

**Universidade Federal de Itajubá
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Física e Química
Pós-graduação em Materiais para Engenharia**

**ESTUDO DO BIOCONJUGADO
CROTOXINA/POLI(N,N'-
DIMETILACRILAMIDA-CO-VINIL
PIRROLIDONA) SEGUNDO A TEORIA DA
REPTAÇÃO**

Rodrigo de Lima Nascimento

Dissertação apresentada como exigência parcial para obtenção do grau de mestre em Materiais para Engenharia à comissão Julgadora da Universidade Federal de Itajubá, sob a orientação do Professor Doutor Álvaro Antônio Alencar de Queiroz

Itajubá, Novembro de 2006

*À minha esposa, Giane de Moraes Lima Nascimento, por todos
momentos de amor e dedicação.*

*Aos meus pais, Wilson Martins do Nascimento e Célia de Lima
Nascimento, pelo carinho incondicional e pela credibilidade
depositada em mim.*

*Ao meu filho, Vinícius de Moraes Nascimento, por representar uma
fonte de inspiração para continuar a caminhada.*

Agradecimentos:

Ao professor Doutor Álvaro Antônio Alencar de Queiroz, pela orientação, ensinamentos e comprometimento com minha formação científica.

À doutora Maria Tereza C.P. Ribela do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo pela marcação e purificação da crotoxina.

À doutora Olga Zazuco Higa, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo pelos ensaios de citotoxicidade.

À doutora Maria Aparecida Pires Camillo pela proteína crotoxina.

Ao doutor Sdnei de Brito Alves pela utilização da visão computacional determinação do tempo de dissolução do bioconjugado.

Aos meus colegas de curso, especialmente Mayler Martins e Ronaldo Cravo da Silva pelo companherismo e colaborações.

Aos amigos que demonstraram solidariedade e incentivo.

Abstract

Recently, our laboratories have explored the synthesis of new materials to delivery of drugs specifically to cancerous tissues, for enhanced therapeutic efficacy and reduced systemic toxicity. In this work, the synthesis of poly(N,N'-dimethylacrylamide-co-N-Vinyl-2-pyrrolidone) copolymers (PDMAM-co-VP) loaded with crotoxin is described. Crotoxin have interesting antitumour property and so may be used in patients with advanced cancer. Our particular interest is the reduction of the neurotoxic effects of crotoxin by their entrapment in the bioerodible PDMAM-co-VP copolymer. In this work we report the study on the diffusion of a crotoxin from PDMAM-co-VP. A mathematical model was developed to describe the release of protein from the PDMAM-co-VP polymer according to the reptation model. Using the reptation model it is shown that the diffusion process measured by the diffusion coefficient, D , is dominated by the chain length, degree of polymerization, N , and the chain architecture. By considering the reptation motion of chain ends across the interface, it has been shown that the interfacial width increases with $t^{1/4}$. The second stage of chrotoxin interdiffusion occurs at times greater than t_r (reptation time) where the diffusion process is predicted to change to give an interfacial width that grows with a $t^{1/2}$ dependence, recovering the classical picture of Fickian diffusion. The experimental results suggested a sort of tuning of parameters that are related to the molecular properties of the polymer, and the drug, such as the polymer molecular weight, the water and the drug diffusion coefficient, the equilibrium volume fractions of the crotoxin, and the water-polymer interaction parameter, could result in sustained zero-order release system. Our study indicated that the PDMAM-co-VP copolymers confer stability to crotoxin, causing controlled release and reduction of the toxic effects of protein.

Resumo

Recentemente, nossos laboratórios têm explorado a síntese de novos materiais para liberação de drogas, especificamente para tecido, especialmente tecidos cancerosos, para melhorar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade do sistema. Neste trabalho, a síntese de copolímeros poli (N,N'-dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona) (PDMAm-co-VP) carregado com crotoxina é descrito. A crotoxina apresenta interessante propriedade anti-tumoral e também pode ser usada em pacientes com câncer avançado. Nós temos interesse na redução dos efeitos neurotóxicos da crotoxina através do seu aprisionamento no copolímero bioerodível PDMAm-co-PV. Um modelo matemático foi desenvolvido para descrever a liberação de proteína do polímero PDMAm-co-VP de acordo com o modelo de reptação. Dentro do modelo de reptação é mostrado que o processo de difusão medido pelo coeficiente de difusão, D , é dominado pelo comprimento da cadeia, pelo grau de polimerização, N , e pela arquitetura da cadeia. Considerando o movimento de reptação das extremidades da cadeia através da interface, tem sido mostrado que a espessura interfacial cresce com $t^{1/4}$. O segundo estágio da interdifusão da crotoxina ocorre para tempos maiores τ_r (tempo de reptação) sendo prevista uma modificação no processo de difusão onde a espessura interfacial cresce proporcionalmente a $t^{1/2}$, caracterizando a figura clássica da difusão Fickiana. Os resultados experimentais sugerem que a afinação apropriada de parâmetros seja relatada para as propriedades moleculares do polímero, os coeficientes de difusão da droga e da água, as frações de volume da crotoxina no equilíbrio e o parâmetro de interação entre a água e o polímero, poderia resultar em um sistema de liberação de ordem zero. Nossos estudos indicaram que os copolímeros PDMAm-co-VP conferem estabilidade para a crotoxina, causando liberação controlada e reduzindo os efeitos tóxicos da proteína.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

(FDA-EUA) - Food and Drug Administration – Estados Unidos da América

(PDMAm-co-VP) - poli (N,N' - dimetilacrilamida – co – vinilpirrolidona)

CT – Crotoxina

Hs87 T -carcioma ductal mamária de origem humana

Lu-1 - adenocarcioma pulmonar de origem humana

NSC - National Cancer Institute

PLA₂ – Fosfolipase A₂

¹H- RMN - ressonância magnética nuclear de hidrogênio

¹³C-RMN - ressonância magnética nuclear de carbono 13

RF – ondas de rádio

GPC – cromatografia de permeação em gel.

DRX – difratometria de raio X.

PLA₂ – Fosfolipase A₂

VP- Vinil pirrolidona

DMAm – Dimetilacrilamida

DMSO-D₆ – Dimetilsulfóxido

TMS - Tetrametil silano

PBS – Solução tampão fosfato salina

ÍNDICE DE SÍMBOLOS

\bar{M}_n - peso molecular numérico médio.

M_i - peso molecular de moléculas da classe i

n_i - número de moléculas da classe i .

\bar{M}_w - peso molecular ponderal médio.

\bar{M}_v - peso molecular viscosimétrico médio.

a - constante dependente do polímero

T_g - temperatura de transição vítrea

L - comprimento total de uma cadeia ideal

N - número de unidades méricas.

r - distância entre as extremidades da cadeia polimérica

l - comprimento das ligações entre unidades méricas.

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

$\langle r^2 \rangle$ - distância média quadrada entre extremidades de uma cadeia polimérica

r_i, r_j - distância entre duas unidades méricas.

θ - ângulo de limitação da rotação das ligações carbono-carbono.

φ - ângulo de povoado pela ligação entre unidades méricas dentro do cone de revolução.

r_{\perp} - projeção ortogonal da distância entre duas unidades méricas.

n - número de ligações entre unidades constituintes da cadeia polimérica

C_{∞} - razão característica da cadeia polimérica

XYZ - sistema de coordenadas.

$X'Y'Z'$ – sistema de coordenadas.

\bar{e} - vetor unitário em uma dada direção.

k_B - constante de Boltzman.

U - energia referente à posição ocupada pela unidade métrica.

$[u]$ - uma matriz dos pesos estatísticos

D - a matriz diagonal das matrizes de $[u]$

A^* e A - as matrizes usadas para o cálculo da média do produto de matrizes de uma cadeia infinita

R_g – raio de giração

$\langle S^2 \rangle$ - média de todas as conformações possíveis

V_{ex} – volume excluído.

L_l – comprimento de uma haste

G – energia livre de Gibbs

ϕ_1 - fração de volume do solvente

ϕ_2 - fração de volume do polímero

T – temperatura absoluta

S – entropia do sistema

χ - parâmetro de Flory

c – concentração do polímero

H – entalpia do sistema

Ω - o número de possíveis conformações que a cadeia polimérica pode assumir.

ΔG_m - variação da energia livre da mistura

ΔH_m - variação da entalpia da mistura.

ΔS_m - variação da entropia de mistura.

V_m - volume da mistura

V_1 - volume do solvente

V_2 - volume do polímero

ΔH_{solv} - entalpia de vaporização do solvente

ΔH_{vap2} - entalpia de vaporização do polímero

δ - parâmetro de solubilidade

R - constante ideal dos gases

$[\eta]$ - viscosidade intrínseca

ζ - coeficiente de fricção do meio

U_{ex} - potencial externo

s - distância da unidade métrica ao centro de massa da cadeia polimérica.

x - posição

t - tempo

$f(t)$ - soma das forças devido às colisões incessantes entre as unidades métricas e as pelas moléculas do fluido

$L_{m,n}$ - componentes da matriz de mobilidade

v_n - velocidade média da partícula

R_n - um vetor cujas componentes são as posições das esferas do polímero

H_{nm} - tensão de mobilidade

U_i - potencial de interação

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

η_s - viscosidade do solvente

\vec{T}_{ij} - vetor unitário na direção de r_{ij} denominado de tensor de Oseen

R_0 - comprimento do tubo de reptação

N_R - número de unidades de Rouse

l_0 - o comprimento das ligações entre as unidades de Rouse

a_{pr} - rigidez do caminho primitivo

l_{pr} - comprimento do caminho primitivo ao longo do contorno do tubo

D' - coeficiente de difusão para a cadeia dentro do tubo de reptação

ζ_p - fator de fricção para a cadeia polimérica

τ_d - tempo de difusão

τ_r - tempo de reptação

τ_{rel} - tempo de relaxação

v - velocidade média

J - fluxo de matéria

F - força motriz

D - coeficiente de difusão

R_1 - raio da esfera

R_2 - raio da esfera ou do cilindro.

N - grau de polimerização.

$f(t)$ - soma das forças devido às colisões incessantes

H_{nm} - tensão de mobilidade gerada pela interação entre as esferas e o solvente.

U_i - potencial de interação.

r_n - vetor cujas componentes são as posições das esferas do polímero.

k_d - taxa de desentrelaçamento das macromoléculas.

C – concentração.

μ - potencial químico.

M_m – mobilidade molecular.

M_t - massa de matéria difundida no tempo t .

M_∞ - massa de matéria difundida até o equilíbrio.

h – espessura da pastilha.

\bar{X}_n - grau de polimerização.

$PM_{(un)}$ - massa molar da unidade polimérica repetitiva.

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1** - O nível do fármaco no sangue em função do tempo para dosagem tradicional (a); e dosagem da liberação controlada de drogas (b). 3
- Figura 2** – Representação da atividade biológica da crotoxina. 8
- Figura 3** – Monômeros formadores do copolímero poli (VP-DMAm). 12
- Figura 4** – Esquema das configurações macromoleculares dos polímeros hidrofílicos durante o processo de dissolução do fármaco. 12
- Figura 5** – Representação do desentrelaçamento da cadeia polimérica. 13
- Figura 6** – Representação teórica da variação da espessura da camada gel em função do tempo de dissolução de um polímero hidrofílico. 13

Capítulo 2

- Figura 7** – Representação esquemática de uma cadeia linear de PDMAm. 16
- Figura 8** - Representação esquemática do polímero ramificado poli(L-lissina-ampifílico). 16
- Figura 9** – Esquema representativo de copolímero alternado (a), de copolímero em bloco (b), copolímero aleatório de polietileno e polipropileno (c) e copolímero de enxerto (d). 17
- Figura 10** – Representação de possíveis formas de configurações poliméricas, onde **R** representa um átomo ou grupo de átomos diferente do hidrogênio. 18
- Figura 11** – Configuração isotática (a) – sindiotática (b) – atática (c) (as esferas vermelhas representam os grupos laterais) 19
- Figura 12** – Representação esquemática de estrutura secundária de uma cadeia Polimérica 19
- Figura 13** – Estrutura terciária de cadeia polimérica. 20
- Figura 14** – Representação computacional de um novelo polimérico aleatório formado por cadeias polipeptídicas. 21
- Figura 15** - Representação da relação entre a viscosidade e o peso molecular de um polímero. 22

Capítulo 3

Figura 16 – Representação de uma cadeia de segmentos livres l_1, l_2, l_3 , representam o comprimento da ligação.	27
Figura 17 - Representação esquemática da distância entre extremidades de uma cadeia polimérica.	28
Figura 18 – Ângulo de limitação da rotação das ligações carbono-carbono.	29
Figura 19 - Projeção da ligação $i+1$ na direção da ligação i (sendo, $r \perp$ as projeções do vetor distância unidade monomérica em coordenadas ortogonais).	30
Figura 20 - Projeção das ligações $i+1$ e $i+2$ na direção da ligação i .	30
Figura 21 - Projeção das ligações $i+1, i+2$ e $i+3$ na direção de i .	31
Figura 22 - Posições permitidas dos monômeros para uma cadeia com rotações restringidas.	32
Figura 23 - Rotação do sistema XYZ de um ângulo θ' até coincidir com o sistema de coordenadas X'Y'Z'.	34
Figura 24 - Rotação do sistema X'Y'Z' de um ângulo ϕ .	34
Figura 25 – Representação do raio de giração de uma cadeia polimérica.	38
Figura 26 – Distância entre os elementos de massa e o centro de massa (s).	39
Figura 27 – Exclusão mútua de moléculas poliméricas e partículas esféricas.	41
Figura 28 - Representação esquemática de um polímero do novelo aleatório em bom solvente (a) e em mau solvente (b).	45
Figura 29 - Representação das possibilidades conformacionais de um soluto de baixo peso molecular (a) e de alto peso molecular (b)	47
Figura 30 – Relação entre a viscosidade e o parâmetro de solubilidade de polímeros.	49
 Capítulo 4	
Figura 31 – Modelo de uma cadeia formada por esferas ligadas por molas.	53
Figura 32 – Representação do movimento das cadeias poliméricas, segundo Zimm.	57

Figura 33 – Cadeias entrelaçadas, para a cadeia em azul será analisado seu movimento dentro do emaranhado de cadeias. **61**

Figura 34 – Representação do movimento de uma cadeia polimérica por reptação através do tubo de confinamento. **61**

Figura 35 – Representação do movimento da cadeia através do tubo de confinamento. **63**

Capítulo 5

Figura 36 – Difusão através de membranas permeáveis. **66**

Figura 37 - Ilustração do percurso de um líquido na membrana polimérica. **70**

Figura 38 - Ilustração do comportamento da membrana quando esta é atravessada por um líquido permeante. **72**

Figura 39 - Desenho esquemático do mecanismo de difusão “Fickiano” (A), anômalo (B) e não “Fickiano” (C). **77**

Capítulo 6

Figura 40 - O efeito de um campo magnético externo sobre o núcleo do hidrogênio. **81**

Figura 41- Separação dos níveis de energia de spin para um núcleo em função de um campo magnético externo (H_0). **82**

Figura 42 - Blindagem (H induzido) causada por elétrons circulando em torno do núcleo em plano perpendicular ao campo externo (H_0). **83**

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. **85**

Figura 44 - Fundamento da técnica de GPC. ⁸ **87**

Figura 45 - Equipamento para cromatografia de permeação em gel (GPC) Waters, modelo 510 utilizado neste trabalho. O equipamento pertence à Petroquímica União/ SP. **88**

Figura 46 – Primeira imagem da pastilha submersa em solução PBS a 37 °C. (A) e (B) representam, respectivamente, a pastilha e o suporte. **89**

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). **90**

Figura 48 – Dimensões de um pixel. **90**

Capítulo 7

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). **92**

Figura 50 - Estrutura química dos monômeros DMAm e VP. **93**

Figura 51 – O espectro ^1H – RMN (200 MHz) de PDMAm (a), PVP (b) e PDMAm-co-VP (c); $f_{VP} = f_{DMAm} = 1,05$. **97**

Figura 52 – Variação da composição do copolímero (f_{DMAm}) com a composição na alimentação (F_{DMAm}). **99**

Figura 53 – Relação entre a concentração em massa de Vp no PDMAm-co-VP e a taxa de absorção de água para este copolímero. **101**

Figura 54 - Relação entre a concentração em massa de Vp no PDMAm-co-VP e o coeficiente de difusão de água para este copolímero. **103**

Figura 55 – Energia de ativação para difusão de água em copolímeros PDMAm-co-VP com diferentes composições de VP. **104**

Figura 56 – Dependência das temperaturas de transição dos copolímeros PDMAm-co-VP em função da composição de VP. **106**

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). **107**

Figura 58 – Difratoograma de raio X (DRX) para o PDMAm-co-VP, apresentando picos de cristalinidade para 2θ entre 20° e 40° . **109**

- 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 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). **110**
- Figura 60** – Configurações macromoleculares de polímeros hidrofílicos durante o processo de dissolução do fármaco sistema matricial. Fase inicial (a), segunda fase (2) e fase final (3). **111**
- 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). **112**
- Figura 62** – Representação gráfica da variação da área em função do tempo. **113**
- Figura 63** – Fração de crotoxina liberada em função do tempo de dissolução do sistema. Amostra com concentração de $2,5 \cdot 10^{-3}$ µg de crotoxina por g de DPMAm-co-VP (a); Amostra com concentração de $1,5 \cdot 10^{-3}$ µg de crotoxina por g de DPMAm-co-VP(b). **116**
- Figura 64** – Mesomerismo na unidade mérica VP. **116**

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1- Atividade antitumoral da crotoxina comparativamente a quimioterápicos clássicos. Os resultados referem-se a resultados pré-clínicos <i>in vivo</i> em carcinoma de Lewis (Lewis lung Carcinoma)	9
--	----------

Capítulo 2

Tabela 2 – Valores típicos de polidispersividade para as macromoléculas sintéticas.	23
--	-----------

Capítulo 5

Tabela 3- Tabela de valores de seno de $(n\pi/2)$ obtidos de acordo com o gráfico da função seno.	73
--	-----------

Capítulo 6

Tabela 4 – Número quântico de spin para vários núcleos atômicos.	80
---	-----------

Tabela 5 – Propriedades finais de polímeros influenciadas por sua massa molecular.	86
---	-----------

Tabela 6 – Intervalos de tempo pré-determinados para a retirada das amostras da solução contendo bioconjugado.	88
---	-----------

Capítulo 7

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.	98
---	-----------

Tabela 8 - Valores dos dados de sorção de água n de copolímeros PDMAm-co-VP para diferentes temperaturas ($a_w = 0,97$).	102
---	------------

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A crotoxina	5
1.1.1. A estrutura da crotoxina	9
1.1.2. A viabilidade da aplicação da crotoxina em tratamentos de câncer	10
1.2. Poli (N,N' dimetilacrilamida-co-vinil pirrolidona)	11
1.3. Objetivos desta dissertação	14
2. O POLÍMERO E SUA ESTRUTURA MOLECULAR	15
2.1. Estrutura macromolecular	15
2.1.1. Estrutura primária	15
2.1.2. Configurações poliméricas (Taticidade)	18
2.1.3. Estruturas secundária, terciária e quaternária	19
2.2. Peso molecular de um polímero e polidispersão	21
3. CONFORMAÇÕES DE CADEIAS POLIMÉRICAS	25
3.1. Introdução	25
3.2. Cadeias deais	25
3.2.1. Cadeia de segmentos livres ou cadeia aleatória	26
3.2.2. Cadeias macromoleculares com rotações livres	29
3.2.3. Cadeias poliméricas com rotações restringidas	32
3.2.4. Modelo do estado isomérico rotacional	36
3.2.5. Raio de giração	38
3.3. Cadeias reais	39
3.3.1. Volume excluído	40
3.3.2. Teoria de Flory para polímeros em bons e maus solventes	43

4. DINÂMICA DE CADEIAS POLIMÉRICAS	52
4.1. Modelos de Rouse	52
4.2. Modelo de Zimm	56
4.3. Reptação em polímeros em solução: difusão e tempo de reptação	61
5. FENOMENOLOGIA DA DIFUSÃO EM MEMBRANAS DE HIDROGÉIS	65
5.1. Introdução.....	65
5.2. Determinação experimental do coeficiente de difusão	69
6. MATERIAIS E MÉTODOS	78
6.1. Crotoxina – Marcação com ¹²⁵ I – Controles de Pureza Química e Radioativa	78
6.2. Síntese do Copolímero PDMAM-co-VP	78
6.2.1. Caracterização Físico-Química do bioconjugado PDMAM-co-VP.....	79
6.2.1.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	79
6.2.1.2 Cromatografia de permeação em gel (GPC)	85
6.3. Preparo do bioconjugado.....	88
6.4. Estudo da liberação de crotoxina do bioconjugado CT/PDMAM-co-VP	88
6.5. Estudo do inchamento e análise da dissolução do bioconjugado CT/PDMAM-co-VP	89
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	91
7.1. Síntese e caracterização espectroscópica do copolímero PDMAM-co-VP	91
7.2. Processo de hidratação do copolímero PDMAM-co-VP.....	100
7.3. Estudo da liberação <i>In vitro</i> da crotoxina	114
7.4. Determinação dos parâmetros k_d , R_g , τ_r e D' para o sistema PDMAM-co-VP...117	
8. CONCLUSÕES	120

9. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	121
10. REFERÊNCIAS	124
APÊNDICE 1 – TÓPICOS DE VISÃO COMPUTACIONAL.....	130