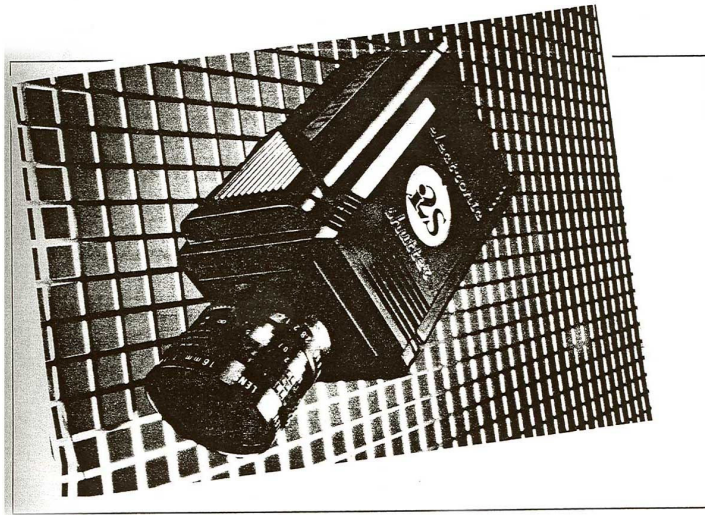


Figura 2 - Câmera de estado sólido de 512x512 pixels⁴⁵.

A escolha de um tipo de sensor de estado sólido e sua configuração para aplicação particular é influenciada pela resolução necessária, lentes utilizadas, iluminação e o custo.

As câmeras de estado sólido oferecem importantes vantagens: sua pequenez e robustez, suas superfícies fotosensitivas não se desgastam com o uso e devido a acuidade de seus fotodetectores, elas exibem poucas distorções na imagem.

O pré-processamento da imagem adquirida envolve as atividades de conversão digital, enjanelamento e restauração da imagem.

Uma câmera, tipicamente, forma de 30 a 60 imagens por segundo. Cada imagem capturada ou congelada, passa por um conversor analógico/digital que transforma os sinais analógicos em digitais, produzindo uma matriz de pixels, representando a distribuição de intensidade de luz sobre a área da imagem. A matriz de pixels é então armazenada na memória para análise e interpretação.

Quando o sistema trabalha com imagens binárias, cada nível de sinal é associado a um de dois valores (0,1). Isto é feito através da comparação de cada pixel com um limiar ou nível de cinza t . Esta conversão pode ser representada como:

$$b(x,y) = \begin{cases} 0 & : f(x,y) < t \\ 1 & : f(x,y) > t \end{cases}$$

Estes sistemas são especialmente voltados para aplicações de inspeção. Sistemas que trabalham com níveis de cinza convertem cada nível de sinal, usualmente, em até 256 níveis de cinza, e requerem técnicas bem elaboradas para a redução de quantidades de dados a ser processada, especialmente quando o sistema é usado nas operações de inspeção e manuseio.

No enjanelamento cria-se uma máscara eletrônica em torno de uma pequena área da imagem a ser estudada, permitindo-se a saída de apenas os pixels a serem analisados pelo computador. Esta técnica é útil em aplicações que requerem inspeções simples, nas quais a presença de uma característica particular deve ser verificada.

Quando a imagem recebe várias formas de degradação tais como, borrões, contraste pobre entre regiões ou a presença de ruídos de fundo, tenta-se restaurar a imagem. A degradação, normalmente, pode ser causada pela movimentação da câmera ou do objeto durante a formação da imagem, iluminação adequada e contraste inadequado da superfície do objeto. A restauração da imagem pode ser realizada, por exemplo, pela adição de quantidade constante de brilho a cada pixel, ou aumento de contraste relativo entre pixels de baixa e alta intensidade, tornando-os mais claros ou mais escuros ⁴⁵.

Os sistemas de visão computacional podem realizar outras operações de processamento tais como detecções de forma e compressão de dados. A detecção de forma é verificada nas regiões onde ocorrem grandes variações das intensidades dos sinais entre pixels, adjacentes. Assim sendo, é uma característica muito importante no processo de inspeção da imagem. A compressão é feita objetivando o armazenamento da imagem a ser utilizada nas operações de análise.

O propósito é obter o máximo de compressão sem perdas de informações relevantes, com redução significativa do volume de dados armazenados.

Uma imagem digital deve ser analisada, medindo e descrevendo as propriedades de muitas características que podem pertencer a toda imagem ou apenas a regiões da imagem. A análise da imagem é geralmente iniciada pelas características mais simples e continua com adição de características de processamento mais exaustivo, até que

a imagem seja claramente identificada. A análise depende do tipo de aplicação, mas medidas de posição e de orientação do objeto, propriedades geométricas e a distribuição de intensidade da luz sobre a sua face visível, podem ser fatores desta operação.

1.3. Métodos de análise de imagens

A análise de uma imagem é feita a partir da extração das características de sua forma e tamanho. Utilizando-se os descritores de forma e tamanho, adequados para reconhecimento e inspeção, já que são independentes da posição e da orientação do objeto no campo da visão. Para alguns propósitos, entretanto, é necessário determinar a posição e orientação de um objeto. Neste trabalho aos descritores a serem utilizados no processo de intumescimento e dissolução do bioconjugado CT/PDMAm-co-VP são a área (A) e o perímetro (P) ou a relação P^2/A (medida de compactação).

1.4. A segmentação de imagens

A segmentação de imagens, ou seja, a identificação de regiões homogêneas na imagem, tem sido objeto de consideráveis atividades de pesquisa nas últimas três décadas. Muitos algoritmos têm sido elaborados para imagens em escalas de cinza. Entretanto, o problema da segmentação em imagens coloridas, que carregam muito mais informação sobre objetos em cenas, tem recebido muito menor atenção da comunidade científica. Enquanto inúmeros levantamentos de técnicas para segmentação de imagens monocromáticas foram publicados, levantamentos similares para imagens coloridas não são encontrados facilmente na literatura.

As técnicas de segmentação podem ser divididas em técnicas de limiarização, técnicas de detecção de bordas, e técnicas de divisão de imagens em regiões.

As técnicas de limiarização são as mais populares na atividade de segmentação. Seja N o conjunto de números naturais, (x, y) as coordenadas espaciais de um ponto de imagem digitalizada e $G = \{0, 1, \dots, l-1\}$ o conjunto de inteiros positivos representando os níveis de cinza, sendo l função do número de bits utilizado para a representação de um pixel. Comumente, são utilizados 8 bits ($l = 2^8$). Logo, uma função de imagem pode ser definida como mapeamento $f : N \times N \rightarrow G$. O nível de cinza de um pixel com coordenada (x, y) é definido como $f(x, y)$. Seja t pertencente a G um limiar, $B = \{b_0, b_1\}$ um par binário de níveis de cinza e, b_0, b_1 , pertencentes a G . A limiarização de uma imagem $f(x, y)$, $x, y = 0, 1, \dots, N-1$, com base no nível de cinza t , é uma função $f_t : N \times N \rightarrow B$, tal que⁴⁵:

$$F_t(x, y) = \begin{cases} b_0, & \text{se } f(x, y) < t \\ b_1, & \text{se } f(x, y) > t \end{cases}$$

Em geral, o método de limiarização determina o valor t baseado em certos critérios. Se t é determinado tendo como base apenas o nível de cinza de cada pixel, então o método de limiarização é dependente do ponto. Se t é determinado de propriedades locais (por exemplo, distribuição de níveis de cinza local) na vizinhança de cada pixel, então o método de limiarização é dependente da região. Uma técnica de limiarização global é aquela que limiariza toda a imagem com um único valor de t , enquanto que a técnica de limiarização local particiona uma dada imagem em subimagens e determina um limiar para cada uma das subimagens.

Seja $h(g)$ o número de pixels com nível de cinza g . Então, o número de pixels em uma dada imagem é:

$$n = \sum_{g=0}^{l-1} h(g) \quad (1)$$

A probabilidade de ocorrência de um nível de cinza g é definida pela Equação (2). Também, por convenção, o nível de cinza 0 é preto e o nível de cinza l é branco.

$$p(g) = \frac{h(g)}{n} \quad (2)$$

A Figura 3 mostra o histograma de uma imagem $f(x, y)$, composta de objetos e fundo. Pixels de valor 1 (ou qualquer outro nível de intensidade conveniente) correspondem a objetos, enquanto que pixels de valor 0 correspondem a imagem de fundo.

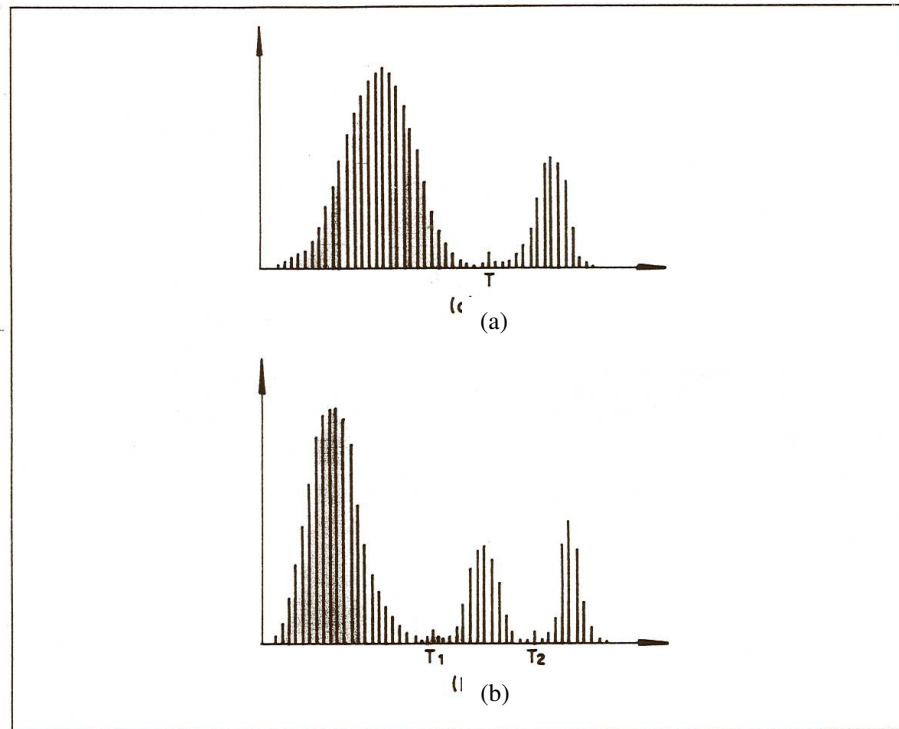


Figura 3. Histograma de intensidades que podem ser divididos em: um único limiar T (a); Múltiplos limiares (b) ⁴⁵.

Pode ser observada na Figura 3 (a) que o limiar T depende apenas de $f(x, y)$. Neste caso, o limiar é global. A Figura 3 (b) apresenta um exemplo de limiar dependente da região (local), uma vez que t depende de $f(x, y)$ e de propriedades locais da imagem.

Serão descritos nesta seção dois tipos de métodos de segmentação, métodos de segmentação de bordas e métodos de divisão de imagens por região que serão aplicados na análise do bioconjugado CT/DMAm-co-VP.

1.4.1. Método de Detecção de Bordas.

O método de detecção de bordas envolve técnicas de segmentação baseadas na detecção da descontinuidade. Uma borda é um local onde ocorre uma variação abrupta nos níveis de cinza. Duas razões são motivadoras deste enfoque: muitas das informações de imagens se situam nos limites entre diferentes regiões e, o sistema visual biológico pode detectar bordas, mas não pode distinguir o limiar de um objeto a partir do histograma da imagem.

Alguns pesquisadores classificam as técnicas de detecção de bordas em duas categorias, paralela e seqüencial. Uma solução paralela para o problema de detecção de

borda, implica em decidir se o conjunto de pontos está ou não sobre o contorno. Esta decisão é tomada considerando-se os níveis de cinza do conjunto e de algum conjunto de seus vizinhos; esta decisão não depende de outras, isto é, não é necessário verificar se outros conjuntos de pontos estão no contorno. Dessa forma, o operador de detecção de borda, em princípio, pode ser aplicado em qualquer lugar na imagem.

Na solução seqüencial para o problema de detecção de borda, o resultado da aplicação do operador em um ponto, é, eventualmente, dependente de resultados obtidos pela aplicação do operador em pixels anteriores. Observando-se que estas definições estão relacionadas a extração de pixels da borda. Para produzir os contornos de um objeto, os elementos extraídos da borda devem ser conectados para formar curvas fechadas.

Alguns algoritmos de varredura apresentam dificuldades para lidar com imagens, como a apresentada na Figura 4.

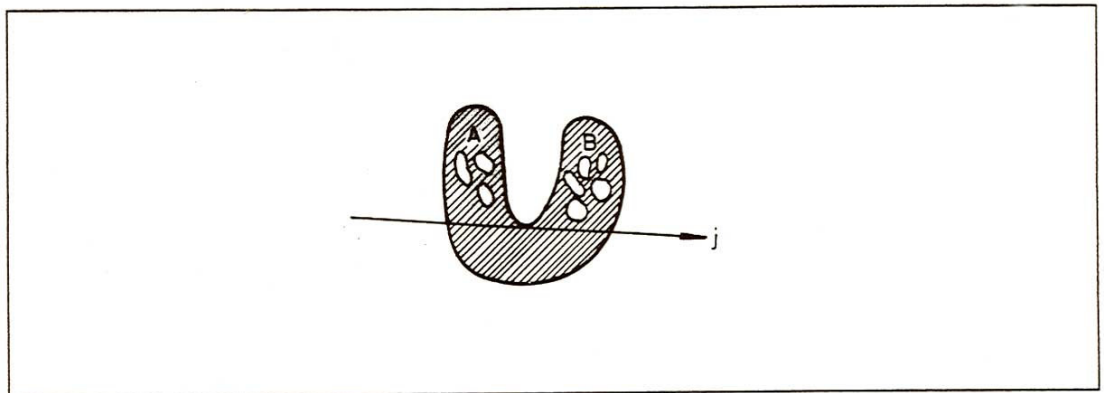


Figura 4 – Exemplo de um objeto problema⁴⁵.

Nas linhas anteriores à linha j , as regiões A e B devem ser tratadas como objetos separados, cada qual com um número de buracos. Quando se conclui que A e B são, de fato, o mesmo (objeto na linha j), A deve ser interligado com B. Os buracos nas regiões A e B devem agora fazer parte do mesmo objeto. O tempo para execução desta atividade é proporcional ao número de buracos. Isto significa que o tempo necessário não é independente da topologia da região.

Qualquer par de sucessivos pixels de transição sobre a mesma linha define um segmento, e as coordenadas (x, y) desses pontos são referidas como pixels da borda. Na Figura 5 os segmentos válidos são designados (x_1, x_2) , (x_3, x_4) , (x_5, x_6) , (x_7, x_8) , etc ... Os correspondentes pixels para o segmento (x_1, x_2) são (x_1, y_i) e (x_2, y_i) , para o segmento (x_3, x_4) são (x_3, y_{i+1}) e (x_4, y_{i+1}) , e assim por diante.

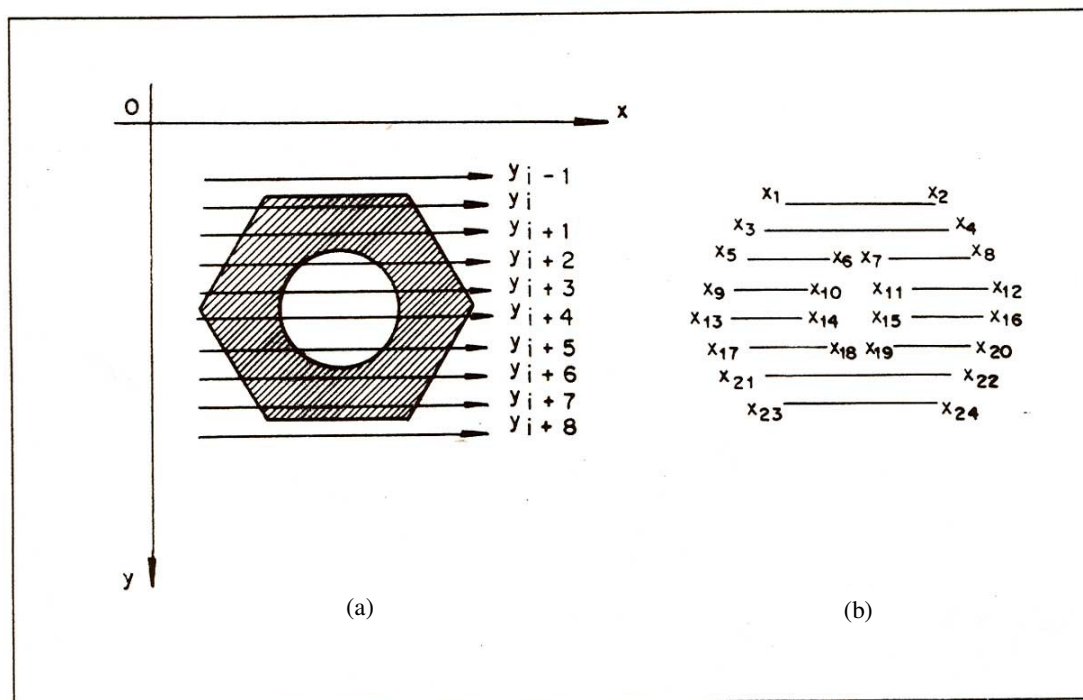


Figura 5. Aproximação de regiões por segmentos: (a) imagem original (b) segmentos

de aproximação⁴⁵.

Uma região do objeto é um conjunto de segmentos conectados. O contorno da região de um objeto, neste exemplo, é definido pela lista ordenada de pixels da borda (x_1, y_i) , (x_3, y_{i+1}) , ..., (x_2, y_i) . De maneira semelhante, o contorno da região de um buraco é (x_7, y_{i+2}) , (x_{11}, y_{i+3}) , ..., (x_6, y_{i+2}) . Estes pixels podem ser considerados como os vértices de um polígono de aproximação para uma região, e podem ser eliminados da lista de pixels da borda, sem perdas de informação da forma. O conjunto de pixels restante, tem sido designado como pixels vértices. Na prática, o conjunto de pixels vértices é menor que o número de pixels da borda. A Figura 6 apresenta o conjunto de pixels vértices.

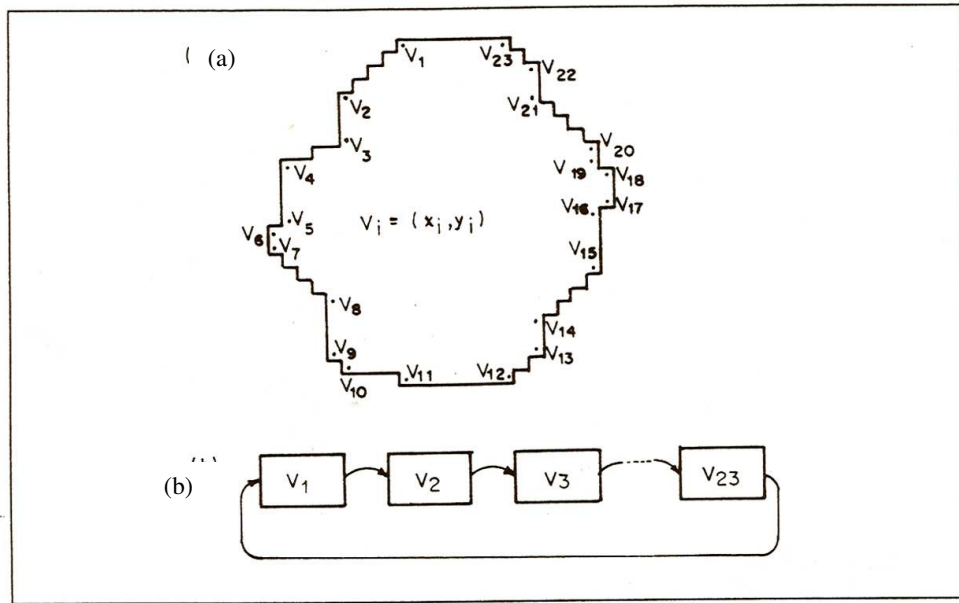


Figura 6 – Representação de pontos de uma região: (a) pixels dos vértices; (b) estrutura de dados⁴⁵.

O método de detecção de imagens binárias, denominado método de Zahn's para descrição de imagens, é baseado na identificação de pixels da borda entre um objeto e a respectiva imagem de fundo. Através de relacionamento aritmético simples, é determinada uma completa descrição dos contornos internos e externos de qualquer objeto. É utilizada uma janela de 2x3, conforme mostra a Figura 7.

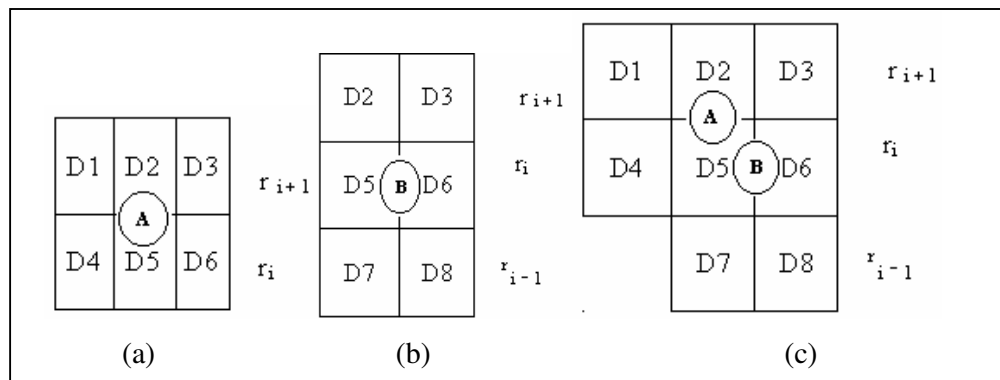


Figura 7 – Janelas de detecção de bordas; janela básica de 2x3 (a); janela rotacionada a 90° (b); composição de janelas (c)⁴⁵.

Para detecção das formas internas e externas dos objetos na imagem, cada pixel da borda é centrado na janela de 2x3. O pixel da borda de A ocupa a coordenada $(c_i, r_i + 0,5)$. Como as janelas (a) e (b) cobrem todas as possíveis direções, elas podem ser recombinadas em uma única janela, na forma apresentada na Figura 7 (c). A vantagem desse método é a de definir, de maneira única, os pixels da borda, simplificando o

processamento de detecção e determinando o tempo igual de processamento para todo pixel. A desvantagem é utilizar um bit extra para marcar a posição do pixel da borda que representa o valor 0,5.

6.1.2 – Métodos de divisão de Imagens em regiões.

Um outro caminho para fazer a segmentação de uma imagem, no lugar de encontrar os limites de uma região, é o de dividir a imagem em regiões. Todas as técnicas de extração de regiões processam a imagem de modo interativo e, geralmente, requerem tempo excessivo de processamento e muita memória. Dessa forma, elas não são consideradas no processo de segmentação.

Para concluir, pode ser afirmado que as técnicas de segmentação de imagens são fortemente dependentes das aplicações. Os critérios de escolha ou de concepção de uma dada técnica particular devem combinar um mínimo de complexidade com o máximo de eficiência.

Os algoritmos utilizados em métodos de análise de imagens ou métodos de extração de características descrevem as características de objetos da imagem em vetores de características da imagem. Tais vetores são repassados a um apropriado reconhecedor, que realiza a análise estatística ou sintática ou estrutural da relação entre padrões.

6.2 – Extração de características.

Várias características de objetos que podem ser usadas em visão artificial foram apresentadas nas Tabelas 2 e 3. Uma característica, no contexto de sistemas de visa, é um valor único que permite fácil comparação e fácil identificação.

Uma das principais dificuldades encontradas no processo de extração de característica, é que não se conhece o modelo matemático da forma da imagem capturada pelo sensor do sistema de visão. Dessa forma, a criatividade, os conhecimentos de estruturas de dados e de engenharia de software, e o uso de uma boa linguagem de programação, que permita manipular operações com bits, de forma eficiente, podem ser muito úteis nesta fase de desenvolvimento de projeto de sistemas de visão artificial.

6.2.1 – Relacionamentos fundamentais entre pixels.

Algumas definições propriedades básicas de relacionamento entre pixels são muito importantes.

6.2.1.1 – Vizinhos de um pixel.

Um ponto p em uma imagem digital $f(x,y)$ tem dois tipos de vizinhos, seus quatro vizinhos horizontais e verticais, chamados de vizinhos diretos (abreviados para $V_{d4}(p)$) e seus quatro vizinhos diagonais, chamados de vizinhos indiretos (abreviados para $V_{i4}(p)$). Ambos os tipos de vizinhos são chamados de vizinhança V_η de p ($V_\eta(p)$) onde $0 \leq \eta \leq 7$ é usado para indicar o pixel, cuja posição está marcada com $\eta=0, \dots, 7$ na Figura 8.

Se p está sobre a borda de $f(x,y)$, alguns de seus vizinhos podem não existir.

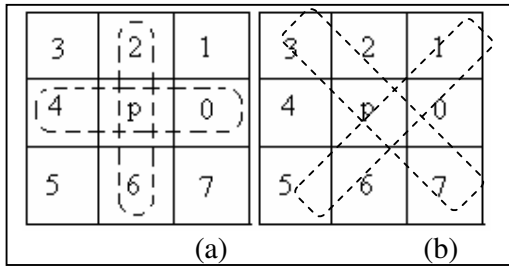


Figura 8 - Notação usada para definir a localização de pixels com relação ao pixel p : (a)

$V_{d4}(p)$; (b) $V_{i4}(p)$ ⁴⁵.

6.2.1.2 – Conectividade

Seja w um conjunto de valores de intensidades de pixels, os quais podem ser conectados. Considere três tipos de conectividade:

1- Conectividade-4: dois pixels p e q com valores em W são 4-conectados se q estiver no conjunto $V_{d4}(p)$;

2- Conectividade-8: dois pixels p e q com valores em W são 8-conectados se q estiver no conjunto da vizinhança-8 de p , indicada por ($V_8(p)$);

3- Conectividade- m (conectividade mista): dois conectores p e q com valores em W são m -conectados se:

a) q estiver na $V_{d4}(p)$, ou

b) p estiver na $V_{i4}(p)$ e o conjunto $V_{d4} \cap V_{d4}(q)$ é vazio.

É observado que a conectividade- m é uma modificação da conectividade-8 e que é introduzida para eliminar as conexões múltiplas, pois estas, algumas vezes causam dificuldade, quando a conectividade-8 é usada. A dificuldade citada é ilustrada na Figura 56.

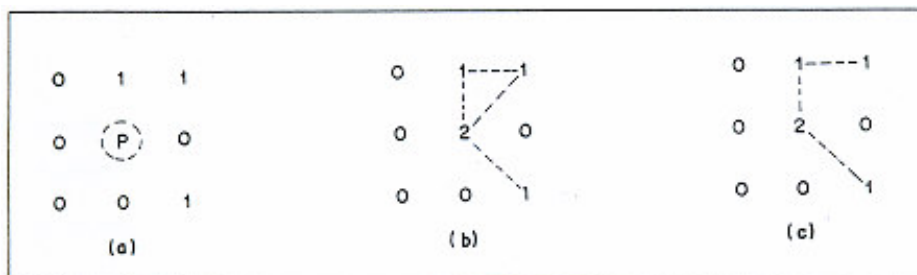


Figura 9 - Em (a): arranjo de pixels; (b) vizinhança₈ do pixel $p = 2$; (c) vizinhança _{m} do mesmo pixel⁴⁵.

A vizinhança $V = \{1,2\}$, a $V_8(p)$ para $p = 2$, é indicada pelas linhas tracejadas da Figura 9. É importante notar a ambigüidade que resulta de múltiplas conexões ao pixel p . Esta ambigüidade é removida pelo uso da conectividade- m como mostrado na Figura 2.8c.

6.2.1.3. Adjacência.

Um pixel p é adjacente do pixel q se eles são conectados. Pode ser definida adjacência-4,-8 ou $-m$, dependendo do tipo de adjacência usado. Dois subconjuntos das subimagens S_1 e S_2 são adjacentes se algum pixel em S_1 for adjacente a algum pixel em S_2 .

6.2.1.4. Caminho

Um caminho do pixel p com coordenadas (x,y) para o pixel q com coordenadas (s,t) , é uma seqüência de pixels distintos, com coordenadas $(x_0, y_0), (x_1, y_1), \dots, (x_n, y_n)$ onde $(x_0, y_0) = (x,y)$ e $(x_n, y_n) = (s,t)$, (x_i, y_i) é adjacente a (x_{i-1}, y_{i-1}) , $1 \leq i \leq n$ em n é o comprimento do caminho. É possível definir caminho-4, -8 ou $-m$, dependendo do tipo de adjacência usado. Se p e q são pixels de um subconjunto de imagens, então p é conectado a q em s , se existir um caminho de p para q consistido inteiramente de pixels em s . Para qualquer pixel p em s , o conjunto de pixels em s que são conectados a p , é chamado conjunto componente conectado a s . Pode-se concluir, portanto, que quaisquer dois pixels, de um conjunto componente conectado, estão ligados a outros pixels do conjunto e que conjuntos componentes conectados distintos são disjuntos.

6.2.1.5. Perímetro

O perímetro de uma região pode ser determinado pelo comprimento total de sua borda. O comprimento total de sua borda. O comprimento da borda, ou em geral, de uma curva digital qualquer, é obtido somando-se 1 para cada pixel na $V_{d4}(p)$ e $\sqrt{2}$ para cada pixel na diagonal, isto é, na $V_{i4}(p)$, conforme a Figura 10.

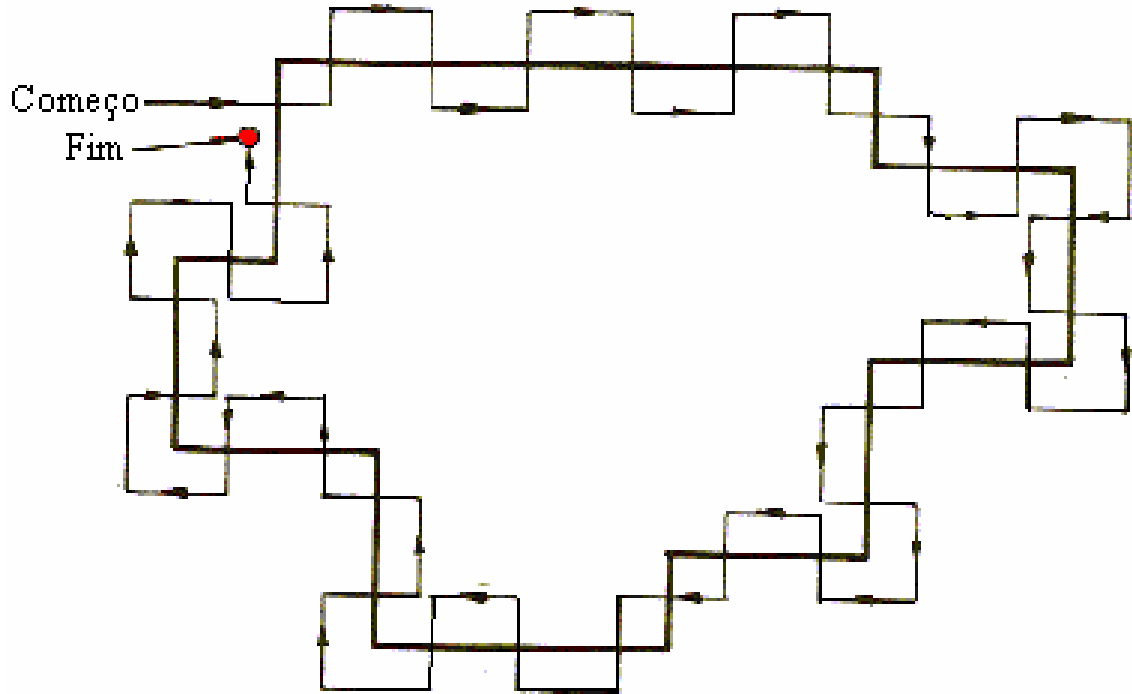


Figura 10 - Procedimento do rastreamento de contorno para a determinação do perímetro de um objeto⁴⁵.

6.2.1.6. Área

A área de um objeto pode ser determinada a partir da definição de momentos, ou pela contagem simples dos pixels da imagem do objeto ilustrada pela Figura 11.

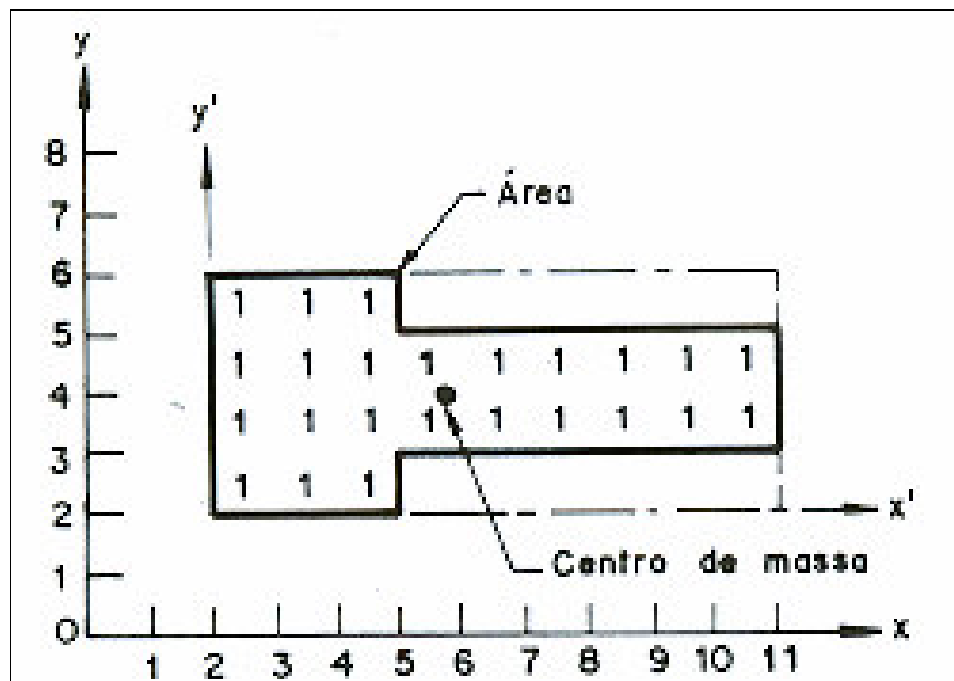


Figura 11 – Ilustração para exemplo do cálculo de área⁴⁵.

A utilização da visão computacional neste trabalho foi de importância, pois possibilitou a determinação em tempo real do tempo de dissolução do bioconjugado PDMAM-co-VP. Dessa forma, a visão computacional revelou-se como ferramenta de grande valor para este fim.