



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SUELLEN CHRISTTINE DA COSTA SANCHES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA PRELIMINAR DO COPOLÍMERO SULFATO
DE CONDROITINA-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA USO
FARMACÊUTICO**

**BELÉM - PA
2013**

SUELLEN CHRISTTINE DA COSTA SANCHES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA PRELIMINAR DO COPOLÍMERO SULFATO
DE CONDROITINA-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA USO
FARMACÊUTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-Orientadora: Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa

BELÉM - PA
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Sanches, Suellen Christtine da Costa.

Caracterização físico-química e avaliação toxicológica preliminar do copolímero sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida para uso farmacêutico / Suellen Christtine da Costa Sanches ; orientador, Flávio de Vasconcelos, co-orientadora, Roseane Maria Ribeiro Costa. — 2013

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém, 2013.

1. Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida. 2. Nanotoxicologia. 3. Carreador de fármacos. 4. Análise Térmica 5. Células PC-12. I. Título.

CDD: 22. ed.: 615.7040724

FOLHA DE APROVAÇÃO

SUELLEN CHRISTTINE DA COSTA SANCHES

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRELIMINAR DO COPOLÍMERO SULFATO DE CONDROITINA-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA USO FARMACÊUTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-Orientadora: Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa

Aprovada em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos (Orientador)

Prof. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Junior

BELÉM - PA
2013

Aos meus pais, Álvaro e Dinair Sanches, pelo apoio, paciência, compreensão, dedicação incondicionais e essenciais para que pudesse superar todas as dificuldades e conseguir alcançar meus objetivos.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e guiar meus passos até este momento.

Ao meu orientador, Dr. Flávio de Vasconcelos e minha co-orientadora Dra. Roseane Costa pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste estudo.

A EMBRAPA Amazônia Oriental pela colaboração no estudo.

Aos pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) e Instituto Evandro Chagas (IEC) que me auxiliaram durante a etapa experimental.

Ao meu namorado, Amilton Gomes, pelo companheirismo e incentivo importantes para a realização deste estudo.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade e Toxicologia, especialmente Adriana Veiga, Ana Carolina Costa, Afonso Vasconcelos, Eliana Nascimento, Polyane Alencar, Raimundo Costa, Taylon Aguiar, Thiago Leite e Thiago Vilhena pelo apoio nas etapas experimentais do estudo, pela amizade sincera, pelos momentos de descontração essenciais para transpor os obstáculos vividos, principalmente durante o período de conclusão dos resultados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, conscientemente ou não para a finalização desta pesquisa.

Muito Obrigada.

“As pesquisas que fazemos são apenas uma gota de um imenso oceano ainda
inexplorado”
Carver

RESUMO

SANCHES, S.C.C. **Caracterização físico-química e avaliação toxicológica preliminar do copolímero sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida para uso farmacêutico**. 2013. 154 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, 2013.

A Indústria Farmacêutica utiliza polímeros em forma de nanopartículas em formulações de liberação controlada e vetorizada por possuírem baixo custo em relação a demais métodos de preparações de formas farmacêuticas, aparentemente não serem reconhecidos pelo sistema de defesa do organismo, proporcionar melhora da eficácia, diminuição da toxicidade e da dose de fármaco administrado. O sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida (SCM + NIPAAm) é um copolímero proposto para este fim, a partir da reação de um polímero sintético, o poli N-isopropilacrilamida (PNIPAAm), com características termossensíveis, com um natural, o Sulfato de Condroitina (SC), com características bioadesivas. Assim, a copolimerização pode ser capaz de somar estas propriedades e aperfeiçoar o seu uso como um veículo para liberação controlada. Este trabalho objetivou, portanto, realizar a caracterização físico-química das partículas de sulfato de condroitina e N-isopropilacrilamida e do copolímero SCM+NIPAAm (2,5 % e 5%) e do SCM+PNIPAAm 2,5% e uma avaliação toxicológica parcial de um destes copolímeros que apresentar as melhores propriedades de um eficiente carreador de fármacos, selecionado a partir dos ensaios de caracterização físico-química. Para determinar a estrutura química dos sistemas particulados e analisar os seus componentes químicos, foi realizada a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Para analisar a morfologia das partículas, foi usado a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); A Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada e Análise Térmica Diferencial (TG/DTG) foi usada para avaliar o comportamento térmico dos sistemas particulados, bem como auxiliar na análise de Cinética de Degradação (CD, método de Flynn-Wall-Ozawa); Foi ainda realizado a técnica de degradação *in vitro* e a determinação carga superficial e tamanho de partículas (análise do Potencial Zeta, PZ). Para avaliar a toxicidade, foi realizado o bioensaio em microcrustáceo *Artemia salina* (24 e 48 h), viabilidade celular (citotoxicidade) em células PC-12 (método do MTT) e também a toxicidade aguda oral em camundongos. As análises de RMN, FTIR e MEV demonstraram semelhança quanto ao aspecto estrutural e morfológico entre os copolímeros estudados. As análises de TG demonstraram que o SCM+NIPAAm 5% apresentou maior estabilidade térmica em relação aos demais copolímeros avaliados, uma vez que sua decomposição polimérica ocorre em temperaturas superiores, em torno de 233°C. O DTA demonstrou valores de temperaturas concordantes com os eventos térmicos de decomposição apresentados pelas curvas das análises TG. Sua estabilidade foi confirmada através da CD e estudo de degradação *in vitro*, apresentando, respectivamente, $E_a > 100 \text{ kJ mol}^{-1}$ e perda de 48% da sua massa inicial após três meses. Além disso, SCM+NIPAAm 5% apresentou diâmetro de partícula inferior a 200 nm e índice de polidispersão de 0,35, além do PZ $> -30\text{mV}$, características de um promissor candidato a carreador de fármacos. Em relação às avaliações toxicológicas, o SCM+NIPAAm 5% não apresentou toxicidade no bioensaio de *A. salina* ($CL_{50} > 1000$) e no modelo celular avaliado, dentro das concentrações e circunstâncias de exposição estudadas. O SCM+NIPAAm 5%, na dose oral de 2000 mg/kg, não apresentou nenhum sinal evidente de toxicidade em camundongos, o que foi corroborado pela ausência de alterações anatomo-histopatológicas. A copolimerização do Sulfato de Condroitina e N-isopropilacrilamida na concentração estudada, dada suas características físico-químicas e toxicológicas preliminares, apresenta propriedades que contribuem para a proposta de um sistema que constitui uma nova forma de liberação controlada, especialmente de fármacos.

Palavras-chave: Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida; Nanotoxicologia; Carreador de fármacos; Análise Térmica; Células PC-12.

ABSTRACT

SANCHES, S.C.C. **Physicochemical characterization and preliminary toxicological evaluation of the copolymer chondroitin sulfate-co-N-isopropylacrylamide for pharmaceutical purposes** 2013. 154 p. Dissertation (Master's Degree) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém/PA - Brazil, 2013.

The pharmaceutical industry uses polymers as nanoparticles in controlled release formulations and vector for having low cost compared to other methods of preparation of pharmaceutical dosage forms, apparently not being recognized by the body's defense system, provide improved efficacy, reduce toxicity and the dose of administered drug. The sulfate of chondroitin-co-N-isopropylacrylamide (SCM + NIPAAm) is a copolymer proposed for this purpose, from a synthetic polymer reaction, poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) with thermosensitive characteristics with a natural, Chondroitin sulfate (CS), with bioadhesive characteristics. Thus, the copolymerization may be able to add these properties and to improve its use as a vehicle for controlled-release. This study aimed to characterize physico-chemical of sulfate chondroitin particles and N-isopropylacrylamide and SCM+NIPAAm copolymer (2.5% and 5%) and SCM+PNIPAAm 2.5% and a partial toxicological evaluation of one of these copolymers presenting the best properties of an efficient carrier of drugs, selected from the trials of physic-chemical characterization. To determine the chemical structure of the particulate systems and analyze the chemical components, it was performed Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (RMN) and Infrared Fourier Transformed Spectroscopy (FTIR), to analyze the morphology of the particles, it was used Electron Microscopy (SEM), The Thermogravimetry and Differential Thermal Analysis (TG/DTA) was used to evaluate the thermal behavior of particulate systems, as well as assist in the analysis of kinetics of degradation (CD, Flynn-Wall-Ozawa method); it was also made in vitro degradation technique and surface charge determining and particles size (Zeta potential analysis, PZ). To evaluate the toxicity, it was performed bioassay in *Artemia salina* (24 and 48 hours), cell viability (cytotoxicity) on PC-12 cells (MTT method), and also acute oral toxicity in mice. The NMR, FTIR and SEM analysis showed similarity regarding the structural and morphologic aspects between the studied copolymers. TG analyzes showed that SCM+NIPAAm 5% showed higher thermal stability compared to the other copolymers evaluated, since its polymer decomposition occurs at temperatures above around 233 °C. DTA demonstrated temperature values consistent with decomposition thermal events provided by the curves of TG analysis. The stability was confirmed by CD and in vitro degradation study, presenting, respectively, $E_a > 100 \text{ kJ mol}^{-1}$ and 48% of its initial weight after three months. Furthermore, SCM+NIPAAm 5% presented particle diameter of less than 200 nm and polydispersity index of 0.35, and the $PZ > -30\text{mV}$, characteristics of a promising candidate as a drug carrier. Regarding toxicological evaluations, SCM+NIPAAm 5% did not show toxicity on bioassay *A. salina* ($LC_{50} > 1000$) and in the cellular model evaluated within the concentrations and circumstances of exposure studied. The SCM+NIPAAm 5%, in the oral dose of 2000 mg/kg, did not show any obvious sign of toxicity in mice, which was confirmed by the absence of anatomical and histopathological changes. The copolymerization of chondroitin sulfate and N-isopropylacrylamide in the studied concentration, given its physical-chemical characteristics and toxicological preliminary, presents properties that contribute to propose a system which is a new form of controlled release, especially drugs.

Keywords: Chondroitin Sulfate-co-N-isopropylacrylamide; Nanotoxicology; Drug Carriers; Thermal analysis; PC-12 Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo para formação de um polímero.....	18
Figura 2	Tipos de Copolímeros.....	19
Figura 3	Polimerização do Etileno.....	20
Figura 4	Propriedades poliméricas.....	21
Figura 5	Esquema ilustrativo da divisão das nanopartículas em nanocápsulas e nanoesferas.....	22
Figura 6	Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidosagem (a) e sistema de liberação controlada (b), sendo A a administração do fármaco	29
Figura 7	Sistemas de liberação de fármacos e polímeros que atuam nas diferentes regiões do trato gastrointestinal (TGI).....	34
Figura 8	a) Sistema de liberação tipo matricial; b) reservatório; e c) osmótico (oral).....	35
Figura 9	Estrutura química do Sulfato de Condroitina.....	39
Figura 10	Reações típicas do grupamento epóxi do metacrilato de glicidila.....	43
Figura 11	Esquema de polimerização do metacrilato de glicidila.....	43
Figura 12	a) Duas diferentes rotas de reação com o Metacrilato de Glicidila: abertura do anel epóxi e a transesterificação. b) Desenho estrutural da modificação química do Sulfato de Condroitina pelo metacrilato de Glicidila através abertura do anel epóxi e da transesterificação.....	44
Figura 13	Estrutura Química do NIPAAm.....	46
Figura 14	Estrutura Química do PNIPAAm.....	46
Figura 15	Representação esquemática da transição de fase para um polímero termossensível.....	46
Figura 16	Solução de um polímero termo-sensível antes (a) e depois (b) da LCST, respectivamente.....	47
Figura 17	Comportamento estímulo-resposta de microcápsulas transportadoras de fármacos, com polímero termossensível na estrutura da casca.....	49
Figura 18	Sulfato de Condroitina modificado pelo Metacrilato de Glicidila.....	80
Figura 19	Espectro de RMN ¹ H obtido de 30 mg do SCM em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b) e vinílico (c).....	81
Figura 20	Estrutura e Espectro de RMN ¹ H a partir de 30 mg do NIPAAm dissolvido em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b) e metínico (c).....	82
Figura 21	Estrutura química do Sulfato de Condroitina modificado (SCM) e Copolímero Sulfato de Condroitina modificado + N-isopropilacrilamida (SCM + NIPAAm).....	82
Figura 22	Espectro de RMN ¹ H obtido de 30 mg do copolímero SCM+NIPAAm 5% em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b), metílico (c), metilênico (d) e metínico (e).....	83
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H obtido de 30 mg do copolímero SCM+PNIPAAm 2,5% em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b), metílico (c), metilênico (d) e metínico (e).....	84

Figura 24	Espectro FTIR obtido de 1mg do SC modificado pelo GMA com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm ⁻¹ e faixa de 4000 a 400 cm ⁻¹	85
Figura 25	Espectro FTIR obtido de 1mg do NIPAAm com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm ⁻¹ e faixa de 4000 a 400 cm.....	86
Figura 26	Espectro FTIR obtido de 1 mg do SCM+NIPAAm 5% com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm ⁻¹ e faixa de 4000 a 400 cm ⁻¹	87
Figura 27	Espectro FTIR obtido de 1 mg do SCM+PNIPAAm 2,5% com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2cm ⁻¹ e faixa de 4000 a 400cm ⁻¹	88
Figura 28	Micrografias obtidas a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura do polímero SCM (a) com magnitude de 1000x e dos copolímeros SCM +NIPAAm 5% (b), SCM+NIPAAm 2,5% (c) e SCM+PNIPAAm 2,5% (d) com magnitude de 2000x.....	90
Figura 29	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra NIPAAm submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	92
Figura 30	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra NIPAAm submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	92
Figura 31	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	94
Figura 32	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	95
Figura 33	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	96
Figura 34	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	97
Figura 35	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	98
Figura 36	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	99
Figura 37	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+PNIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	101
Figura 38	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+PNIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5 ^o C, 10 ^o C e 20 ^o C/ min ⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N ₂).....	102
Figura 39	Logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura para os níveis de decomposição térmica em SCM+NIPAAm 5%.....	103
Figura 40	Resultado do estudo de degradação <i>in vitro</i> do copolímero SCM+NIPAAm 5%.....	106
Figura 41	Distribuição do tamanho médio de partículas do copolímero SCM+NIPAAm 5%.....	108
Figura 42	Efeito de diferentes concentrações do copolímero SCM+NIPAAm 5% na viabilidade de células PC12 incubadas por 24h a 37°C em DMEM. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Experimentos realizados em sextuplicata. *** Significativo para p< 0,0001 (em relação ao controle e demais concentrações do copolímero). ^{NS} Valores não significativos entre si ou comparados ao Controle.....	114
Figura 43	Efeito de diferentes concentrações do copolímero SCM+NIPAAm 5% na viabilidade de células PC12 incubadas por 48 h a 37°C em DMEM. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão. Experimentos realizados em sextuplicata. *** Significativo para p< 0,0001 (em relação ao controle e demais concentrações do copolímero). ^{NS} Valores não significativos entre si ou comparados ao Controle.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipo e Distribuição das Glicosaminoglicanas.....	37
Tabela 2	Descrição dos polímeros avaliados neste trabalho.....	68
Tabela 3	Eventos térmicos de TG obtidas do NIPAAm.....	91
Tabela 4	Eventos térmicos de DTA do NIPAAm.....	92
Tabela 5	Eventos térmicos de TG do SCM.....	94
Tabela 6	Eventos térmicos de DTA do SCM.....	95
Tabela 7	Eventos térmicos de TG do SCM+NIPAAm 5%.....	96
Tabela 8	Eventos térmicos de DTA do SCM+NIPAAm 5%.....	97
Tabela 9	Eventos térmicos de TG do SCM+NIPAAm 2,5%.....	98
Tabela 10	Eventos térmicos de DTA do SCM+NIPAAm 2,5%.....	99
Tabela 11	Eventos térmicos de TG do SCM+PNIPAAm 2,5%.....	100
Tabela 12	Eventos térmicos de DTA do SCM+PNIPAAm 2,5%.....	101
Tabela 13	Parâmetros cinéticos de decomposição térmica para SCM+NIPAAm 5%.....	104
Tabela 14	Resultados da toxicidade do SCM+NIPAAm 5% no bioensaio em <i>Artemia salina</i>	112
Tabela 15	Resultados da variação de massa corporal, consumo médio de ração e água por grupo em camundongos machos tratados com dose oral única do copolímero SCM + NIPAAm 5% (2000 mg/Kg) e observados durante 15 dias.....	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	- Fator pré-exponencial
ANOVA	- Análise de Variância
ATCC	- American Type Culture Collection
CL ₅₀	- Concentração Letal 50%
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DE ₅₀	- Dose efetiva 50%
DL ₅₀	- Dose letal 50%
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTA	- Análise térmica diferencial
Ea	- Energia de ativação
ECM	- Matriz extracelular da cartilagem
FTIR	- Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier
Gags	- Glicosaminoglicanas
GMA	- Metacrilato de glicidila
GRT's	- Gastrorretensivos
IPAA	- Isopropilacrilamida
IPN	- Interpenetrantes
LCST	- " <i>lower critical solution temperature</i> "
Log A	- Pré-exponencial
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	- Microscopia ótica
MTT	- Brometo de metiltetrazólio
NIPAAm	- N-isopropilacrilamida
OECD	- Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PAA	- Poliacrilamida
PBS	- Solução salina tamponada
PEO	- Poli(óxido de etileno)
PMP	- poli(4-metil-1-penteno)
PNIPAAm	- Poli(N-isopropilacrilamida)
REM	- Radiação eletromagnética
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SC	- Sulfato de condroitina
SCENIHR	- Comitê Científico da Comissão Europeia de Emergentes e Recentemente Identificados Riscos para a Saúde
SCM	- Sulfato de Condroitina modificado por Metacrilato de glicidila
SCM+NIPAAm	- Copolímero Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida
Semi-ipns	- Semi-interpenetrantes
-T _Δ S	- Entrópico
Tg	- Temperatura de transição vítrea
TG	- Análise termogravimétrica
UCST	- " <i>upper critical solution temperature</i> "
α	- Níveis conversionais
β	- Razões de aquecimento
ζ	- Potencial Zeta
μV	- Microvolts

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
TiO ₂	Óxido de titânio
Al ₂ O ₃	Óxido de alumínio
KBr	Brometo de potássio
HCl	Ácido clorídrico
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
D ₂ O	Água deuterada
TSP-d43	'(tri) propiônico-2,2,3,3-d ₄ de ácido sal sódico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
N ₂	Nitrogênio
OH	Hidroxila
DMSO	Dimetilsulfóxido
N-H ou -NH ₃ ⁺	Grupo amina
C=OOH ou -COO ⁻	Grupo carboxila
CH ₃	Grupo metílico
CH	Grupo metínico
C=O	Grupo carbonila
C=C	Dupla de carbono
N-H	Amida
CH ₂	Grupo metilênico
-OSO ₃ ⁻	Grupos sulfidríla

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Polímeros	18
2.2	O uso de polímeros na nanotecnologia	21
2.3	Polímeros em sistemas inovadores de liberação de fármacos	28
2.3.1	SISTEMAS ORAIS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	32
2.3.2	SISTEMAS MATRICIAIS.....	32
2.3.3	SISTEMAS RESERVATÓRIOS.....	33
2.3.4	SISTEMA GASTRORRETENSIVO.....	35
2.4	Sulfato de condroitina	36
2.4.1	COMPOSIÇÃO DO SULFATO DE CONDRITINA.....	36
2.4.1.1	Glicosaminoglicanas	36
2.4.1.2	Proteoglicanas.....	37
2.4.2	CARACTERÍSTICAS DO SULFATO DE CONDRITINA.....	38
2.4.3	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO SULFATO DE CONDRITINA PELO METACRILATO DE GLICIDILA.....	42
2.5	Poli(N- isopropilacrilamida)	45
2.6	Métodos de Caracterização Físico-Química	51
2.6.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	51
2.6.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	51
2.6.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	52
2.6.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL.....	52
2.6.5	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PELO MÉTODO DE FLYNN-WALL-OZAWA.....	52
2.6.6	DEGRADAÇÃO <i>in vitro</i>	54
2.6.7	TAMANHO DE PARTÍCULA.....	55
2.6.8	POTENCIAL ZETA.....	55
2.7	Avaliação toxicológica dos polímeros	56
2.8	Métodos para avaliação toxicológica	63
2.8.1	BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i> leach.....	63

2.8.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	64
2.8.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL.....	65
3	OBJETIVOS.....	67
3.1	Objetivo geral.....	67
3.2	Objetivos específicos.....	67
4	MATERIAL E METÓDOS.....	68
4.1	Materiais.....	68
4.2	Métodos.....	69
4.2.1	SÍNTESE DO COPOLÍMERO SULFATO DE CONDROITINA-CO-N-ISOPROPILACRILAMIDA.....	69
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	70
4.2.2.1	Ressonância magnética nuclear.....	70
4.2.2.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier.....	70
4.2.2.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	70
4.2.2.4	Análise termogravimétrica e análise térmica diferencial.....	71
4.2.2.5	Cinética de degradação pelo método de Flynn-Wall-Ozawa.....	71
4.2.2.6	Degradação <i>in vitro</i>.....	71
4.2.2.7	Tamanho de partícula.....	72
4.2.2.8	Potencial zeta.....	72
4.2.3	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE.....	72
4.2.3.1	Bioensaio de toxicidade em <i>Artemia Salina</i> leach.....	72
a)	Preparação do copolímero SCM + NIPAAm 5% e realização do ensaio.....	73
4.2.3.2	Avaliação da citotoxicidade.....	74
a)	Preparação do copolímero SCM + NIPAAm 5% para os ensaios <i>in vitro</i>.....	74
b)	Ensaio de Viabilidade Celular.....	75
4.2.3.3	Avaliação da toxicidade aguda oral.....	76
a)	Procedimento para avaliação da toxicidade aguda oral.....	77
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1	Caracterização físico-química.....	80
5.1.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	80

5.1.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	85
5.1.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	89
5.1.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL	91
5.1.5	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PELO METÓDO DE FLYNN-WALL-OZAWA.....	103
5.1.6	DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>	106
5.1.7	TAMANHO DE PARTÍCULA.....	108
5.1.8	POTENCIAL ZETA.....	110
5.2	Avaliação preliminar da toxicidade.....	112
5.2.1	BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i> Leach.....	112
5.2.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	113
5.2.3	TOXICIDADE AGUDA ORAL.....	117
6	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS.....	124

ANEXOS

ANEXO 1- Autorização do Comitê de Ética Animal da UFPA

ANEXO 2- Tabela de Avaliação do Ensaio Hipocrático (Teste de Toxicidade Aguda)

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia, como técnica para a encapsulação de fármacos, surgiu recentemente, mas os avanços rápidos permitiram a descoberta e/ou desenvolvimento de novas oportunidades de diagnóstico e terapia de várias doenças. As nanopartículas são sistemas sólidos à base de polímeros (sintéticos ou naturais) ou de outros materiais que atuam como veículo para fármacos ou outras substâncias. Atualmente é utilizada pela indústria farmacêutica na produção de formulações de liberação controlada e vetorizada por proporcionar melhora da eficácia, diminuição da toxicidade e da dose de fármaco administrado, aumentando a adesão do paciente ao tratamento (REIS, 2007; MATOS, 2008).

Os materiais tradicionais usados nos processos de revestimentos dos fármacos eram os solventes orgânicos, que apresentavam custos elevados por exigir instalações de sistemas de exaustão arrojados para o tratamento dos resíduos químicos, criando uma atmosfera de ameaça à saúde dos operadores, riscos de explosões e danos ao meio ambiente. Com isso, uma grande quantidade e variedade de polímeros sintéticos, naturais e copolímeros têm sido avaliados e utilizados para o revestimento de formas sólidas orais, devido demonstrarem baixo custo, não serem reconhecidos pelo sistema de defesa do organismo, liberação controlada e precisa do fármaco, com excelente reprodutibilidade (BUNHAK et al. 2006).

Sendo assim, é proposto a formação de um copolímero a partir da reação de um polímero sintético com um natural. O N-isopropilacrilamida é um monômero sintético que ao polimerizar forma o poli(N-isopropilacrilamida) classificado como termossensível devido sua capacidade de expansão e contração a uma determinada temperatura, assim o fármaco é liberado durante sua contração, difundindo-se pelo corpo. O Sulfato de Condroitina é um polímero natural encontrado nas cartilagens da maioria dos mamíferos, é denominado bioadesivo por aumentar o tempo de permanência do fármaco no organismo, melhorando sua biodisponibilidade e diminuindo o número de doses administradas ao paciente (MOURA, 2005; LOPES et al. 2009; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Diante disso, é necessário a realização de análises físico-químicas para verificar se o copolímero formado irá melhorar e conservar as características de veículo de liberação controlada de cada polímero reagente. Devido a versatilidade,

biocompatibilidade, biodegradabilidade, possibilidade em modificar suas características adicionando ou removendo grupos químicos específicos e de projetar mecanismos ou sistemas diferentes de liberação de fármacos, muitas organizações científicas têm recomendado que, além das análises físico-químicas, sejam também realizadas avaliações toxicológicas que caracterizem o tipo de efeito tóxico que os polímeros são capazes de produzir (OGA e CAMARGO e BATISTUZZO, 2008).

Por serem biodegradáveis, os produtos de sua degradação podem ser tóxicos e promoverem, por exemplo, uma resposta inflamatória. Assim, uma avaliação toxicológica torna-se necessária para caracterizar possíveis efeitos tóxicos que o copolímero selecionado possa vir a apresentar, mesmo a despeito de suas excelentes propriedades na aplicação como sistema de liberação de fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Polímeros

A palavra polímero tem origem no vocábulo grego *polumeres*, composto por *polu* (*πολυ*) que pode ser traduzido como muitas e *meres* (*μέρος*) que significa partes. Polímeros são, portanto, substâncias químicas formadas por muitas partes. A estrutura molecular de um polímero consiste na repetição de pequenas unidades, ligadas por covalência, originando uma molécula bastante longa, de alta massa molar, ou seja, uma macromolécula. Estas pequenas unidades são chamadas de monômeros (do grego, uma parte). A reação que promove a união dos monômeros para formar um polímero é chamada de polimerização e o grau de polimerização é o número de monômeros da cadeia polimérica (Figura 1) (MANO, 1985; VIEIRA, 2006).

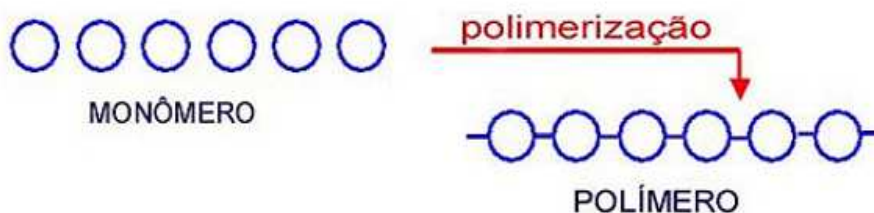


Figura 1: Esquema ilustrativo para formação de um polímero
Fonte: MANO, 1985.

A alta massa molar dos polímeros e a diversidade de estruturas (arquiteturas moleculares) que podem ser formadas pelo encadeamento dos monômeros conferem a estes materiais propriedades químicas e físicas especiais, como por exemplo, alta viscosidade, elasticidade ou dureza, resistência ao calor, à umidade, à abrasão, etc. Quando o polímero é formado por apenas um tipo de monômero usa-se a expressão homopolímero. Quando há mais de um tipo de monômero na molécula, ela é designada como um copolímero e os monômeros que lhe dão origem de comonômeros. O termo copolímero é geral, quando há três monômeros na constituição do polímero, usa-se a expressão terpolímero. Em relação à seqüência monomérica da cadeia do polímero, esta pode ser variada de acordo com o método da síntese. Em geral, quatro tipos de seqüências são encontradas (MANO, 1985; ALLCOCK e LAMPE, 1990; VIEIRA, 2006) (Figura 2).

a) Polímeros randômicos (estatísticos): não existe seqüência definida das unidades do monômero, que se dispõem ao acaso. São freqüentemente formados quando monômeros do tipo olefinas copolimerizam via radical livre.

b) Polímeros aleatórios ou alternados: contêm uma seqüência regular de unidades monoméricas. A polimerização de olefinas feitas através de mecanismos iônicos podem originar polímeros deste tipo.

c) Polímeros em bloco: contêm um bloco de um monômero conectado a um bloco de outro monômero. São geralmente formados por um processo de polimerização iônica. Para estes três tipos de seqüência as propriedades dos polímeros são diferentes das dos homopolímeros correspondentes.

d) Polímeros ramificados ou enxertados ou grafitizados (graft): são geralmente preparados ligando-se dois polímeros diferentes. Podem ser preparados por irradiação eletromagnética do tipo raio X de uma mistura de dois homopolímeros. As propriedades destes polímeros estão relacionadas com as dos homopolímeros.

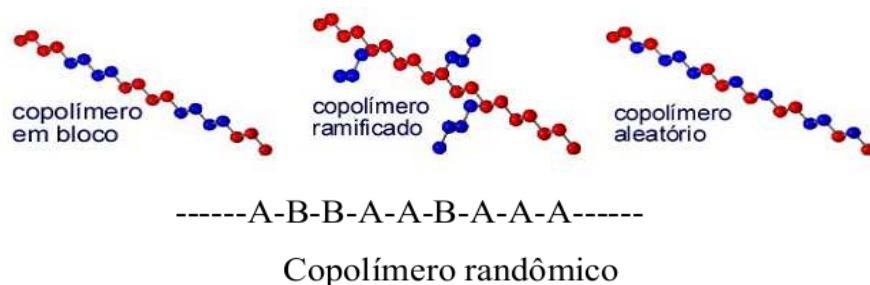


Figura 2: Tipos de Copolímeros
Fonte: MANO, 1985 e VIEIRA, 2006.

Os polímeros podem ser inorgânicos ou orgânicos, naturais ou sintéticos. Um exemplo de polímero inorgânico é a sílica gel, enquanto que a borracha da seringueira, polissacarídeos (amido e celulose), proteínas (gelatina, albumina, queratina e o colágeno) e os ácidos nucleicos (DNA e RNA), constituem exemplos de macromoléculas naturais orgânicas, e os polímeros sintéticos orgânicos são, basicamente, formados por hidrocarbonetos insaturados, derivados do petróleo, como o etileno e o propileno. A reação de polimerização que dá origem a esses materiais, em

geral, é classificada em dois tipos: condensação e adição. Na reação por condensação, cada etapa do processo é acompanhada pela formação da molécula de uma substância simples, como a água, o ácido clorídrico ou a amônia. Na polimerização por adição, os monômeros reagem para produzir um polímero a partir de reações de adição de olefinas, acetilenos, aldeídos e outros compostos portadores de ligações insaturadas, não formando subprodutos. As polimerizações por adição são normalmente conduzidas na presença de catalisadores como peróxidos, azo compostos, ácidos de Lewis, espécies organometálicas ou ainda irradiação de alta energia, os quais, em certos casos, exercem controle sobre a estrutura da molécula, com efeitos importantes nas propriedades do polímero. A Bakelite, as poliamidas como o Nylon, os poliuretanos e os poliésteres como o poli(tereftalato de etileno) são alguns polímeros obtidos por condensação. Como exemplos da polimerização por adição há o polietileno (Figura 3), poli(cloreto de vinila), poliestireno, entre outros (MANO, 1985; VIEIRA, 2006).

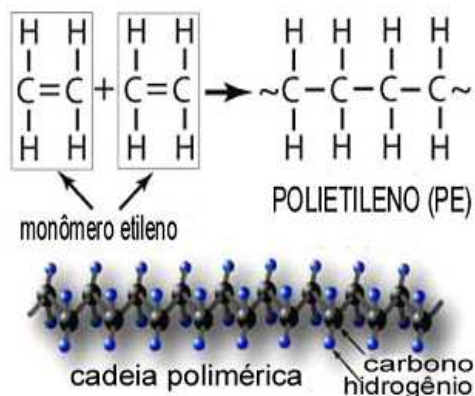


Figura 3: Polimerização do Etileno
Fonte: MANO, 1985.

Os três grandes grupos de polímeros sintéticos, os plásticos, borrachas e fibras, se diferenciam pelas suas propriedades mecânicas, ou seja, como o material responde quando é submetido a uma força ou tensão, dentre outras características típicas de cada grupo. A propriedade reversível de fundir sob aquecimento e solidificar por resfriamento caracteriza os chamados polímeros termoplásticos e permite que esses materiais possam ser reciclados com maior facilidade. Os polímeros que por aquecimento ou outra forma de tratamento assumem uma estrutura reticulada (rede tridimensional), através de ligações covalentes fortes ou ligações de hidrogênio intermoleculares tornam-se infusíveis e são designados como termorrígidos. Ainda, o

aumento da massa molar destes materiais, pela formação das ligações cruzadas, muitas vezes, também os tornam insolúveis (Figura 4) (MANO, 1985).

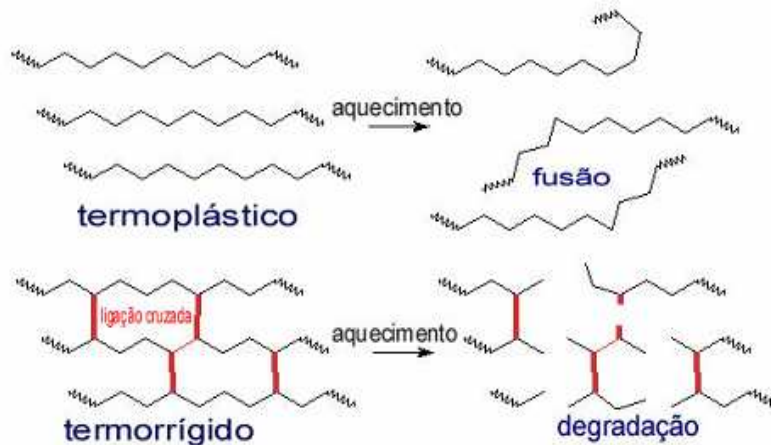


Figura 4: Propriedades poliméricas
Fonte: MANO, 1985.

As borrachas ou elastômeros, por exemplo, são macromoléculas que exibem elasticidade em longa faixa, à temperatura ambiente. O processamento de borrachas para produção de artefatos, como pneus ou solados de calçados, envolve a formação de ligações entre as cadeias poliméricas, através de uma reação química com enxofre, denominada de vulcanização. A borracha vulcanizada é um material termorrígido, com a característica única de permitir um grande alongamento, seguido instantaneamente de uma retração quase completa (MANO, 1985; VIEIRA, 2006).

Na medicina o uso de polímeros, de acordo com DIAS (2006), coincide com a ampliação no campo da ciência de polímeros sintéticos. Na década de 40, surgem registros de uso em cirurgia de nylon, poli(metacrilato de metila) e o poliéster Dracon. A partir daí apareceram novos materiais como teflon, polipropileno, e poliuretanos. Estes materiais são os mais importantes usados na medicina como componentes de próteses permanentes, lentes artificiais, implante vascular, cateteres etc.

2.2 O uso de polímeros na nanotecnologia

A nanotecnologia, como técnica para a encapsulação de fármacos, surgiu há pouco tempo, mas os avanços rápidos e recentes permitiram a descoberta e/ou

desenvolvimento de novas oportunidades de diagnóstico e terapia de variadíssimas doenças. Em virtude do crescimento há um corrente interesse na pesquisa de materiais nanoestruturados em várias áreas científicas e tecnológicas: como catálise, materiais optoeletrônicos, alimentícia, agrícola, gráfica, médica, bioencapsulação e liberação controlada de fármacos (CABRAL, 2004; REIS, 2007).

Nano é um prefixo grego que significa "anão", um nanômetro é igual a um milionésimo de milímetro e 1000 nm equivale a 1 μm , visualizando-se em escala de centímetro um fio de cabelo possui o diâmetro de 100.000 nm, átomos são cerca de 1/10.000 nm do tamanho de uma bactéria e bactérias são 1/10.000 nm do tamanho dos mosquitos. As nanopartículas são definidas como sistemas sólidos à base de polímeros (sintéticos, semi-sintéticos ou naturais), ou de outros materiais, de natureza biodegradável ou não, com tamanho menor que 1 μm , pois partículas maiores são denominadas micropartículas, servindo de veículo para fármacos ou outras substâncias (CABRAL, 2004; REIS, 2007; DURAN e AZEVEDO, 2012).

Segundo REIS (2007) o termo nanopartícula engloba dois tipos específicos em relação à sua estrutura: as nanoesferas e as nanocápsulas. As nanoesferas são sistemas que possuem uma estrutura do tipo matriz, os fármacos ou substâncias a encapsular podem ser adsorvidos à superfície da nanoesfera ou encapsulados no seu interior, de forma homogênea ou heterogênea. As nanocápsulas são sistemas vesiculares onde o fármaco, ou substância a encapsular, está confinado a um núcleo líquido ou sólido limitado por uma membrana polimérica, denominado na tecnologia farmacêutica como invólucro. Neste último caso, o fármaco ou substância a encapsular pode localizar-se no núcleo sob a forma dissolvida ou suspensa ou, em última instância, adsorvido à superfície da nanocápsula, como ilustra a Figura 5.

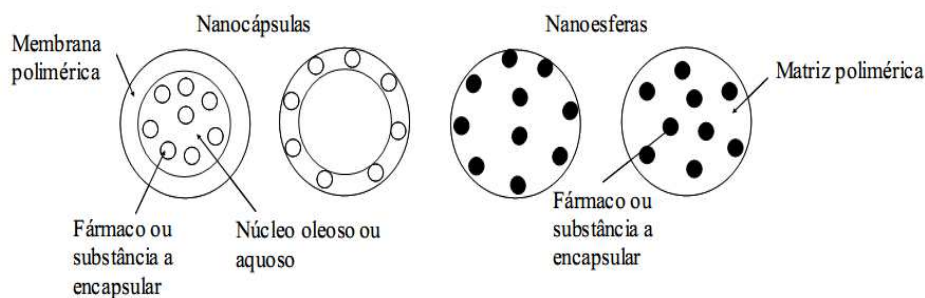


Figura 5: Esquema ilustrativo da divisão das nanopartículas em nanocápsulas e nanoesferas. Fonte: REIS, 2007.

A literatura enfatiza que a granulometria reduzida das nanopartículas oferece vantagens, no que concerne à sua elevada captação a nível intracelular, por exemplo, a captação por células intestinais é influenciada, entre outros fatores, pela granulometria das partículas envolvidas. Além da granulometria, a natureza do polímero e a sua carga de superfície também são fatores que interferem igualmente na captação intestinal das nanopartículas. Geralmente, as nanopartículas de polímeros hidrofóbicos apresentam maior captação intestinal do que as nanopartículas de polímeros hidrofílicos (JUNG et al. 2000; REIS, 2007).

Desta forma, a composição do polímero (hidrofobicidade, carga elétrica à superfície e perfil de biodegradação), a natureza dos adjuvantes e o próprio fármaco (peso molecular), carga e localização do fármaco nas nanopartículas têm uma forte influência na absorção, distribuição, metabolismo e eliminação das nanopartículas. Assim, tendo em conta as características físico-químicas do fármaco ou da substância a encapsular, é possível escolher o método de preparação e o polímero adequados. Dentre os biomateriais sintéticos mais usados na engenharia de tecido apresentam-se grandes grupos de polímeros sintéticos não degradáveis: polietileno, poli(álcool vinílico), polimetilmetacrilato, polidimetil siloxano, poli(etileno tereftalato) e outros; polímeros sintéticos degradáveis: poli(ácido glicólico), poli(ácido láctico), poli(óxido de etileno) (PEO), poli(lactato-co-glicolídico), poli(ϵ -caprolactona) e polímeros naturais biológicos: alginato, sulfato de condroitina, quitosana, ácido hialurônico, colágeno, polilisina, dextrana e heparina (DIAS, 2006; REIS, 2007).

Atualmente na indústria farmacêutica, as aplicações das nanopartículas são variadas: na eliminação de sabores ou odores; na redução ou eliminação da irritação gástrica ou outros efeitos secundários provocados por alguns fármacos; no melhoramento das características de escoamento de pós; na maior facilidade no manuseio de substâncias tóxicas; na proteção em relação aos agentes atmosféricos (umidade, luz, calor e oxigênio); na redução da volatilidade dos princípios ativos; na administração simultânea de fármacos que apresentem incompatibilidades entre si; na conversão de líquidos em sólidos; na dispersão de substâncias insolúveis em água ou em meios aquosos e no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação controlada e vetorizada (REIS, 2007).

Vários tipos de nanopartículas e sistemas coloidais podem melhorar a cinética, biodistribuição e a liberação de uma substância, seja um fármaco, vacina, proteínas recombinantes ou oligonucleotídeos, os principais sistemas nanoestruturados para

carreamento de fármacos e vacinas desenvolvidos pela Indústria Farmacêutica são definidos a seguir:

- a) Lipossomas:** Os lipossomas são vesículas esféricas artificiais de tamanho variável (20 nm a vários micrômetros de diâmetro) que podem ser produzidas com fosfolipídios naturais e colesterol. Foram descobertos em 1961 por Alec Bagham durante um estudo de fosfolipídios e coagulação sanguínea que mostrou que quando se combinam com a água, formam imediatamente uma esfera de bicamada. Isso ocorre porque enquanto uma ponta de cada molécula é solúvel em água, a outra é hidrofóbica. Desde então, eles têm sido ferramentas bastante versáteis, amplamente utilizados como modelos de membranas celulares na biologia e bioquímica. A sua utilização como sistema carreador de fármacos foi proposta pela primeira vez em 1971 por Gregoriadis, e a partir de então eles têm sido extensivamente utilizados. Os fármacos hidrossolúveis ficam encapsulados no interior da cavidade lipossomal, enquanto que os fármacos lipossolúveis são incorporados na bicamada lipídica. Essa bicamada, por sua vez, pode se fundir com outras bicamadas lipídicas, como de células, liberando o conteúdo dos lipossomas. Os lipossomas foram os primeiros nanossistemas utilizados na clínica e, ainda hoje, são os únicos aprovados para administração endovenosa. O primeiro medicamento lipossomal a ser introduzido no mercado foi a doxorubicina (Doxil/Caelix) em 1995 para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado à Aids (BANGHAM, 1961).
- b) Nanopartículas Poliméricas:** Ao contrário dos lipossomas, as nanopartículas poliméricas não têm um núcleo aquoso, mas sim uma membrana ou matriz sólida constituída de polímero. O fármaco é agregado, encapsulado ou adsorvido às partículas, e, dependendo do método de preparação, pode-se obter nanoesferas ou nanocápsulas. O fármaco é liberado gradualmente da partícula por erosão ou difusão. A vantagem das nanopartículas poliméricas em relação aos lipossomas, além do menor custo dos polímeros, é a sua maior estabilidade e durabilidade, o que pode facilitar a estocagem à temperatura ambiente e aumentar o tempo de prateleira do medicamento. Os polímeros mais utilizados clinicamente, principalmente em próteses ortopédicas e fios de sutura biodegradáveis, são os

sintéticos como o poli(ácido-láctico), o poli(láctico-co-ácido glicólico) e a poli (ε-caprolactona) (BANGHAM, 1961).

- c) Ciclodextrinas:** Ciclodextrinas são uma família de oligossacarídeos cíclicos tridimensionais em forma de copo de cerca de 1 nm de altura, com alto número de hidroxilas, o que lhes confere uma boa solubilidade em água. Como seu interior é hidrofóbico, servem bem para solubilizar fármacos lipossolúveis. A primeira patente usando a ciclodextrina para formulação de drogas foi em 1953. São os sistemas de carregamento de fármacos há mais tempo comercializados, mas seu uso parenteral encontra restrições devido à sua toxicidade (DAVIS e BREWSTER, 2004).
- d) Dendrímeros:** Os dendrímeros são polímeros globulares altamente ramificados, com cerca de 1-10 nm produzidos pela primeira vez no início da década de 1980 por Donald Tomalia. Seu diferencial em relação aos outros polímeros sintéticos é que têm alto grau de uniformidade molecular, e uma alta previsão de peso molecular e tamanho. Sua vantagem em relação às outras partículas poliméricas é a previsibilidade de seu tamanho e número de grupos funcionais, o que confere maior segurança quanto à quantidade de fármaco ou DNA complexado. Quanto à toxicidade, os dendrímeros catiônicos são mais tóxicos e os aniônicos mais biocompatíveis (D'EMANUELE e ATTWOOD, 2005).
- e) Nanopartículas Inteligentes:** Além de impedirem a degradação do fármaco, sua precipitação nos rins, liberação mais controlada ou permitir sua passagem através de barreiras biológicas intransponíveis pelo fármaco livre, as partículas descritas acima poderiam ainda ser funcionalizadas para um melhor direcionamento ao tecido-alvo prevenindo os efeitos colaterais da substância carregada. A vantagem de um sistema assim é que permite um tratamento bem focalizado e intenso sobre as células doentes, poupando as células saudáveis, e reduzindo sensivelmente os efeitos colaterais do tratamento (LAVAN e MCGUIRE e LANGER, 2003).

Além disso, a liberação eficiente do fármaco depende do comportamento fisiológico dos biomateriais que compõem as nanopartículas, pois podem ser

compostos de substâncias de origens naturais ou sintéticas que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. São utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substitui algum tecido, órgão ou função do corpo ou ainda como um material viável utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos, podendo ser classificados em: (MIRTCHI e LEMAITRE e TERAQ, 1989; HENCH e WILSON, 1993; JAHNO, 2005):

- a) **Biotoleráveis:** materiais apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através da formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formado, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos assim como a grande maioria dos metais.
- b) **Bioinerte:** materiais também tolerados pelo organismo, mas em que a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica será passageira e uma fina cápsula tomará lugar após o implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são alumina, zircônio, titânio, ligas de titânio e carbono.
- c) **Bioativos:** materiais em que ocorrem ligações de natureza química entre material e tecido ósseo (osteointegração). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a estes materiais, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros e vitro-cerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.
- d) **Biodegradáveis:** materiais que após certo período de tempo em contato com os tecidos acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas em

função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos destes materiais são os biopolímeros, como o poli (ácido láctico).

Em 1960 começaram as primeiras suturas biodegradáveis aprovadas na indústria médica formadas de ácido láctico e ácido glicólico, desde então outros materiais compostos por poli(dioxanona), poli(trimetileno carbonato) e poli(ϵ -caprolactona) foram aceitos para o uso como dispositivos biomédicos, sendo utilizados na medicina em suturas biodegradáveis, órgão artificial e próteses reabsorvíveis. Atualmente, para confecção de barreiras mecânicas têm-se usado polímeros sintéticos biodegradáveis, os quais oferecem controle da estrutura e propriedades assim como estrutura física e química, cristalinidade, condições hidrofílicas e hidrofóbicas, padrão de degradação e propriedades mecânicas. Este material pode ser processado em várias formas e estruturas, assim como a área superficial desejada, quantidade, tamanho e distribuição dos poros (BARROWS, 1986; DUBOIS et al. 1991; JAHNO, 2005).

Na produção de sistemas poliméricos para liberação vetorizada de fármacos um dos mais eficientes compostos são os polímeros biodegradáveis, pois direciona o fármaco ao seu sítio-alvo específico no organismo, são estáveis, sofrem degradação e dependendo das modificações químicas não são reconhecidos por macrófagos do sistema reticuloendotelial de defesa (DAVDA e LABHASETWAR, 2002; KWON, 2002; REIS, 2007).

Esta característica biodegradável é essencial para a eficácia do tratamento, uma vez que se a matriz polimérica não degrada dentro do corpo ela deve ser cirurgicamente removida, implicando em um alto custo e risco para o paciente, suscitando a preocupação sobre os possíveis efeitos adversos que a presença deste material no organismo poderia ocasionar, sendo necessária sua remoção cirúrgica após a liberação do fármaco. Assim, a síntese de polímeros biodegradáveis contribuiu para melhorar estes sistemas, já que não requerem remoção cirúrgica, apresentam poucos efeitos colaterais e são biocompatíveis (PREIS e LANGER, 1979; AZEVEDO, 2002).

Por esse motivo, várias patentes relativas ao uso destes sistemas foram relatadas nos últimos anos, incluindo, por exemplo, nanopartículas ocas de proteínas com capacidade para biorreconhecimento molecular, auxiliadas por um transportador na liberação a células específicas; novas formulações de comprimidos com resistência

gástrica, utilizando como componentes polivinilpirrolidona reticulado, alginato de sódio, goma xantana e bicarbonato de sódio, dirigindo-se a absorção ao trato gastrointestinal, entre outros (AKKARA et al. 2000; CABRAL, 2004).

2.3 Polímeros em sistemas inovadores de liberação de fármacos

O termo liberação controlada tem sido associado aos sistemas a partir dos quais os fármacos são liberados a velocidades pré-definidas, por um período de tempo prolongado após a sua administração. A seringa pode ser considerada o primeiro sistema de liberação controlada da história, pois utiliza polímeros transparentes, aprotogênicos, de elevada molhabilidade, com alta estabilidade química e de barreira e, resistentes à esterilização por radiação gama ou óxido de etileno (SHIN, 2005; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

As formas farmacêuticas de liberação controlada, que objetivam prolongar e melhorar o controle da administração de fármacos requerem administrações menos frequentes do medicamento em relação às formas convencionais, nas quais a concentração do fármaco apresenta um aumento na corrente sangüínea, atinge um pico máximo e então declina (Figura 6). Desde que cada fármaco possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ele é tóxico e abaixo da qual ele é ineficaz os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas, isso se torna mais crítico se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica.

Neste fato reside uma das grandes vantagens dos sistemas de liberação controlada sobre os métodos convencionais, com a manutenção da concentração terapêuticamente efetiva de fármacos no sistema circulatório por um extenso período de tempo (TANAKA et al. 2005; TANAKA et al. 2006; LYRA et al. 2007).

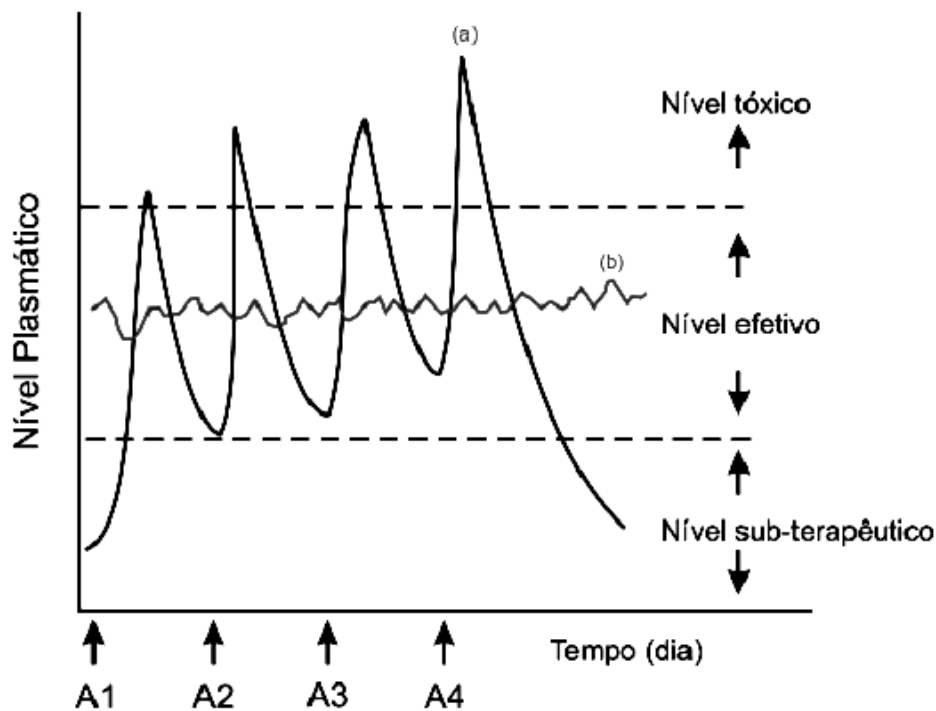


Figura 6: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidose (a) e sistema de liberação controlada (b), sendo A a administração do fármaco.
Fonte: THACHARODI e RAO, 1996.

A liberação controlada de fármacos é obtida principalmente por meio de sistemas nanoparticulados devido a manter a dose terapêutica em níveis seguros; impedir níveis tóxicos e efeitos colaterais locais e sistêmicos; evitar subníveis terapêuticos; aumentar concentrações plasmáticas de princípios ativos de meia-vida plasmática relativamente curta; proporcionar maior segurança na utilização de alguns fármacos de elevada toxicidade; maior comodidade pela diminuição do número de administrações diárias, podendo ser evitada a administração noturna e conferindo economia de fármaco; efeitos indesejados reduzidos, melhorando a eficácia do fármaco, aumentando a adesão do paciente ao tratamento e otimizando a administração de produtos oriundos da biotecnologia como vacinas, peptídeos, proteínas, entre outros (VENDRUSCOLO et al. 2005; CHAVANPATIL et al. 2006; LYRA et al. 2007; MATOS, 2008).

Apesar das inúmeras vantagens, as formas farmacêuticas de liberação controlada possuem algumas limitações como: restrições para fármacos com baixo tempo de meia-vida, com dificuldade de absorção no trato gastrointestinal e muito potentes; impossibilidade de interrupção do efeito terapêutico imediato em caso de

intoxicação ou intolerância; risco de acumulação do fármaco com velocidade de eliminação lenta e dificuldade de adaptação da posologia às diferentes farmacocinéticas inter-individuais. Sendo assim, os fármacos que mais se adaptam a estes sistemas apresentam velocidades médias de absorção e excreção; absorção uniforme no trato gastrointestinal; absorção em doses relativamente pequenas; margem de segurança relativamente larga; utilização no tratamento de doenças crônicas em vez de agudas, entre outros (VENDRUSCOLO et al. 2005; LYRA et al. 2007).

Os materiais tradicionais usados nos processos de revestimentos dos fármacos eram os solventes orgânicos, que apresentavam custos elevados por exigir instalações de sistemas de exaustão arrojados para o tratamento dos resíduos químicos, criando uma atmosfera de ameaça à saúde dos operadores, riscos de explosões e danos ao meio ambiente. Com isso, uma grande quantidade e variedade de polímeros formadores de filmes têm sido pesquisados para o revestimento de formas sólidas orais, sendo avaliada além dos revestimentos compostos de polímeros sintéticos a sua associação com polímeros naturais por apresentarem alta estabilidade, flexibilidade para modificação química, baixo custo e biodegradabilidade específica (SEITZ e MEHTA e YEAGER, 2001; ZHENG e SAUER e MCGINITY, 2005; BUNHAK et al. 2006).

A aplicação da tecnologia de revestimento usando materiais poliméricos tem demonstrado liberação controlada e precisa de fármacos com excelente reprodutibilidade, tendo aumentado propostas de novos sistemas inovadores baseados em polímeros sintéticos ou naturais, biodegradáveis ou não, copolímeros, hidrogéis, entre outros. Assim, além de formulações orais, os produtos poliméricos têm sido utilizados para administração injetável e tópico, incluindo adesivos, implantes, dentre outros dispositivos médicos (CABRAL, 2004; BUNHAK et al. 2006; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Os sistemas de liberação controlada do tipo polimérico podem ser preparados por difusão, quimicamente ou por solvente. Na difusão o fármaco forma uma partícula interna (caroço) envolvida por uma barreira de difusão inerte, este sistema inclui membranas, cápsulas, nanocápsulas, lipossomas e fibras ocas ou por meio de um agente ativo que está disperso ou dissolvido em um polímero sólido monolítico inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero (PEPPES, 1987; AZEVEDO, 2002; BRANNON-PEPPAS, 2011).

Os sistemas controlados quimicamente utilizam a bioerosão de polímeros, que corresponde à conversão do material insolúvel em água em um material solúvel, resultando na absorção dos resíduos pelo organismo, assim a droga também pode estar ligada covalentemente e ser liberada por cisão da ligação por ação da água ou de enzimas. Nos sistemas controlados por solvente o agente ativo está dissolvido ou disperso na matriz polimérica e a difusão ocorre somente se o polímero intumescer (por exemplo, com água), abaixando a temperatura de transição vítrea (T_g), tornando o material mais plástico, e difundindo o fármaco contido na matriz para o meio externo (PEPPES, 1987; AZEVEDO, 2002; BRANNON-PEPPAS, 2011).

Pesquisas demonstram que após administração intravenosa de nanoesferas poliméricas, assim como de outros carreadores coloidais, as proteínas do plasma conhecidas como opsoninas (imunoglobulinas IGM e IGG, relacionadas à resposta imune inata do organismo), são rapidamente adsorvidas na superfície das partículas. Esta adsorção de opsoninas leva ao rápido reconhecimento pelas células do sistema reticuloendotelial (macrófagos, principalmente no baço e células de Kupffer, no fígado) e consequente fagocitose das partículas, especialmente no fígado (60-90%), baço (2-20%), medula óssea (0,1-1%) e quantidades variadas nos pulmões (SHERSTOV et al. 1996; AZEVEDO, 2002).

Devido este fato, pesquisas realizadas recentemente, com o objetivo de reduzir a captura das partículas coloidais pelo sistema reticuloendotelial e aumentar a concentração destes veículos no sangue, consequentemente no alvo desejado, desenvolvem copolímeros anfifílicos em que a porção hidrofóbica forma a matriz polimérica (nanopartícula) enquanto que a porção hidrofílica forma a cobertura, pois a presença destes polímeros sobre a superfície da partícula decresce a adsorção de opsoninas e subsequente fagocitose, ou seja, o carreador não é reconhecido pelo sistema de defesa do organismo. Uma aplicação destes sistemas é a utilização de nanopartículas sólidas que encapsulem fármacos anticâncer para serem direcionadas mais facilmente ao alvo (DAVDA e LABHASETWAR, 2002; KWON, 2002; KREUTER et al. 2002).

Além dos copolímeros anfifílicos, com desenvolvimento das pesquisas na área polimérica são propostos novos sistemas inovadores baseados em polímeros sintéticos ou naturais, biodegradáveis ou não, bioadesivos, hidrogéis, visando a liberação de fármacos. Exemplos de sistemas de liberação controlada de base polimérica são formas farmacêuticas orais fundamentados em sistemas matriciais, reservatórios,

gastroretentivos, entre outros (SWARBRICK, 2007; HOFFMAN, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

2.3.1 SISTEMAS ORAIS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS

As cápsulas e comprimidos continuam sendo exaustivamente estudados, pois, além de apresentarem ampla aceitação por médicos e pacientes, genericamente podem apresentar liberação retardada ou liberação controlada (prolongada) do fármaco. Os polímeros são incorporados em tais formas farmacêuticas visando diferentes funções, como mascarar odor e sabor desagradáveis, proteger o fármaco de condições agressivas do meio ambiente (luz e umidade) e do ambiente fisiológico, auxiliar no processo produtivo e para modular a liberação do fármaco (WATERMAN, 2007; HOFFMAN, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

2.3.2 SISTEMAS MATRICIAIS

Os sistemas matriciais podem ser monolíticos (comprimidos ou cápsulas) ou particulados (minicomprimidos, grânulos ou pellets, incorporados em comprimidos ou cápsulas). Tais sistemas podem ser preparados a partir de polímeros solúveis em água, polímeros insolúveis erodíveis ou polímeros insolúveis inertes. Nas matrizes, o fármaco encontra-se disperso no polímero e o controle da liberação pode ocorrer por um ou mais dos seguintes mecanismos: difusão, dissolução, hidratação, precipitação, erosão e/ou degradação (SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; ARORA e TANDON, 2009; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Os principais polímeros naturais utilizados em matrizes são os hidrogéis de quitosana, alginato, sulfato de condroitina, gelatina, dextrina, hialuronana e poli(lisina). Exemplos de polímeros sintéticos são: bisacrilamida, poli(acrilamida), (polietilenoglicol), poli(ácido metacrílico), poli(acrilato de butila), polimetacrilato de metila, poli(N-isopropil acrilamida), polivinilpirrolidona, poli(fosfazona), poli(metacrilato de 2-hidroxietila), poli(oligo(óxido de etileno)monometiléter metacrilato) contendo ligações cruzadas por grupos tióis e copolímeros diversos. Há um grande número de comprimidos matriciais

de liberação modificada comercialmente disponíveis, na grande maioria, o polímero que controla a liberação é a hidroxipropilmetilcelulose (LEE, 2007; XINMING, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

2.3.3 SISTEMAS RESERVATÓRIOS

Nos sistemas reservatórios, a formação de filmes poliméricos sobre os núcleos dos comprimidos fundamenta-se na evaporação do solvente de um látex polimérico, promovendo a coalescência das partículas e a formação de um revestimento contínuo, que se caracteriza por ser um filme poroso ou não poroso. No primeiro caso, a difusão do fármaco determinará o processo de liberação. No segundo caso, a liberação será governada pela erosão/degradação do polímero (SWARBRICK, 2007; SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

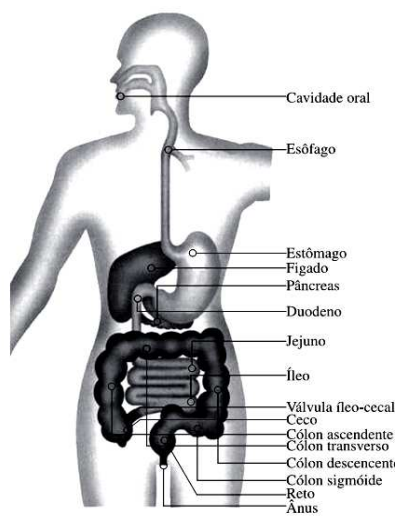
Os ésteres da poliacrilamida (PAA) representam uma classe de polímeros eficazes na preparação de sistemas reservatório. O polimetacrilato de metila foi o primeiro acrílico empregado como biomaterial, inclusive em processos de revestimento farmacêutico. Os principais monômeros utilizados são: metacrilato de metila, metacrilato de etila, metacrilato de butila, acrilato de etila, dimetilaminoetil metacrilato e cloridrato de trimetilaminoetil metacrilato (ZALFEN, 2008; KIM, 2009; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Revestimentos para mascarar sabor e odor desagradável de fármacos podem ser obtidos a partir de copolímeros contendo metacrilato de butila, metacrilato de metila e dimetilaminoetil metacrilato, pois o copolímero formado é catiônico, interagindo com substâncias ativas aniônicas, neutralizando o sabor das mesmas. Além disso, o revestimento formado é insolúvel em pH próximo da neutralidade, não sofrendo dissolução no pH da saliva (pH entre 5 e 7) (VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Revestimentos entéricos, também chamados gastrorresistentes ou enterossolúveis, são copolímeros aniônicos obtidos a partir do metacrilato de etila e do metacrilato de metila. Os filmes formados permanecem íntegros no estômago, porém, desintegram-se em valores de pH maior que 5, liberando o fármaco. Além de melhorar a biodisponibilidade, o revestimento protege os fármacos da degradação em ambiente ácido e protege a mucosa do estômago da ação de certos ativos irritantes. Um exemplo

de comprimido cujo revestimento tem finalidade protetora é Aspirina® Protect, enquanto que o Asacol® HD possui revestimento cuja finalidade é proteger o fármaco do pH ácido e promover sua liberação em pH acima de 7, ambos são copolímeros do ácido metacrílico e do metacrilato de metila, nas proporções de 1:1 e 1:2, respectivamente (CHOURASIA e JAIN, 2003; SIEPMANN e SIEPMANN, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Copolímeros neutros preparados a partir do metacrilato de metila e metacrilato de butila são insolúveis em água, apresentam baixa permeabilidade e sofrem intumescimento ao longo de todo o trato gastrointestinal, sendo empregados para a fabricação de sólidos matriciais ou de sistemas revestidos de liberação sustentada (VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010). A Figura 7 apresenta os principais polímeros utilizados em sistemas de liberação que atuam no trato gastrointestinal.



Região	pH	Tempo de residência (H)	SLF	Polímeros
Cavidade oral	6,8	Sem permanência, exceto para bioadesivos	Filme, adesivo, implante dental e comprimido bucal	-poli(ácido acrílico); -carbômero; -PEO; -tiómeros
Estômago	1 - 3,2 até 6	0 - 2 (jejum) 3 - 5 (cheio)	Comprimidos e cápsulas de liberação modificada: retardada e sustentada. Sistema: -matricial; -reservatório; -osmótico; -hidrogel; -gastroretentivo (flutuante ou bioadesivo); -particulado; -biodegradável	Copolímeros acrílicos: -AE/MMA; -AE/MMA/BMA; -AE/MMA/TAMCl; -AMA/AE; -AMA/MMA Hidrogéis (matrizes): -PEO; -PEG; -PMMA; -PHEMA; -PVP Bioadesivos: -poli(ácido acrílico); -carbômero -PEO; -PVP; -tiómeros
Duodeno	5 - 7	Variável entre 3 e 6		
Jejuno	6 - 7			
Íleo	7 - 7,5			
Cólon	6 - 8	Variável até 30		
Reto	7 - 8		Supositório, gel e comprimido bioadesivos	-PEO; -PEG; -poli(ácido acrílico)

Figura 7: Sistemas de liberação de fármacos e polímeros que atuam nas diferentes regiões do trato gastrointestinal.

Fonte: VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010.

Um sistema reservatório especial conhecido como bomba osmótica - OROS® (Osmotic-controlled Release Oral Systems) é utilizado na preparação dos comprimidos Adalat® OROS, empregados no tratamento da hipertensão. Nesta tecnologia, uma membrana semipermeável (hidroxipropilcelulose e acetofalato de celulose) permite a entrada do meio de dissolução na forma farmacêutica que contém polímeros que intumescem (poli(óxido de etileno) e hidroxipropilcelulose). A pressão interna é aumentada mediante expansão dos polímeros hidrofílicos, forçando a saída do fármaco através de um orifício feito a laser (CONLEY e GUPTA e SATHYAN, 2006; VILLANOVA

e ORÉFICE e CUNHA, 2010). A Figura 8 representa os sistemas orais de liberação: matricial, reservatório e bomba osmótica.

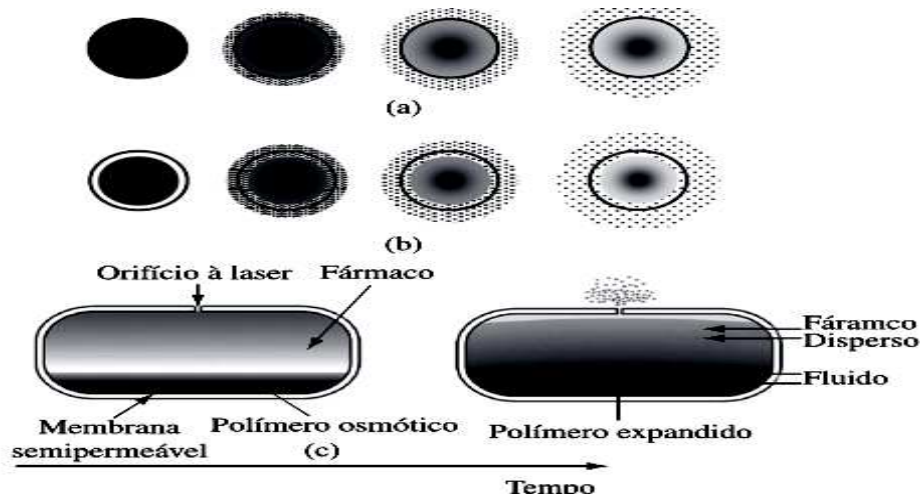


Figura 8: a) Sistema de liberação tipo matricial; b) reservatório; e c) osmótico (oral).
Fonte: VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010.

2.3.4 SISTEMA GASTRORRETENSIVO

O desenvolvimento de medicamentos com tempo de retenção gástrica aumentado, denominados gastrorretensivos (GRT's), é outro artifício capaz de incrementar o efeito terapêutico, sobretudo, em casos de absorção no estômago ou na parte proximal do intestino delgado. Diferentes mecanismos são empregados na preparação de GRT's. Além da bioadesão, outra tecnologia é a obtenção de sistemas expansíveis, nos quais os polímeros intumescem em contato com o fluido gástrico e aumentam de tamanho, não passando através da válvula terminal do estômago (VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Sistemas denominados hidrodinamicamente balanceados baseiam-se em polímeros com capacidade de expansão, associados ou não a excipientes formadores de gás, que ao expandirem permitem a liberação do fármaco por difusão. O ar ou gás carbônico incorporado no polímero expandido permitem a flutuação do sistema. Os principais polímeros utilizados nos GRT's são gelatina, quitosana, HPMC, alginato de sódio, PAA e copolímeros derivados dos ácidos acrílico e metacrílico (SWARBRICK, 2007; GARG, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

2.4 Sulfato de condroitina

2.4.1 COMPOSIÇÃO DO SULFATO DE CONDROITINA

2.4.1.1 Glicosaminoglicanas

A substância fundamental viscosa, semilíquida e gelatinosa da maioria dos tecidos conjuntivos é formada predominantemente por carboidratos denominados de mucopolissacarídeos. Os mucopolissacarídeos sulfatados foram chamados de mucopolissacarídeos ácidos, os mucopolissacarídeos não-sulfatados foram chamados de mucopolissacarídeos neutros (BANKS, 1998; SANTOS, 2009). Os mucopolissacarídeos sulfatados estão presentes em todas as formas de vida que têm alguma organização celular (CASSARO e DIETRICH, 1977; SANTOS, 2009).

Os carboidratos predominantes na substância fundamental são chamados de glicosaminoglicanas (GAGs). O termo significa literalmente um aminoaçúcar (glicosamino) polissacarídico (glicana). As GAGs são heteropolissacarídeos aniônicos lineares formados por unidades repetitivas dissacarídicas de alto peso molecular, sendo que um dos monossacarídeos na unidade dissacarídica é um aminoaçúcar, a N-acetilglicosamina ou N-acetilgalactosamina e os outros monossacarídeos na unidade repetitiva podem ser um ácido urônico ou galactose. As GAGs são um grupo heterogêneo de carboidratos que têm algumas propriedades significantes em comum, sendo poliânions capazes de reter grande quantidade de água (LAMARI e KARAMANOS, 2006; SANTOS, 2009).

Em seu papel estrutural, GAGs são pivôs em agrupar complexos de proteína-proteína na superfície das células ou na matriz extracelular (ECM) e, conseqüentemente, estão envolvidos na sinalização ou inibição de eventos celulares por caminhos bioquímicos. Adicionalmente, GAGs extracelulares podem isolar proteínas e apresentá-las nos sítios apropriados para ativação. Com esta função, as GAGs são capacitadas para influenciar na adesão, migração, proliferação e diferenciação de células, devido suas características químicas e biológicas tem sido utilizada para combater doenças relacionadas à arteriosclerose, trombose, hiperlidemia e osteoartrites (RICHY et al. 2003; LOPES, 2009).

A unidade repetitiva contém uma hexosamina e estas unidades repetitivas são diferentes nas várias GAGs, caracterizando o tipo de GAG. Todas as GAGs, exceto o ácido hialurônico, estão complexadas a proteínas e a proteoglicanas. As GAGs têm uma distribuição variável por todo tecido conjuntivo, conforme a Tabela 1. Entre as GAGs incluem-se os seguintes compostos: o ácido hialurônico, a condroitina-4-sulfato, a condroitina-6-sulfato, o queratossulfato, o sulfato de dermatana e a heparina (BANKS, 1998; SANTOS, 2009).

Tabela 1: Tipo e Distribuição das Glicosaminoglicanas

Tipo	Distribuição
Ácido Hialurônico	Líquido sinovial, cordão umbilical, humor vítreo, tecido conjuntivo frouxo
Condroitina	Córnea
Condroitina-4-sulfato	Cartilagem, osso, córnea, aorta
Condroitina-6-sulfato	Cartilagem, núcleo pulposo, esclerótica, tendão, cordão umbilical
Queratossulfato	Cartilagem, osso, córnea, núcleo pulposo
Sulfato de Dermatana	Aorta, válvulas cardíacas, ligamento da nuca, esclerótica, pele, tendão
Heparina	Mastócitos
Sulfato de Heparina	Superfícies celulares

Fonte: BANKS, 1998.

2.4.1.2 Proteoglicanas

As proteoglicanas são conjugados de GAGs e proteínas. Devido a essas macromoléculas possuírem 95% de carboidratos, elas se comportam mais como açúcares do que como proteínas. Uma proteoglicana típica tem uma proteína central com o peso molecular de cerca de 20000 da, à qual numerosas GAGs estão complexadas (cerca de 100 cadeias de sulfato de condroitina (SC), 110 cadeias de queratossulfato e aproximadamente 15 outros oligossacarídeos) ficando com peso molecular de aproximadamente $2,5 \times 10^6$. Foram identificadas algumas regiões específicas da proteína central: região de conjugação do SC, a região de conjugação do

queratossulfato e a região de conjugação do ácido hialurônico, sendo esta última envolvida na formação dos agregados de proteoglicanas (SANTOS, 2009).

A natureza polianiônica das proteoglicanas as torna bastante adequadas para o desempenho de suas funções básicas e para sua importância biológica. Por absorverem facilmente a água, elas contribuem para formação do líquido sinovial e para as propriedades compressivas de um tecido, atuando como depósito quando o excesso de água ocupa o espaço intersticial e proporcionando uma fonte de água facilmente disponível para as células. Assim, as proteoglicanas contribuem para a estabilidade e para o suporte proporcionado pelo tecido conjuntivo e ainda colaboram com a manutenção do volume de água e com a distribuição de eletrólitos por todo organismo (BANKS, 1998).

2.4.2 CARACTERÍSTICAS DO SULFATO DE CONDROITINA

Segundo MOREIRA (2006) o Sulfato de Condroitina (SC) é um polímero natural solúvel em água altamente purificado de cadeias repetidas de moléculas denominadas mucopolissacarídeos, encontrado nas cartilagens da maioria dos mamíferos como a bovina, porcina e do homem. Caracteriza-se por ser um GAG monossulfatado de cadeia longa, variando seu comprimento médio de um tecido para outro ou dentro do mesmo tecido. Em geral, a massa molecular média das cadeias de SC diminui com a idade, estresse ou dano na cartilagem articular (RICHY et al. 2003; TOFFOLETT et al. 2005; LOPES, 2009).

Com exceção do ácido hialurônico todos os glicosamino e /ou galactosamino-glicanos são encontrados na forma de proteoglicanos. Os tipos de proteoglicanos na cartilagem apresentam-se com diferentes volumes hidrodinâmicos, fato este ligado ao número de cadeias de GAGs. Sendo que a maior parte dos GAGs encontrados em ossos e cartilagens é constituída por SC. Nas cartilagens, os condrócitos sintetizam os vários tipos de proteoglicanos que formam juntos com a matriz colagênica um complexo supramolecular que dão a este tecido a função de uma mola biológica capaz de resistir a forças de alta compressão, além de estarem envolvidos no crescimento e remodelação do tecido. As cartilagens têm um altíssimo teor de proteoglicanos que são responsáveis pela sua estrutura morfológica e pela nutrição das células cartilaginosas

(RUOSLAHTI e YAMAGUCHI, 1991; YANAGISHITA, 1993; TOFFOLETT et al. 2005).

O SC é caracterizado quimicamente como um heteropolímero aniônico linear de ácido D-glicurônico e N-acetil-D-galactosamina. O primeiro a descrever o SC foi Levene em 1925, ele mostrou que seus constituintes eram o ácido D-glicurônico, D-galactosamina, e ácido acético e sulfúrico (ROSEMAN, 2001; SANTOS, 2009). Entretanto, a sua correta estrutura foi elucidada mais tarde: composto por unidades repetidas de $[\rightarrow 4 \text{ ácido D-glicurônico } \beta 1 \rightarrow 3 \text{ N-acetil-D-galactosamina } \beta 1]$, também ficou elucidado que, nos mamíferos, a posição mais comum do radical sulfato (que determina qual o isômero formado) é o C4 e/ou o C6 da N-acetil-D-galactosamina, formando a condroitina-4-sulfato ou a condroitina-6-sulfato, respectivamente.

A condroitina-4-sulfato é chamada de sulfato de condroitina A e a condroitina-6-sulfato de sulfato de condroitina C. O sulfato de condroitina B é o sulfato de dermatana (SD), já que este possui algumas diferenças estruturais (FRANSON e HAVSMARK e SILVERBERG, 1990; LAMARI, KARAMANOS, 2006; SANTOS, 2009). Estas diferenças incluem a 5-epimerização do ácido D-glicurônico a ácido L-idurônico e a O-sulfatação no C4 e C6 da N-acetil-D-galactosamina e no C2 do ácido L-idurônico (CASU et al. 1998; SANTOS, 2009). Uma forma desse composto pode ser não-sulfatada. Esses isômeros têm uma distribuição diferenciada relacionada com o tecido, com a idade e com o estado de saúde do organismo (BANKS, 1998; SANTOS, 2009). A Figura 9 ilustra a estrutura química dos três principais tipos de SC.

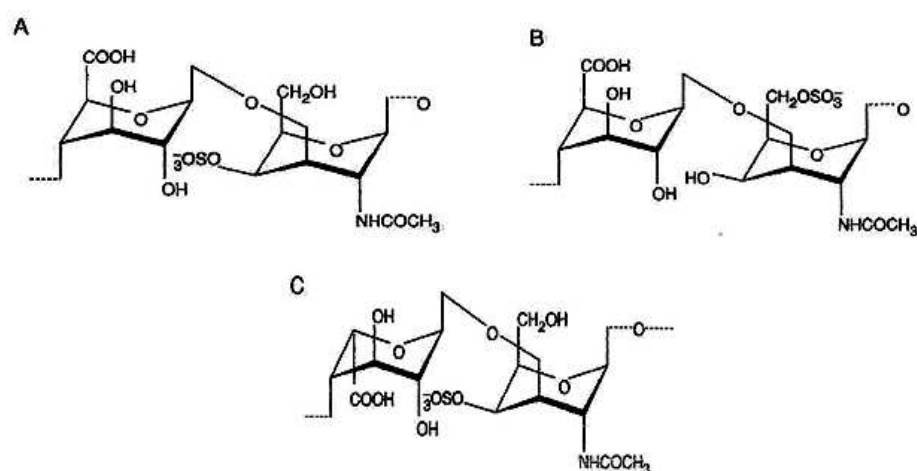


Figura 9: Estrutura química do Sulfato de Condroitina.
Fonte: PAVÃO e VILELA-SILVA e MOURÃO, 2006.

A síntese do SC começa com a proteína central sendo sintetizada no interior do retículo endoplasmático granular e sendo transportada para o aparelho de Golgi. No aparelho de Golgi ocorrem três etapas: formação da região de ligação, polimerização (alongamento das cadeias) e sulfatação dos polissacarídeos. A formação da região de ligação, que é comum a maioria das GAGs, é feita pela adição de um resíduo de xilose à uma serina específica na cadeia polipeptídica, seguida da adição de duas galactoses e um ácido glicurônico. Estas reações são catalisadas por glicosiltransferases específicas, com adição de um açúcar do respectivo uridina difosfato (PAVÃO e VILELA-SILVA e MOURÃO, 2006; SANTOS, 2009).

A polimerização envolve a adição sequencial de N-acetil-D-galactosamina e ácido glicurônico pela ação de diferentes N-acetilgalactosiltransferases e glucoroniltransferases. A sulfatação ocorre em consequência da doação de sulfatos pela 3'-fosfoadenina 5'-fosfossulfato, enquanto que a degradação de proteoglicanas em um tecido conjuntivo depende da ação sequencial de proteases, de glicosidases, de acetilases e de sulfatases (PAVÃO e VILELA-SILVA e MOURÃO, 2006; SANTOS, 2009).

As cadeias de SC possuem carga negativa, devido à presença de enxofre, que capturam as moléculas de água, dando a cartilagem característica de uma esponja. Quando a articulação está relaxada, a cartilagem absorve o líquido sinovial da cápsula articular. Quando comprimida, o fluído é espalhado pela articulação promovendo a lubrificação, nutrição e eliminação de substâncias. Além disso, apresenta ação antiinflamatória independente das cicloxigenases, atua na reparação óssea durante a ossificação endocondral, é largamente utilizado no tratamento para osteoartrite, é um importante constituinte da matriz extracelular da cartilagem (ECM) e confere desejáveis propriedades mecânicas para a mesma (GARNJANAGOONCHORN e WONGEKALAK e ENKGAGUL, 2007; FERNANDES, 2009; LOPES, 2009).

As características químicas e biológicas do SC o classificam ao grupo dos polímeros bioadesivos, assim como: o poli(acrilamida), a quitosana, polioxietileno, polietilenoglicol, polivinilpirrolidona, ésteres de poliglicerol de ácidos graxos, poli(lisina), carbômeros, alginato de sódio, goma carragena, pectina, hidroxipropilmetilcelulose e a carboximetilcelulose. O mecanismo que descreve a bioadesão de polímeros à mucosa ainda não foi totalmente esclarecido, sendo que estudos demonstram que os polímeros bioadesivos são materiais capazes de se ligarem a substratos biológicos de duas

maneiras: aderindo à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos), acredita-se que estejam envolvidos os eventos de: adsorção, espalhamento do material bioadesivo sobre a mucosa e interpenetração entre cadeias do polímero e da mucosa. A bioadesão é uma propriedade explorada como estratégia para aumentar o tempo de permanência de um medicamento no organismo, conseqüentemente, a biodisponibilidade dos fármacos pode ser otimizada e o número de doses administradas, diariamente, pode ser reduzido. Além disso, a bioadesão pode ser modulada para ocorrer em sítios específicos, diminuindo a toxicidade e aumentando a efetividade terapêutica dos fármacos (ANDREWS e LAVERTY e JONES, 2009; LOPES, 2009; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

De modo geral, as características que favorecem a bioadesividade do polímero são: a elevada massa molar, capacidade de dispersão em água, presença de grande número de grupos hidroxila, habilidade de formar ligações de hidrogênio, flexibilidade da cadeia polimérica, presença de superfície negativamente carregada, embora alguns polímeros catiônicos sejam bioadesivos; um alto conteúdo de carboxilas que promove o intumescimento e possibilita a formação de ligações de hidrogênio, podendo ocorrer também interações dos tipos eletrostática, hidrofóbica e atração de van der Waals; o pH do local, devido favorecer a formação de ligações de hidrogênio, causando baixa ionização do polímero e o ângulo de contato (φ) polímero/muco. Tais propriedades facilitam a interpenetração das cadeias poliméricas pela mucina, principal proteína do muco, permitindo o estabelecimento de interações físicas e mecânicas (LINDEN et al. 2008; NANGIA, 2008; VILLANOVA e ORÉFICE e CUNHA, 2010).

Além disso, o SC pode atuar como agente de reticulação ou reticulante, que são moléculas de peso molecular muito menor que o peso molecular da cadeia, estando entre duas ligações cruzadas consecutivas e apresentando no mínimo dois grupos funcionais reativos, ácido carboxílico e hidroxila, que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas para otimizar as propriedades mecânicas de polímeros que apresentam menor módulo de elasticidade ou rigidez e grande capacidade de deformação, conduzindo a formação de uma rede tridimensional (BERGER, et al. 2004; JUNIOR, 2008).

O estudo de HIRANO et al (2001) demonstraram que fibras de quitosana recobertas com glicosaminoglicanos ácidos, como o ácido hialurônico, os SC e a heparina, possuíam menor resistência mecânica, liberando o GAGs e acelerando a cicatrização de feridas.

No entanto, a elevada hidrossolubilidade do polímero limita a sua aplicação, podendo acarretar uma liberação prematura do fármaco quando o polissacarídeo estiver inserido como excipiente farmacotécnico. Sendo assim, as modificações químicas deste polímero natural têm sido motivo de muitas investigações, na expectativa de se reduzir a solubilidade (BUNHAK et al. 2006; REIS et al. 2006).

Neste contexto, diversos estudos acerca da eficiência do SC como carreador de fármacos têm sido conduzidos, o primeiro foi realizado por RUBINSTEIN e NAKAR e SINTOV (1992) que realizaram uma modificação química no SC na perspectiva de liberação colo-específica, uma vez que bactérias anaeróbicas do cólon, tais como *Bacteroides thetaiotaon* e *B. ovatus* degradam o sulfato de condroitina, justificando sua aplicação como candidato promissor ao transporte de fármaco para liberação específica no intestino grosso, onde se encontram bacteróides em abundância (SINHA e KUMRIA, 2001).

Em outro estudo WANG e SHEN e LU (2003) sugeriram a formação de hidrogéis de SC com vários graus de substituição e as características obtidas com esses hidrogéis demonstraram ser ideais para sua aplicação em sistemas de liberação controlada de fármacos.

2.4.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO SULFATO DE CONDRITINA PELO METACRILATO DE GLICIDILA

O monômero metacrilato de glicidila (GMA) é um composto que apresenta dois sítios de reação, contendo grupos epóxi em um dos lados da cadeia e grupos acrílicos do outro. Estas duas funções trazem benefícios na preparação de polímeros, devido este material oferecer propriedades como flexibilidade e molhabilidade oriundas da função acrílico juntamente com a resistência química proveniente do epóxi. Os homopolímeros e copolímeros baseados no GMA formam uma classe de polímeros potencialmente funcionais. A alta reatividade do grupo epóxi frente a uma larga variedade de reagentes provém novas rotas para preparar inúmeros polímeros multifuncionais através das modificações químicas, como o exemplo da Figura 10 (KUNITA, 2005; GLYCIDYL METHACRYLATE, 2012).

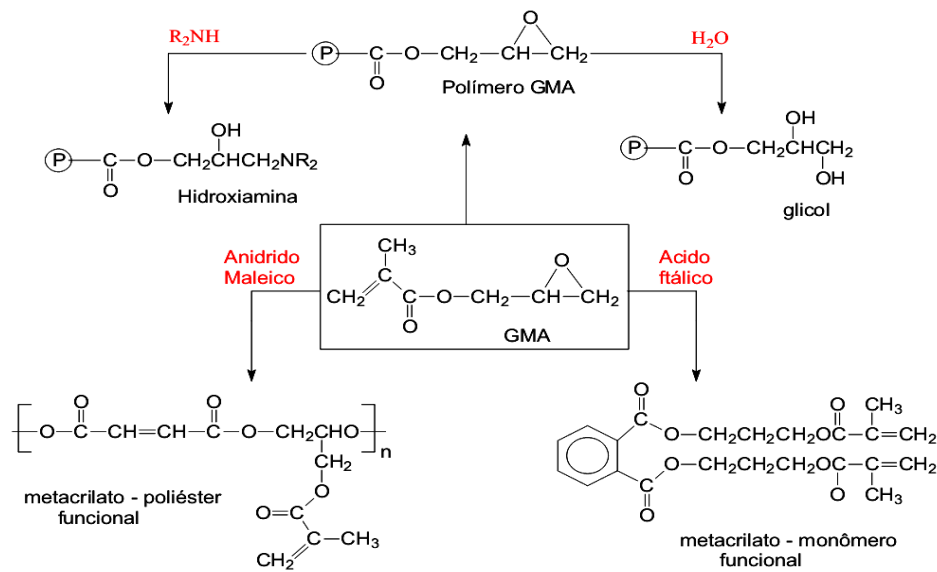


Figura 10: Reações típicas do grupamento epóxi do metacrilato de glicidila.
Fonte: KUNITA, 2005.

Estes materiais obtidos do GMA têm encontrado diversas aplicações como suporte para imobilização de enzimas, em processos cromatográficos, em processos de adesão, entre outras. O GMA apresenta reação de polimerização por adição, iniciado por peróxido de benzoíla (SELVAMALAR et al. 2003; KUNITA, 2005; GLYCIDYL METHACRYLATE, 2012), segundo o esquema da Figura 11.

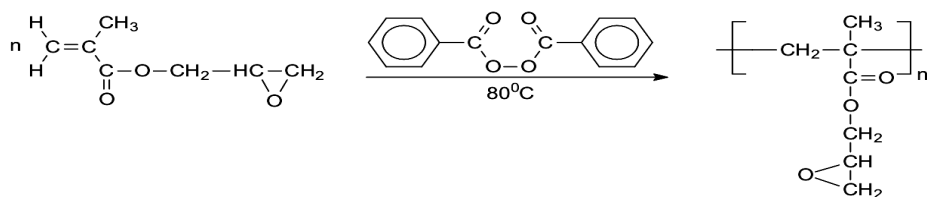


Figura 11: Esquema de polimerização do metacrilato de glicidila.
Fonte: KUNITA, 2005.

A modificação química do SC pelo GMA pode ser explicada por meio da inserção de bandas π carbono-carbono proveniente do GMA na estrutura do polissacarídeo, provavelmente, através de duas rotas de reação: a transesterificação e a abertura do anel epóxi, promovendo a abertura dos anéis de três membros constituídos por um átomo de oxigênio ligado a dois átomos de carbono unidos entre si, originando o Sulfato de Condroitina modificado por GMA (SCM) (Figura 12). A reação

de transesterificação é o termo geralmente usado para descrever a reação na qual um éster é transformado em outro através do intercâmbio do substituinte alcóxido, recebendo a denominação de alcóólise quando um éster reage com um álcool, e dependendo do álcool utilizado pode ser denominado de metanólise (metanol), etanólise (etanol) ou glicerólise (glicerol) (NICOLAU et al. 2007; REIS et al. 2008; REIZNAUTT, 2008).

A polimerização por abertura do anel epóxido possui diversas vantagens: durante a polimerização não há formação de subprodutos e todas as reações são do tipo adição; o grau de reticulação e, conseqüentemente, as propriedades finais das resinas podem ser controladas pela estequiometria do grupo epóxi/ agente reticulante; o estado físico e a rigidez dos produtos podem ser manipuladas pela adição de vários co-reagentes (alcoóis e amins primárias ou secundárias) e catalisadores, reduzindo ou aumentando a reatividade e as reações podem ser interrompidas pela diminuição da temperatura (NICOLAU et al. 2007; REIS et al. 2008; REIZNAUTT, 2008).

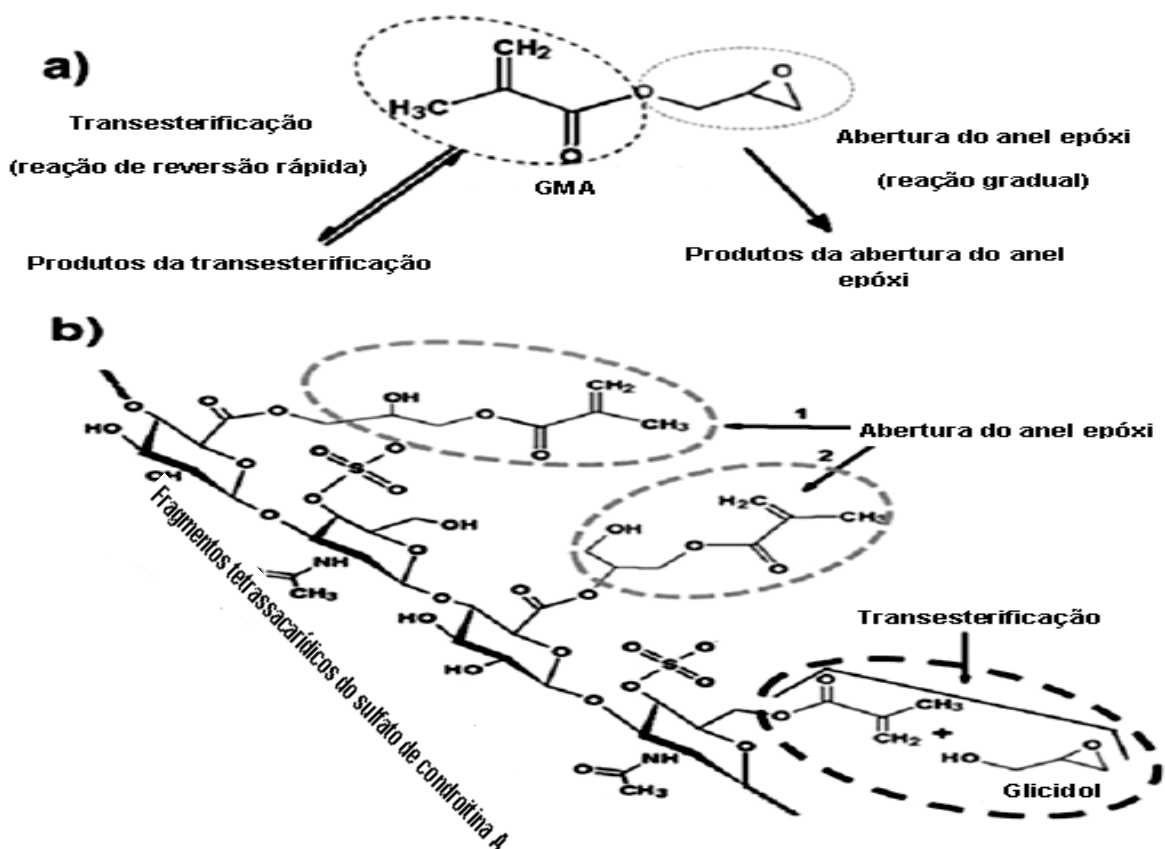


Figura 12: a) Duas diferentes rotas de reação com o Metacrilato de Glicidila: abertura do anel epóxi e a transesterificação. b) Desenho estrutural da modificação química do Sulfato de Condroitina pelo metacrilato de Glicidila através abertura do anel epóxi e da transesterificação.

Fonte: Adaptado de REIS et al. 2008.

Diversos estudos utilizam o GMA para modificar quimicamente a estrutura de um polímero, objetivando aperfeiçoar sua aplicabilidade. LOSS et al (2006) promoveram a modificação da goma arábica modificada por GMA para obter esferas de hidrogéis superabsorventes de goma arábica. MARTEL et al (2000) fizeram o ancoramento de ciclodextrinas em polipropileno enxertado com GMA para tratamento e descontaminação de águas residuais.

HUANG e LIU (1998) desenvolveram um método de enxertia de GMA em polipropileno para melhorar a compatibilização na preparação de blendas poliméricas, sendo possível devido ao anel epóxi do GMA apresentar-se reativo frente a diversos compostos que apresentem grupos funcionais tais como aminas e hidroxilas (ALLMÉR e HULT e RÅNBY, 1989; ZHANG et al. 1995).

WANG e LEE e LAI (1996) apresentaram um trabalho onde se utilizou membranas de poli(4-metil-1-penteno) (PMP) para separação de água em uma solução concentrada em etanol, sendo que para aumentar a seletividade no processo de separação de água, os autores enxertaram e sulfonaram o monômero GMA na membrana polimérica, os melhores resultados foram obtidos para a membrana de PMP com grau de enxertia de 5,8%.

2.5 Poli(N- isopropilacrilamida)

O N-isopropilacrilamida (NIPAAm) é um dos componentes do grupo de hidrogéis termosensíveis, também denominados de polímeros inteligentes ou “*smart*”, devido apresentarem alteração em sua estrutura e propriedades em resposta a uma mudança na temperatura do sistema, como por exemplo de contração e expansão. O NIPAAm (Figura 13) é um monômero sintético que pode polimerizar formando um polímero que passa a se chamar poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm) (Figura 14), que pode ser sintetizado pelos seguintes métodos: polimerização iniciada por radicais livres, iniciadas por reação redox, polimerizações iônicas, sendo que é necessário o uso de iniciadores (MOURA et al. 2002; GAO et al. 2005; VIEIRA, 2006).

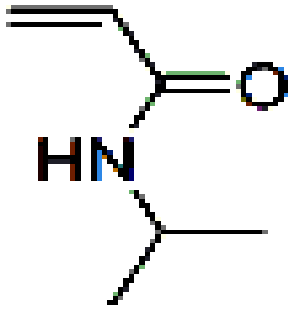


Figura 13: Estrutura Química do NIPAAm.
Fonte: CHEMICAL BOOK, 2011.

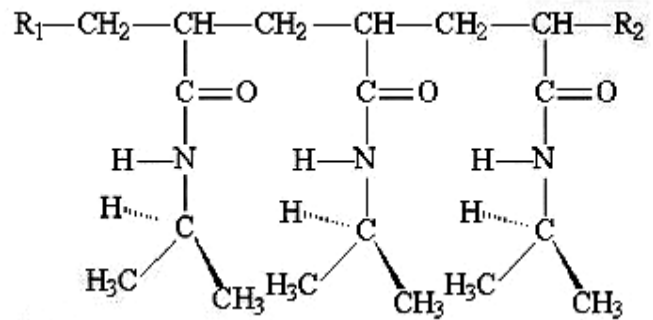


Figura 14: Estrutura Química do PNIPAAm.
Fonte: MOURA, 2005.

Na maioria das vezes, a solubilidade dos materiais aumenta com o aumento da temperatura, isto é, soluto e solvente são miscíveis se a temperatura do sistema é maior que a chamada “*upper critical solution temperature*” (UCST), porém se a temperatura apresentar valor menor que a UCST, o sistema exibe uma transição de fase e o soluto precipita, sendo denominados de sistemas com dependência positiva à temperatura. Entretanto, alguns polímeros, em solução aquosa, mostram um comportamento contrastante. Quando a temperatura aumenta acima de certo ponto, comumente chamado de “*lower critical solution temperature*” (LCST), eles tornam-se insolúveis e são ditos terem dependência negativa com à temperatura, ou seja, abaixo da LCST o polímero é solúvel em fase aquosa e apresenta cadeia extendida e rodeada por moléculas de água, enquanto que acima da LCST, o polímero torna-se insolúvel e ocorre a separação de fase (EECKMAN e MÖES e AMIGHI, 2002; VIEIRA, 2006) (Figura 15).

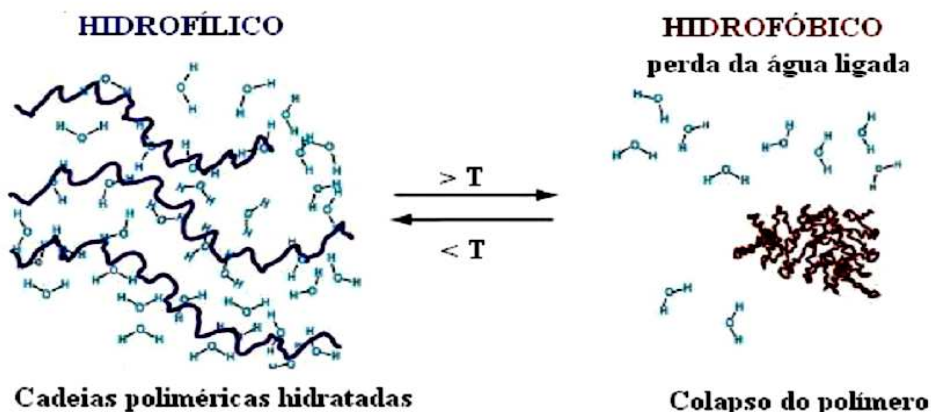


Figura 15: Representação esquemática da transição de fase para um polímero termossensível.
Fonte: VIEIRA, 2006.

O PNIPAAm é um polímero termossensível típico, com dependência negativa à temperatura, conhecido por apresentar uma LCST em meio aquoso em cerca de 32-33 °C, abaixo da qual o polímero é solúvel e acima da qual ele está em uma fase “colapsada” ou insolúvel em água. O polímero termosensível não tem somente grupos hidrofílicos amina (N-H) e carboxila (COOH), mas tem também um grupo hidrofóbico (isopropil), portanto, tanto a interação hidrofílica como a interação hidrofóbica podem ter um papel determinante na termosensibilidade deste polímero. Assim, abaixo da LCST hidrogéis de PNIPAAm possuem caráter hidrofílico, apresentando suas cadeias expandidas, devido a interações de hidrogênio entre os grupos polares desse polímero e as moléculas de água, possuindo alto grau de intumescimento, enquanto que, acima da LCST ocorre o colapso da rede por meio do enfraquecimento das interações de hidrogênio, favorecendo as interações intra e intermoleculares entre os grupos amida do polímero, expondo os grupos isopropil, assim o polímero desidrata, tornando-se insolúvel em água e levando a cadeia do polímero para uma conformação globular. A transição polimérica da fase hidrofílica para hidrofóbica é conhecida como “coil” a globular, e conduz à agregação do polímero e então, à turvação do sistema, demonstrado na Figura 16. (GAO e MOHWALD e SHEN, 2005; MOURA et al. 2005; VIEIRA, 2006).



Figura 16: Solução de um polímero termo-sensível antes (a) e depois (b) da LCST, respectivamente. Fonte: VIEIRA, 2006.

Do ponto de vista termodinâmico, o processo de mistura em temperaturas baixas, é favorecido pela formação de ligações de hidrogênio, o que leva a uma entalpia negativa de mistura. Entretanto, apesar do ganho moderado na entropia composicional resultante do processo de mistura, moléculas de água interagindo por ligações de

hidrogênio com cadeias de PNIPAAm originam uma entropia orientacional muito baixa, assim a separação de fase ocorre com o aumento da temperatura devido a uma contribuição desfavorável da entropia para a energia livre. Sendo que, para um polímero apresentar dependência negativa com a temperatura, há a necessidade de uma entalpia de mistura negativa e de uma entropia de mistura negativa. A entalpia negativa se opõe à separação, pois contribui para um decréscimo na energia livre do sistema. No entanto, em uma temperatura suficientemente alta, o termo entrópico ($-T\Delta S$), que é favorável à separação, supera a contribuição da entalpia, resultando em uma energia livre positiva, levando à separação de fase. Estes processo de dissolução/precipitação em água em resposta à temperatura são reversíveis (COSTA e FREITAS, 2002; VIEIRA, 2006).

PNIPAAm e outros géis poliméricos já têm sido utilizados como solventes extratores na concentração de soluções de proteínas e outras macromoléculas, absorvendo à temperatura ambiente, mais de 40 vezes o seu peso em água. À medida que se aumenta a temperatura, ele se contrai, passando por uma transição de fases descontínua, ou de primeira ordem, por volta de 35°C. A medida dessa expansão pode ser dada pelo grau de expansão volumétrico, definido como sendo a relação entre o volume do gel expandido e o volume do gel seco, ou pela fração volumétrica do polímero no gel, que é o inverso do grau de expansão volumétrico. A seletividade desses géis é em função de sua estrutura física, podendo, ainda, ser dependente das interações polímero-solvente, pois o gel termosensível isopropilacrilamida (IPAA) pode apresentar diferentes comportamentos de fase quando em contato com diferentes meios (OLIVEIRA e FREITAS, 1993; SOUSA et al. 1993; SOUSA e FREITAS, 1995).

O uso de hidrogéis termosensíveis como substrato para crescimento de células também é muito importante, devido proporcionarem principalmente o descolamento dessas células, pois para serem descoladas, em substratos convencionais, as células necessitam da introdução de substâncias químicas como o etilenodiamino tetra-acético (EDTA) ou enzimas proteolíticas, e este método prejudica a estrutura celular, assim, no final do processo a quantidade de células viáveis é muito pequena. Com a utilização de substratos contendo PNIPAAm, pode-se evitar esse tipo de extratificação e as células podem ser descoladas da superfícies apenas pelo resfriamento do sistema, não prejudicando a estrutura celular (HENDRICK et al. 2001; CURTI et al. 2005; MOURA, 2005).

Além disso, o comportamento térmico de PNIPAAm impulsionou pesquisas para o desenvolvimento de biomateriais como hidrogéis, micelas, cápsulas, entre outras, baseando-se na sua sensibilidade diante de mudanças na temperatura (MUNIZ e GEUSKENS, 2000; GUILHERME e RUBIRA e MUNIZ, 2002). HOFFMAN e AFRASSIABI e DONG (1986) propuseram a aplicação de PNIPAAm e seus copolímeros para a liberação controlada de fármacos, pois o fármaco, distribuído uniformemente dentro da matriz do hidrogel, deixa a matriz durante a contração do hidrogel que ocorre devido ao aumento da temperatura acima da LCST, assim, o gel se contrai e libera o fármaco, conseqüentemente, as moléculas do fármaco poderão difundir-se pelo corpo (MOURA, 2005) (Figura 17).

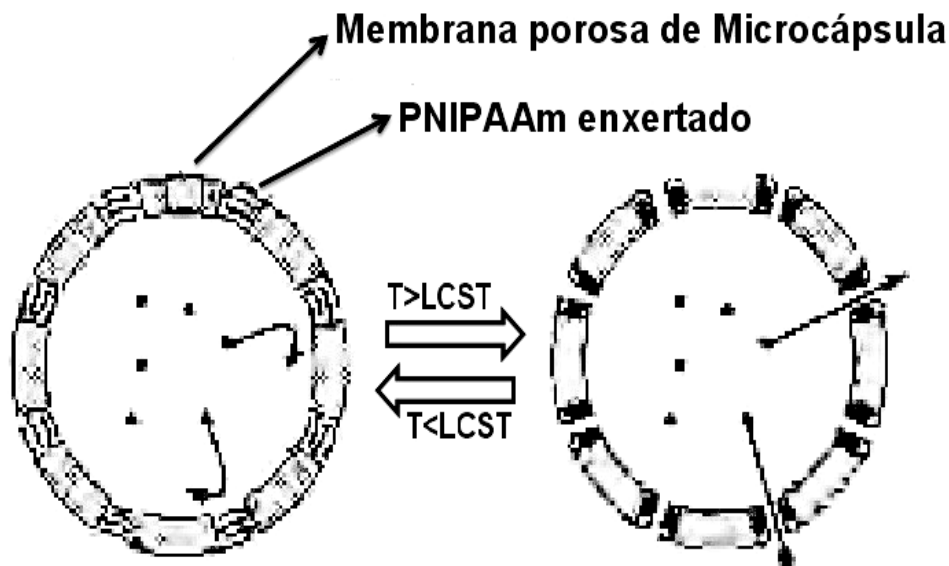


Figura 17: Comportamento estímulo-resposta de cápsulas transportadoras de fármacos, com polímero termo-sensível na estrutura da casca.

Fonte: CHU et al. 2001.

Uma séria limitação para tais aplicações é o fato de que hidrogéis de PNIPAAm apresentam propriedades mecânicas muito pobres quando intumescidos. Com o intuito de contornar esta barreira tecnológica, há procedimentos alternativos que modificam a LCST pela adição de grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos ou pela adição de cossolventes ou surfactantes, os quais agem como agentes de reticulação (MOURA et al. 2005; VIEIRA, 2006) e que demonstram ser eficientes para melhorar as propriedades mecânicas do hidrogel (MOURA et al. 2005; VIEIRA, 2006).

EECKMAN e MÖES e AMIGHI (2004) sintetizaram NIPAAm com N-vinilacetamida e com N-vinil-2-pirrolidiona e estudaram o efeito sobre a LCST, demonstrando que o polímero exibiu um aumento na temperatura de turvação pela adição de monômeros hidrofílicos ao NIPAAm.

TAKEDA et al (2004) sintetizaram NIPAAm com N,N-dimetilaminoetilmetacrilato e butilmetacrilato, que são monômeros hidrofóbicos e obtiveram resultados que mostram um decréscimo na temperatura de turvação destes polímeros relativamente ao PNIPAAm.

CAMPESE et al (2007) verificaram que redes semi-interpenetrantes (semi-IPNs) contendo PNIPAAm e alginato de Ca^{+2} exibem melhores propriedades mecânicas que o hidrogel contendo somente PNIPAAm e a temperatura de LCST do PNIPAAm em forma de semi-IPN não é afetada e verificou-se que os hidrogéis tipo semi-IPN ficam mais resistentes à medida que é aumentada a concentração de PNIPAAm de 1,3 para 5,0%.

Além disso, alterações na quantidade ou no tipo de agente de ligação cruzada, na temperatura de síntese e no tipo de iniciador também resultam em mudanças nas características desse gel polimérico (RATHJEN et al. 1995; SILVA FILHO, 2005; SILVA, 2006).

A capacidade de incorporar várias propriedades em uma única matriz, como, por exemplo, sensibilidade à temperatura, ao pH, biocompatibilidade, bioadesividade e maior resistência mecânica, é de grande valia na fabricação de dispositivos inteligentes, onde um hidrogel pode ser conectado a um biosensor que irá responder a rápidas mudanças nas condições biológicas externas. A incorporação dessas propriedades se dá com a copolimerização de dois ou mais monômeros hidrofílicos ou hidrofóbicos com propriedades específicas, ou na síntese de um gel com cadeias interpenetrantes (IPN) (LANGER e PEPPAS, 2003; XIA e MARQUEZ, 2005; SILVA, 2006).

ALVAREZ-LORENZO et al (2005) sintetizaram um hidrogel IPN contendo quitosana e PNIPAAm para formar um gel que continuou sensível à temperatura e que incorporou a mucoadesividade, características da quitosana. FEIL et al. (1992) sintetizaram um gel com três monômeros, sendo eles o NIPAAm, o dietil amino etil metacrilato e o butil metacrilato para incorporar, além da termosensibilidade, características de sensibilidade ao pH e maior estabilidade mecânica ao gel, respectivamente, conseguindo um copolímero com todas as características citadas para estudar a influência do pH e da temperatura na expansão do gel (SILVA, 2006).

2.6 Métodos de Caracterização Físico-Química

Dentre as diversas metodologias físico-químicas utilizadas para caracterizar os polímeros, destaca-se:

2.6.1 RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A Espectroscopia é o estudo da interação da radiação eletromagnética (REM) com a matéria. A interação entre a REM e a matéria pode ocorrer de duas formas: pela sua componente elétrica ou pela sua componente magnética. A ressonância magnética nuclear (RMN) é o estudo de transições entre os níveis de energia do núcleo quando colocado em um campo magnético. O núcleo do átomo é constituído de prótons e nêutrons e o princípio do RMN se baseia no fato de que núcleos com número ímpar de prótons, nêutrons ou ambos terão um spin nuclear intrínseco, isto é, tem momento angular, sendo identificados pela técnica. (NASCIMENTO e BLOCH, 2001; TANGERINO, 2006). O RMN, atualmente, é uma das mais poderosas técnicas espectroscópicas no estudo de aspectos estruturais e dinâmicos de moléculas orgânicas em solução (KAISER, 2000; SOUZA, 2009).

2.6.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

A região espectral do infravermelho compreende radiação com números de onda no intervalo de aproximadamente 12800 a 10 cm^{-1} . Os métodos quantitativos no infravermelho diferem dos métodos espectroscópicos no ultravioleta/visível devido à maior complexidade dos espectros, à menor largura das bandas e às limitações instrumentais dos aparelhos de infravermelho. A espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem sido utilizada com frequência pela indústria farmacêutica no controle de qualidade de produtos e monitoração do processo de produção. Além disso, a região do infravermelho é adequada para a análise da estrutura química de componentes dos GAGs (REICH, 2005; FOOT e MULHOLLAND, 2005; ROSSIGNOLI, 2006).

2.6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é uma técnica muito versátil e utilizada rotineiramente para a análise estrutural de materiais sólidos. O aumento máximo conseguido pelo MEV fica entre a Microscopia ótica (MO) e a Microscopia eletrônica de transmissão (MET). A grande vantagem do MEV em relação ao MO é sua alta resolução, na ordem de 2 a 5 nm (20-50 Å), atualmente existem instrumentos com até 1 nm (10 Å), enquanto que no ótico é de 0,5 µm. Comparado com o MET a grande vantagem do MEV está na facilidade de preparação das amostras. Além disso, a elevada profundidade de foco (imagem com aparência tridimensional) e a possibilidade de combinar a análise estrutural com a análise química são fatores que contribuem para o amplo uso desta técnica (MALISKA, 2007).

2.6.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL

A análise termogravimétrica (TG) é a técnica na qual a mudança da massa de uma substância é medida em função da temperatura enquanto esta é submetida a uma programação controlada. A análise térmica diferencial (DTA) é a técnica na qual a diferença de temperatura entre uma substância e um material de referência é medida em função da temperatura, enquanto a substância e o material de referência são submetidos a uma programação controlada de temperatura. (WENDHAUSEN e RODRIGUES e MARCHETTO, 2006).

2.6.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PELO MÉTODO DE FLYNN-WALL-OZAWA

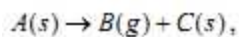
A cinética química é o estudo da dependência da extensão ou velocidade de uma reação química com o tempo ou temperatura. Os estudos cinéticos utilizam modelos matemáticos que quantificam a relação existente entre velocidade de reação, tempo e temperatura. A termogravimetria é uma técnica utilizada para medir a variação da massa de um material e para verificar sua estabilidade térmica em função da temperatura. Com procedimentos experimentais apropriados, podem ser obtidas

informações sobre a cinética de decomposição e o tempo de vida estimado do material. Existem dois métodos termogravimétricos que são normalmente utilizados para avaliar a cinética de decomposição térmica: o isotérmico e o não-isotérmico ou dinâmico, onde, diversos métodos matemáticos podem ser utilizados para a obtenção dos parâmetros cinéticos (PEREIRA, 2010).

No método isotérmico, é possível obter as curvas de TG em uma determinada temperatura, registrando a variação da massa da amostra com o tempo. No método não-isotérmico, fixa-se a razão de aquecimento β , aquecendo linearmente a amostra, e registra-se a variação da massa em função do tempo ou da temperatura. Quando compara-se as duas metodologias, percebe-se que para o caso estudado, há uma vantagem significativa na cinética não isotérmica, uma vez que essa resolve um grande problema encontrado em condições isotérmicas, ou seja, da amostra requerer algum tempo para alcançar a temperatura experimental podendo sofrer algumas transformações que afetam o resultado cinético e conseqüentemente o resultado (WENDLANDT, 1986; PEREIRA, 2010).

Para a determinação da expressão cinética apropriada para a decomposição térmica de um sólido é geralmente realizada a determinação dos coeficientes de regressão linear de todas as equações testadas, analisando-se os dados experimentais e utilizando a equação que proporcione um melhor ajuste da curva experimental. O desvio padrão é muito útil na escolha do melhor modelo cinético, e os parâmetros cinéticos E_a (energia de ativação) e A (fator pré-exponencial) ajudam na escolha do mecanismo do processo (BORCHARDT et al. 1957; SINFRÔNIO, 2006).

Em geral, a velocidade de uma reação homogênea do tipo:



é medida pela diminuição da concentração do reagente A ou o aumento da concentração de um dos produtos, à temperatura constante.

A escolha de equações cinéticas que descrevam adequadamente o mecanismo de uma reação de decomposição térmica deve obedecer algumas condições básicas, como descrever a velocidade de reação de maneira menos complexa e da melhor maneira possível e descrever o processo total dentro do intervalo de valores da fração decomposta, α , entre 0 e 1.

A maioria das reações do estado sólido pode ser representada por equações do tipo: (Equação 1)

$$g(\alpha) = k(T)t$$

Na qual: $K(T)$ = constante de velocidade;

α = fração decomposta no tempo t ;

T = temperatura.

A cinética de uma reação de decomposição térmica, de um reagente sólido (meio heterogêneo) pode ser caracterizada pelos valores dos parâmetros cinéticos ordem de reação (n), energia de ativação (E_a) e fator pré-exponencial (A), calculados para essa reação. Um grande número de modelos matemáticos tem sido desenvolvido para realização dos cálculos desses parâmetros a partir de dados de uma curva termogravimétrica, dentre eles o Método Flynn-Wall-Ozawa (FLYNN et al. 1966; ZSAKÒ, 1996; SINFRÔNIO, 2006). Este modelo essencialmente assume que A , $(1-\alpha)^n$ e E_a são independentes da temperatura do sistema, enquanto que apenas A e E_a são independentes de α . Portanto, a Equação 2 pode ser reescrita como:

$$\log F(\alpha) = \log\left(\frac{AE_a}{RT}\right) - \log \beta + \log p\left(\frac{E_a}{RT}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

Usando a aproximação proposta por Doyle (1961) para a integral com valores de $\left(\frac{E_a}{RT}\right) > 20$, obtêm-se uma simplificação da Equação (3), descrita como:

$$\log F(\alpha) = \log\left(\frac{AE_a}{RT}\right) - \log \beta + 2,315 - 0,4567 \frac{E_a}{RT} \quad (\text{Equação 3})$$

2.6.6 DEGRADAÇÃO *in vitro*

A degradação *in vitro* auxilia na interpretação do efeito de degradação dos sistemas particulados, a fim de prever a cinética de liberação da substância que posteriormente poderá incorporar o sistema. A degradação de materiais poliméricos

pode ocorrer por meio de várias reações: oxidação, redução, eliminação, isomerização, e outras, por ação de enzimas ou não (KIMURA, 1993). Na presença das moléculas de água, por exemplo, o processo de degradação ocorre por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros, ou monômeros, solúveis e não tóxicos, prosseguindo através de processos biologicamente ativos ou pela clivagem hidrolítica passiva (ELKE e ROLF-JOACHIM e WOLF-DIETER, 2003; HUANG et al 2004).

2.6.7 TAMANHO DE PARTÍCULA

O tamanho da partícula ou aglomerado tem forte influência nas propriedades de polímeros modificados com cargas poliméricas, pois, de maneira geral a resistência do compósito aumenta com a diminuição do tamanho de partícula. A forma das partículas da carga também é um fator importante para a tenacificação de termoplásticos vítreos e acredita-se que partículas com formato esférico sejam mais eficientes para exercer funções de iniciação e terminação das trincas melhorando as propriedades mecânicas do compósito. Além disso, apresenta grande influência no desempenho mecânico de materiais elastoméricos, sendo estas últimas as mais importantes por apresentarem sítios quimicamente ativos, responsáveis pela interação entre a carga e as cadeias poliméricas (AGARWAL e BROUTMAN, 1990; BOKOBZA e RAPOPORT, 2002; NAPOLITANO et al. 2004).

2.6.8 POTENCIAL ZETA

Partículas finamente divididas suspensas em um líquido carregam consigo cargas equivalentes à própria carga mais a carga da porção fixa da dupla camada. A existência da dupla camada tem como consequência efeitos eletrocinéticos. Todos esses efeitos são causados pelo fato de que a dupla camada está apenas ligeiramente ligada à superfície sólida sendo, portanto, móvel. A intensidade de todos os efeitos eletrocinéticos depende da quantidade de carga na parte móvel da dupla camada. Isto cria uma diferença de potencial muito próxima à parede e este fenômeno é conhecido como potencial zeta (ζ). É a diferença de potencial entre a partícula com a sua camada adsorvida na superfície e a solução, ou seja, é o potencial através da linha divisória

entre as partes fixa e móvel da dupla camada. A carga da parte móvel da dupla camada depende do potencial ζ e, portanto, deste potencial dependem as intensidades de todos os efeitos eletrocinéticos (CASTELLAN, 1986).

2.7 Avaliação toxicológica de polímeros

A Toxicologia é o ramo da ciência que estuda as substâncias nocivas à saúde, suas ações, seus sintomas, seus efeitos e seus contravenenos (BRITO, 1998). O termo “tóxico” pode ser considerado como sinônimo prejudicial presente num efeito químico. Além disso, as substâncias químicas podem ser preferencialmente efetivas em pequenas concentrações. Em contraste, algumas substâncias podem apresentar atividade seletiva em células provocando danos. A avaliação toxicológica compreende: a análise dos dados toxicológicos de uma substância ou composto químico com o objetivo de classificá-lo toxicologicamente e, ao mesmo tempo, fornecer informações a respeito da forma concreta de seu emprego, bem como as medidas preventivas e curativas quanto ao seu uso inadequado (LOOMIS e HAYES, 1996; LARINI, 1999).

Devido à escassez de informações toxicológicas sobre muitos compostos químicos utilizados na indústria, existe frequentemente uma tendência em considerar que compostos que possuem características químicas próximas terão propriedades tóxicas similares, porém se isto pode ser verdade para um número limitado de substâncias, este fato não pode significar uma verdade universal. Diante deste contexto, atualmente uma nova ciência tem emergido denominada de Nanotoxicologia, uma sub-área da Nanotecnologia que estuda a interação de nanoestruturas com sistemas biológicos, com ênfase em elucidar a relação entre suas propriedades físicas e químicas na indução de respostas biológicas tóxicas (POHLMANN e GUTERRES, 2010).

Em 1990, dois artigos consecutivos apareceram no “*Journal of Aerosol Scienc*” e questionaram se partículas menores do que 100 nm de diâmetro quando inaladas poderiam ocasionar uma resposta pulmonar maior do que o esperado. A administração inalatória de partículas nanométricas de óxido de titânio (TiO_2) e óxido de alumínio (Al_2O_3) causou uma resposta inflamatória significativamente maior nos pulmões de ratos em comparação com partículas maiores, com a mesma composição química. Os dois estudos foram a vanguarda de pesquisas desafiadoras que avaliavam a resposta à

exposição de partículas em escala nanométrica, considerando-se sua composição química e atividade biológica. Os efeitos específicos de tamanho foram atribuídos a um aumento da taxa de intersticialização das partículas em escala nanométrica nos pulmões, pois pesquisas concluíram que as partículas são fagocitadas nos alvéolos, neutralizadas e translocadas para o espaço intersticial. A morte de macrófagos alveolares ou disfunção promove a translocação dos alvéolos intersticiais, pois as partículas de cerca de 0,02-0,03 μm diâmetro penetram mais facilmente do que as partículas de 0,2-0,5 μm de diâmetro, sendo que pequenas partículas costumam formar agregados. O seu tamanho aerodinâmico determina a deposição nas vias aéreas, após a deposição, podem desaglomerar, se o tamanho da partícula primária é de 0,02-0,03 μm a desaglomeração pode afetar a translocação das partículas mais do que para os agregados constituídos por partículas com dimensões maiores (FERIN et al. 1990; OBERDORSTER, 2000; MAYNARD e WARHEIT e PHILBERT, 2011).

Esta declaração delineou dois aspectos emergentes de materiais que podem potencialmente mediar efeitos toxicológicos: tamanho de partícula e comportamento dinâmico. Em estudos de acompanhamento, foram descobertos mais associações entre a físico-química do material e os seus efeitos, mais notadamente o papel da área de superfície de partículas na mediação de toxicidade pulmonar. Usando amostras de TiO_2 de dois tamanhos diferentes de partículas primárias foi demonstrado que enquanto as respostas inflamatórias após inalação em ratos dependia do tamanho da partícula, normalizaram em relação a área de superfície, conduzindo a um tamanho invariante em função da dose-resposta.

MAYNARD e KUEMPEL (2005) mostraram que uma gama de materiais insolúveis normalmente classificados como "poeiras inoportunas" originam uma curva dose-resposta semelhante para a inflamação pulmonar em ratos, porém, materiais mais quimicamente ativos, tais como quartzo cristalino demonstraram uma diferença marcante em relação a dose-resposta (OBERDORSTER, 2000; MAYNARD e WARHEIT e PHILBERT, 2011).

Em 2005, o Comitê Científico da Comissão Europeia de Emergentes e Recentemente Identificados Riscos para a Saúde (SCENIHR) publicou uma avaliação completa do estado da ciência sobre os riscos potenciais associados com os produtos artificiais e acidentais das nanotecnologias. Foi um dos primeiros de uma longa série de avaliações e análises de toxicologia de materiais em nanoescala que têm ajudado a identificar questões emergentes em torno dos impactos potenciais à saúde destes

materiais, e, embora o estado da ciência tenha mudado desde a sua publicação, questões fundamentais foram identificadas pela comissão e que se mantêm atuais. Na revisão da literatura, a comissão identificou três mediadores em nanoescala de toxicidade: tamanho de partícula, forma e composição química.

Baseando-se em evidência de toxicidade material que foi influenciado pela forma física, bem como composição química, SCENIHR et AL. (2005) pesquisaram como esses três mediadores podem potencialmente afetar a biodisponibilidade, biointeração e exposição tendo como influência a dose. Mecanismos específicos de toxicidade destacaram lesão do tecido epitelial, inflamação, estresse oxidativo, e alergia, concluindo que não há dados suficientes disponíveis para identificar quaisquer regras genéricas que regem a toxicologia, ecotoxicologia e nanotoxicologia (SCENIHR, 2005; MAYNARD e WARHEIT e PHILBERT, 2011).

Atualmente, além da administração inalatória de partículas nanométricas, a indústria farmacêutica utiliza nanoestruturas poliméricas como alternativa eficaz para desenvolver sistemas de liberação controlada de fármacos devido apresentarem versatilidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, possibilidade em modificar suas características adicionando ou removendo grupos específicos e de projetar mecanismos ou sistemas diferentes de liberação de drogas (SOUSA et al. 2005), sendo recomendado por muitas organizações científicas que além das análises físico-químicas, sejam também realizadas avaliações toxicológicas que caracterizem o tipo de efeito tóxico que os polímeros são capazes de produzir (OGA e CAMARGO e BATISTUZZO, 2006).

No entanto, há polímeros que apresentam baixa toxicidade, porém podem causar efeitos colaterais aos indivíduos, que é o caso do monômero sintético ϵ -caprolactama, pois apesar dos estudos de genotoxicidade in vitro e in vivo por via oral e intraperitoneal mostrarem em sua grande maioria, resultados negativos em ratos, camundongos e coelhos, os epidemiológicos indicam a possibilidade de causar inflamações oculares e cutâneas, irritações no sistema respiratório, hipotensão, taquicardia, palpitações, rinorréia, ressecamento nasal, efeitos geniturinários, distúrbios nas funções menstrual e ovariana, complicações no parto e problemas neurológicos e hematológicos (BOMFIM e ABRANTES e ZAMITH, 2009).

O mecanismo mais aceito para os nanomateriais causarem efeitos adversos é devido se apresentarem em escala de macromoléculas biológicas e prestam-se a hibridização, uma vez que foi comprovado que macromoléculas como o DNA tem sido

usado para solubilizar nanotubos de parede única de carbono altamente hidrófobos e é esta escala que permite que ácidos nucleicos, lípidos, proteínas e outras macromoléculas sejam susceptíveis a interagir com a superfície de nanomateriais para produzir danos, por exemplo, os nanotubos de parede única de carbono têm sido mostrados para reprodutivelmente ganhar acesso a núcleos de células e induzir quebras de DNA de partículas ou a formação de núcleos. O reconhecimento de nanomateriais por macromoléculas biológicas ocorre devido um processo de adsorção nas superfícies disponíveis, o qual é frequentemente associado com as fases iniciais da inflamação, conhecidos como opsonização (ALEXIS et al. 2008; DAWSON e SALVATI e LYNCH, 2009; GAUCHER et al. 2009).

Devido a troca dinâmica de macromoléculas entre o espaço externo e a superfície do nanomaterial, dependente da localização anatômica do material, provavelmente ocorrem pelo menos três resultados biológicos: (1) as interações entre fluidos biológicos e matrizes podem causar danos ao alvo, esquemas que são concebidos para proporcionar modificações altamente funcionais de nanomateriais para locais anatômicos específicos e os efeitos podem aumentar no exterior do alvo (2) a adsorção de elementos da cascata do complemento podem ativar ou inibir os processos inflamatórios que normalmente permite que o corpo elimine efetivamente ameaças biológicas e ambientais em escala nanométrica (3) o nanomaterial em si pode fornecer uma plataforma estável para a entrega inadequado de moléculas bioativas em locais anatômicos e iniciar processos de sinalização celular que desencadeiam um efeito adverso ou benéfico se adequadamente concebidos (SERDA et al. 2009; CVETICANIN et al. 2010; MOGHIMI et al. 2010).

Muitos dos nanomateriais que estão em produção em massa são estáveis, susceptíveis de persistirem no corpo e a natureza dinâmica das interações entre a interface do material nanométrico e a superfície biológica aumentam a complexidade do que precisa ser conhecido na avaliação do provável resultado biológico (YAMAMOTO et al. 2010; MAYNARD e WARHEIT e PHILBERT, 2011).

Diante disso, a indústria farmacêutica, considerando a interseção entre o uso benéfico, biointerações e o impacto do potencial biológico, tem preferencialmente utilizado uma variedade de excipientes inteligentes para administração orientada que se dissolvem com o tempo e dão origem a produtos químicos solúveis que são facilmente eliminados na urina e / ou fezes, reduzindo assim o potencial para efeitos de bioacumulação e de atingirem um local fora do alvo. Outras abordagens usam a

dissolução do nanomaterial para reduzir a ativação mediada pelo complemento após admissão para o espaço vascular (GAO e PHILBERT e KOPELMAN, 2008; MAYNARD e WARHEIT e PHILBERT, 2011).

A eliminação do material torna-se mais complicada quando a superfície do material é revestido com a segmentação de ligantes na liberação de nanodispositivos para um local anatômico específico ou tipo de célula, por exemplo, misturas de copolímeros de ácido poliláctico-glicólico e nanopartículas de polietileno-glicol foram enxertadas com sucesso em um certo número de ligantes como o Herceptin (anticorpo anti-HER₂), sendo demonstrado o efeito de segmentação quantitativamente controlada por duas vias principais: (1) ajustando a proporção de mistura de copolímero da matriz de nanopartículas com mudanças concomitantes na geometria da superfície e alterações na densidade de ligante sobre a superfície de nanopartículas (2) ajustando a relação molar de herceptina para aminas livres que aparecerem na superfície de nanopartículas (BORM et al. 2004; POPE et al. 2004).

Alguns dos efeitos adversos das nanopartículas *in vivo* estão relacionados à resposta inflamatória, com exacerbação da doença das vias respiratórias e dos eventos cardiovasculares causadas por hipercoagulabilidade ou desestabilização da placa aterosclerótica. Muitos destas conclusões são derivados a partir de estudos sobre as partículas em nanoescala que podem causar uma resposta inflamatória, porém não podem ser extrapoladas a nanopartículas em geral, e eles podem ser menos relevantes para nanomateriais (LIANG et al. 2009).

Um estudo realizado por VALCARENGHI (2006) demonstrou que o polímero natural Quitosana-Ferro (III) não causa efeitos sobre o sistema nervoso autônomo, sistema motor e tônus muscular, avaliados pelas observações comportamentais; o tratamento com o polímero não alterou o ganho de peso dos animais tratados em relação ao grupo controle; os parâmetros bioquímicos e hematológicos não foram alterados com a administração do polímero, sugerindo ausência de toxicidade devido a permanência do ferro no complexo; a análise macroscópica, peso e deposição de ferro nos órgãos não sofreram alterações significativas em relação ao grupo controle demonstrando sua segurança.

Os testes toxicológicos também são realizados em polímeros naturais provenientes de espécies vegetais como no estudo desenvolvido por GARCIA et al (2009) em que determinaram a ingestão de água, o consumo de ração, ganho de peso

e possível efeito tóxico decorrentes da ingestão de três doses (10%, 25% e 50%) do derivado do polímero de mamona (*Ricinus communis*), adicionado à água de bebida de ratos da espécie *Rattus norvegicus*. Observou-se que a ingestão do polímero de mamona reduziu a ingestão de ração (10% e 50%) e o ganho de peso (10% e 25%) em relação ao grupo-controle, provavelmente relacionado à palatabilidade do produto. Entretanto, numa segunda fase experimental (estudo multigeracional) não se verificaram efeitos tóxicos, nas proles, como má formação externa e alterações incompatíveis com a vida, apesar de ter havido redução no peso dos machos e das fêmeas da segunda geração (GARCIA et al. 2009)

IARC (1994) e RICE (2005) em seus estudos demonstrarem os efeitos carcinogênicos da acrilamida em animais experimentais e suas propriedades mutagênicas em células de mamíferos, apesar de a acrilamida não ter apresentado mutagenicidade no teste de Ames para *Salmonella*, porém sua administração induziu mutações genéticas e aberrações cromossômicas em células de roedores *in vivo* e *in vitro*. FAO/WHO (2005) evidenciou em suas pesquisas que a genotoxicidade da acrilamida parece estar relacionada com a sua biotransformação em glicidamida, que mostrou maior potencial mutagênico que a própria acrilamida em uma determinada dose. Além disso, demonstrou em estudos de toxicidade reprodutiva com roedores redução da fertilidade, efeitos letais dominantes e efeitos adversos na morfologia e no número de esperma em machos, após a administração de doses de acrilamida maiores que 7 mg/kg pc/dia, enquanto que em fêmeas nenhum efeito adverso na fertilidade foi observado e mostrou-se não teratogênica em ratos ou camundongos (FAO/WHO, 2005).

Uma pesquisa desenvolvida por LO PACHIN (2005) mostrou que embora os estudos realizados com animais experimentais tenham implicado a carcinogenicidade e a genotoxicidade como possíveis consequências da exposição à acrilamida, a neurotoxicidade é o único efeito adverso identificado através de estudos epidemiológicos envolvendo populações humanas ocupacionalmente expostas.

VIHOLA et al (2005) estudaram a citotoxicidade de géis sintéticos PNIPAAm em culturas de células intestinais e do pulmão em função da concentração polimérica, do tempo e temperatura de incubação, entre outros fatores, obtendo resultados de baixa ou nenhuma toxicidade, ao contrário de seu monômero NIPAAm que apresentou um certo grau de toxicidade. MALONNE et al (2005) também não encontraram grau de toxicidade em seus experimentos preliminares em ratos com o PNIPAAm.

Um estudo realizado por KREIN (2003) em ratas prenhas com o polímero natural SC demonstrou que não houve alteração nos índices de fertilidade e reprodutivos das mães entre os grupos; o desenvolvimento ponderal e consumos de água e ração também não foram alterados pelo tratamento com diferentes doses de SC, quando comparados com o grupo controle; não ocorreram sinais de toxicidade materna; não foram encontradas alterações estatisticamente significativas ($p < 0,05$) nos percentuais de malformações esqueléticas, não se mostrando teratogênico para ratas Wistar (KREIN, 2003).

Em termos gerais, tais estudos toxicológicos, quando aplicados em animais de laboratório e sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias em humanos, a partir da extrapolação dos resultados obtidos nestes estudos (BARROS e DAVINO, 1996). Neste caso, os resultados de exames hematológicos e bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação devem ser realizados, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA et al. 2003).

Todavia, o número de animais usados em pesquisas é algo cada vez mais discutido, principalmente pelo caráter ético, em relação ao grande número e ao sofrimento causados a esses em pesquisas (REPETTO e MARTINEZ e REPETTO, 1995).

Para este fim, alguns testes toxicológicos preliminares são realizados com o intuito de se pesquisar a atividade de produtos naturais de maneira mais rápida e sem a necessidade de animais de experimentação, que cada vez mais estão sendo submetidos a um controle rigoroso de aceitação. Estes são os chamados testes toxicológicos *in vitro* (ROGERO et al. 2003).

Os métodos *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* tais como poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos mais facilmente além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. O problema da extrapolação dos dados obtidos *in vitro* para a aplicação clínica dos biomateriais pode ser superado pelo uso de materiais de referência apropriados, atualmente em uso em clínicas (ROGERO et al. 2003).

Esses métodos alternativos *in vitro*, compreendem a utilização de organismos como bactérias, fungos, algas, crustáceos e também suspensões celulares e cultivo de tecidos, para que substitua ou sirvam como prévia para um estudo toxicológico *in vivo*,

melhorando a sensibilidade e especificidade de testes com animais (BEDNARCZUK et al. 2010).

2.8 Métodos para avaliação toxicológica

Dentre as diversas metodologias para avaliação toxicológica utilizadas para analisar as possíveis propriedades tóxicas dos polímeros, destaca-se:

2.8.1 BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM *ARTEMIA SALINA* LEACH

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas dois parâmetros envolvidos: sobrevivência ou morte. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e portanto é considerado um ensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.

Estudos relatam que o microcrustáceo *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é utilizado para determinar toxicidade de produtos naturais e químicos, considerando que estas larvas apresentam sensibilidade a substâncias tóxicas, além de ser considerado um teste rápido e barato (CAVALCANTE *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2003; PRETTO, 2005). A simplicidade com que pode ser manuseado, a rapidez dos ensaios e o baixo custo favorece a sua utilização rotineira em diversos estudos, além do que tais ensaios de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral (MEYER *et al.* 1982; LUNA *et al.* 2005).

Em ambiente propício como em água salina em combinação a luz e oxigênio, os ovos deste microcrustáceo tornam-se hidratados, rompendo a membrana de eclosão e liberando o náuplio (primeira fase de vida livre do animal) a nadar ativamente (VEIGA e VITAL 2002, SORGELOOS *et al.* 1978, GOMES, 1986).

O náuplio, durante suas primeiras 24h, se alimenta da própria camada que envolve seu corpo, chamada de vitelo, sendo assim, ainda não necessita da filtração para se alimentar, ficando protegido de agentes tóxicos do meio. Após essas primeiras 24h, passa-se para fase de metanáuplio I, II e III, nessas fases o organismo já inicia atividade de filtração, dependendo disso para se alimentar, assim tornando-se suscetível aos agentes contidos no meio (SORGELOOS *et al.* 1978). Sendo assim,

obtem-se uma taxa de sobrevivência do náuplio ao produto testado, ou seja, observam-se os danos causados ao organismo teste e a concentração que provoca a morte de 50% dos mesmos, representada pela sigla CL₅₀ (CAVALCANTE et al, 2000; BAROSA et al, 2003).

MCLAUGHLIN et al (1998) relatam que esse ensaio tem boa correlação com atividade citotóxica em alguns tumores humanos sólidos e levou à descoberta dos Annonaceous acetogenins como nova classe de agentes antitumorais ativos. No mesmo estudo foi observado os valores de dose efetiva 50% (DE₅₀) encontrados para citotoxicidade, em geral eram 1/10 dos valores de concentração letal 50% (CL₅₀) encontrados nos testes realizados com *Artemia salina*, sugerindo que tal teste pode ser utilizado como uma primeira análise do potencial citotóxico de novos compostos.

A determinação da toxicidade preliminar a partir do cálculo da CL₅₀ do copolímero SCM+NIPAAm 5% em microcrustáceo *Artemia salina* foi realizada a partir da metodologia original descrita por MEYER et al (1982), MCLAUGHLIN et al (1998) e VEIGA (1989), com pequenas modificações.

2.8.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Citotoxicidade é um termo abrangente que significa, em linhas gerais, morte celular induzida. Está presente em todos os organismos multicelulares e unicelulares e em mamíferos a citotoxicidade pode ser causada pela atividade lítica direta de uma célula citotóxica (atividade fagocítica e receptores de morte, por exemplo) ou pela secreção de moléculas líticas solúveis (defensinas, componentes do sistema complemento, TNF, perforina/granzimas, por exemplo) (PONS e OLIVEIRA, 2011).

A citotoxicidade basal é definida como os efeitos adversos resultantes da interferência com estrutura e/ou processos celulares essenciais para a sobrevivência, proliferação e/ou função comum a todas as células do organismo. A avaliação da citotoxicidade basal é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. A citotoxicidade basal é expressa como CL₅₀ (concentração letal a 50% das células quando comparado às células controle não-tratadas), a qual pode ser matematicamente calculada a partir da curva de concentração-efeito (OGA, 1996).

As metodologias que utilizam tecidos e células vivas são as mais empregadas, pois a intrínseca complexidade celular é mantida. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes vitais (ROGERO et al. 2003).

Vários métodos aplicados para testar a toxicidade geral são úteis na toxicologia *in vitro*. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente a função celular mensurada utilizando diferentes alvos.

MOSMANN (1983) descreveu uma técnica para quantidades elevadas de amostras, onde as células são semeadas em microplacas e a viabilidade celular é avaliada por métodos colorimétricos, utilizando a redução do MTT, brometo de [3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio], um sal de tetrazólio, de cor amarelada, que é reduzido por enzimas redutases mitocondriais de células metabolicamente ativas em cristais azuis de formazan que são solubilizados e posteriormente analisados por espectrofotometria UV/visível. Assim, quanto menor for a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor o sinal espectrofotométrico. Esta técnica é rápida e quantitativa, pois permite avaliar várias concentrações do produto e calcular a concentração que causa 50 % de morte celular.

2.8.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL

Por definição, a toxicidade aguda avalia o efeito nefasto produzido dentro de um curto período de tempo e que resulta da administração de uma dose única. Neste contexto, a avaliação da toxicidade aguda fornece uma estimativa das propriedades tóxicas de uma substância, visando dar subsídios a cerca dos riscos à saúde resultantes de uma exposição de curta duração e servir de alicerce para estabelecer um regime posológico para pesquisas sobre toxicidade crônica (BRITO, 1994).

Segundo OGA e CAMARGO e BATISTUZZO (2008) a toxicidade aguda é definida como os efeitos adversos que ocorrem dentro de um período curto após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. Sendo a dose única utilizada para determinar a potencia da substância em casos de ingestão ou envenenamento acidental e as doses múltiplas são usadas para avaliar os efeitos

cumulativos, escolhendo a via de administração de acordo com o modo de exposição humana.

A avaliação toxicológica é de fundamental importância para eficácia terapêutica, pois este padrão visa à detecção e avaliação do potencial tóxico, para o homem, de qualquer substância ou produto químico acabado, ao qual possa estar exposto (BIGHETTI et al. 2004).

O teste de toxicidade aguda por dose fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), é um destes métodos alternativos, que avalia a toxicidade aguda oral, na qual se evita utilizar o critério morte dos animais como objetivo final e propõe a observação do aparecimento de sinais de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas, permitindo, desta forma, classificar a substâncias testada de maneira compatível com o sistema empregado pela União Europeia, o qual qualificava pelos valores de DL_{50} oriundos do teste clássico de toxicidade aguda (OECD 420, 2001; VALADARES, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é o de realizar a caracterização físico-química das partículas de sulfato de condroitina e N-isopropilacrilamida e dos copolímeros Sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida (denominados SCM+NIPAAm 5%, SCM+NIPAAm 2,5% e SCM+PNIPAAm 2,5%) e a avaliação toxicológica parcial de um destes copolímeros que apresentar as melhores propriedades de um eficiente carreador de fármacos, selecionado a partir dos ensaios de caracterização físico-química.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a estrutura química dos sistemas particulados a partir da Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear;
- Analisar os seus componentes químicos através da Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier;
- Analisar sua morfologia através da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- Estudar seu comportamento térmico por meio das técnicas termoanalíticas: Termogravimetria e Análise Térmica Diferencial;
- Realizar a cinética de degradação pelo método de Flynn-Wall-Ozawa dos sistemas particulados;
- Analisar a degradação *in vitro* dos sistemas particulados;
- Determinar sua carga superficial através da análise do Potencial Zeta;
- Avaliar o tamanho de partículas;
- Avaliar a citotoxicidade em células PC-12 de feocromocitoma de rato, pelo método do MTT;
- Determinar a toxicidade (CL₅₀) em microcrustáceo *Artemia salina*;
- Avaliar a toxicidade aguda oral em camundongos;

4 MATERIAL E METÓDOS

4.1 Materiais

Os sistemas poliméricos SCM, SCM+NIPAAm 5%, SCM+NIPAAm 2,5%, SCM+PNIPAAm 2,5% (Tabela 2) foram gentilmente cedidos pela EMBRAPA Amazônia Oriental e o NIPAAm foi obtido da empresa Sigma-Aldrich® para efetuação das análises, destacando que o polímero sintético NIPAAm encontra-se em diferentes concentrações e o terceiro copolímero apresenta a forma polimerizada do NIPAAm, o PNIPAAm.

Para a realização da síntese do SCM+NIPAAm 5%, os materiais utilizados foram: sulfato de condroitina (SC) de origem bovina, grau de pureza $\geq 95\%$, livre de encefalopatia espongiiforme bovina, doado pela empresa Solabia Biotecnológica LTDA (Maringá, Brasil); os tubos de celulose de alta retenção (D-0530, lote 103H0525) com largura média plana de 32 mm (1,3 polegadas), MWCO 12.400 Da (99,99% de retenção de diálise) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®; NIPAAm - N-isopropilacrilamida (Sigma-Aldrich®); GMA - metacrilato de glicidila (Acros Organics®); álcool benzílico P.A. (Nuclear® - Brasil); etanol 99,8 % (Nuclear® Brasil); ácido clorídrico P.A. (Nuclear® - Brasil); Persulfato de sódio (Sigma-Aldrich®); TEMED - N, N, N', N'-tetrametiletilenodiamina (Sigma-Aldrich®); TSP-d43 - '(tri) propiônico-2,2,3,3-d₄ de ácido sal sódico (Sigma-Aldrich®).

Os demais reagentes e solventes foram de grau analítico ou ultrapuro.

Tabela 2: Descrição dos sistemas poliméricos avaliados neste trabalho

Sistemas Poliméricos	Identificação
SCM	Sulfato de Condroitina modificado por GMA
NIPAAm	N-isopropilacrilamida
SCM+NIPAAm 5%	Sulfato de Condroitina modificado por GMA +N-isopropilacrilamida 5%
SCM+NIPAAm 2,5%	Sulfato de Condroitina modificado por GMA +N-isopropilacrilamida 2,5%
SCM+PNIPAAm 2,5%	Sulfato de Condroitina modificado por GMA +Poli-N-isopropilacrilamida 2,5%

4.2 Métodos

4.2.1 SÍNTESE DO COPOLÍMERO SULFATO DE CONDROITINA-CO-N-ISOPROPILACRILAMIDA

Para a realização dos dos testes toxicológicos, especialmente os testes *in vivo*, há necessidade de uma quantidade significativa do copolímero, sendo assim foi realizada a síntese do copolímero SCM+NIPAAm 5% exatamente como descrito no procedimento realizado por REIS et al (2010).

Primeiramente foi realizado a modificação do sulfato de condroitina com metacrilato de glicidila, através de uma massa de 22,5 g de sulfato de condroitina e 4,6 g de metacrilato de glicidila solubilizados em 150 mL de água destilada, ajustando o pH para 3,5 ao adicionar 1,3 mL de HCl concentrado, sendo observado a formação de um líquido opalescente após uma reação de 24 horas a temperatura 50°C a 800rpm (Agitador Magnético Microprocessado com Aquecimento - Q261M23 - QUIMIS). O material modificado foi separado por filtração sob pressão reduzida e diálise em água ultra-pura, sendo que a água foi renovada a cada 12 h durante um período total de 72 h.

Após esse tempo, foi preparado 50 mL de uma solução aquosa contendo 15% de SCM e 150 mL de álcool benzílico, desoxigenando-a com borbulhamento de N₂ por 15 minutos sob a adição de 5% do NIPAAm na solução. A seguir, foram adicionados à mistura, 10 mg do agente iniciador persulfato de sódio sob agitação constante de 6000 rpm (QuimisV R, dispersor Extratur V), sendo posteriormente adicionados 0,2 mL do catalisador N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) a uma temperatura de 25 °C a 1200 rpm por 15 minutos (QuimisV R, Dispersor Extratur V).

Posteriormente, foram adicionados 500 mL de acetona, ocorrendo a agregação das partículas e filtração a vácuo do precipitado, resultando em partículas de SCM+NIPAAm 5% após 4 horas do processo, sendo analisada sua pureza por meio das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

4.2.2.1 Ressonância magnética nuclear

Neste estudo, foram utilizados 30 mg das amostras de SCM, NIPAAm e dos copolímeros solubilizados em água deuterada (D_2O) para análise de hidrogênio (1H) no aparelho de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (Varian, modelo Mercury Plus BB 300 MHz), com ângulo de pulso de 90^0 , pertencente ao Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Faculdade de Química (UFPA).

4.2.2.2 Espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier

As amostras de SCM, NIPAAm e copolímeros (1 mg) foram analisadas nas seguintes condições: 150 mg de pastilhas de brometo de potássio (KBr), scan 64, resolução 2 cm^{-1} e na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , em um espectrômetro de Infravermelho Thermo Electron Corporation IR 100 Spectrometer, pertencente ao Laboratório de Laboratório de Pesquisa e Análise de Combustíveis (LAPAC) da Faculdade de Química (UFPA).

4.2.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

O SCM e os copolímeros foram inicialmente metalizados, isto é, depositadas em fitas de cobre dupla face e recobertas por uma fina película de ouro, e observados em aparelho de emissão de MEV (LEO 1450 VP), pertencente ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Instituto Evandro Chagas (IEC).

4.2.2.4 Análise termogravimétrica e Análise térmica diferencial

Neste trabalho, 5,0 mg de cada uma das amostras de SCM, NIPAAm e copolímeros foram depositadas em cadinho de alumina submetida as razões de aquecimento de 5^oC, 10^oC e 20^oC/min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N₂) em uma termobalança (Shimadzu, modelo DTG 60H), pertencente ao Laboratório de Catálise e Oleoquímica (LCO) da Faculdade de Química (UFPA).

4.2.2.5 Cinética de degradação pelo método de Flynn-Wall-Ozawa

O estudo de degradação térmica foi realizado nas razões de aquecimento de 5^oC, 10^oC e 20^oC/min⁻¹ e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N₂) em uma termobalança (Shimadzu, modelo DTG 60H), pertencente ao Laboratório de Catálise e Oleoquímica (LCO) da Faculdade de Química (UFPA). A energia de ativação (E_a) foi determinada pelo método de Flynn-Wall-Ozawa. Para o cálculo dos parâmetros cinéticos foram utilizados os dados de termogravimetria das curvas obtidas à 5^oC, 10^oC e 20^oC/min⁻¹ do segundo evento do SCM+NIPAAm 5%.

4.2.2.6 Degradação *in vitro*

O ensaio de degradação *in vitro* foi realizado em tampão fosfato pH 7,4 contendo azida sódica 0,01% a 37^oC, durante 11 semanas (HAUSBERG e DELUCA, 1995; CROTTS e SAH e PARK, 1997; COSTA, 2008) no Laboratório de Controle de Qualidade da Faculdade de Farmácia da UFPA. Inicialmente, foram pesados exatamente 10mg do copolímero SCM + NIPAAm 5% em tubos cônicos de 1,5 mL do tipo Eppendorf[®]. A cada tubo foi adicionado 1,0 mL de tampão fosfato pH 7,4 e mantidos em incubadora a 37^oC com a 80 r.p.m (SP Labor- SP 200) e a cada semana, as amostras foram coletadas e centrifugadas a 10.000 r.p.m durante 5 minutos (Centrifuga Biovera RB7-R). Em seguida, o meio aquoso foi removido com micropipetador e o mesmo volume de água ultrapura do tipo Milli-Q[®] (1 mL) foi adicionado para lavagem das microesferas. Após, centrifugação, a temperatura ambiente, uma quantidade suficiente de partículas foi armazenada em dessecador

em temperatura ambiente para posterior pesagem em balança analítica (SHIMADZU AUJ).

4.2.2.7 Tamanho de partícula

Para análise do tamanho de partículas, foram utilizados 10 mg do copolímero SCM+NIPAAm 5% introduzido em um capilar de quartzo e analisadas em um aparelho Zetasizer 300ES (MALVEN INSTRUMENTS, Malvern, UK) com um feixe de laser no comprimento de onda de 670 nm a 258^oC, pertencente ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia da EMBRAPA Gado de Leite (Belo Horizonte, MG).

4.2.2.8 Potencial Zeta

Para a determinação do Potencial Zeta, foi utilizada uma suspensão do copolímero SCM+NIPAAm 5% em azida sódica 0,05% (m/v) em diferentes valores de pH (4, 6 e 8), realizado em um aparelho Zetasizer 300ES (MALVEN INSTRUMENTS, Malvern, UK) com um feixe de laser no comprimento de onda de 670 nm a 258^oC, no Laboratório Nacional de Nanotecnologia da EMBRAPA Gado de Leite (Belo Horizonte, MG). A concentração dos copolímeros foi ajustada para cerca de 1 mg / mL (ALVES, 2011).

4.2.3 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE

4.2.3.1 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina* Leach

Para eclosão dos cistos de *A. salina*, foi preparada uma solução salina adequada ao desenvolvimento do microcrustáceo composta de sal marinho bruto em água destilada não clorada (30 g/L), tamponada com bicarbonato de sódio (NaHCO₃) a fim de ajustar o pH da solução em um valor entre 8 - 9, com o uso de um potenciômetro digital (Meter[®]). A solução foi homogeneizada e filtrada em papel de filtro comum, aerada por agitação e transferida para um aquário de vidro com capacidade adequada, dividido em

duas partes: a parte clara, separada por uma tampa de material plástico com uma pequena entrada, iluminada e aquecida por uma lâmpada incandescente de 40 W, e a parte escura, coberta por papéis para que não passasse a luz transmitida pela lâmpada. Foram adicionados na parte escura cerca de 50 mg de cistos do microcrustáceo *Artemia salina*. Tal procedimento foi adotado para que os náuplios (larvas) viáveis passassem da parte escura para a clara por fototropismo.

Os cistos ficaram nesta solução por 24 h, em temperatura de cerca de 28 °C, tempo suficiente para eclosão dos mesmos e a migração dos respectivos náuplios viáveis para a zona clara do aquário. A solução foi mantida sob aeração com auxílio de uma bomba de ar para aquário.

Os períodos de incubação dos cistos foram estabelecidos conforme trabalhos anteriores realizados com a espécie, sendo de 24 horas, como proposto por VEIGA (1989) e 48 horas, como proposto por MEYER et al. (1982).

a) Preparação do copolímero SCM + NIPAAm 5% e realização do ensaio

Para o bioensaio de toxicidade, foram preparadas diferentes concentrações do copolímero SCM + NIPAAm 5%: 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL solubilizado em solução salina 0,9 % (v/v), perfazendo um total de 5 mL/tubo para cada concentração e controle.

Os ensaios foram realizados em triplicata em tubos de vidro de 20 x 2 cm. Em cada um dos tubos foi adicionado 10 - 13 exemplares de *A. salina* viáveis e mantidos por mais 24 e 48 horas sob iluminação e temperatura de cerca de 28 °C. Após esse período, foi feita a contagem das artemias vivas e mortas com auxílio de uma lupa e o cálculo da CL₅₀ (adaptado de MEYER et al. 1982).

Para o cálculo da CL₅₀ e respectivos intervalos de confiança, foi usado o método de Probitos (FINNEY, 1971), empregando-se o software free GraphPad 5.0.

O bioensaio de toxicidade em *A. salina* foi realizada no Laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da UFPA.

4.2.3.2 Avaliação da citotoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade, foram utilizadas células PC 12 derivadas de feocromocitoma de rato, adquiridas da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) e mantidas em meio Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) com alta concentração de glicose, acrescido de 0,1% de uma mistura de antibióticos composta por 5mg/mL de penicilina, 5 mg/mL de estreptomicina e 10 mg/mL de neomicina, suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 10% de soro eqüino, em atmosfera umidificada composta de 95% de ar e 5% de CO₂, a 37% em incubadora HEPA CLASS 100 da Thermo Electron Corporation® (GREENE e TISCHLER, 1976). A troca do meio foi feita a cada 3 dias.

As células, mantidas em tubos criogênicos imersos em nitrogênio líquido, foram descongeladas e cultivadas a cada 4-5 dias em frascos estéreis de 75 cm² para cultivo celular (TPP Techno Plastic Products AG®, Switzerland). Para cada passagem, as células foram desagregadas do frasco com solução de tripsina (Sigma-Aldrich®) a 0,25% (m/v), neutralizada com o próprio DMEM suplementado na proporção de duas vezes o próprio volume de tripsina 0,25% e a solução centrifugadas a 2000 r.p.m. (687 xg, Centrífuga Excelsa Baby 208 N® - Fanem) por 2 minutos e o *pellet* ressuspenso em DMEM. Para contagem das células, foi usado a câmara de Neubauer (Bright Line, Boeco®) e a viabilidade foi testada com corante Trypan Blue 0,4 % (Invitrogen®) (FRESHNEY, 1987).

Para realização dos experimentos, foram utilizadas células após a 2^a ou 3^a passagem (quando havia cerca de 90 – 95 % de confluência) e com viabilidade celular superior a 80%. Os meios de cultura e demais reagentes utilizados no cultivo das células foram adquiridos da Gibco™.

a) **Preparação do copolímero SCM + NIPAAm 5% para os ensaios *in vitro***

O copolímero SCM + NIPAAm 5% liofilizado foi dissolvido em solução de NaCl 2 % (m/v) na concentração inicial de 20 mg/mL. A solução foi agitada em vortex (Biomixer®) por cerca de 1 minuto e mantida em banho de ultrassom (Ultrasonic Cleaner 2840 D - Odontobrás®) por 15 minutos, e em seguida a solução foi alíquotada em diferentes concentrações (2000, 1000, 500, 250 e 100 µg/mL) em câmara de fluxo laminar para uso nos ensaios de viabilidade celular.

b) Ensaio de Viabilidade Celular

O ensaio foi realizado pela técnica do MTT (brometo de [3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio]), proposto inicialmente por MOSSMAN (1983) e CARMICHAEL et al. (1987). A técnica do MTT é um ensaio quantitativo para determinar a viabilidade celular por meio da interrupção da atividade mitocondrial, através da absorção do sal MTT pelas células, sendo reduzido no interior da mitocôndria pela da enzima succinato desidrogenase, a um produto chamado formazan. Este produto, acumulado dentro da célula, é extraído através da adição de um solvente apropriado. Desta forma, é fornecida uma medida da função mitocondrial e, conseqüentemente, da viabilidade celular.

Para realização deste ensaio, foi utilizado o procedimento descrito por HANSEN e LACIS e PRATHER (1989) com pequenas modificações: $2,0 \times 10^4$ células/poço foram incubadas com diferentes concentrações do copolímero SCM + NIPAAm 5% em placas estéreis de 96 poços (TPP Techno Plastic Products AG[®], Switzerland) por 24 e 48 h. O meio de cultivo foi então desprezado e 20 μ L de MTT (Sigma-Aldrich[®]) na concentração de 5mg/mL (m/v) em solução salina tamponada foram adicionados em cada poço (concentração final: 0,5 mg/mL). Em seguida a placa foi incubada por 3 horas a 37°C sob agitação em um agitador térmico (Thermomixer Confort - Eppendorf[®]), na ausência de luz.

Foi realizado um controle positivo (células + solução salina tamponada + solução de MTT) e um controle negativo (células + Triton X-100 0,2% + solução de MTT). Após o período de incubação, o sobrenadante foi desprezado por inversão da placa e secagem em papel toalha e para que ocorresse lise celular, foram adicionados 200 μ L de dimetilsulfóxido (DMSO) P.A. (Sigma-Aldrich[®]) em cada poço. A placa foi colocada em agitador térmico (Thermomixer Confort - Eppendorf[®]) à 37°C por 5 minutos em 700 r.p.m. e a absorbância da solução foi determinada em $\lambda = 570$ nm, usando-se uma leitora de microplacas Multiskan FC - Thermo Scientific[®]. O solvente de lise celular (DMSO P.A.) foi usado como branco de reagentes.

A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis com relação ao grupo controle (solução salina 2% m/v).

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Laboratório de Fármaco/ Toxicodinâmica do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, em Ribeirão Preto/SP.

4.2.3.3 Avaliação da toxicidade aguda oral

Para a realização dos testes de toxicidade aguda foram utilizados camundongos (*Mus musculus* L. (1758), família Muridae), var. albino, linhagem Swiss, machos, com cerca de 6-9 semanas e peso inicial de 30-33 gramas, provenientes do Biotério do Instituto Evandro Chagas (IEC). Os mesmos foram previamente aclimatados por 5 dias, mantidos na Sala de Experimentação da Faculdade de Farmácia da UFPA, em ambiente com temperatura controlada (23 ± 3 °C), umidade em torno de 40-70%, ciclo de luz/escuro de 12 h, baixos níveis de ruídos e com contínua exaustão de ar. Não houve necessidade de procedimentos como o enriquecimento ambiental.

Os animais foram mantidos com água filtrada (oferecida através de “bebedouros” próprios) e ração peletizada para roedores (Biobase - Biotec[®]) *ad libitum* em caixas de polipropileno (50x35x15 cm) com tampa metálica, forradas com palha de arroz seca e isenta de qualquer tratamento antiparasitário ou antimicrobiano (para evitar qualquer interferência nos testes de toxicidade) em número máximo de 6 animais por caixa (que foi devidamente etiquetada para constar todos os dados de variação de peso, consumo de água e ração e o estado fisiológico diário dos mesmos) durante todo período, da aclimação ao último dia de experimentação, e posteriormente foram transportados para o Laboratório de Toxicologia (anexo à sala de experimentação) e submetidos à sedação e inconsciência profunda para realização dos procedimentos descritos abaixo.

Em animais totalmente inconscientes por utilização de anestesia profunda (induzida pela mistura de 2 partes de Cloridrato de Cetamina 100 mg/mL + 1 parte de Xilazina 25 mg/mL, na dose de 2,5 mL/kg, totalizando uma dose (em mg/kg) aproximada de 166,7 mg de Cloridrato de Cetamina e 20,8 mg Xilazina, por via intraperitoneal), foi feita abertura da cavidade abdominal e torácica (craniana, para retirada do cérebro) com auxílio de tesouras e pinças cirúrgicas próprias, para ressecção total dos órgãos e acondicionamento em recipientes previamente

preenchidos com formalina tamponada, para avaliação anátomo-histopatológica. As demais partes (carcaça) foram mantidas congeladas em sacos próprios para descarte biológico até o momento de serem recolhidas para incineração, no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFPA.

Todos os procedimentos com animais foram realizados dentro das mais rígidas normas de experimentação animal, de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, segundo as Normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório - SBCAL (nova denominação do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (CoBEA) e do recém-criado CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, Lei nº. 11.794, publicada no DOU de 08/10/2008).

Para garantir o cumprimento das diretrizes preconizadas pelo Comitê de Ética do Uso de Animais de Laboratório, o trabalho envolvendo animais (manuseio, treinamento e inspeção geral da qualidade de acomodação dos animais) contou com o apoio e supervisão do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira, médico veterinário e patologista clínico, professor Associado II da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da UFPA - CEPAE/UFPA (Parecer BIO134-13 em Anexo 1).

a) Procedimento para avaliação da toxicidade aguda oral

Para os testes de toxicidade aguda oral do Copolímero Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida, foram utilizados os Procedimentos de Dose Fixa da OECD 420, na sua versão revista adotada em 2001 (OECD *GUIDELINE* 420), com algumas adaptações. Este procedimento, apesar de usar muito menos animais do que o da DL₅₀ provê informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método DL₅₀, onde a morte do animal não é uma meta. Observa-se cuidadosamente o aparecimento de sinais claros de toxicidade em uma de uma série de níveis de doses fixas (BRITO, 1994).

Camundongos machos foram aclimatados na Sala de Experimentação da Faculdade de Farmácia da UFPA por, pelo menos, cinco dias antes da administração do copolímero (reconstituído em solução salina 2% m/v, a fim de evitar a polimerização

e formação de gel) e a solução cuidadosamente administrada por meio de gavagem, através de sonda gástrica de aço inox de 4 cm (Becton & Dickinson™ Co). Os animais foram divididos em caixas de uma maneira que não impedia a observação precisa de cada um, a temperatura local, umidade e ciclo luz/escuro e outras condições serão as mesmas já supracitadas.

Os níveis de dose para o copolímero foram estabelecidos para, no máximo, 3 doses suficientemente espaçadas (2000, 200 e 20 mg/kg), a fim de mostrar os efeitos tóxicos e as diferentes taxas de mortalidade. Grupos controle serão tratados apenas com solução salina 2 % (m/v). Caso a dose de 2000 mg/kg não produza mortalidade nos grupos tratados, não haverá a necessidade de ser administrados doses inferiores. O volume administrado nos animais da substância-teste não deverá exceder a 10 mL/kg de peso corporal do animal. Foi utilizado um nº. de 6 animais por grupo.

Os animais foram observados durante um período de 15 dias. foi realizada uma avaliação ou screening hipocrático, fornecendo uma estimativa geral da natureza farmacológica e toxicológica de uma substância em questão, como: estado consciente e disposição, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos, atividade sobre o SNC e SNP (MALONE e ROBICHAUD, 1983; BRITO, 1994).

Ao final dos 15 dias de observação, os animais foram submetidos à eutanásia (pela mistura constituída de duas partes de cloridrato de cetamina + 1 parte de xilazina, na dose de 2,5 mL/kg i.p., conforme descrito acima) e os órgãos resseccionados para avaliação anátomo-histopatológica. O procedimento de ressecção dos órgãos de cada animal não ultrapassou 10 minutos de duração, suficiente para não causar lesão tecidual por hipóxia celular antes da fixação por formalina dos cortes histológicos. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Toxicologia da UFPA e as análises anátomo-histopatológicas foram realizadas no Laboratório de Patologia Clínica Animal do Instituto de Saúde e Produção Animal da Universidade Federal Rural da Amazônia (ISPA/UFRA).

4.3 Análise Estatística

Para a avaliação da citotoxicidade, todos os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o teste de Análise de Variância (ANOVA) *one way* ou *two way* (dependendo do experimento) seguido do *pos-hoc* teste de Bonferonni ou um teste não paramétrico (Mann-Whitney *Test*). Para o bioensaio com *A. salina*, o cálculo da CL_{50} e respectivos intervalos de confiança, foi usado o método de Probitos (FINNEY, 1971). Nos testes de toxicidade aguda oral (avaliação da variação de ganho ponderal, consumo de água e ração) entre os animais não tratados (grupo controle) e os animais tratados, os dados foram expressos como média \pm desvio padrão da média e as análises estatísticas foram realizadas empregando-se o Teste *t* de Student para dados não pareados. Todos os testes foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism™ version 5.00 for Windows® (*GraphPad Software free*, San Diego, Califórnia, USA), adotando-se $p < 0,05$ como nível de significância.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização Físico-Química

5.1.1. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

Na análise de RMN avaliou-se os sinais de prótons característicos das partículas de SCM, NIPAAm, SCM +NIPAAm 5%, SCM +NIPAAm 2,5% e SCM +PNIPAAm 2,5%. Primeiramente, analisou-se a modificação química do SC pelo GMA por meio de uma reação de transesterificação ou pela abertura do anel epóxi, objetivando reduzir a solubilidade do polissacarídeo, originando o composto apresentado pela Figura 18 (REIS et al. 2006; LEE e HUANG e LEE, 2007; REIS et al. 2008).

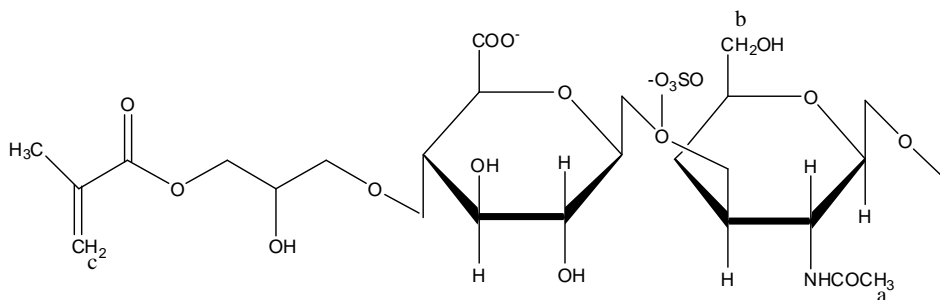


Figura 18: Sulfato de Condroitina modificado pelo Metacrilato de Glicidila
Fonte: Adaptado de LEE et al (2007) e REIS et al (2008).

Os sinais de hidrogênios que confirmam a reação entre o SC e o GMA são observados no espectro RMN ^1H na Figura 19, o qual apresenta sinais característicos do SC observados em 1,92 ppm e 3,69 ppm, relacionados aos hidrogênios do grupo metílico (a) e metilênico (b), respectivamente. A presença do GMA é representada pelos sinais 6,08 ppm e 5,66 ppm que indicam os hidrogênios do carbono vinílico (c) presente em sua estrutura. Os dados destacados encontram-se de acordo com a literatura, pois os estudos de LEE e HUANG e LEE (2007), REIS et al (2008) e REIS et al (2010) também confirmaram a eficácia da modificação química do polissacarídeo pelo GMA por meio da identificação dos sinais apresentados neste estudo.

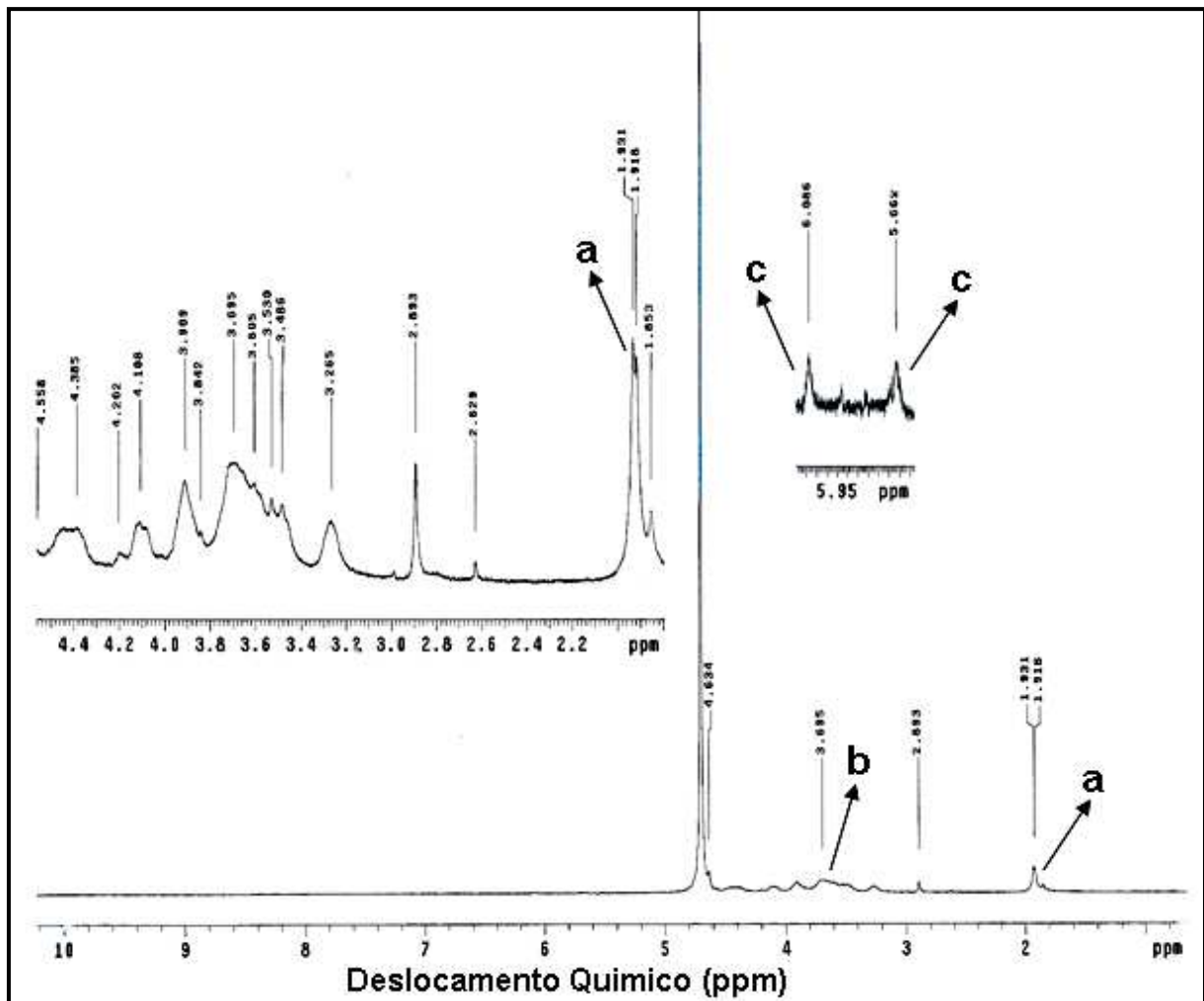


Figura 19: Espectro de RMN ¹H obtido de 30 mg do SCM em água deuterada (D₂O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b) e vinílico (c).

Os sinais de prótons que caracterizam o NIPAAm (Figura 20) no espectro de RMN ¹H estão em torno de 1,01 ppm; 3,90 ppm e 6,13 ppm (Figura 20), correspondentes aos hidrogênios dos grupos metílico (a), metilênico (b) e metínico (c), respectivamente, corroborando com o estudo de GONZALEZ (2008) destacando os sinais apresentados para confirmar a presença do NIPAAm em um composto polimérico com o ácido acrílico; VIEIRA (2006) confirmando a terpolimerização de poli(N-isopropilacrilamida)-co-poli[(monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉metil éter] ao observar os sinais referentes ao NIPAAm e ROBB et al (2007), ao identificarem os sinais em destaque no copolímero poli(NIPAAm-co-cisteamina).

Após confirmar a modificação química do polímero natural e caracterizar o NIPAAm é verificado a formação do copolímero SCM +NIPAAm (Figura 22) devido a perda da conjugação dos grupos éster (REIS et al. 2010).

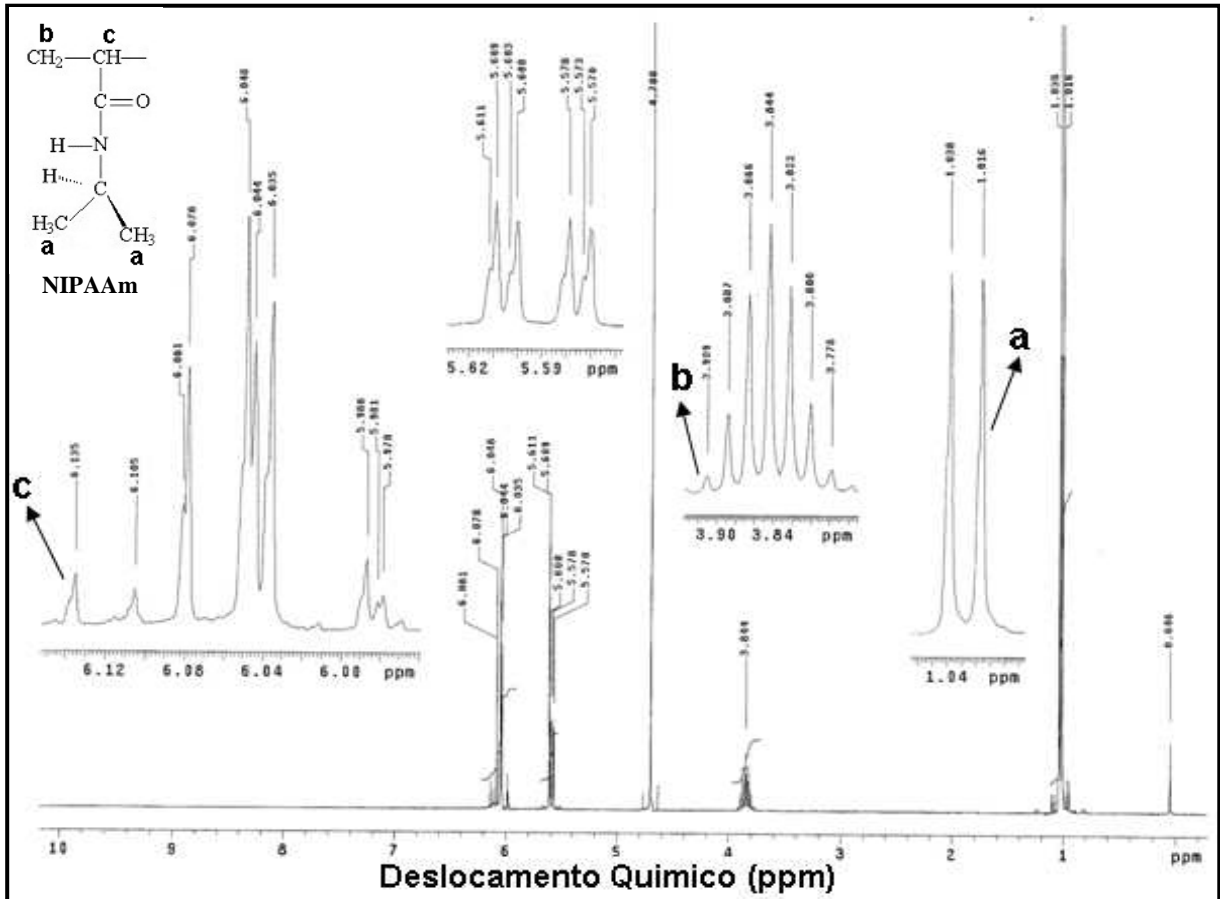


Figura 20: Estrutura e Espectro de RMN ^1H obtido de 30 mg do NIPAAm dissolvido em água deuterada (D_2O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b) e metínico (c).

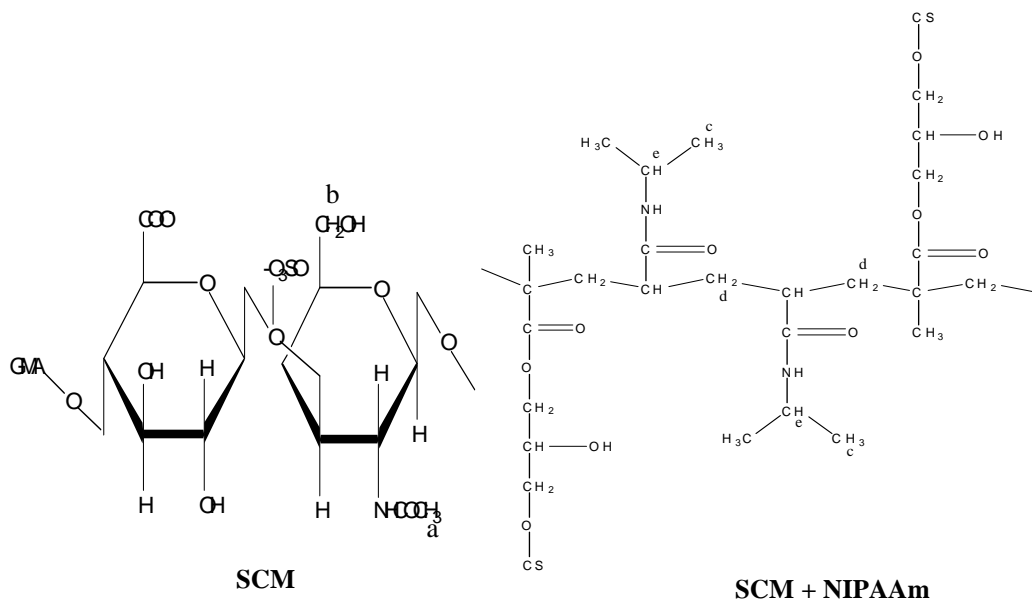


Figura 21: Estrutura química do Sulfato de Condroitina modificado (SCM) e Copolímero Sulfato de Condroitina modificado + N-isopropilacrilamida (SCM + NIPAAm).
Fonte: Adaptado de LEE et al (2007) e REIS et al (2008).

A Figura 22 demonstra o êxito da reação de copolimerização, uma vez que o espectro RMN ^1H da amostra SCM +NIPAAm 5% demonstra sinais característicos de ambos os polímeros. A identificação do SCM é evidenciada pelos sinais 1,92 ppm; 3,69 ppm referentes aos hidrogênios dos carbonos metílico (a), metilênico (b), respectivamente (LEE e HUANG e LEE, 2007; REIS et al. 2008; REIS et al. 2010). O NIPAAm é caracterizado pelos sinais referentes a 1,14 ppm, 1,97 e 3,90 ppm correspondentes dos hidrogênios dos grupos metílico (c), metilênico (d) e metínico (e), respectivamente, estando de acordo com a literatura (VIEIRA, 2006; ROBB et al, 2007; GONZALEZ, 2008). Os sinais destacados também estão presentes no espectro de RMN ^1H referente ao copolímero SCM+NIPAAm 2,5%, indicando que a concentração diferenciada do polímero sintético não interfere na estrutura química do composto (Figura 21).

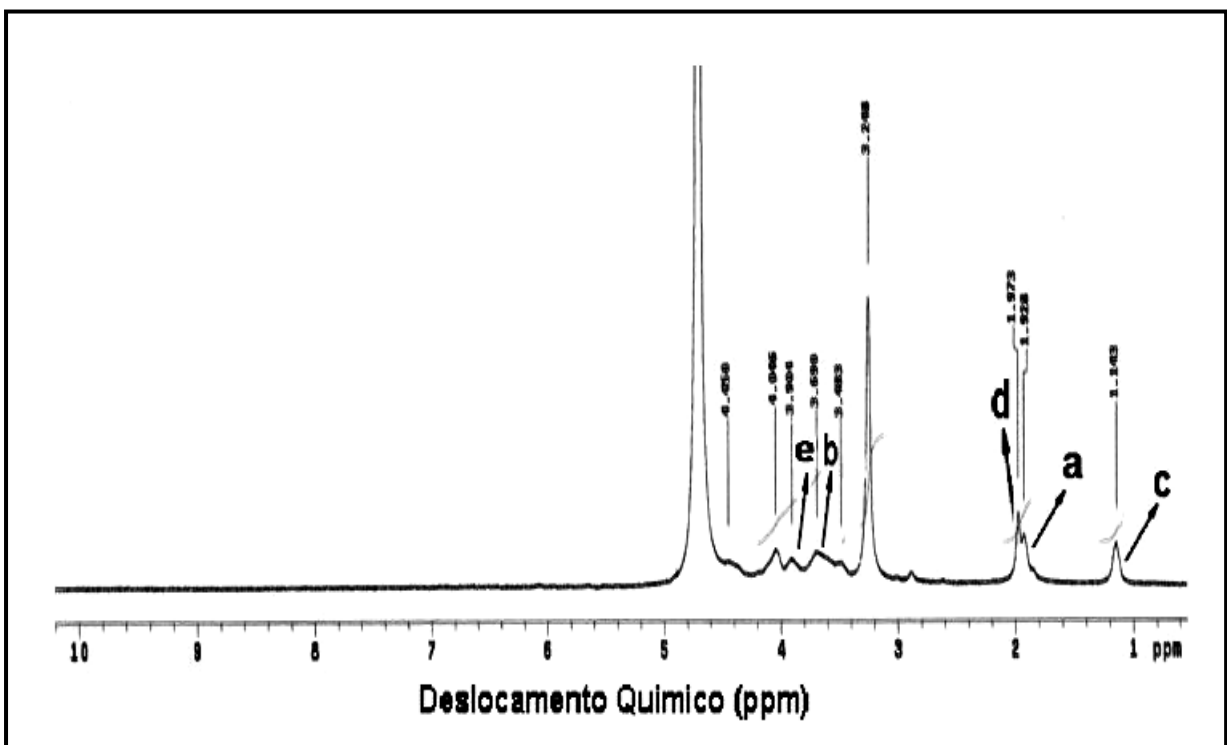


Figura 22: Espectro de RMN ^1H obtido de 30 mg do copolímero SCM+NIPAAm 5% dissolvido em água deuterada (D_2O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b), metílico (c), metilênico (d) e metínico (e).

Além disso, o copolímero SCM+PNIPAAm 2,5% também apresentou igual estrutura química em relação aos demais copolímeros, demonstrando que a polimerização do NIPAAm antes da reação com o polissacarídeo não promove

modificações estruturais no composto, como pode ser observado na Figura 23, que apresenta os mesmos sinais de destaque da figura anterior.

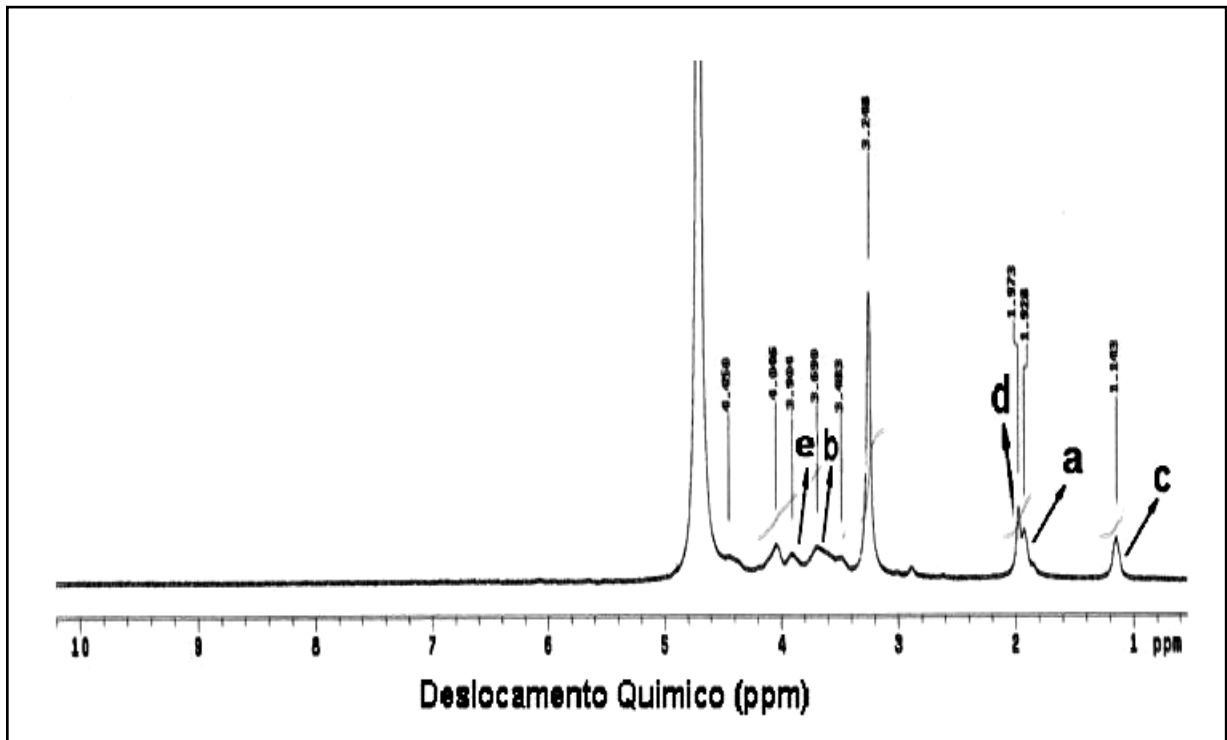


Figura 23: Espectro de RMN ^1H obtido de 30 mg do copolímero SCM+PNIPAAm 2,5% dissolvido em água deuterada (D_2O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b), metílico (c), metilênico (d) e metínico (e).

O aparecimento de sinais que identificam estruturalmente ambos os polímeros confirma a eficácia da copolimerização para formação do produto Sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida (SCM + NIPAAm), independente da concentração estudada do polímero sintético e da sua polimerização antes da reação com o SCM, uma vez que todos demonstraram características de sinais de prótons iguais.

MACEDO (2010) através da análise de RMN ^1H demonstrou a inclusão do fármaco trimetoprima na cavidade do complexo polimérico 2 Hidroxipropil gama Ciclodextrina. MARTINI (2010) por meio da análise de RMN ^1H e ^{13}C observou a formação de oligoésteres e poliésteres para as reações envolvendo os ésteres metílicos epoxidados obtidos de polímeros derivados do biodiesel do óleo de linhaça.

MATHEW e KURIAKOSE (2013) confirmaram a encapsulação da proteína albumina proveniente do soro bovino em nanopartículas de prata por meio da análise de RMN ^1H .

DOMÍNGUEZ et al (2013) observaram que os espectros de RMN ^{13}C de resina de lignina fenólica e resina comercial confirmaram a substituição do grupo hidroximetil ligados por pontes metilênicas indicando a reação de condensação típica de polímeros termoresistentes.

5.1.2 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER

Os componentes estruturais das partículas SCM, NIPAAm, SCM+NIPAAm 5%, SCM+NIPAAm 2,5% e SCM+PNIPAAm 2,5% foram analisados por FTIR. O espectro da Figura 24 demonstra que o SC apresenta banda de absorção de deformação axial na região de $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, atribuído a hidroxila (OH) e os picos ao redor de 2950 cm^{-1} representam a vibração dos carbonos sp_3 (CH_3) e sp (CH), corroborando com os dados de LEE e HUANG e LEE (2007) que demonstraram as regiões destacadas para caracterizar o sulfato de condroitina em seu estudo. As bandas em torno de 1715 e 1638 cm^{-1} correspondem a vibrações da deformação axial do grupo carbonila (C=O) e da dupla carbono - carbono (C=C), respectivamente, confirmando a modificação do polímero pelo GMA, assim como observado nos estudos de GUILHERME et al (2010) e REIS et al (2010) que afirmaram a interação entre o GMA e o polímero por meio da identificação das bandas de absorção em destaque e KUNITA (2005) ao identificar as bandas de absorção após modificar o polipropileno com GMA.

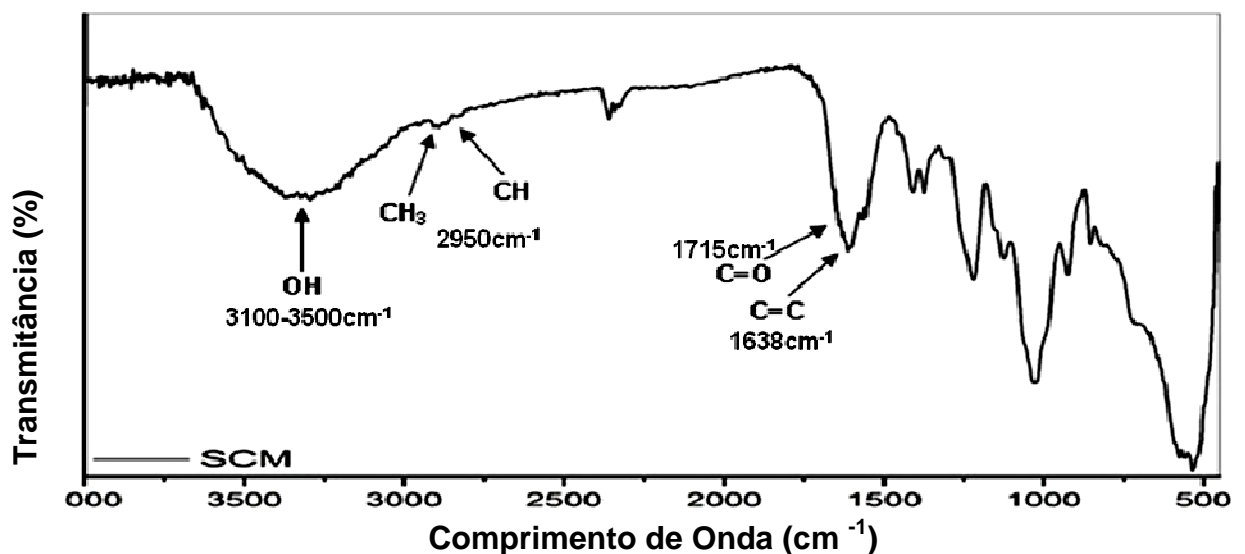


Figura 24: Espectro FTIR obtido de 1mg do SC modificado pelo GMA com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

A Figura 25 apresenta o espectro do NIPAAm caracterizando-o por meio das bandas de absorção em torno de $2972\text{-}2875\text{ cm}^{-1}$ atribuído ao carbono sp ligado ao carbono metílico ou vinílico, ao redor de 1604 cm^{-1} , relacionado a deformação axial da vibração amida II (N-H), 1540 cm^{-1} , que representa a deformação axial angular característico do estiramento amida I (N-H) e 1446 cm^{-1} referente ao estiramento do carbono sp_2 (CH_2), estando de acordo com SOUSA (2009) ao confirmar a presença do NIPAAm em híbridos de gel polimérico em sílica mesoporosa estruturalmente ordenada para liberação controlada de fármacos; MOURA (2005) que observou as bandas visualizadas neste estudo ao analisar o hidrogel alginato- Ca^{2+} -co-poli(N-isopropilacrilamida); VIEIRA (2006) ao identificar as bandas características do NIPAAm ao sintetizar o termopolímero poli(N-isopropilacrilamida)-co-poli[(monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉metil éter]; IGNACIO (2009) que verificou as faixas de absorção destacadas no copolímero poli-N-isopropilacrilamida-co-poliuretano, identificando o polímero sintético e REIS et al (2010) que confirmaram a síntese do composto sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida após visualizar as bandas de absorção características do NIPAAm.

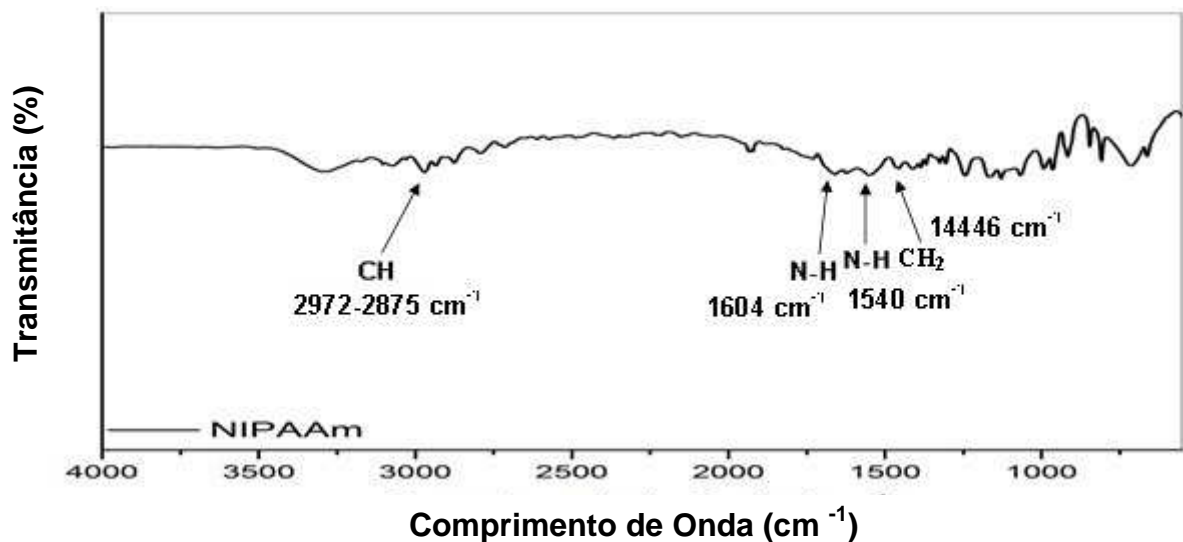


Figura 25: Espectro FTIR obtido de 1mg do NIPAAm com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$.

A Figura 26 apresenta o espectro do copolímero SCM+NIPAAm 5%, confirmando a reação entre os polímeros estudados, uma vez que são observadas regiões de absorção características do SCM e do NIPAAm. A presença do SC é

evidenciado pela região de absorção em torno de $3100\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, correspondente a deformação axial OH e a banda em torno de $1710\text{--}1715\text{ cm}^{-1}$ é atribuído a deformação axial C=O, regiões já observadas na Figura 23 e coincidentes com os trabalhos de LEE e HUANG e LEE (2007) que identificaram as respectivas bandas ao sintetizar o copolímero sulfato de condroitina-co-poli(L-láctico) e REIS et al (2010) ao caracterizarem as bandas do polímero natural no copolímero sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida.

O NIPAAm é caracterizado pelos picos ao redor das faixas 1604 cm^{-1} , relacionado a deformação axial da vibração amida II (N-H), 1540 cm^{-1} , que representa a deformação axial angular característico do estiramento amida I (N-H) e 1446 cm^{-1} referente ao estiramento do carbono sp_2 (CH_2) correlacionando-se com os dados observados nos estudos de MOURA (2005) que observou as bandas visualizadas neste estudo ao analisar o hidrogel alginato- Ca^{2+} -co-poli(N-isopropilacrilamida); VIEIRA (2006) ao identificar as bandas características do NIPAAm ao sintetizar o termopolímero poli(N-isopropilacrilamida)-co-poli[(monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉metil éter]; IGNACIO (2009) que verificou as faixas de absorção destacadas no copolímero poli-N-isopropilacrilamida-co-poliuretano, identificando o polímero sintético e REIS et al (2010) que confirmaram a síntese do composto sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida após visualizar as bandas de absorção características do NIPAAm.

As bandas de absorção observadas nesta amostra também foram identificadas no SCM+NIPAAm 2,5%, mostrando que não há diferença estrutural entre os copolímeros de distintas concentrações.

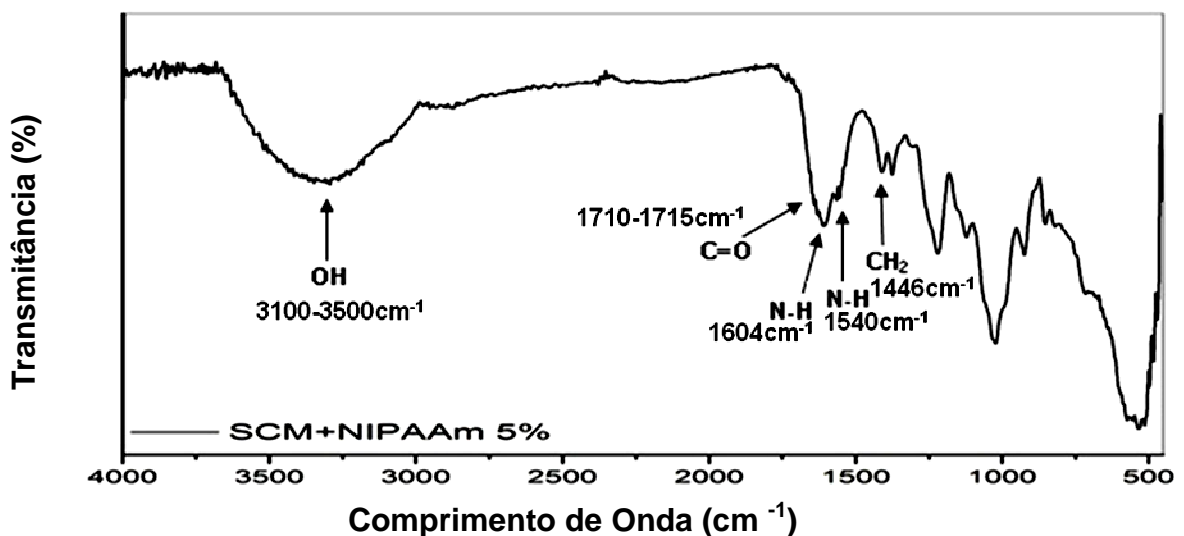


Figura 26: Espectro FTIR obtido de 1 mg do SCM+NIPAAm 5% com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

A Figura 27 apresenta o espectro do copolímero SCM +PNIPAAm 2,5%, na qual observa-se que as bandas de absorção referentes as substâncias químicas do composto polimérico são iguais as visualizadas na Figura 25, demonstrando que a polimerização do NIPAAm antes da reação com o SC não interfere na estrutura química do copolímero.

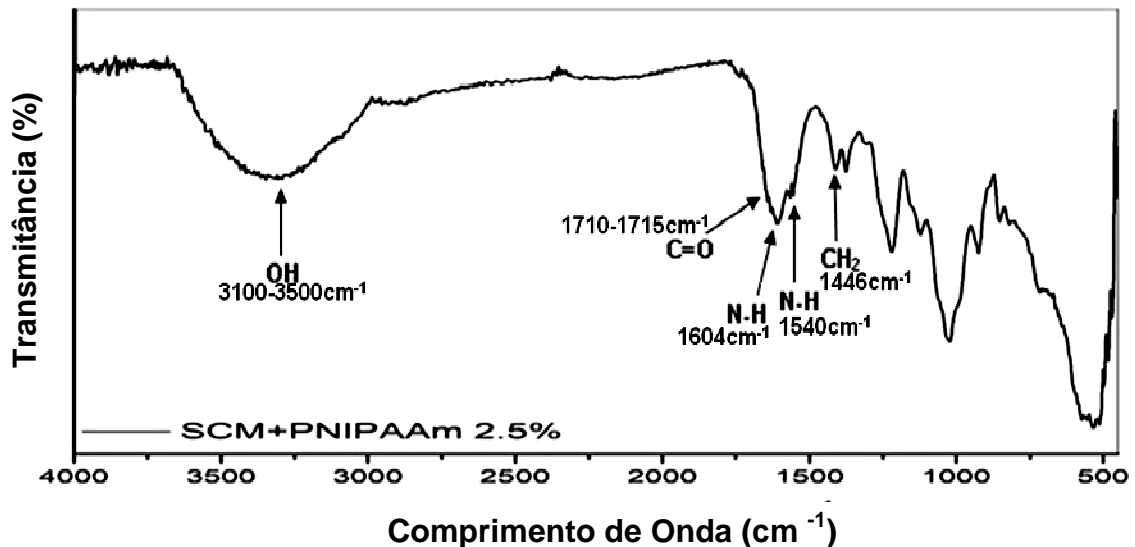


Figura 27: Espectro FTIR obtido de 1 mg do SCM+PNIPAAm 2,5% com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2cm^{-1} e faixa de 4000 a 400 cm^{-1} .

Sendo assim, observa-se que a estrutura química do copolímero possui componentes químicos característicos dos compostos SCM e NIPAAm, que apresentam seus espectros estruturais e bandas de absorção definidos na literatura, confirmando que o material de estudo é o Sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida (SCM+NIPAAm), em qualquer concentração do polímero sintético, uma vez que todos demonstraram características de bandas de absorção iguais.

COIMBRA (2010) por meio do registro dos espectros de FTIR, revelou que, nos hidrogéis mergulhados em pH 2, a perda de massa resultava tanto da perda de pectina como de quitosano, enquanto em pH 7,4, a perda de massa podia ser majoritariamente atribuída à dissolução das cadeias de pectina, podendo este comportamento ser aos diferentes estados de ionização/protonação dos dois polissacarídeos (poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) e pectina) nos dois meios aquosos.

ALVES (2011) identificou pelo espectro de absorção do infravermelho bandas características, tanto do hidrogel (poliacrilamida-co-metilcelulose) como do fármaco incorporado ao complexo polimérico, propranolol. JINDAL et al (2013) concluíram que os espectros de FTIR revelaram máxima interação entre os grupos carboxílicos do fruto de goma e a amina da quitosana ao serem reagidos na mesma proporção para formação do filme fruto de goma-quitosana.

JEEVITHA e AMARNATH (2013) observaram que os espectros de FTIR indicam interação entre os grupos de hidroxila dos polifenóis e amina na molécula de quitosana-co-poli (ácido-glicólico), confirmando a formação das nanopartículas.

5.1.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Figura 28 mostra as micrografias obtidas a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura do polímero SCM com magnitude de 1000x e dos copolímeros SCM +NIPAAM 5%, SCM+NIPAAM 2,5% e SCM+PNIPAAM 2,5% com magnitude de 2000x, apresentando as características morfológicas do polímero natural e dos copolímeros em diferentes concentrações do polímero sintético. Observa-se que as partículas apresentam-se agregadas, com uma forma esférica e superfície regular, não sendo observadas diferenças morfológicas entre o polímero natural e os copolímeros, provavelmente devido os monômeros possuírem características de morfologia similares.

São evidenciados as semelhanças morfológicas dos monômeros nos estudos de MATZELLE e REICHELDT (2008) ao analisarem a morfologia de géis de PNIPAAm verificaram que possuía uma forma esférica assim como VIEIRA (2006) que além de observar uma estrutura esférica, destacou sua superfície lisa e regular após sua reação com o poli[(monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉metil éter], formando o termopolímero poli(N-isopropilacrilamida)-co-poli[(monometacrilato de poli(etilenoglicol)₉metil éter].

Partículas de SC ao serem analisadas morfológicamente por REIS et al (2008) para avaliarem o potencial de encapsulação de um antiinflamatório pelo polissacarídeo e REIS et al (2010) ao sintetizarem o composto sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida demonstraram estrutura esférica e oca do mesmo modo que LEE e HUANG e LEE (2007) após a formação do copolímero sulfato de condroitina-co-poli(l-

lático) e HUANG (2010) ao preparar cápsulas de quitosana-co-sulfato de condroitina, que além dessas características destacaram sua superfície lisa.

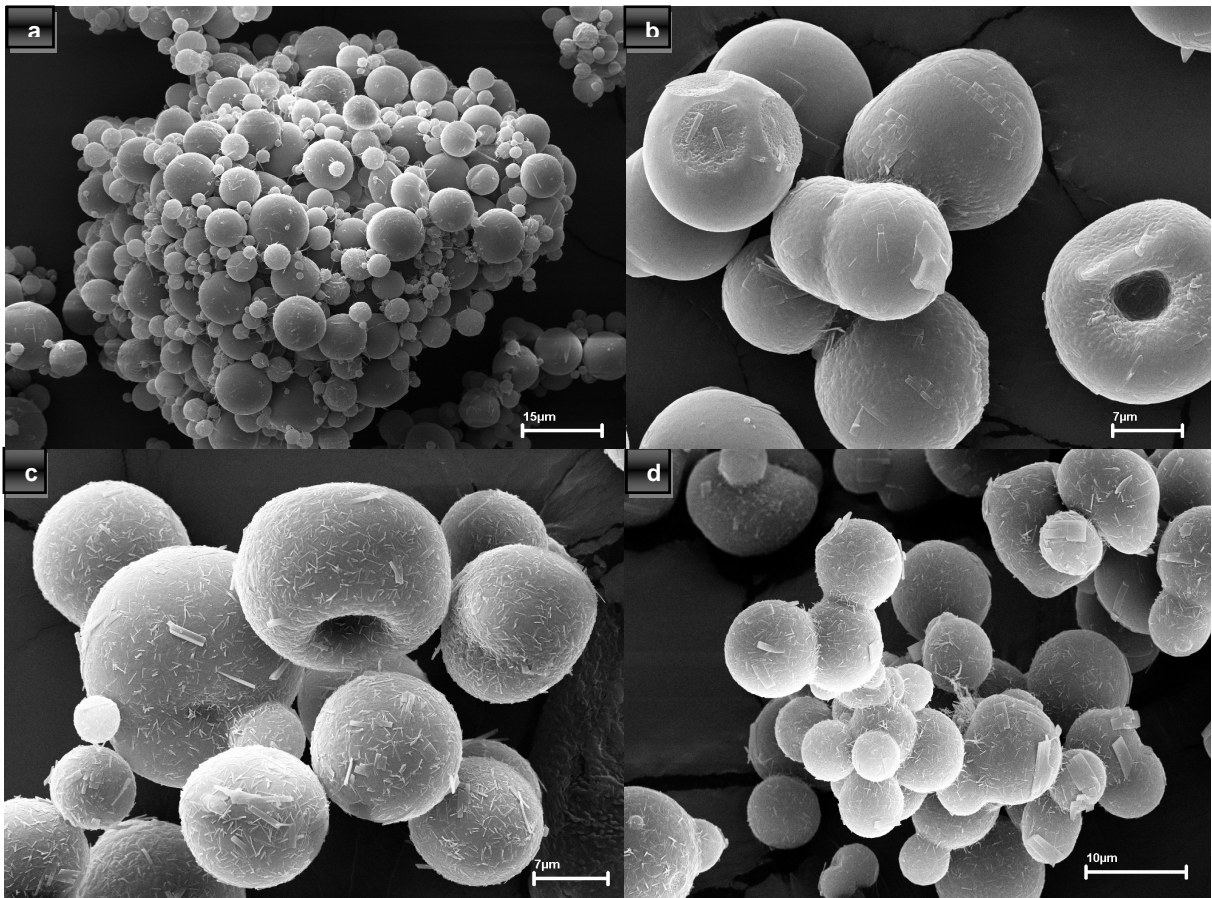


Figura 28: Micrografias obtidas a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura do polímero SCM (a) com magnitude de 1000x e dos copolímeros SCM +NIPAAm 5% (b), SCM+NIPAAm 2,5% (c) e SCM+PNIPAAm 2,5% (d) com magnitude de 2000x.

JEEVITHA e AMARNATH (2013) obtiveram imagens pelo MEV que demonstram nanopartículas de quitosana-co-poli(ácido glicólico) com glóbulos de variados tamanhos e formas irregulares, indicando que o poli(ácido glicólico) encontra-se disperso na matriz de quitosana e a baixa adesão entre as fases. MASUDA et al (2013) por meio do MEV caracterizaram e observou a morfologia da sílica mesoporosa, apresentando imagens uniformes com poros cilíndricos e pequenos. WU et al (2013) observaram nas imagens obtidas pelo MEV que todos os filmes poliméricos de pululano-quitosana/carboximetilquitosana apresentavam-se com morfologia lisa e homogênea, indicando a alta miscibilidade entre os polímeros. DEKA, MISRA e MOHANTY (2013) verificaram uma superfície fraturada, porém de boa molhabilidade do polímero poli (álcool furfurílico) após análise das imagens obtidas pelo MEV.

5.1.4 ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL

A análise térmica dos materiais SCM, NIPAAM e copolímeros SCM+NIPAAM 5%, SCM+NIPAAM 2,5% e SCM+PNIPAAM 2,5% foi avaliada através das análises TG/DTG e DTA em diferentes razões de aquecimento (5°C, 10°C e 20°C), a fim de avaliar o comportamento térmico dos polímeros.

O NIPAAM nas três razões de aquecimento as curvas TG (Figura 29) demonstraram apenas um evento nas temperaturas e variações de massa apresentadas pela Tabela 3, que corresponde à completa decomposição polimérica, com a saída de água fisicamente adsorvida, amina e carboxila, corroborando com os dados encontrados na literatura (GARAY e LIAMAS e IGLESIAS, 1997; YING e KANG e NEOH, 2003; SAEED e GEORGET e MAYES, 2010). GARAY e LIAMAS e IGLESIAS (1997) avaliaram o comportamento térmico dos complexos poliméricos de PNIPAAM com poli(ácido carboxílico), poli(ácido acrílico) e poli(ácido metacrílico) evidenciando a perda de água adsorvida fisicamente do NIPAAM na mesma faixa de temperatura que foi encontrada neste trabalho.

YING e KANG e NEOH (2003) observaram o mesmo fenômeno térmico em temperaturas semelhantes após a produção de membranas de microfiltração pH e temperatura dependentes através de blendas formadas a partir de PNIPAAM-co-poli(ácido acrílico)-co-poli(fluoreto de vinilideno) para aplicação na área de liberação controlada de fármacos. SAEED e GEORGET e MAYES (2010) verificaram semelhante perfil térmico do monômero sintético na avaliação da estabilidade térmica e degradação dos copolímeros de Poli(N-isopropilacrilamida-co-hidroximetilacrilamida).

Tabela 3: Eventos térmicos de TG obtidas do NIPAAM

Razão de aquecimento (°C/min⁻¹)	Temperatura (°C) e perda de massa (%)
5	126-138 (96%)
10	131-156 (93%)
20	139-173 (91%)

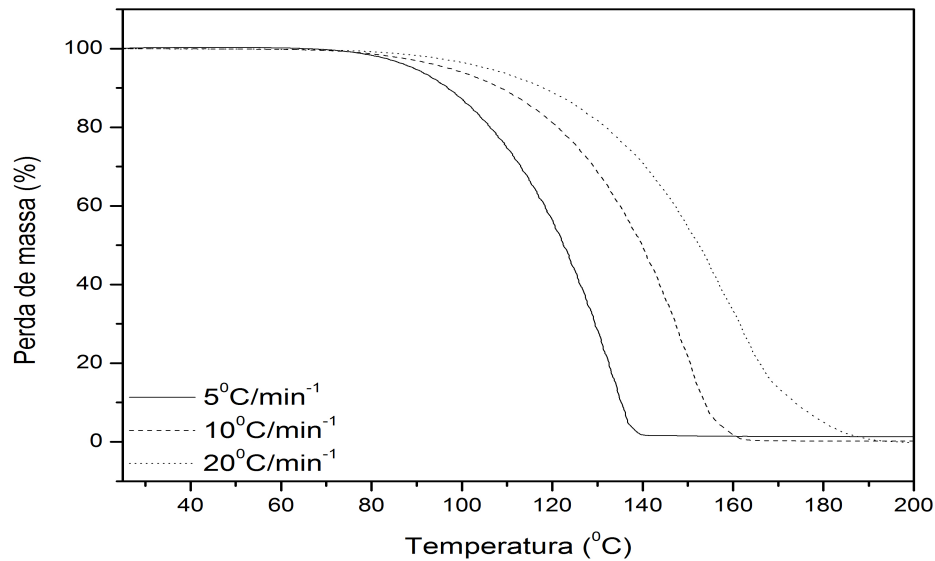


Figura 29: Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra NIPAAm submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

A análise das curvas de DTA do NIPAAm (Figura 30) identificou dois eventos endotérmicos demonstrados na Tabela 4. O primeiro pico endotérmico indica o ponto de fusão do monômero, estando coerente com o estudo de SILVA (2006) que apresenta um ponto de fusão na faixa de $65\text{-}70^{\circ}\text{C}$ após o processo de purificação do monômero, e o segundo pico representa a faixa de decomposição do polímero evidenciada nas análises das curvas de TG.

Tabela 4: Eventos térmicos de DTA do NIPAAm

Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	
	1º EVENTO	2º EVENTO
5	66	136
10	68	155
20	71	170

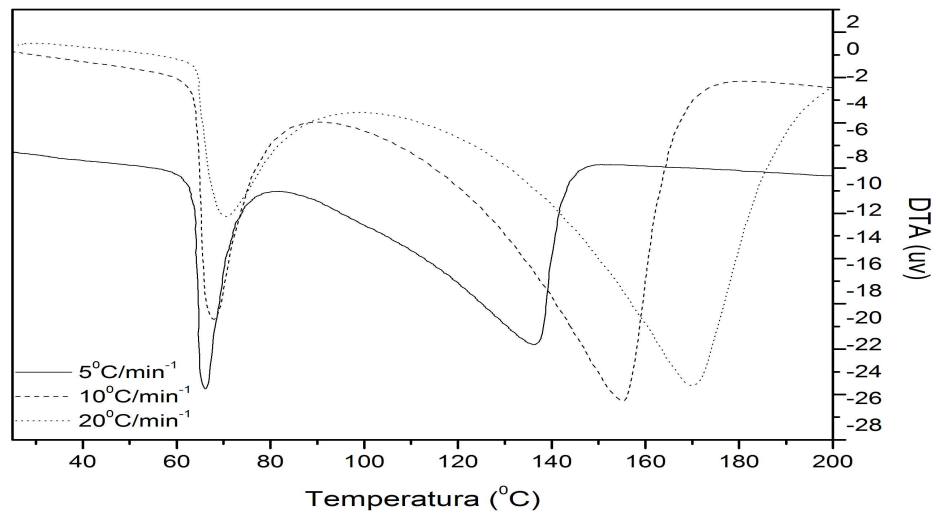


Figura 30: Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra NIPAAm submetida a diferentes razões de aquecimento ($5^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

O SCM apresentou cinco eventos térmicos na razão de aquecimento de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ e quatro eventos nas razões de $10^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ evidenciadas pelas curvas TG (Figura 31), ocorrendo nas temperaturas e perdas de massa correspondentes a Tabela 5. O primeiro pico está relacionado à evaporação da água do composto, estando de acordo com os estudos publicados na literatura (FAJARDO et al. 2010; FAJARDO et al. 2012).

FAJARDO et al (2010) observaram o evento térmico em semelhantes intervalos de temperatura ao analisar a estabilidade do complexo polieletrólítico SC/quitosana. Em outro trabalho, FAJARDO et al (2012) verificaram o mesmo fenômeno ao avaliar o comportamento térmico do composto SC/pectina- NH_2 , objetivando o desenvolvimento de um biomaterial para promover o crescimento de células. O segundo e terceiro eventos indicam a degradação do SC, com a saída de grupos sulfatados e ácidos carboxílicos.

Os resultados demonstram que o SCM degrada em uma temperatura inferior em relação ao polissacarídeo SC, pois segundo a literatura a decomposição do SC não modificado inicia-se em, aproximadamente, 246°C (FAJARDO et al. 2010; FAJARDO et al. 2012), indicando a diminuição da estabilidade térmica do SC após sua modificação química pelo GMA, assim como demonstrado nos estudos de WANGA et al (2003) ao avaliarem o comportamento térmico de hidrogéis de SC modificado por GMA para diminuir a solubilidade do SC e utilizá-lo para liberação controlada de substâncias e IQBAL et al (2009) ao observarem que a temperatura de degradação térmica de copolímeros acrilonitrila modificada por GMA diminuía a medida que a concentração de GMA era aumentada. O terceiro e quarto picos representam a

decomposição do GMA, com a saída dos seus grupos epóxi e acrílico, assim como o quinto pico observado apenas na razão de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$.

O GMA apresentou o mesmo comportamento térmico nos trabalhos de IQBAL et al (2009) ao observarem que a temperatura de degradação térmica de copolímeros acrilonitrila modificada por GMA diminuía a medida que a concentração de GMA era aumentada e WANGA et al (2003) ao avaliarem o perfil térmico de hidrogéis de SC modificado por GMA.

Tabela 5: Eventos térmicos de TG do SCM

Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e perda de massa (%)				
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO	5º EVENTO
5	25-77 (17%)	225-241 (26%)	278-382 (15%)	483-539 (15%)	628-635 (16%)
10	39-82 (17%)	235 -250 (27%)	297-367 (17%)	497-570 (15%)	
20	38-99 (16%)	234-269 (29%)	317-412 (16%)	521-650 (19%)	

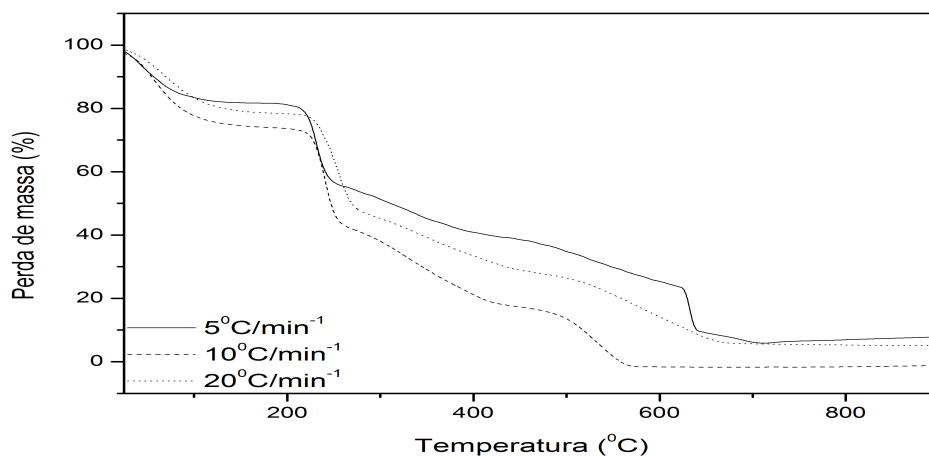


Figura 31: Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

Na análise das curvas de DTA do SCM (Figura 32) observou-se quatro eventos endotérmicos nas temperaturas apresentadas pela Tabela 6. O primeiro pico endotérmico refere-se à perda de água, estando de acordo com as curvas TG, já que nesta faixa é observado variação de massa devido à desidratação. O segundo e terceiro picos endotérmicos indicam a degradação do SCM, corroborando

com as curvas TG, pois neste intervalo de temperatura observa-se a decomposição da partícula. O quarto pico endotérmico refere-se a decomposição do GMA associado ao SC, concordando com a faixa de temperatura demonstrada pelas curvas TG.

Tabela 6: Eventos térmicos de DTA do SCM

Razão de aquecimento (°C/min ⁻¹)	Temperatura (°C)			
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO
5	54	288	451	632
10	67	268	453	599
20	85	298	475	719

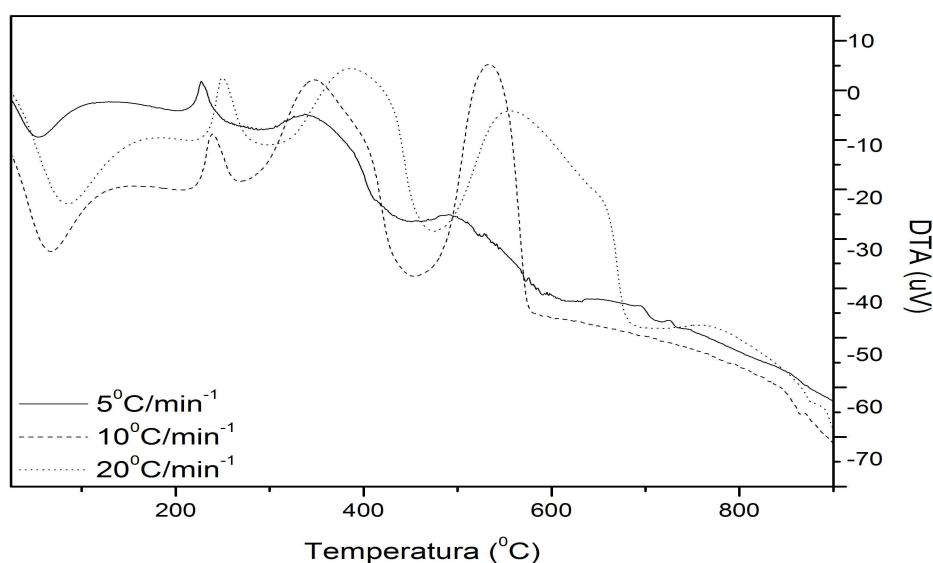


Figura 32: Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C, 10°C e 20°C/min⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N₂).

A análise das curvas TG nas razões de aquecimento de 5°C, 10°C e 20°C/min⁻¹ do copolímero SCM+NIPAAm 5% (Figura 33) demonstrou quatro eventos térmicos nos intervalos de temperatura e percentuais de perda de massa mostrados na Tabela 7.

O primeiro pico é atribuído à desidratação, com eliminação das moléculas de água em uma única etapa. O segundo e terceiro picos correspondem ao início da decomposição térmica do copolímero, com a saída de amins e carboxilas da estrutura do NIPAAm e grupos sulfatados e ácidos carboxílicos do SCM. Este segundo evento, que ocorre em torno de 233^oC, indica a decomposição do copolímero, pois ambos os materiais analisados separadamente decompõem em uma temperatura superior a 100^oC como apresentado pelas curvas TG anteriores.

O quarto evento representa a degradação do GMA, com a decomposição de seus grupos epóxi e acrílicos, pois as curvas TG do SC modificado por GMA mostram que o GMA é decomposto neste intervalo de temperatura, acima de 400^oC.

Tabela 7: Eventos térmicos de TG do SCM+NIPAAm 5%

Razão de aquecimento (°C/min ⁻¹)	Temperatura (°C) e perda de massa (%)			
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO
5	34-70 (20%)	222-237 (28%)	292-365 (15%)	487-575 (21%)
10	41-69 (11%)	233-252 (25%)	301-383 (12%)	515-685 (19%)
20	41-104 (16%)	231-265 (27%)	326-396 (17%)	522-571 (16%)

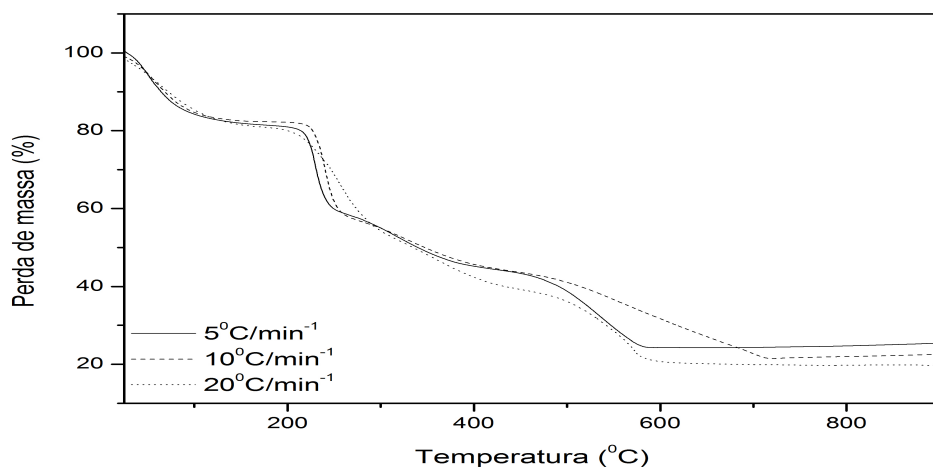


Figura 33: Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+nipaam 5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5^oC, 10^oC e 20^oC/ min⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N₂).

A análise de DTA do SCM+NIPAAm 5% (Figura 34) do composto mostra quatro eventos endotérmicos nas três razões de aquecimento citadas e nas temperaturas relacionadas na Tabela 8. A desidratação do composto é representada pelo primeiro pico endotérmico, estando coerente com as curvas TG, pois se observa perda de massa nesta faixa térmica. O segundo e terceiro picos endotérmicos indicam o início da decomposição do copolímero, pois foi observado este fenômeno no intervalo de temperatura das curvas TG. O quarto pico endotérmico representa a decomposição do GMA, concordando com a faixa de temperatura das curvas TG.

Tabela 8: Eventos térmicos de DTA do SCM+NIPAAm 5%

Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO
5	57	276	292	618
10	71	316	336	659
20	80	290	459	582

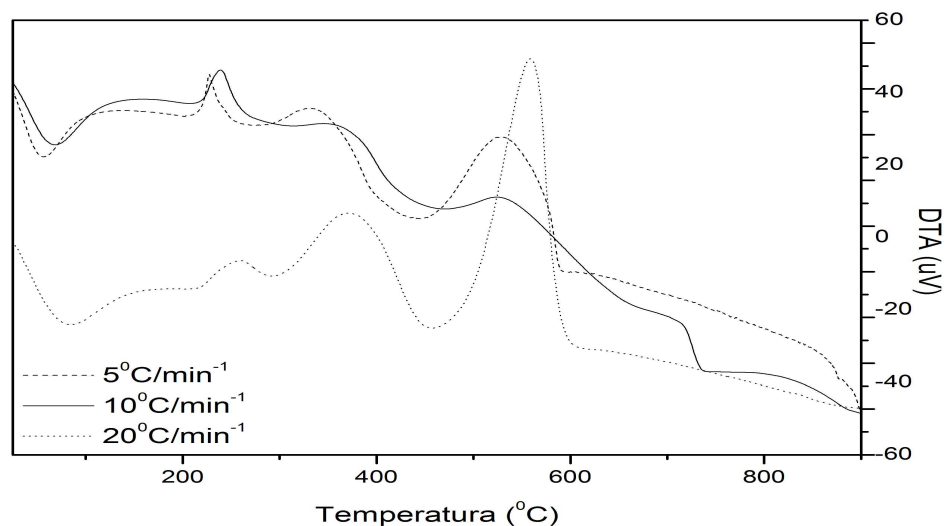


Figura 34: Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

As curvas TG do copolímero SCM+NIPAAm 2,5% (Figura 35) nas razões estudadas também demonstrou quatro eventos nas temperaturas e variações de massa

demonstrados na Tabela 9. A desidratação do copolímero é representada pelo primeiro pico térmico. Assim como o copolímero analisado anteriormente, os segundo e terceiro picos indicam o início da decomposição do copolímero, com a saída de aminas e carboxilas da estrutura do NIPAAm e grupos sulfatados e ácidos carboxílicos do SCM.

O quarto evento representa a degradação do GMA, com a saída de grupos epóxi e acrílicos, já que as faixas de temperatura se correlacionam com as curvas TG do SCM, ocorrendo a sua degradação acima de 400°C. No entanto, observa-se que este composto apresenta menor estabilidade térmica em relação ao copolímero SCM+NIPAAm 5%, uma vez que a sua decomposição inicia-se em temperaturas inferiores, em torno de 224°C.

Tabela 9: Eventos térmicos de TG do SCM+NIPAAm 2,5%

Razão de aquecimento (°C/min ⁻¹)	Temperatura (°C) e perda de massa (%)			
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO
5	35-79 (15%)	220-237 (31%)	290-371 (17%)	482-604 (21%)
10	39-94 (17%)	224-266 (27%)	316-385 (14%)	496-567 (17%)
20	36-105 (14%)	218-285 (27%)	334-409 (10%)	518-701 (18%)

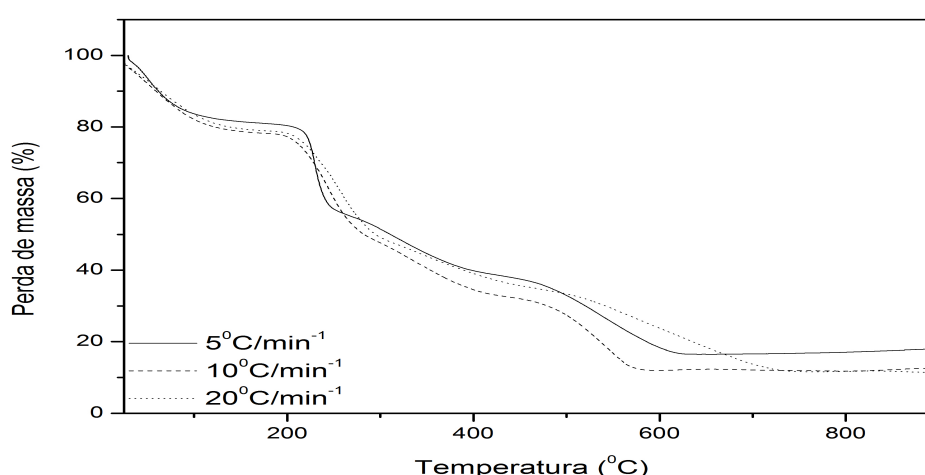


Figura 35: Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C, 10°C e 20°C/ min⁻¹) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N₂).

As curvas de DTA do SCM+NIPAAm 2,5% (Figura 36) apresentam cinco eventos endotérmicos na razão de 5°C/min⁻¹ e quatro nas razões de 10°C/min⁻¹ e

$20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$ com suas temperaturas apresentadas pela Tabela 10. O primeiro evento representado por um pico endotérmico refere-se à evaporação da água pois é observado variação de massa nesta faixa de temperatura nas curvas TG.

O segundo e terceiro picos endotérmicos representam a decomposição do copolímero, já que corroboram com o intervalo de temperatura apresentado pelas curvas de TG. O quarto pico endotérmico indica a decomposição do GMA, assim como o quinto pico endotérmico visualizado apenas na razão de $5^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$, estando de acordo com os intervalos de temperaturas apresentados nas curvas TG.

Tabela 10: Eventos térmicos de DTA do SCM+NIPAAm 2,5%

Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)				
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO	5º EVENTO
5	58	289	455	594	616
10	73	280	386	579	
20	90	315	471	716	

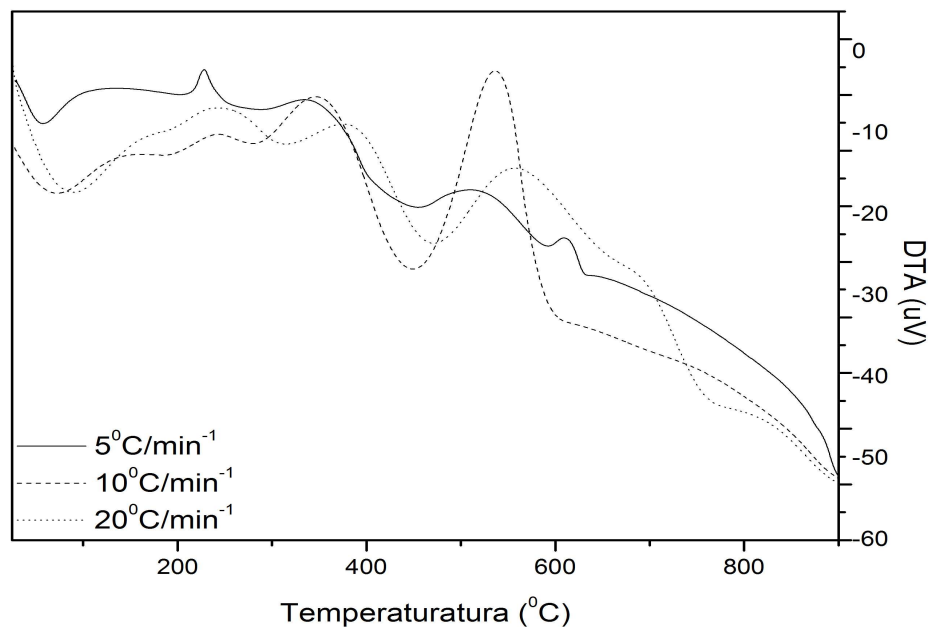


Figura 36: Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

A avaliação das curvas TG do composto SCM+PNIPAAm 2,5% (Figura 37), apresentou cinco eventos nas razões de aquecimento de 5°C e 20°C/min⁻¹, porém apenas quatro eventos na razão de e 10°C/min⁻¹ cujas temperaturas e percentuais de perda de massa são demonstradas na Tabela 11.

A polimerização do NIPAAm e conseqüente aumento da cadeia polimérica antes da reação com o SCM é evidenciada pelo aparecimento de um quinto pico térmico. O primeiro evento associa-se a evaporação de água em uma única etapa. Os segundo e terceiro picos estão relacionados ao início da decomposição do copolímero, com a saída de aminas e carboxilas da estrutura do NIPAAm e grupos sulfatados e ácidos carboxílicos do SCM.

Os eventos demonstram que o início da degradação do copolímero ocorre a uma temperatura inferior em comparação aos copolímeros anteriores em torno de 223°C, demonstrando menor estabilidade em relação aos compostos avaliados anteriormente. O quarto evento representa a degradação do GMA, com a saída de grupos epóxi e acrílicos e o quinto pico indica a extensão da decomposição do copolímero, devido ao aumento da estrutura da cadeia polimérica.

Tabela 11: Eventos térmicos de TG do SCM+PNIPAAm 2,5%

Razão de aquecimento (°C/min ⁻¹)	Temperatura (°C) e perda de massa (%)				
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO	5º EVENTO
5	39-71 (14%)	221-240 (24%)	299-378 (15%)	493-541 (15%)	693-708 (11%)
10	32-92 (20%)	223-254 (17%)	303-395 (32%)	507-597 (19%)	
20	41-117 (15%)	211-297 (29%)	337-391 (9%)	549-630 (21%)	723-786 (14%)

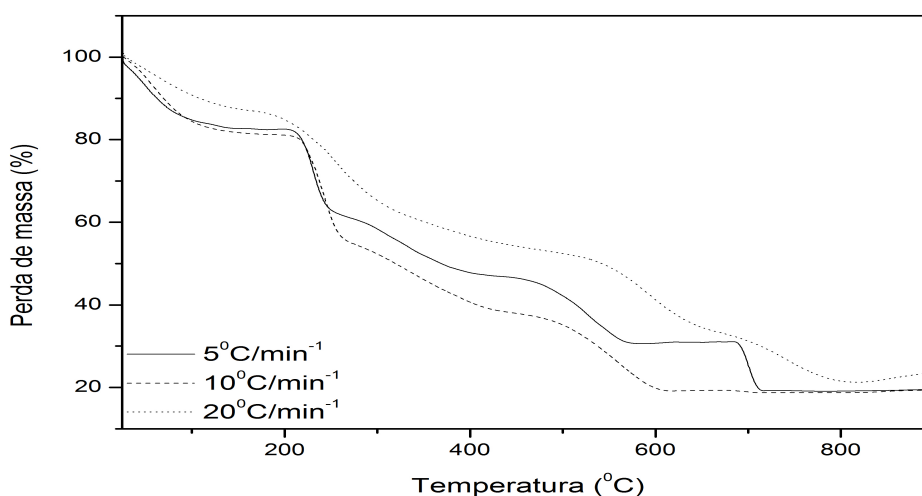


Figura 37: Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+PNIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

A análise das curvas de DTA do SCM+PNIPAAm 2,5% (Figura 38) do copolímero demonstrou quatro eventos endotérmicos nas razões de aquecimento estudadas, sendo apresentadas as temperaturas na Tabela 12. O primeiro pico endotérmico está relacionado a desidratação do composto, uma vez que encontra-se na faixa de temperatura observada nas curvas TG.

O segundo e terceiro picos endotérmicos referem-se ao início da decomposição do copolímero, concordando com as faixas de temperatura das curvas TG. O quarto pico endotérmico indica a degradação do GMA e a extensão de decomposição polimérica, corroborando com as temperaturas apresentadas pelas curvas TG.

Tabela 12: Eventos térmicos de DTA do SCM+PNIPAAm 2,5%

Razão de aquecimento ($^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)			
	1º EVENTO	2º EVENTO	3º EVENTO	4º EVENTO
5	56	279	459	580
10	71	283	461	596
20	94	335	434	739

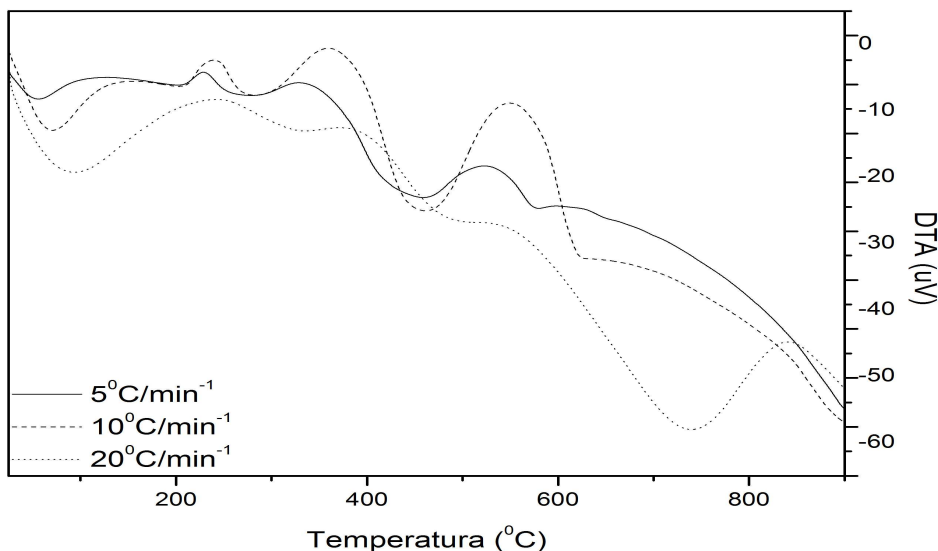


Figura 38: Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+PNIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).

Os copolímeros apresentaram um comportamento térmico semelhante entre si, pois inicialmente há a evaporação das moléculas de água e posteriormente ocorre a degradação efetiva dos copolímeros com a ruptura das ligações químicas de suas cadeias em etapas. A diferença entre os materiais é em relação a porcentagem de perda de água devido a força das ligações de hidrogênio entre os grupos polares na cadeia polimérica (GRIFFITH, 2000; NETO et al 2005). Além disso, se observam distintos valores de perda de massa nas etapas correspondentes a degradação polimérica, pois cada copolímero apresenta seu grau de reticulação, sendo que quanto maior o grau de reticulação polimérico maior é a sua estabilidade (ALVES et al 2011).

Assim, é verificado que o copolímero SCM+NIPAAm 5% demonstra maior estabilidade térmica em relação aos outros copolímeros estudados, devido apresentar maior temperatura de degradação, demonstrando as propriedades térmicas mais adequadas para compor um sistema de liberação controlada, por isso somente ele será submetido as demais análises físico-químicas e avaliações toxicológicas.

5.1.5 CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PELO MÉTODO DE FLYNN-WALL-OZAWA

Os parâmetros cinéticos de decomposição térmica do copolímero escolhido SCM+NIPAAm 5% foram obtidos aplicando-se o método dinâmico de Flynn-Wall-Ozawa. A análise foi realizada mediante a utilização do segundo evento térmico das curvas TG em razões de aquecimento (β) de 5, 10 e 20 °C/min⁻¹, representadas no gráfico pelas diferentes formas geométricas, sob atmosfera de N₂ e os níveis conversionais (α) foram de 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%, representadas pelas linhas de conversão.

No método de Flynn-Wall-Ozawa obteve-se a energia de ativação (E_a) para o processo de degradação por meio do coeficiente angular da reta gerada pelo gráfico de $\log \beta$ em função do inverso da temperatura ($1/T$) em Kelvin (K), a partir desses valores de E_a foram obtidos os valores do fator pré-exponencial ($\log A$).

A Figura 39 demonstra as curvas $\log \beta$ em função de $1/T$ para o copolímero SCM+NIPAAm 5% e os dados de α , E_a e $\log A$ são apresentados na Tabela 13 .

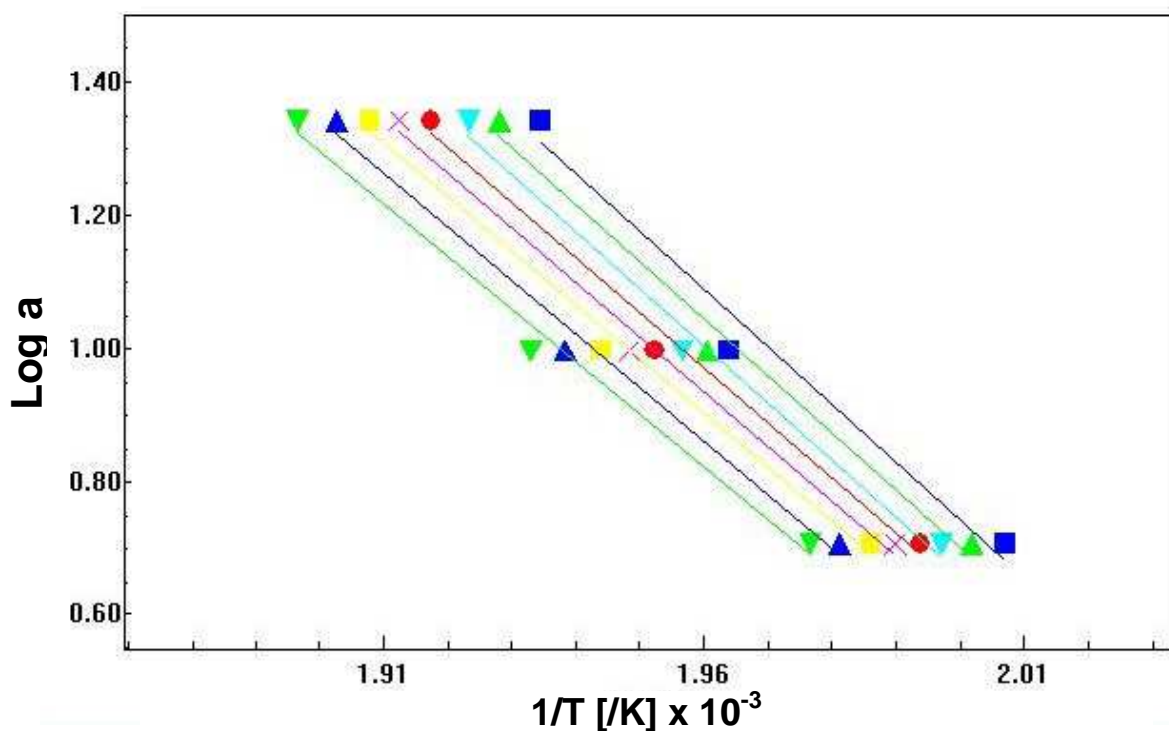


Figura 39: Logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura para os níveis de decomposição térmica em SCM+NIPAAm 5%. As figuras geométricas representam as razões de aquecimento (5, 10 e 20 °C/min⁻¹) e os níveis de conversão são representadas pelas linhas (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80%).

Tabela 13: Parâmetros cinéticos de decomposição térmica para SCM+NIPAAm 5%

AMOSTRA	CONVERSÃO (%)	Ea (KJ. mol ⁻¹)	PERDA DE MASSA (%)
SCM + NIPAAm 5%	10	157,84	97
	20	155,87	95
	30	156,40	93
	40	150,64	91
	50	149,25	89
	60	147,39	88
	70	146,36	86
	80	144,24	84

A tabela 13 demonstra que os valores de Ea e porcentagem de perda de massa diminuem à medida que o nível de conversão é aumentado, demonstrando que é necessário uma elevada Ea para iniciar a degradação do copolímero, sendo que após a quebra das ligações químicas mais fortes, o composto será formado apenas por ligações fracas, assim a Ea é reduzida, pois é necessária uma energia inferior para quebrar estas ligações, isto é, a temperatura de degradação térmica dependerá da energia das ligações químicas que constituem os polímeros. Este comportamento encontra-se de acordo com a afirmação de que valores elevados de Ea (> 100 kJ mol⁻¹) sugerem um mecanismo de degradação associado à cisão das ligações fortes (quebra randômica da cadeia) refletindo a existência de múltiplas reações competindo no processo de degradação, indicando a estabilidade térmica do composto (OLIVEIRA et al. 2006; PAOLI, 2008; PEREIRA, 2010)

Esta energia de ligação é influenciada pelos substituintes ao longo da cadeia, pelo número de ramificações da cadeia do polímero e pela presença ou não de comônômeros. Por exemplo, polímeros que tem somente ligações covalentes C-C e C-H, como o poli(isopreno), polipropileno e polietileno apresentam faixas de temperaturas de decomposição térmica diferentes, 291-311, 336-366 e 375-436 °C, respectivamente. Cada um destes tem uma característica em cada mero que o distingue dos outros: o poli(isopreno) tem uma ligação dupla C=C e um grupo metila ligado a um destes carbonos, o polipropileno tem um carbono terciário a cada mero e o polietileno só tem carbonos terciários nas ramificações da cadeia principal. A presença de "ligações fracas" (Ea mais baixa) que se quebram com maior probabilidade que as "fortes" (Ea mais alta) ao longo da cadeia ou em substituintes irá acelerar o processo de degradação térmica

por este mecanismo, ou seja, para que ocorra a quebra de ligações com calor será necessário que a energia fornecida seja maior que a energia da ligação (PAOLI, 2008).

LAGE e KAWANO (1999) demonstraram, por meio do método de Flynn-Wall-Ozawa, que o Poli(Sulfeto de Fenileno) da marca Fortron é mais estável termicamente que o Poli(Sulfeto de Fenileno) da marca Ryton, uma vez que apresentou uma E_a de 183 kJ.mol^{-1} em condições de atmosfera inerte, estimando as condições ao qual o material pode ser submetido.

OLIVEIRA et al (2006) mostraram que que blendas de carboximetilcelulose (CMC)/ hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) na proporção de 50:50 apresentam os menores valores de E_a em seus respectivos sistemas, enquanto que em 70:30 e 30:70 exibem um efeito sinérgico, pois os seus valores de E_a são superiores aos obtidos para os respectivos polímeros puros, indicando um aumento na estabilidade destas blendas. PEREIRA (2010) demonstrou que o aumento do pré-polímero na proporção pré-polímero/poliol aumenta a perda de massa do primeiro evento de decomposição térmica da poliuretana, já que apresentou valores de E_a acima de 100 kJ.mol^{-1} . Bem como SINFRÔNIO (2006), que apresentou valores de E_a acima de 100 kJ.mol^{-1} no estudo de degradação térmica do polietileno e polietileno tereftalato.

WANG et al (2011) observou pelo método de Flynn-Wall-Ozawa que a reação entre o poli-metilpenilsilsesquioxano (PMPSQ) e a resina epóxi (EP) aumentava a estabilidade térmica do EP, uma vez que demonstrava E_a acima de 100 kJ.mol^{-1} após a inserção do polímero. WANG et al (2012) demonstrou por meio do método de Flynn-Wall-Ozawa que a formação do composto carboxila de terminação epoxi butadieno-acrilonitrila/carboxila-modificada acelerou a reação de cura da resina epóxi quando utilizada em borracha.

LOPES et al (2012) demonstraram que o composto alfa-poli (fluoreto de vinilideno)/NaY 4% apresenta uma energia de ativação similar ao alfa-poli (fluoreto de vinilideno), isto é, a estabilidade térmica do composto é mantida após a inserção de 4% de NaY e NARUSE et al (2012) mostraram que os polímeros polietileno clorossulfonado e dieno de etileno propileno sofreram aceleração da degradação térmica após perda mecânica. Já MOTAUNG et al (2012) concluíram que o polimetacrilato de metila ao reagir com dois diferentes tipos de titânio formam nanopartículas com características térmicas distintas, demonstrando energias de ativação diferentes, porém ambas demonstram a estabilidade das nanopartículas. OMRANI e MOTALLEBI (2012) demonstraram o mecanismo de degradação do nanocomposto de epóxi contendo

Silsesquioxano oligomérico poliédrico Octasilane ao analisar o valor obtido da energia de ativação.

5.1.6 DEGRADAÇÃO *in vitro*

Na avaliação do perfil de degradação do copolímero SCM+NIPAAm 5% em temperatura ambiente observou-se diminuição da sua massa em função do tempo ($p < 0,05$) como demonstrado na Figura 40.

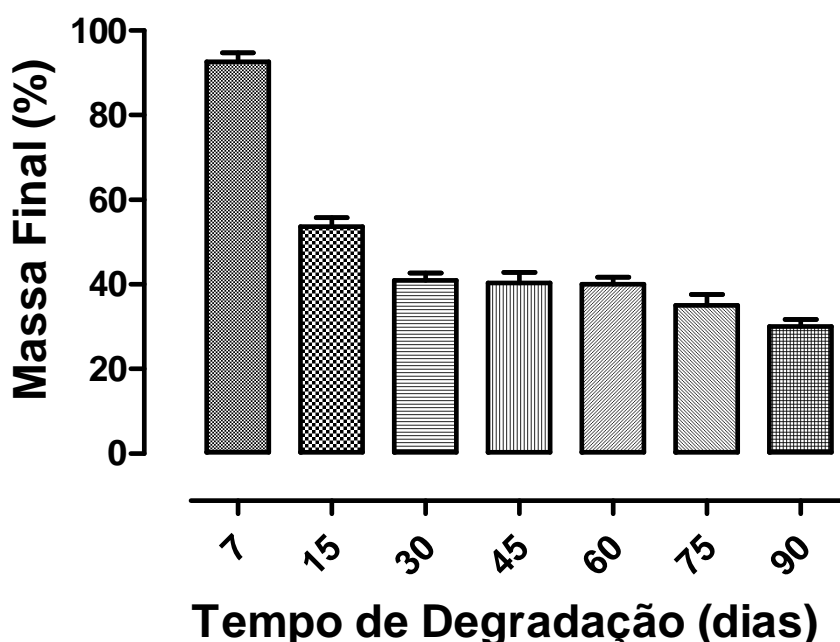


Figura 40: Resultado do estudo de degradação *in vitro* do copolímero SCM+NIPAAm 5%. As colunas representam as médias das replicatas.

Por meio da análise da Figura 40 observa-se uma queda significativa da massa do copolímero em função do tempo em que permaneceu submetido ao aquecimento. No 7º dia de análise o copolímero apresentou em torno de 93% da sua massa inicial, perdendo apenas 7% de seu peso, sendo que essa perda tornou-se acentuada nas próximas cinco semanas (15º ao 45º dias), ocorrendo uma perda aproximadamente de 18%. Nas seis semanas seguintes (60-90º dias) houve uma diminuição de cerca de 3% de massa, observando-se em torno de 48% de material polimérico no final do processo.

A discreta diminuição da massa do copolímero na primeira semana indica que está ocorrendo hidrólise, tornando sua cadeia instável e polímeros de maior tamanho da

cadeia apresentam uma redução mais acentuada de massa molecular no decorrer das semanas, provavelmente de forma (VANIN et al 2004), corroborando com os resultados observados por LEENSLAG et al (1987), JAHNO (2005) LEMMOUCHI et al (1998) e MOTTA e DUEK (2008).

LEENSLAG et al (1987) relacionam a queda inicial da massa, no processo de hidrólise dos poliésteres alifáticos, à degradação preferencial que as regiões amorfas apresentam durante a entrada das moléculas de água nas cadeias do polímero. MOTTA e DUEK (2008) demonstraram que inicialmente é possível notar uma discreta diminuição no valor da massa do copolímero poli (L-co-DL ácido láctico) devido a ação hidrolítica. JAHNO (2005) mostra que houve um decréscimo pequeno, porém significativo da massa do poli (L-ácido láctico) no início da análise. LEMMOUCHI et al (1998) mostraram que a queda de massa do copolímero da família dos poliésteres alifáticos se mostra mais intensa quanto maior for a concentração de partes amorfas DL-lactide em sua seqüência.

Além disso, queda na massa de dispositivos é precedida de queda de propriedades mecânicas (PIETRZAK e VERSTYNEN e SARVER, 1997), tornando-se extremamente importante que haja um perfil de queda compatível, por exemplo, com o período de consolidação óssea. Um estudo desenvolvido por DUEK et al (2008), em que a degradação “*in vitro*” de pinos de poli (L-ácido láctico) foi avaliada, a porcentagem de queda da massa do homopolímero semicristalino foi de 45% nas 2 primeiras semanas de estudo, o que provocou uma queda significativa das propriedades mecânicas desses dispositivos neste curto período, tornando-os impróprios para determinadas aplicações na fixação de fraturas.

MOTTA e DUEK (2006) demonstraram por meio do estudo da degradação “*in vitro*” que as membranas do Poli (L-ácido láctico) (PLLA) aumentaram seu grau de cristalinidade em função do tempo de degradação.

MOTTA e DUEK (2008) observaram através do estudo “*in vitro*” que o processo de degradação do copolímero poli (L-co-DL ácido láctico) (PLDLA) afeta a massa molecular desde a segunda semana de estudo.

VANIN et al (2004) por meio do estudo *in vitro* que mostraram que a blenda poli(β -hidroxibutirato)/ poli(L-ácido láctico) (PHB/PLLA) é imiscível em todas as composições estudadas, apresentando morfologia com separação de fases, sendo que o PLLA perdeu propriedades mecânicas de tração mais rapidamente que o PHB, durante o processo de degradação, tornando-se mais quebradiço, além disso também

ocorreu o aumento no grau de cristalinidade e na espessura do período longo das cadeias poliméricas nas blendas em função da degradação, sugerindo aumento da lamela cristalina.

GIL e FERREIRA (2010) obtiveram resultados no estudo de degradação in vitro que demonstram as matrizes pectina:quitosano 2:1 com uma taxa de degradação superior, sendo que também apresentam maior capacidade de inchaço. Observou-se ainda que o comportamento de intumescimento apresentado está dependente do pH do meio.

5.1.7 TAMANHO DE PARTICULA

Na análise do tamanho de partícula do copolímero SCM+NIPAAm 5%, avaliou-se a distribuição do seu diâmetro médio. Na Figura 41 observa-se que o copolímero apresenta um diâmetro entre 71-173 nm, corroborando com dados da literatura.

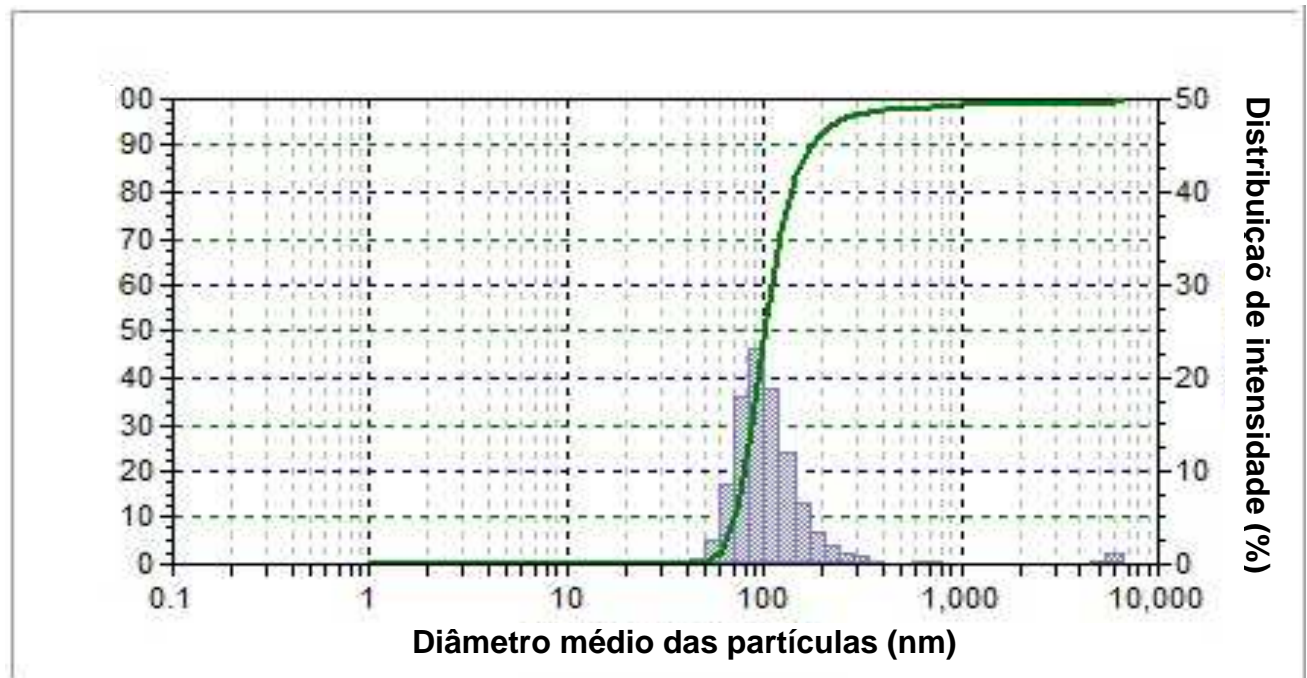


Figura 41: Distribuição do tamanho médio de partículas do copolímero SCM+NIPAAm 5%

LEE et al (2007), demonstraram que as nanopartículas de Sulfato de Condroitina-co-Poli(L-lactideo) apresentou tamanho de partícula inferior a 200nm sendo

uma vantagem na produção de compostos para administração intravenosa, assim como verificado por GUILHERME et al (2010) ao analisar o microhidrogel de sulfato de condroitina modificada que possui 0,1µm, ou seja, 100 nm de diâmetro de partícula.

MOSELHY et al (2009), observaram que a partícula Poli (N-isopropilacrilamida-co-2-(dimetilamino) etil methacrilato) possui um diâmetro menor que 200nm quando o composto apresenta uma menor concentração de NIPAAm estando equivalente com a pesquisa de MATZELLE e REICHEL (2008), na qual demonstrou que microgéis de PNIPAAm possuem um tamanho inferior a 200nm de partícula.

O valor do tamanho de partícula do SCM+NIPAAm 5% menor que 200 nm o torna um promissor candidato a carreador de fármacos, pois indica sua menor suscetibilidade a absorção pelo sistema reticuloendotelial e não interfere na absorção do fármaco encapsulado, proporcionando maior dissolução do princípio ativo, maior superfície de contato e estabilidade à formulação, uma vez que um fármaco se dissolverá mais rapidamente quanto maior for a sua área de superfície, ou seja, quanto menor for o tamanho de suas partículas, tendo impacto direto na velocidade de dissolução e conseqüentemente na biodisponibilidade do composto (SNIDER et al, 2004; BALBACH e KORN, 2004; GASPAROTTO, 2005; TEIXEIRA e DINIZ e LIMA, 2006; LOH et al, 2008).

JEONG e NA (2012) demonstraram que o sulfato de condroitina ao encapsular o antiinflamatório anticonvulsivo apresenta diâmetro em torno de 200nm, indicando sua aplicação para liberação controlada do fármaco e XI e ZHOU e DAÍ (2012) observaram que nanogéis de sulfato de condroitina possuem tamanho de partícula aproximadamente de 140nm, podendo ser utilizado para liberação controlada de substâncias.

CHOU et al (2012) determinaram que a partícula magnetita/poli(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico) possui um tamanho de partícula em torno de 160nm, indicando sua potencial utilização como catalisador, imobilizador de proteínas, entre outros e LI et al (2013) demonstraram que o poli (N-isopropilacrilamida-co-metacrilato de glicidila) apresenta diâmetro médio inferior a 300nm, podendo ser usado para encapsular e carrear de maneira eficaz fármacos que atuam no tratamento do câncer como o 5-Fluorouracil.

A proporção de estruturas em diferentes tamanhos, formas e composição são indicados pelo índice de polidispersão (IP), o qual também influencia na distribuição de tamanho de nanoestruturas (GIRIGOSWAMI e DAS, 2006; RODOVALHO, 2007),

sendo que o $IP < 0,7$ indica homogeneidade no tamanho das partículas e $IP < 0,3$ indica amostras monodispersas (SOUZA, 2007).

O copolímero SCM+NIPAAm 5% apresenta $IP = 0,35$, indicando que suas partículas são homogêneas e monodispersas, isto é, demonstra forma esférica e tamanhos de partícula semelhantes (JUNIOR e VARANDA, 1999) como evidenciado no MEV e confirmado pelos trabalhos de LEE et al (2007), que em seu estudo com a partícula Sulfato de Condroitina-co-Poli(L-lactideo) mostrou formas esféricas e de tamanhos aproximados e MACKOVÁ e HORÁK (2005), demonstrando que microesferas de PNIPAAm preparadas por precipitação apresentam-se esféricas e com semelhantes diâmetros de partícula. Os trabalhos de LI et al (2013) mostram um $IP < 0,3$ para a partícula poli (N-isopropilacrilamida-co-metacrilato de glicidila), observando-se esferas com diâmetros próximos entre si e JEONG e NA (2012) concluíram que o nanocomplexo sulfato de condroitina também apresenta um $IP < 0,3$, visualizando-se partículas esféricas e de tamanhos aproximados.

5.1.8 POTENCIAL ZETA

O estudo do potencial zeta avalia as interações eletrostáticas entre os monômeros do complexo polieletrólítico SCM+NIPAAm 5% apresentando um valor negativo de $-63,15\text{mV}$, indicando a existência de interações eletrostáticas fortes entre os grupos amina ($-\text{NH}_3^+$) do polímero catiônico NIPAAm e os grupos sulfidríla ($-\text{OSO}_3^-$) e carboxila ($-\text{COO}^-$) do polímero aniônico sulfato de condroitina, confirmando que o potencial zeta aumenta à medida que diminui a distância em relação à superfície da partícula (PIAI, 2008). Além disso, valores de potencial zeta acima de -30mV significam estabilidade dos sistemas coloidais durante seu período de armazenamento, já que não há probabilidade de agregação entre as partículas nestas condições de repulsão eletrostática (NANAKI e PANTOPOULOS e BIKIARIS, 2011), mostrando também que embora o complexo seja formado em meio ácido, sua estabilidade relativa refere-se a qualquer valor de pH (PIAI, 2008), corroborando com dados obtidos da literatura (LIM et al, 2011; AYANO et al, 2012; PAN et al, 2012; XI e ZHOU e DAÍ, 2012).

LIM et al (2011) ao desenvolverem técnicas para sintetizar partículas micro e nanométricas de sulfato de condroitina obtiveram um potencial zeta acima de -30mV, apresentando versatilidade para a liberação de fatores de crescimento adaptados carregados positivamente, do mesmo modo que XI e ZHOU e DAÍ (2012) determinaram que nanogéis de sulfato de condroitina possuem potencial zeta acima de 30mV, podendo ser utilizada na liberação controlada de fármacos.

AYANO et al (2012) ao sintetizarem a partícula poli (N-isopropilacrilamida-dl-lactídeo) obtiveram um potencial zeta de -50mV, provavelmente devido a ionização dos grupos terminais carboxílicos do poli(lactideo) na superfície das partículas, indicando a possibilidade de ser utilizado como um complexo polimérico para liberação controlada de fármacos, assim como PAN et al (2012) que ao sintetizarem a partícula poli (ácido metacrílico-co-N-isopropilacrilamida) determinaram um potencial zeta aproximadamente de -95,26mV, pois apresenta elevada carga de superfície devido os grupos carboxílicos do poli (ácido metacrílico).

AHMED e NARAIN (2011) observaram que a partícula 2-amino-etil metacrilamida-co-3-gluconamidopropil metacrilamida ao ser sintetizado de maneira randômica apresenta maiores valores positivos de potencial zeta em relação ao copolímero produzido em bloco, que apresenta baixa interação com as proteínas do soro bovino encapsuladas em relação ao copolímero randômico. NANAKI e PANTOPOULOS e BIKIARIS (2011) concluíram que a partícula poli (ϵ -caprolactona)-co-poli (propileno adipato) possui elevada estabilidade para carrear substâncias devido apresentar um valor de potencial zeta acima de -30mV.

DU et al (2012) demonstraram que o potencial zeta do sistema particulado biodegradável monometoxipoli (etilenoglicol)-poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)-poli-L-lisina varia de um valor positivo para um negativo ao encapsular um pequeno RNA de interferência devido neutralizar as cargas negativas do copolímero, tornando-se um promissor candidato para liberação controlada de fármacos antivirais.

SILVA et al (2012) demonstraram elevada interação entre a partícula alginato-co-quitosana com o herbicida clomazone por meio da análise do potencial Zeta, indicando a utilização das nanopartículas em atividades agrícolas.

5.2 Avaliação preliminar da toxicidade

5.2.1 BIOENSAIO em *Artemia salina* leach

O copolímero SCM+NIPAAm 5% testado nas concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL apresentou $CL_{50} > 1000$ µg/mL após 24 e 48 horas de exposição dos metanúplios ao copolímero (Tabela 14).

Tabela 14: Resultados da toxicidade do SCM+NIPAAm 5% no bioensaio em *Artemia salina*

Concentrações SCM + NIPAAm (µg/mL)	Letalidade Média (% mortes)	
	24 h	48 h
1000	0	0
750	0	0
500	0	0
250	0	0
100	0	0
50	0	0

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de CL_{50} em *Artemia salina* < 1000 µg/mL (MEYER et al. 1982; NASCIMENTO et al. 2008). Assim, o copolímero estudado pode ser considerado atóxico, pois não foi observada nenhuma morte neste modelo e em concentrações de até 1000 µg/mL, fornecendo dados preliminares para ensaios de citotoxicidade e toxicidade aguda.

A *Artemia* sp. é um microcústáceo encontrado ao longo dos cinco continentes. Tem como habitat natural lagos de águas salgadas e salinas, é adaptada para a sobrevivência em águas que sofrem marcantes variações, devido às estações do ano. A ampla distribuição e facilidade de obtenção de seus cistos fazem com que o gênero *Artemia* tenha sido usado em testes de toxicidade para a ampla variedade de produtos como pesticidas, petroquímicos, dispersantes, metais pesados, metabólicos de microorganismos, e produtos carcinogênicos, desde a década de 1950 (CAVALCANTE et al., 2000; PRETTO, 2005).

O primeiro trabalho relativo ao uso de *Artemia salina* em bioensaios foi publicado em 1956 e, a partir daí inúmeros artigos tem sido reportados na literatura em estudos

utilizando produtos e toxinas naturais além de extratos de plantas, e tem sido proposto como teste padrão por VanHaecke e Persoone (CAVALCANTE *et al.*, 2000; PRETTO, 2005). No Brasil estes testes foram inicialmente utilizados pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) em meados da década de 1980 para a avaliação da toxicidade aguda de substâncias, sendo a norma (CETESB, 1991) publicada em 1987 (VEIGA, VITAL, 2002; RIBEIRO, 2010). CAVALCANTE *et al.* (2000) mostraram que os derivados de 1,3,5-triazínicos apresentam um certo grau de toxicidade, podendo ser maior ou menor dependendo da concentração analisada.

MARTINS (2010) demonstrou que nenhum dos compostos anfifílicos do copolímero o-carboximetilquitosana apresentavam potencial citotóxico, por meio da realização do teste de *Artemia Salina*. SIRAJUDDIN *et al.* (2012) demonstraram que os compostos azometina [2 - ((3,5-dimethylphenylimino) metil) fenol] e cloreto de organoestanho (IV) é apresentou toxicidade ao ser comparado com o fármaco de referência tricaina metanosulfonato.

Polímeros naturais modificados (o-carboximetilcelulose, policloreto de alumínio, e amido modificado) praticamente não têm demonstrado toxicidade para organismos vivos, apresentando $CL_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ (TERZAGHI *et al.* 1998).

5.2.2 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE

Na avaliação da compatibilidade do material polimérico com uma cultura de células utiliza-se frequentemente o método do MTT, pois este é capaz de detectar o potencial de um material ou dispositivo em produzir efeitos letais ou subletais em sistemas biológicos a nível celular (MOSMANN, 1983; PALMA e CORAT e SOARES, 2007).

As figuras 42 e 43 mostram, respectivamente, os resultados da viabilidade celular no modelo de células PC12 após 24 e 48 h de incubação com o copolímero SCM + NIPAAm 5%.

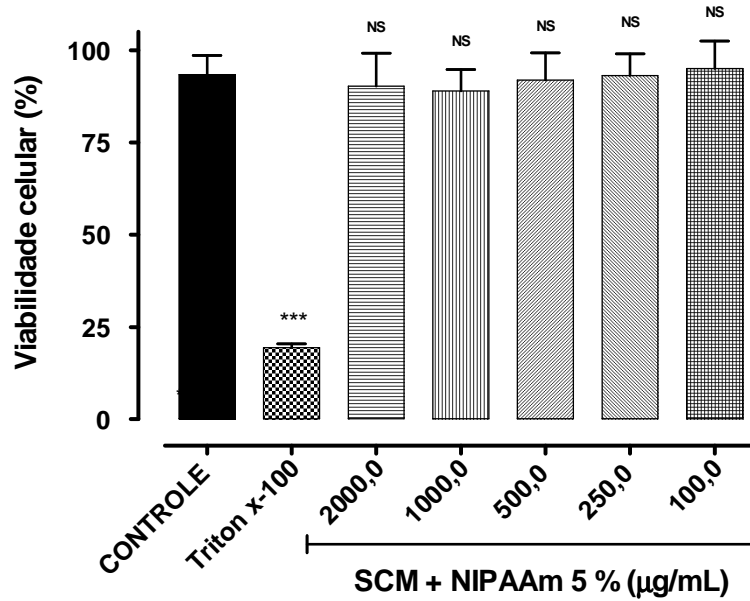


Figura 42: Efeito de diferentes concentrações do copolímero SCM+NIPAAm 5% na viabilidade de células PC12 incubadas por 24h a 37°C em DMEM. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Experimentos realizados em sextuplicata. *** Significativo para $p < 0,0001$ (em relação ao controle e demais concentrações do copolímero).^{NS} Valores não significativos entre si ou comparados ao Controle.

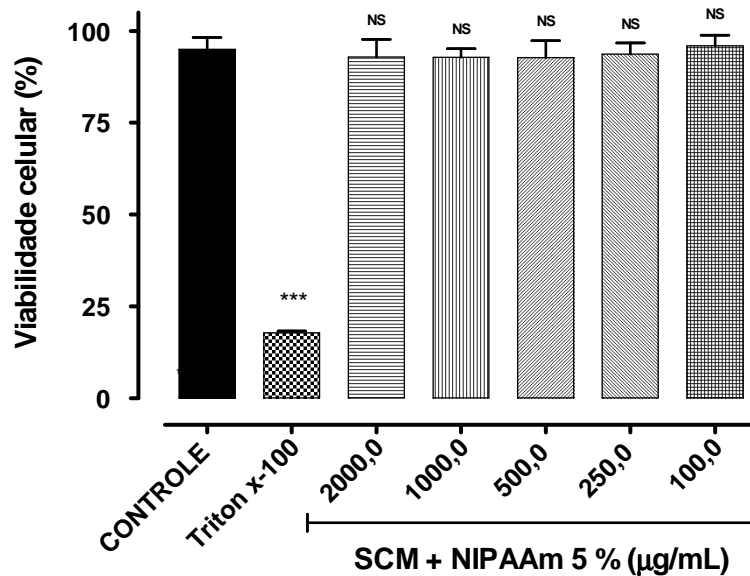


Figura 43: Efeito de diferentes concentrações do copolímero SCM+NIPAAm 5% na viabilidade de células PC12 incubadas por 48 h a 37°C em DMEM. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Experimentos realizados em sextuplicata. *** Significativo para $p < 0,0001$ (em relação ao controle e demais concentrações do copolímero).^{NS} Valores não significativos entre si ou comparados ao Controle

O modelo utilizado para análise foi a linhagem celular PC12 derivada de feocromocitoma da glândula adrenal de ratos, respondendo ao fator de crescimento do nervo (NGF), sendo frequentemente utilizada como modelos para estudos de células de neuroproteção, neurotoxicidade e doenças neurodegenerativas (FENG e WEI e LIU, 2005; XIE e HU e LI, 2010; SPANINGER e SYTKOWSKI e DEBELJAK, 2013). Tornou-se um modelo de estudo para avaliar a diferenciação neuronal e conseqüentemente de neuritos, pois ao serem tratadas com NGF exibem muitas das características de neurônios diferenciados. Além disso, apresentam população celular homogênea e diversas características neuronais que incluem: síntese, armazenamento e excreção de noradrenalina e dopamina, a presença dos receptores nicotínicos de acetilcolina, do ácido gama-aminobutírico (GABA), da colina acetiltransferase e da tirosina hidroxilase (COLOGNATO et al. 2006; GARTLON et al. 2006; SANTOS, 2008).

As células PC12 têm uma estrutura cilíndrica simples, membrana invaginada e citoesquelética altamente organizada similar à de axônios. Tem sido demonstrado que neuritos de PC12, bem como os axônios, são viscoelástico e respondem às forças de alongamento externos através um processo de relaxamento com uma escala de tempo característica (BERNAL e PULLARKAT e MELO, 2007; FERNANDEZ e PULLARKAT, 2010). Além disso, uma característica excepcional de axônios e neuritos de PC12 é a sua capacidade de sofrer transformações de forma súbita em resposta a uma tensão mecânica aplicada, uma instabilidade conhecido como " pérolas de instabilidade" para os físicos (OCHS e POURMAND e JERSILD, 1996; MARKIN e TANELIAN e OCHS, 1999; PULLARKAT e DOMMERSNES e OTT, 2006; FERNANDEZ e PULLARKAT, 2010).

Neste trabalho, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,0001$) na viabilidade das células PC12 incubadas com diferentes concentrações do copolímero SCM + NIPAAm 5% durante 24 e 48 horas de incubação, indicando que o mesmo não foi citotóxico para esta linhagem celular, ou seja, que este copolímero não libera substâncias tóxicas para o meio que possam inviabilizar o crescimento e adesão celular.

A adesão e viabilidade celular de diferentes tipos de células sobre substratos poliméricos dependem das características de superfície desses materiais como: molhabilidade, presença de grupamentos químicos específicos, carga, rugosidade e rigidez (MALMONGE et al. 1999). Neste estudo destaca-se os grupos químicos e a carga superficial do copolímero SCM+NIPAAm 5%, o qual mostra interações

eletrostáticas fortes devido o NIPAAm apresentar uma carga positiva graças a presença do grupo químico -NH_3^+ e o SCM ter característica negativa atribuída aos grupos -OSO_3^- e -COO^- , pois segundo LEE et al (1994), SMETANA (1993) e LIO et al (1994) superfícies positivamente carregados proporcionam maior adesão, espalhamento e crescimento celular *in vitro*, devido as interações eletrostáticas entre a membrana celular e o substrato representando um dos mecanismos de adesão celular ao substrato, uma vez que as glicoproteínas presentes na membrana celular são negativamente carregadas.

No entanto, a presença de grupos negativos como -COO^- presente no SCM diminuem a adesão celular por mimetizar os estímulos normalmente fornecidos pelas glicoproteínas presentes na matriz extracelular dos tecidos, conforme ocorre com a blenda de poliHEMA-poli(MMA-co-AA), que possui grupamentos (COOH) provenientes do ácido acrílico. O fato de um substrato apresentar menor adesão celular *in vitro* não significa que sua biocompatibilidade seja menor. Ao contrário, alguns autores acreditam que a presença de grupos (COOH) em hidrogéis não reabsorvíveis diminuem a interação do material com macrófagos, sendo portanto mais interessantes para algumas aplicações clínicas (SMETANA, 1990; SMETANA, 1993).

Além disso, a característica hidrofílicas/hidrofóbicas do copolímero dependente da temperatura e a ocorrência de grupos funcionais carregados podem influenciar a interação das células com o substrato e conseqüentemente a função celular. Os autores relatam ainda que a presença de grupos ácido carboxílico (COOH) no hidrogel, semelhante ao que ocorre na matriz extracelular natural, permite a este polímero participar no controle da função celular, mimetizando os estímulos normalmente realizados pela matriz extracelular natural (MALMONGE et al. 1999).

A análise preliminar *in vitro* da citotoxicidade é importante para determinar a concentração em que um composto é capaz de inviabilizar a proliferação celular e analisar a necessidade de ser realizado um teste *in vivo* ou não, por isso vem sendo frequentemente utilizado e relatado na literatura.

ROSA et al (2012) demonstraram que o polímero N-benzil-O-carboximetil quitosana não é tóxico até a concentração de 1000 $\mu\text{g} / \text{mL}$ e diminui a tensão superficial por concentração na superfície do sistema, podendo potencializar a solubilidade em fármacos hidrófobos. ZHANG et al (2011) por meio da avaliação da citotoxicidade pelo MTT mostraram que a partícula Poli (metacrilato de dimetilaminoetilo) não possui toxicidade em linhagem celular L929 de fibroblastos de camundongo, além

de demonstrar eficiente e promissora transferência de DNA quando comparado ao padrão ouro de poli (etilenoimina).

JIN et al (2012) ao avaliarem a citotoxicidade de nanobastões de ouro conjugados com folato (folato / AuNRs) observaram que a luz de infravermelho induzia um aquecimento ao conjugado de folato/AuNRs, podendo danificar a membrana celular, rompendo a homeostase celular e levando à despolimerização do citoesqueleto, representando um nanomaterial promissor para a terapia fototérmica contra um tumor.

XI e ZHOU e DAI (2012) observaram que nanogéis de sulfato de condroitina apresentam baixa citotoxicidade *in vitro*, podendo ser utilizado na aplicação de fármacos e VENKATARAMAN et al (2011) demonstraram que a viabilidade celular do composto poli (metacrilato de dimetilaminoetilo) a foi maior com células da linhagem HEK 293 em relação ao modelo HepG2.

Os resultados observados no bioensaio com *Artemia salina* e no teste de viabilidade em células PC12 indicam, portanto, que o copolímero SCM + NIPAAm 5% é praticamente atóxico nas concentrações empregadas e ainda possui atividade estimuladora sobre a neuritogênese e diferenciação celular e sobre a proliferação celular pelo ensaio do BrdU - Bromo-desoxiuridina, ambos em modelo de células PC12 (resultados não publicados neste trabalho).

5.2.3 TOXICIDADE AGUDA ORAL

A avaliação de toxicidade aguda tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL₅₀ (dose letal mediana). Este parâmetro é útil para se identificar a toxicidade relativa da substância frente a uma população de cobaias. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda como o potencial tóxico em órgãos específicos, indicativos sobre a toxicocinética e mecanismos de ação, estabelecimento das doses para estudos complementares de toxicidade entre outros (VALADARES, 2006).

Depois de anos de debates, no entanto, o teste de DL₅₀ foi banido das diretrizes que norteiam a avaliação de toxicidade aguda (BOTHAM, 2002). Hoje, são empregados três métodos alternativos em animais que trouxeram uma significativa melhora do bem-estar da cobaia.

O teste de toxicidade aguda por dose fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, na sigla em inglês), é um destes métodos alternativos, que avalia a toxicidade aguda oral, na qual se evita utilizar o critério morte dos animais como objetivo final e propõe a observação do aparecimento de sinais de toxicidade decorrentes da exposição a uma série de doses fixas; permitindo, desta forma, classificar a substância testada de maneira compatível com o sistema empregado pela União Europeia, o qual qualificava pelos valores de DL₅₀ oriundos do teste clássico de toxicidade aguda (OECD 420, 2001; VALADARES, 2006).

Um estudo internacional (VAN DEN HEUVEL et al. 1990) envolvendo 33 laboratórios de 11 países avaliou o Teste de Dose Fixa, e verificou-se que este procedimento, apesar de usar muito menos animais do que o DL₅₀, produzia resultados compatíveis entre os diferentes laboratórios e provia informações adequadas sobre a toxicidade das substâncias, permitindo produzir categorias de toxicidade compatíveis com os fornecidos pelo método DL₅₀.

Neste trabalho, os animais foram submetidos a administração oral única do copolímero SCM+NIPAAm 5% na dose de 2000mg/kg, pois como não houve mortes ou aparecimento de quaisquer sinais e sintomas de toxicidade com esta dose, evidenciado pelo *screening* hipocrático e pela avaliação da evolução ponderal, consumo de água e ração e ainda pelos resultados anátomo e histopatológicos, não houve necessidade de administração de doses menores do copolímero.

A triagem farmacológica e comportamental (avaliação ou *screening* hipocrático) foi realizada de acordo com avaliação proposta por MALONE e ROBICHAUD (1983) modificado por BRITO (1994) (Anexo 2). Os animais tratados com o copolímero (2000 mg/kg) não apresentaram quaisquer sinais de alteração do sistema nervoso central, autônomo ou motor, mudança de comportamento ou outros descrito no Anexo 2, durante todo o período de experimentação.

A administração do copolímero também não alterou significativamente a variação de massa corporal, que inicialmente era de $45,51 \pm 1,57$ g para os animais do grupo controle e $38,28 \pm 1,04$ g para os animais do grupo tratado (n=6 animais/grupo). Após 15 dias da administração oral única do copolímero na dose de 2000 mg/kg ou salina 2% (controle), os valores de massa corporal ficaram em $43,84 \pm 1,11$ g e $52,44 \pm 1,57$ g, respectivamente, cujo valor da variação é mostrada na Tabela 15.

Já para o consumo médio de ração e água, houve redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao controle (Tabela 15). Entretanto, este

cálculo não levou em consideração a proporção de massa corporal entre os dois grupos. Assim, se for levado em conta esta diferença, já que os animais do grupo tratado tinham massa corporal inicial também inferior aos do grupo tratado, podemos supor que não houve redução no consumo de alimento e água, o que corrobora com os dados da variação de massa corporal.

Tabela 15: Resultados da variação de massa corporal, consumo médio de ração e água por grupo em camundongos machos tratados com dose oral única do copolímero SCM + NIPAAm 5% (2000 mg/Kg) e observados durante 15 dias.

PARÂMETROS	GRUPOS	
	Controle	SCM + NIPAAm 5% (2000 mg/kg)
Varição de massa corporal (g)	6,93 ± 0,92	5,56 ± 0,70 ^{NS}
Consumo médio de ração (g/dia/grupo)	93,27 ± 3,07	72,06 ± 9,10 *
Consumo médio de água (mL/dia/grupo)	49,87 ± 9,45	41,74 ± 3,98 *

Os valores estão expressos em Média ± Desvio Padrão da Média (n=6).

* Significativo para $p < 0,05$ (Teste "t" de Student)

^{NS} Não significativo (Teste "t" de Student não pareado)

Mesmo uma pequena redução no consumo do alimento e água oferecida aos animais não necessariamente indica um sinal de toxicidade, uma vez que o copolímero é capaz de absorver várias vezes a quantidade sua massa seca em água, formando uma massa viscosa pouco gelificada no interior do intestino dos animais, permanecendo por alguns dias até ser totalmente excretada com as fezes, proporcionando sensação de saciedade. Outro fato é que, apesar da alta dose empregada no teste de toxicidade agudo oral (equivante a cerca de 120 a 150 gramas do copolímero para um humano adulto), não houve alteração comportamental, fisiológica ou alterações anátomo e histopatológica em quaisquer órgãos analisados (conforme descrito abaixo), o que mostra que o copolímero não é absorvido no trato gastrointestinal ou a fração absorvida não é capaz de produzir toxicidade aguda evidente.

Além do exame morfológico externo, foram analisados macro e microscopicamente o cérebro e cerebelo, estômago, intestinos, mesentério, o coração, pulmão, fígado e rins de todos os animais. Características da pele e pelos

normais (cor, textura, densidade, espessura, comprimento dos pelos), sem sinal de alterações nos membros, orelhas, língua, dentes e olhos.

Como observado nos resultados da análise anátomo e histopatológica, os pulmões revelaram arquitetura lobulares parenquimatosas preservadas, tendo os alvéolos paredes finas com revestimento epitelial habitual por pneumócitos. Nenhum sinal da presença de células envolvidas em processos inflamatórios e líquido no interior dos alvéolos.

Cérebro e cerebelo com estruturas celulares normais. Região do cárdia (estômago), com epitélio estratificado e porção glandular sem alterações na estrutura tecidual interior. Segmento do intestino delgado (íleo) estruturalmente normal.

Rins apresentando superfície externa envolvida por cápsula opalescente, que se destaca com facilidade do parênquima. Às secções seriadas, observa-se superfície compacta, pardacenta, com limites córtico-medulares nítidos e perfeita visualização pirâmides e cálices renais. Cotos ureterais representando remanescentes de amputação proximal. O estudo histológico mostrou arquitetura lobular e “população” glomerular preservadas. Nos glomérulos, tufos capilares e mesângio delicados estavam separados da cápsula de Bowman por espaço de retração artefactual. Não foram observadas lesões fibróticas, hemorrágicas ou áreas de enfarte.

O coração apresentava-se recoberto por epicárdio fino, transparente e delicadamente vascularizado, vasos da base proporcionais às dimensões do órgão e cavidades átrio-ventriculares revestidas por endocárdio liso e brilhante sendo ora vazias, ora ocupadas por coágulos sangüíneos (alteração natural *post-mortem*). As válvulas átrio-ventriculares e semilunares (pulmonar e aórtica) tinham bordas livres. Ao exame microscópico, o tecido cardíaco mostrou-se também dentro dos limites da normalidade histológica.

Não houve sinais de inflamação, agregados linfocitários, necrose ou alterações circulatórias no fígado, mas foi observado discreta esteatose microvesicular em todos os grupos, com pequenos vacúolos limitados às zonas lobulares hepáticas, provavelmente induzidas pela alimentação (este tipo de ração contém um teor maior de gorduras) ou por estresse, causado pela manipulação diária, que induz a liberação cortisol e adrenalina, mobilizando triglicerídeos e ácidos graxos, ambos lipídios que são metabolizados principalmente no fígado (KUMAR et al, 2010). Esteatose microvesicular discreta não alcoólica é um achado comum de outros estudos histopatológicos em

camundongos de ambos os gêneros, provenientes do Biotério Central da UFPA (GOMES, 2011; SILVA, 2012; VILHENA, 2012).

A potencial utilização de sistemas particulados em formulações farmacêuticas específicas necessita de avaliações toxicológicas para aprovação do seu uso, com isso estudos *in vivo* como o Teste de Toxicidade Aguda Oral são um dos utilizados para avaliar primariamente suas características toxicológicas, como demonstrado nos estudos de ZHANG et al (2010) que utilizaram esta avaliação para mostrar que baixas concentrações de nanopartículas de ouro não provocam uma diminuição evidente na massa corporal ou toxicidade apreciável, mesmo após a sua decomposição *in vivo* em camundongos. Entretanto, altas concentrações de nanopartículas de ouro por via oral induzem diminuição no peso corporal, na quantidade de hemácias e valores de hematócrito.

XIONG et al (2011) observaram que a toxicidade das nanopartículas de TiO_2 e ZnO aumentam com a concentração, demonstrando efeito tóxico dependente da dose. SINGH et al (2013) ao tratarem camundongos oralmente com Fe_2O_3 em micro e nanoescala nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg não observaram alterações estatisticamente significativas em relação ao grupo controle durante o período de observação.

Os resultados de um trabalho de YANG et al (2012) com carboximetilquitosana não mostrou toxicidade aguda, indicando que o copolímero não causa toxicidade significativa sobre o sistema arterial de camundongos depois de ser absorvida na cavidade abdominal e gradualmente degradada no sangue.

FORMARIZ (2008) demonstrou que microemulsões compostas ou não por oleato de sódio associadas a doxorubicina diminuem a toxicidade aguda do fármaco, funcionando como sistema reservatório que proporciona atividade terapêutica mais intensa e por tempo prolongado na terapia do câncer.

SU et al (2011) verificaram por meio do teste de toxicidade aguda oral que o fármaco antitumoral vinorelbina ao ser incorporado em um sistema de emulsão lipídica não demonstrou irritação venosa local, hemólise e hipersensibilidade quando comparado ao fármaco vinorelbina livre, indicando que a emulsão lipídica pode ser utilizada para carreador potencial do fármaco antitumoral com eficácia similar e menor toxicidade.

Os resultados preliminares obtidos nos testes de toxicidade mostram que o copolímero SCM + NIPAAm 5% não possui toxicidade evidente nos modelos e nas

concentrações avaliadas. Testes em andamento avaliarão se o copolímero apresenta toxicidade *in vivo* em doses repetidas (ensaio de toxicidade oral subcrônico) e outros deverão ser realizados para avaliar o potencial mutagênico, carcinogênico ou teratogênico desta substância.

6 CONCLUSÕES

- ✓ As avaliações físico-químicas referentes à RMN e a FTIR demonstraram semelhança estrutural entre os copolímeros (SCM+NIPAAm 5%, SCM+NIPAAm 2,5% e SCM+PNIPAAm 2,5%), por meio da observação dos sinais e bandas de absorção referentes aos seus respectivos grupos químicos;
- ✓ As análises das curvas TG e DTA , demonstraram que o SCM+NIPAAm 5% apresentou as propriedades térmicas mais adequadas de um provável candidato a carreador de fármacos, confirmando sua estabilidade através da Cinética de Degradação por meio do Método de Flynn-Wall-Ozawa, já que apresentou energia de ativação superior a 100 kJ mol^{-1} , e após três meses sob temperatura constante o material polimérico permaneceu com cerca de 48% da sua massa inicial, conforme verificado na análise de cinética de degradação;
- ✓ Além de estabilidade térmica adequada, o copolímero apresentou tamanho médio de partícula inferior a 200 nm, homogêneas e monodispersas, e índice de polidispersão de 0,35, indicando que possui menor suscetibilidade a absorção pelo sistema reticuloendotelial, não interferindo na absorção de um provável fármaco encapsulado; As fortes interações eletrostáticas observadas entre os monômeros que compõe o SCM+NIPAAm 5% através do estudo do potencial Zeta demonstra a estabilidade dos sistemas coloidais durante seu período de armazenamento, já que há pouca ou nenhuma probabilidade de agregação entre as partículas nestas condições de repulsão eletrostática;
- ✓ Em relação aos ensaios toxicológicos preliminares, os resultados obtidos mostraram que o copolímero SCM + NIPAAm 5% não possui toxicidade evidente nos modelos e nas concentrações avaliadas, não dispensando, entretanto, ensaios de doses repetidas *in vivo* e avaliação do potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico para garantir sua total ausência de toxicidade dentro das circunstâncias de exposição;
- ✓ A copolimerização do Sulfato de Condroitina e N-isopropilacrilamida na concentração estudada, dada suas características físico-químicas e toxicológicas preliminares apresenta propriedades que contribuem para a proposta de um sistema que constitui uma nova forma de liberação controlada, especialmente de fármacos.

REFERÊNCIAS*

AGARWAL, B, D; BROUTMAN, L. J. Analysis and Performance of Fiber Composites. **John Wiley & Sons**. v. 2, p. 1- 53, 1990.

AHAMAD, T; ALSHEHRI, S. M. Synthesis, characterization and anti-microbial activity of phenylurea–formaldehyde resin (PUF) and its polymer metal complexes (PUF–Mn(II)). **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**. v. 96, p. 179–187, 2012.

AHMED, M; NARAIN, R. The effect of polymer architecture, composition, and molecular weight on the properties of glycopolymer-based non-viral gene delivery systems. **Biomaterials**. p. 1-12, 2011.

AKKARA, J. A., JOHN, V. T., KAPLAN, D. L., MCPHERSON, G. L. **Controlled polymerization in reversed micelles to form spheres used for encapsulation of bioactives for controlled release, luminescent materials, and ferrites for superparamagnetic properties**. US6022500-A. 2000.

ALCOK, H. R; LAMPE, F.W. **Contemporary Polymer Chemistry**. New Jersey: Prentice Hall, 1990.

ALEXIS, F; PRIDGEN, E; MOLNAR, L. K; FAROKHZAD, O. C. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Mol. Pharm.** v. 5, p. 505–515, 2008.

ALLMÉR, K; HULT, A; RÅNBY, B. Surface Modification of Polymers III. Grafting of Stabilizers onto Polymer Films. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**. v. 27, p. 3405-3417, 1989.

ALVAREZ-LORENZO, C; CONCHEIRO, A; DUBOVIK, A. S; GRINBERG, N. V; BUROVA, T. V; GRINBERG, V. Y. Temperature-sensitive Chitosan-poly(N-isopropylacrylamide) Interpenetrated Networks with Enhanced Loading Capacity and Controlled Properties. **Journal of Controlled Release**.v. 102, p. 629-641, 2005.

ALVES, T. G. **Obtenção e Caracterização de hidrogéis de poliacrilamida-cometilcelulose como carreadores de fármacos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 2011.

* Elaborada de acordo com as Normas Vigentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará

ALVES, T, V, G; TAVARES, E. J. M; AOUADA, F. A; NEGRÃO, C. A. B; OLIVEIRA, M. E. C; DUARTE JUNIOR, A, P; COSTA, C. E, F; SILVA JUNIOR, J. O. C; COSTA, R. M. R. Thermal analysis characterization of PAAm-co-MC hydrogels. **J Therm Anal Calorim.** v. 106, p. 717–724, 2011.

ANDREWS, G. P; LAVERTY, T. P.; JONES, D. S. Biopharmacology. **European Journal of Pharmacology.** v. 71, p.505, 2009.

ARORA, P.; TANDON, P. N. Efficacy of pleural fluid alkaline phosphatase and its ratio to. **Appicattions of Matherial Models.** v. 33, p.692, 2009.

AYANO, E; KARAKI, M; ISHIHARA, T; KANAZAWA, H; OKANO, T. Poly (N-isopropylacrylamide)–PLA and PLA blend nanoparticles for temperature-controllable drug release and intracellular uptake. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 99, p. 67–73, 2012.

AZEVEDO, M.M.M. **Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos.** I Workshop do Curso de Química na UNICAMP. p. 3, 7, 12, 13, 2002.

BALBACH, S; KORN, C. Pharmaceutical evaluation of early development candidates “the 100 mg-approach”. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 275, p. 1-12, 2004.

BANKS, W. J. Histologia aplicada à veterinária. **Manole.** São Paulo, v. 2, p. 658, 1998.

BANGHAM, A. D. A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. **Nature.** v. 192, n. 480, p. 1197-1198, 1961.

BAROSA, J; FERREIRA, A; FONSECA, B; SOUZA, I. Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina*. **Poluição e ecotoxicologia marinha.** 2003.

BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia.** c. 1.5, p. 60-70, 1996.

BARROWS, T. H. Degradable implant materials: a review of synthetic absorbable polymers and their applications. **Clinical Materials.** v.1, p. 233-257, 1986.

BEDNARCZUK, V. O; VERDAM, M. C. S; MIGUEL, M. D; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica.** v. 11, n. 2, 2010.

BERGER, J. et al. Structure and interaction in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.** v.57, p.19-34, 2004.

BERNAL, R; PULLARKAT, P. A; MELO, F. Mechanical properties of axons. **Phys. Rev. Lett.** 2007.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; POSSENTI, A.; FOGGIO, M. A.; SIQUEIRA, M. G.; CARVALHO, J. E. **Efeitos da administração aguda e subcrônica da Luehea divaricata Martus et Zuccarini, Lec.** v.22, p.53-58, 2004.

BOMFIM, M. V. J.; ABRANTES, S. M. P.; ZAMITH, H. P. S. Estudos sobre a toxicologia da ϵ -caprolactama. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 45, n. 1, 2009.

BORBA, L. R. **Viabilidade do uso da moringa oleifera lam no tratamento simplificado de água para pequenas comunidades.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba. p. 21-22, 2001.

BORCHARDT, H. J.; DANIELS, F. The application of differential thermal analysis to the study of reaction kinetics. **Journal of American Chemical Society.** v. 79, p. 41-46, 1957.

BORM, P. J.; SCHINS, R. P.; ALBRECHT, C. Inhaled particles and lung cancer, part B: paradigms and risk assessment. **Int. J. Cancer.** v. 110, p. 3–14, 2004.

BOKOBZA, L.; RAPOPORT, O. Macromolecular Materials and Engineering. **Journal Applied of Polymer Science.** v. 85, p. 2301, 2002.

BOTHAM, P. A. Acute systemic toxicity. **ILAR J.** v. 43, p. S27-S30, 2002.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo.** Universidade de Campinas. v. 1, p. 122, 1994.

BUNHAK, E. J.; MENDES, E. S.; PEREIRA, N. C.; CAVALCANTI, O. A. Influência do sulfato de condroitina na formação de filmes isolados de polimetacrilato: avaliação do índice de intumescimento e permeabilidade ao vapor d'água. **Quimica Nova.** v. 30, n. 2, p. 312-313, 2006.

BRANNON-PEPPAS, L. **Polymers in Controlled Drug Delivery.** Disponível em <<http://www.devicelink.com/mpb/archive/97/11/003.html>> Acesso em novembro de 2011.

CABRAL, P. K. A. **Sistemas de Liberação Controlada de Drogas: Uma Revisão.** Monografia. Universidade Federal de Campina Grande. 2004.

CAMPESE, G. M.; TAMBOURGI, E. B.; GUILHERME, M. R.; MOURA, M. R.; MUNIZ, E. C.; YOUSSEF, E. Y. Resistência mecânica de hidrogéis termo-sensíveis constituídos de alginato- Ca^{2+} /pnipaam, tipo semi-ipn. **Quimica Nova.** v. 30, n. 7, p. 1649-1650, 2007.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.;GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D; MITCHELL, J. B. Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. **Cancer Research.** v. 47,p. 936-942,1987.

CASSARO, C. M. F.; DIETRICH, C. P. Distribution of sulfated mucopolysaccharides in invertebrates. **Journal Biological Chemistry**. v. 252, p. 2254-2261, 1977.

CASTELLAN, G. **Fundamentos de Físico-Química**. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. v. 1, 1986.

CASU, B.; PETITOU, M.; PROVASOLI, M.; SINAY, P. Conformational flexibility: a new concept for explaining binding and biological properties of iduronic acid-containing glycosaminoglycans. **Trends Biochemistry Science.**, v. 13, p. 221-225, 1998.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**. v. 23, n. 1, p. 20-22, 2000.

COLOGNATO, R; LAURENZA, I; FONTANA, I; COPPEDÉ, F; SICILIANO, G; COECKE, S; ARUOMA, O.I; BENZI, L; MIGLIORE, L. Modulation of hydrogen peroxide-induced DNA damage, MAPKs activation and cell death in PC12 by ergothioneine. **Clin. Nutr.**, v.25, n.1, p.135-145, 2006.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL (CETESB). Norma técnica L5.021. Água do mar – teste de toxicidade aguda com *Artemia*: método de ensaio. São Paulo, 1991.

CHAVANPATIL, M. D. P; JAIN, S; CHAUDHARI, R; SHEAR, P. R. V. Novel sustained release, swellable and bioadhesive gastroretentive drug delivery system for ofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 316, p. 86-92, 2006.

CHEN, S.N; NAN, F. H; CHEN, S; WU, J. F; LU, C. L; SONI, M. G. Safety assessment of mushroom β -glucan: Subchronic toxicity in rodents and mutagenicity studies. **Food and Chemical Toxicology**. v. 49, p. 2890–2898, 2011.

CHOU, F. Y; SHIH, C. M; TSAI, M. C; CHIU, W. Y; LUE, S. J. Functional acrylic acid as stabilizer for synthesis of smart hydrogel particles containing a magnetic Fe₃O₄ core. **Polymer**. v. 53, p. 2839-2846, 2012.

CHOURASIA, M. K.; JAIN, S. K. Pharmaceutical approaches to colon target drug delivery systems. **Journal of Pharmacology and Pharmacology Science**. v. 6, p. 33, 2003.

CHU, L. Y; PARK, S. H; YAMAGUCHI, T; NAKAO, S. Preparation of thermo-responsive core-shell capsules with a porous membrane and poly(N-isopropylacrylamide) gates. **Journal of Membrane Science**. v. 192, p. 27, 2001.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra. 2010.

CONLEY, R.; GUPTA, S. K.; SATHYAN, G. Clinical spectrum of the osmotic-controlled. **Current Medicine Opinion**. v. 22, p. 1879, 2006.

COSTA, R.O.R; FREITAS, R.F.S. Phase Behavior of Poly(N-Isopropylacrylamide) in Binary Aqueous Solutions. **Polymer**. v. 43, p. 5879, 2002.

COSTA, A. P. O. **Preparação e Caracterização de Compósitos de Poliuretanas Elastoméricas Rígidas Obtidas a Partir de Fontes Renováveis**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2007.

COSTA, R. M. R. **Desenvolvimento de microesferas de PLGA contendo interleucina-2 para aplicação na terapia antineoplásica**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Pernambuco. 2008.

CURTI P. S.; MOURA M. R.; VEIGA W.; RADOVANOVIC E.; RUBIRA A. F.; MUNIZ E. C. Characterization of PNIPAAm photografted on PET and PS surfaces. **Applied Surface Science**. v. 245, p. 223, 2005.

CROTTS, G; SAH, H; PARK, T. G. Adsorption determines in vitro protein release rate from biodegradable microspheres: quantitative analysis of surface area during degradation. **Journal of controlled release**. v. 47, p. 101-111, 1997.

CVETICANIN, J; JOKSIC, G; LESKOVAC, A; PETROVIC, S; SOBOT, A. V; NESKOVIC, O. Using carbon nanotubes to induce nuclei and double strand breaks of the DNA in human cells. **Nanotechnology**. v. 21, 2010.

DAVDA, J.; LABHASETWAR, V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int. Journal of Pharmacology*. v.233, n.1, p.51-59, 2002.

DAVINO, F. S. F. **Tecnologia de Tratamento de Água - Água na Indústria**. Editora Ltda. Rio de Janeiro, 1976.

DAVIS, M. E; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 3, n. 12, p. 1023-1035, 2004.

DAWSON, K. A; SALVATI, A; LYNCH, I. Nanoparticles reconstruct lipids. **Nat. Nanotechnol**. v. 4, p. 84–85, 2009.

DEKA, H; MISRA, M; MOHANTY, A. Renewable resource based “all green composites” from kenaf biofiber and poly(furfuryl alcohol) bioresin. **Industrial Crops and Products**. v. 41, p. 94–101, 2013.

D'EMANUELE, A; ATTWOOD, D. Dendrimer-drug interactions. **Advanced drug delivery reviews**. v. 57, n. 15, p. 2147-2162, 2005.

DIAS, R. C. M. **Síntese, caracterização e avaliação preliminar de citotoxicidade da matriz porosa de nanocompósito biodegradável.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. p. 25, 2006.

DOLABELA, M. F. **Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Farmacologia, ICB/UFMG, p. 130, 1997.

DOMÍNGUEZ, J.C; OLIET, M; ALONSO, M.V; ROJO, E; RODRÍGUEZ, F. Structural, thermal and rheological behavior of a bio-based phenolic resin in relation to a commercial resol resin. **Industrial Crops and Products.** v. 42, p. 308–314, 2013.

DOYLE, C. J. Kinetic analysis of thermogravimetric data. **Applied Polymer Science.** p. 285 – 292, 1961.

DU, J; SUN, Y; SHI, Q. S; LIU, P. F; ZHU, M. J; WANG, C. H; DU, L. F; DUAN, Y. R. Biodegradable Nanoparticles of mPEG-PLGA-PLL Triblock Copolymers as Novel Non-Viral Vectors for Improving siRNA Delivery and Gene Silencing. **International Journal Molecular Science.** v. 13, p. 516-533, 2012.

DUBOIS, Ph. et al. Macromolecular engineering of polylactonas and polylactides.4. Mechanism and kinetics of lactide homopolymerization by aluminum isopropoxide. **Macromolecules.** v. 24, p. 2266-2270, 1991.

DUEK, E. A. R; ZAVAGLIA, C. A. C; BELANGERO, W. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. **Polymer.** v. 40, p. 6465–6473, 1999.

EECKMAN, F; MÖES, A. J; AMIGHI, K. Evaluation of a new controlled-drug delivery concept based on the use of thermoresponsive polymers. **International Journal of Pharmaceutics.** v. 241, p. 113, 2002.

EECKMAN, F; MÖES, A. J; AMIGHI, K. Synthesis and characterization of thermosensitive copolymers for oral controlled drug delivery. **European Polymer Journal.** v. 40, p. 873, 2004.

ELKE, M; ROLF-JOACHIM, M; WOLF-DIETER, D. **Polym. Degrad.Stab.** p.485, 2003.

FAJARDO, A. R; PIAI, J. F; RUBIRA, A. F; MUNIZ, E. C. Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers.** n. 80, p. 934–943, 2010.

FAJARDO, A. R; ANTONIO, L. C. L; PEREIRA, G. B. A; RUBIRA, F; MUNIZ, E. D. Polyelectrolyte complexes based on pectin–NH₂ and chondroitin sulfate. **Carbohydrate Polymers.** n. 87; p. 1950 – 1955, 2012.

FAO/WHO (Food and Drug Administration/World Health Organization). Acrylamide. **In: Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting, joint fao/who expert committee on food additives (JECFA)**. p. 7-17, 2005.

FEIL, H; BAE, Y. H; FEIJEN, J; KIM, S. W. Mutual Influence of pH and Temperature on the Swelling of Ionizable and Thermosensitive Hydrogels. **Macromolecules**. v. 25, p. 5528-5530, 1992.

FENG, W; WEI, H; LIU, G. Pharmacological study of the novel compound FLZ against experimental Parkinson's models and its active mechanism. **Mol Neurobiol**. v. 31, p. 295–300, 2005.

FERIN, J; OBERDORSTER, G; PENNEY, D. P; SODERHOLM, S. C; GELEIN, R; PIPER, H. C. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles 1. Particle clearance, translocation, morphology. **J. Aerosol. Sci**. v. 21, p. 381–384, 1990.

FERNANDES, L. L. **Produção e Caracterização de membranas de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. Monografia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

FERNANDEZ, P; PULLARKAT, P. A. The Role of the Cytoskeleton in Volume Regulation and Beading Transitions in PC12 Neurites. **Biophysical Journal**. p. 3571–3579, 2010.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press. v. 3, p. 76-80, 1971.

FLYNN, J. H., WALL, L. A., OZAWA, T. Methods. *Journal of Responsive Natural*. p. 487, 1966.

FOOT, M.; MULHOLLAND, M. Classification of chondroitin sulfate A, chondroitin sulfate C, glucosamine hydrochloride and glucosamine 6 sulfate using chemometric techniques. **Journal of Pharmacology and Biomedicine Analyses**. v.38, p.397-407, 2005.

FORMARIZ, T. P. **Formulação e caracterização físico-química e biofarmacêutica de microemulsões lipídicas contendo doxorubicina**. Universidade Estadual Paulista. Tese de Doutorado. 2008.

FRANSSON, L. A.; HAVSMARK, B.; SILVERBERG, I. A method for the sequence analysis of dermatan sulphate. **Biochemistry Journal**. v. 269, p. 381-388, 1990.

GARAY, T. M; LIAMAS, C. M; IGLESIAS, E. Study of polymer-polymer complexes and blends of poly(N-isopropylacrylamide) with poly(carboxylic acid): 1. Poly(acrylic acid) and poly(methacrylic acid). **Polymer**. n. 38, p. 5091–5096, 1997.

GAO, G; MOHWALD, H; SHEN, J. Thermosensitive poly (allylamine)-g-poly (N-isopropylacrylamide): synthesis, phase separation and particle formation. **Polymer**. v. 46, p. 4088, 2005.

GAO, D; XU, H; PHILBERT, M. A; KOPELMAN, R. Bioeliminable nanohydrogels for drug delivery. **Nano Lett**. v. 8, p. 3320–3324, 2008.

GARCIA, S. D; VENTUROLI, S. H; GILBERTO, P; CARDOSO, C. D. Avaliação da toxicidade subaguda e multigeracional da ingestão de derivado do polímero de mamona em ratos. **Ciência Animal Brasileira**. v. 10, n. 1, p. 219-225, 2009.

GARG, R.; GUPTA, G. D. Progress in controlled gastroretentive drug delivery system. **Tropical Journal of Pharmaceutical Response**. v. 7, p. 1055, 2008.

GARNJANAGOONCHORN, W; WONGEKALAK, L; ENKAGUL, A. Determination of chondroitin sulfate from different sources of cartilage. **Chemical Engineering and Processing**. v. 46, p. 465-471, 2007.

GARTLON, J; KINSNER, A; BAL-PRICE, A; COECKE, S; CLOTHIER, R.H. Evaluation of a proposed in vitro test strategy using neuronal and non-neuronal cell systems for detecting neurotoxicity. **Toxicol. In Vitro**. v.20, n.8, p.1569-1581, 2006.

GASPAROTTO, F. S. **Fatores relacionados à síntese de matérias-primas que podem alterar a biodisponibilidade do medicamento genérico**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

GAUCHER, G; ASAHINA, K; WANG, J. H; LEROUX, J. C. Effect of poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nano-particles. **Biomacromolecules**. v. 10, p. 408–416, 2009.

GIL, M. H; FERREIRA, P. **Síntese de materiais poliméricos para regeneração de tecido muscular**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra . 2010.

GIRIGOSWAMI A; DAS. S. S. Fluorescence and dynamic light scattering of niosomes-membrane mimetic systems. **Spectrochimica Acta Part**. v. 64, p. 859-866, 2006.

GLYCIDYL METHACRYLATE (GMA) – **A High purity, dual functionality monomer for coatings and resins**. Disponível em: <http://www.acrylicmonomers.com>. Acesso em fevereiro de 2012.

GOMES, L. A. O. **Cultivo de crustáceos e moluscos**. Nobel. p. 226, 1986.

GOMES, L. F. S. **Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica in vitro e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de *Aspidosperma excelsum* Benth (APOCYNACEAE).** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 2011.

GONZALEZ, R. S. **Preparação, caracterização morfológica e aplicações de hidrogéis de P(N-isopropilacrilamida-co-ácido acrílico).** Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. 2008.

GREENE, L.A.; TISCHLER, A.S. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.73, n.7, p.2424-2428, 1976.

GRIFFITH, L. G. Polymeric biomaterials. **Acta Mater.** v. 48, p. 263–77, 2000.

GUILHERME, M. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Water affinity and permeability in membranes of alginate-Ca²⁺ containing poly(N-isopropylacrylamide). **Journal of Membranes Science.** v. 210, p. 129, 2002.

GUILHERME, M. R; REIS, A. V; ALVES, B. R. V; KUNITA, M. H; RUBIRA, A. F; TAMBOURGI, E. B. Smart hollow spheres of chondroitin sulfate conjugates and magnetite nanoparticles for magnetic vector. **Journal of Colloid and Interface Science.** v. 352 p. 107–113, 2010.

HANSEN, J., A. LACIS, AND M. PRATHER. Greenhouse effect of chlorofluorocarbons and other trace gases. **J. Geophys. Res.** v. 94, p. 16417-16421, 1989.

HAUSBERG, A. G; DELUCA, P. P. Characterization of biodegradable poly (D,L-lactide-co-glycolide) polymers and microspheres. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis.** v. 13, n. 6, p. 744-760, 1995.

HENCH, L. L; WILSON, J. Introduction to bioceramics. **Word Scientific Publishing Co.** p. 1-15, 1993.

HENDRICK V., MUNIZ E.C., GEUSKENS G., WÉRENNE J. Adhesion, growth and detachment properties of cells on modified polystyrene surface. **Cytotechnology** v. 36, p. 49, 2001.

HIRANO, M; ANDERSON, D. E; ERICKSON, H. P; HIRANO, T. Bimodal activation of SMC ATPase by intra- and inter-molecular interactions. **EMBO J.** v. 20, p. 3238–3250, 2001.

HOFFMAN A. S.; AFRASSIABI A.; DONG L. C. Thermally reversible hydrogels II: Delivery and selective removal of substances from aqueous solutions. **Journal of Control Release**. v. 4, p. 213, 1986.

HOFFMAN, A. S. Rationalizing the selection of oral lipid based drug delivery systems by an in vitro dynamic lipolysis model for improved oral bioavailability of poorly water soluble drugs. **Journal Controlled Release**. v. 132, p.153, 2008.

HUANG, H; LIU, N. C. Nondegradative Melt Functionalization of Polypropylene with Glycidyl Methacrylate. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 67, p. 1957-1963, 1998.

HUANG, M. H; LI, S; HUTMACHER, D. W; SCHANTZ, J. T; VACANTI, C. A; BRAUD, C; VERT, M. **J. Biomed. Mater. Res**. p.417, 2004.

HUANG, L; SUI, W; WANG, Y; JIAO, Q. Preparation of chitosan/chondroitin sulfate complex capsules and application in controlled release of 5-fluorouracil. **Carbohydrate Polymers**. v. 80, p. 168–173, 2010.

IARC (International Agency for Research on Cancer). Acrylamide. **In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. v. 60, 1994.

IGNACIO, C. **Desenvolvimento de curativos para cicatrização de feridas por segunda intenção baseados em biomateriais capazes de promoverem resposta celular controlada via estímulo externo**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2009.

IQBAL, M. S; JAMIL, Y; KAUSAR, T; AKHTAR, M. Thermal degradation study of glycidyl methacrylate acrylonitrile copolymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 96, n. 1, p. 225–233, 2009.

JAHNO, V. D. **Síntese e caracterização do poli (l-ácido láctico) para uso como biomaterial**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2005.

JEEVITHA, D; AMARNATH, K. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 126– 134, 2013.

JEONG, D; NA, K. Chondroitin sulfate based nanocomplex for enhancing the stability and activity of anthocyanin. **Carbohydrate Polymers**. v. 90, p. 507– 515, 2012.

JIN, H; YANG, P; CAI, J; WANG, J; LIU, M. Photothermal effects of folate-conjugated Au nanorods on HepG2 cells. **Applied Microbiology Biotechnology**. v. 94, p. 1199-1208, 2012.

JINDAL, M; KUMAR, V; RANA, V; TIWARY, A. K. Physico-chemical, mechanical and electrical performance of bael fruit gum e chitosan IPN films. **Food Hydrocolloids**. v. 30, p. 192-199, 2013.

JUNG, T.; KAMM, W.; BREITENBACH, A.; KAISERLING, E.; XIAO, J. X.; KISSEL, T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake?. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 50, p. 147-160, 2000.

JUNIOR, M. J; VARANDA, L. C. O Mundo dos Colóides. **Química nova na escola**. N. 9, 1999.

JÚNIOR, E. S. C. **Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epithelial**. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2008

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradientes de campo na composição estrutura de compostos orgânicos. **Química Nova**. v.23 , p.231-236, 2000.

KIM, S. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 71, p. 420, 2009.

KIMURA, Y. Biodegradable Polymers. **Biomedical Applications of Polymeric Materials**. P. 163-189, 1993.

KREIN, A. **Avaliação toxicológica do sulfato de condroitina sobre o desenvolvimento pré-natal de ratos wistar**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2003.

KREUTER, J.; SHAMENKOV, D.; PETROV, V.; RAMGE, P.; CYCHUTEK, K.; KOCH-BRANDT, C.; ALYAUTDIN, R. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. **Journal of Drug Target**. v. 10, n.4, p.317-325, 2002.

KUNITA, M. H. **Enxertia de metacrilato de glicidila em filmes poliméricos por processo com fluidos supercríticos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Maringá. 2005

KWON, G. S. Block copolymer micelles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Review**. v.54, n.2, p.167, 2002.

LAGE, L. G; KAWANO, Y. Estudos Sobre a Cinética de Decomposição Térmica do Poli(Sulfeto de Fenileno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. 1999.

LAMARI, F. N.; KARAMANOS, N. K. Structure of chondroitin sulfate. **Advances in Pharmacology**. Patras, v. 53, 2006.

LANGER, R; PEPPAS, N. A. Advances in Biomaterials, Drug Delivery, and Bionanotechnology. **AIChE Journal**. v. 49, p. 2990-3006, 2003.

LARINI, L. **Toxicologia**. São Paulo: Editora Manole. v. 3, p. 301, 1999.

LAVAN, D. A; MCGUIRE, T; LANGER, R. Small-scale systems for in vivo drug delivery. **Nature Biotechnology**. v. 21, n. 10, p. 1184-1191, 2003.

LEE, J. H; JUNG, H. W; KANG, I. K; LEE, H. B. Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups. **Biomaterials**. v. 15, n. 9, p. 705-711, 1994.

LEENSLAG, J. W; PENNING, A. J; BOS, R. R. M; ROZEMA, F. R; BOERING, G. Resorbable materials of poly(L-lactide) VIII. In vivo and in vitro degradation, **Biomaterials**. v. 8, p. 311-14, 1987.

LEMMOUCHI, Y; SCHACHT, E; KAGERUKA, P; DE DEKEN, R; DIARRA, B; DIALL, O; GEERTS, S. Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: In vitro and in vivo studies. **Biomaterials**. v. 19, p. 1827-1837, 1998.

LI, P; XU, R; WANG, W; LI, X; XU, Z; YEUNG, K. W. K; CHU, P. K. Thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide-co-glycidyl methacrylate) microgels for controlled drug release. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 251-255, 2013.

LIANG, X. J; CHEN, C; ZHAO, Y; JIA, L; WANG, P. C. Biopharmaceutics and Therapeutic Potential of Engineered Nanomaterials. **Curr Drug Metab**. 2009.

LIO, K; MINOURA, N; AIBA, S; NAGURA, M; KODAMA, M. Cell growth on poly(vinyl alcohol) hydrogel membranes containing biguanido groups. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 28, p. 459-462, 1994.

LIM, J. J; HAMMOUDI, T. M; BRATT-LEAL, A. M; HAMILTON, S. K; KEPPLER, K. L; BLOODWORTH, N. C; MCDEVITT, T. C; TEMENOFF, J. S. Development of Nano- and Micro-Scale Chondroitin Sulfate Particles for Controlled Growth Factor Delivery. **Acta Biomater**. v. 7, n. 3, p. 986-995, 2011.

LINDEN, S. K.; SUTTON, P.; KARLSSON, N. G.; KOROLIK, V. & MCGUCKIN, M. A. Mucins in the mucosal barrier to bacterial infection. **Mucosal Immunology**. v. 1, p.183, 2008.

LEE, C. T; HUANG, C. P; LEE, Y. D. Synthesis and characterizations of amphiphilic poly(L-lactide)-grafted chondroitin sulfate copolymer and its application as drug carrier. **Biomolecular Engineering**. n. 24, p. 131-139, 2007.

LEE, K. Y.; YUK, S. H. Polymeric protein delivery systems. **Progress Polymer Science**. v. 32, p. 669, 2007.

LIMA, N. P; BIASI, L. A; ZANETTE, F. et al. Produção de mudas por estaquia de duas espécies de guaco. **Horticultura Brasileira**. v. 21, n.1, p. 106-109, 2003.

LO PACHIN, R. M. Acrylamide neurotoxicity: neurological, morphological and molecular endpoints in animal models. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 561, p. 21-37, 2005.

LOH, X. J; WU, X. L; SEOW, W. T. J; NORIMZAN, M. N. I; ZHANG, Z. X; XU, F. J; KANG, E. T; NEOH, K. G; LI, J. Micellization and phase transition behavior of thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide)–poly(3-caprolactone)–poly (N-isopropylacrylamide) triblock copolymers. **Polymer**. v. 49, p. 5084–5094, 2008.

LOOMIS, T. A.; HAYES, A. W. **Loomis essentials of toxicology**. San Diego Academic. v. 4, p. 282, 1996.

LOPES, M. A. F.; DEARO, A. C. O; IAMAGUTI, P.; THOMASSIAN, A; FIGUEIREDO, L. M. A. Aderências peritoneais em eqüinos: tratamento profilático com carboximetilcelulose. **Ciência Rural**. v. 28, n. 3, p. 423-430, 1998.

LOPES, L. C; PIAI, J. F.; FAJARDO, A. R.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. **Propriedades de hidrogéis constituídos de quitosana e sulfato de condroitina na presença de teofilina intumescidos em diferentes phs**. Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros. Paraná, 2009.

LOPES, A.C.; CAPARROS, C; RIBELLES, J. L. G; NEVES, I. C; LANCEROS-MENDEZ, S. Electrical and thermal behavior of c-phase poly(vinylidene fluoride)/NaY zeolite composites. **Microporous and Mesoporous Materials**. v. 161, p. 98–105, 2012.

LOSS, R. S; REIS, A. V; GUILHERME, M. R; FÁVARO, S. L; MUNIZ, E. C; Radovanovic, E. **Preparação de esferas de hidrogéis de goma arábica Modificada. Caracterizações químicas e estudos morfológicos**. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. 2006.

LUNA, J. S; SANTOS, A. F; LIMA, M. R. F; OMENA, M. C; MENDONÇA, F. A. C; BIEBER, L. W; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast **Brazil**. **J Ethnopharmacol**. v. 97, n. 2, p. 199-206, 2005.

LYRA, M. A. M; SOARES-SOBRINHO, J. L; BRASILEIRO, M. T; ROCA, M. F. L; BARRAZA, J. A; VIANA, O. S; ROLIM-NETO, P. J. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. **Latin American Journal of Pharmacy**. v. 26, n. 5, 2007.

MACEDO, O. F. L. **Preparação e caracterização de complexo de Inclusão entre trimetoprim e 2 hidroxipropil gama ciclodextrina**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe. 2010.

MACKOVÁ, H; HORÁK, D. Effects of the Reaction Parameters on the Properties of Thermosensitive Poly(N-isopropylacrylamide) Microspheres Prepared by Precipitation and Dispersion Polymerization. **Journal of Polymer Science**. v. 44, p. 968–982, 2006.

MALISKA, A. M. **scopia Eletrônica de Varredura e análise**. Universidade Federal de Santa Catarina. 2007.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. The Pharmacological Evaluation of Natural Products – General and Specific Approaches to Screening Ethnopharmaceuticals. **J. Ethnopharmacol**. v. 8, p.127-147, 1983.

MALONNE, H.; EECKMAN, F.; FONTAINE, D.; OTTO, A.; DE VOS, L.; MOËS, A.; FONTAINE, J.; AMIGHI, K. Preparation of Poly(N-isopropylacrylamide) copolymers and preliminary assessment of their acute and subacute toxicity in mice. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. n. 61, p. 188-194, 2005.

MALMONGE, S. M; ZAVAGLIA, C. A. C; SANTOS JR, A. R; WADA, M. L. F. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo in vitro. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**. v. 15, n. 1-2, p. 49-54, jan/ago 1999.

MANO, E. B. **Introdução a polímeros**. Editora: Edgard Blücher Ltda. São Paulo, ed. 2, 1985.

MARKIN, V. S; TANELIAN, D. L.; OCHS, S. Biomechanics of stretch-induced. beading. **Biophys. J**. 1999

MARTEL, B; LE THUAUT, P; CRIN, G; MORCELLET, M; NAGGI, A. M; MASCHKE, U; BERTINI, S; VECCHI, C; COQUERET, X; TORRI, G. Grafting of Cyclodextrins onto Polypropylene Nonwoven Fabrics for the Manufacture of Reative Filters II. Characterization. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 78, p. 2166-2173, 2000.

MARTINI, D. S. **Polímeros derivados do biodiesel do óleo de linhaça: obtenção e propriedades físico-químicas**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2010.

MARTINS, P. **Avaliação da atividade antibiana, mutagênica e toxicidade aguda de derivados anfifílicos da o-carboximetilquitosana**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. 2010.

MASUDA, Y; KUGIMIYA, S; MURAI, K; HAYASHI, A; KATO, K. Enhancement of activity and stability of the formaldehyde dehydrogenase by immobilizing onto phenyl-functionalized mesoporous silica. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 26–33, 2013.

MATHEW, T. V; KURIAKOSE, S. Studies on the antimicrobial properties of colloidal silver nanoparticles stabilized by bovine serum albumin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 101, p. 14–18, 2013.

MATOS, F. C. **Caracterização físico-química de galactomananas de adenanthera pavonina (carolina) e delonix regia (flambuoyant) reticuladas com trimetafosfato de sódio**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. São Paulo, p.1, 2008.

MATZELLE, T; REICHEL, R. Review: hydro-, - and nanogels studied by complementary measurements based on sem and sfm. **Acta Microscopica**. v. 17, n. 1, p. 45–61, 2008.

MAYNARD, A. D; KUEMPEL, E. D. Airborne nanostructured particles and occupational health. **J. Nanopart. Res.** v. 7, p. 587–614, 2005.

MAYNARD, A. D; WARHEIT, D. B; PHILBERT, M. A. The New Toxicology of Sophisticated Materials: Nanotoxicology and Beyond. **Toxicological Sciences**. v. 120, p. 109–S129, 2011.

MCLAUGHLIN, J. L; ROGERS, L. L; ANDERSON, J. E. The Use of Biological Assays to Evaluate Botanicals. **Drug Information Journal**. v. 32, p. 513-524, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGINI, N. R.; PUTNAN, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLSON, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plants constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31, 1982.

MIRTCHI, A.; LEMAITRE, J; TERAQ, N. Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate – monocalcium phosphate system. **Biomaterials**. v. 10, p. 475-480, 1989.

MOGHIMI, S. M; ANDERSEN, A. J; HASHEMI, S. H; LETTIERO, B; AHMADVAND, D; HUNTER, A. C; ANDRESEN, T. L; HAMAD, I; SZEBENI, J. Complement activation cascade triggered by PEG-PL engineered nanomedicines and carbon nanotubes: the challenges ahead. **J. Controlled Release**. v. 146, p. 175–181, 2010.

MOREIRA, M. B. **Efeitos da oxigenoterapia hiperbárica e do sulfato de condroitina-a associado ao sulfato de glucosamina na reparação óssea de coelhos**. Tese de Doutorado. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, p.1, 2006.

MOSELHY, J; VIRA, T; LIU, F; WU, X. Y. Characterization of complexation of poly (N-isopropylacrylamide-co-2-(dimethylamino) ethyl methacrylate) thermoresponsive cationic nanogels with salmon sperm DNA. **International Journal of Nanomedicine**. v. 4, p. 153–164, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**. v. 65, p. 55, 1983.

MOTTA, A. C; DUEK, E. A. R. Síntese, caracterização e degradação “in vitro” do poli(L-ácido láctico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 16, n. 1, p. 26-32, 2006.

MOTTA, A. C; DUEK, E. A. R. Estudo inicial da degradação “in vitro” de poli (L-co-DL ácido láctico) sintetizado em laboratório. **Revista Matéria**. v. 13, n. 3, p. 429 - 438, 2008.

MOURA, R. M.; RADOVANOVIC, A.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Surface modification of polystyrene and poly(ethylene terephthalate) by grafting poly(N-isopropylacrylamide). **Journal of Science Materials Medicine**. v. 13, p. 1175, 2002.

MOURA, M. R. **Caracterização de matriz polimérica de hidrogel termosensível sintetizada a partir de alginato-Ca²⁺ e poli(N-isopropil acrilamida), do tipo IPN e semi-IPN**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. p. 11-14, 2005.

MOTAUNG, T. L; LUYT, A. S; BONDIOLI, F; MESSORI, M; SALADINO, M. L; SPINELLA, A; NASILLO, G; CAPONETTI, E. PMMA etitania nanocomposites: Properties and therm al degradation behaviour. **Polymer Degradation and Stability**. v. 97, p. 1325-1333, 2012.

MUNIZ, E. C.; GEUSKENS, G.; J. Mechanisms Controlling the Temperature-Dependent Binding of Proteins to Poly(N-isopropylacrylamide) gels. **Membranes Science**. v. 72, p. 287, 2000.

NANAKI, S. G; PANTOPOULOS, K; BIKIARIS, D. N. Synthesis of biocompatible poly(ϵ -caprolactone)-block-poly(propylene adipate) copolymers appropriate for drug nanoencapsulation in the form of core-shell nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**. v. 6, p. 2981–2995, 2011.

NAPOLITANO, B. A; MARTINS, A. F; VISCONTE, L. L. Y; NUNES, R. C. R. Compósitos de Borracha Natural ou Policloropreno e Celulose II: Influência do Tamanho de Partícula. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 14, n. 4, p. 223-229, 2004.

NARUSE, T; HATTORI, T; YAMAGUCHI, Y; KANAI, T; SEKIYA, T. Thermal degradation of chlorosulfonated polyethylene rubber and ethylene propylene diene terpolymer. **Materials and Design**. v. 42, p. 147–155, 2012.

NASCIMENTO, C. J.; BLOCH, C. J. RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR: Gradus Primus. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** . n. 21, 2001.

NASCIMENTO, J. E; MELO, A. F. M; LIMA E SILVA, T. C; VERAS FILHO, J; SANTOS, E. M; ALBUQUERQUE, U. P; AMORIM, E. L. C. Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae). **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**. v. 29, n.2, p. 143-148, 2008.

NETO, C. G. T; GIACOMETTI, J. A; JOB, A. E; FERREIRA, F. C; FONSECA, J. L. C; PEREIRA, M. R. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydr Polym**. v. 62, n. 2, p. 97–103, 2005.

NICOLAU, A; NUCCI, A. M; MARTINI, E. M. A; SAMIOS, D. Electrical impedance spectroscopy of epoxy systems II: Molar fraction variation, resistivity, capacitance and relaxation processes of 1,4-butanediol diglycidyl ether/succinic anhydride and triethylamine as initiator. **European Polymer Journal**. v. 43, p. 2708, 2007.

NOGUEIRA, A. J. M. **Novas dietoxifosfonil-N-acilarilidrazonas e dialquilfosforilidrazonas com potencial atividade biológica**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

OBERDORSTER, G. Toxicology of ultrafine particles: in vivo studies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* **A Math. Phys. Eng. Sci**. v. 358, p. 2719–2740, 2000.

OCHS, S; POURMAND, R; JERSILD, R. A. Origin of beading constrictions at the axolemma: presence in unmyelinated axons and after b,b0 -iminodipropionitrile degradation of the cytoskeleton. **Neuroscience**. 1996.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. 1996

OGA, S; CAMARGO, M. M. A; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu Editora. v. 3, 2008.

OLIVEIRA, E. D.; FREITAS, R. F. S. **Estudo das Propriedades e do Comportamento de Fase de Géis Termossensíveis**. Anais do Congresso Brasileiro de Polímeros. São Paulo, p. 608, 444-448, 1993.

OLIVEIRA, A. F; CRISTIANO, C. M. Z; ANDREANI, L; PORTO, L. C; SOLDI, V. **Estudos cinéticos de degradação térmica de blendas formadas por carboximetilcelulose / goma guar ou hidroxipropilmetilcelulose**. Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. 2006.

OMRANI, A; HASANKOLA, S. M. M. Kinetic study on solid state thermal degradation of epoxy nanocomposite containing Octasilane polyhedral oligomeric silsesquioxane. **Journal of Non-Crystalline Solids**. v. 358, p. 1656– 1666, 2012.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure**. OECD guideline for testing of chemicals, n. 420. Adopted: 17th December 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **A Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**. OECD guideline for testing of chemicals, n. 407. Adopted: 3 October 2008.

PALMA, M. B. S; CORAT, E. J; SOARES, C. P. **Avaliação da citotoxicidade in vitro de superfícies recobertas por nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT)**. Relatório final de projeto de iniciação científica. 2007

PAN, T. Y; LEE, Y. P; CHU, C. H; CHEN, Y. H; TSAI, C. A; LEE, C. F. Synthesis and characteristics of poly(methacrylic acid e coeN-isopropylacrylamide)/Nano ZnO thermosensitive compo site hollow latex particles. **Polymer**. v. 53, p. 1665- 1674, 2012.

PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros**. Editora: Chemkeys. v. 2, 2008.

PAVÃO, M. S. G.; VILELA-SILVA, A. C.; MOURÃO, P. A. S. Biosynthesis of chondroitin sulfate: from the early precursor discoveries to nowadays, genetics approaches. **Advances in Pharmacology**. Rio de Janeiro, v. 3, 2006.

PEPPES, N. A. In Hydrogels in Medicine and Pharmacy. **CRC Press**. 1987.

PEREIRA, P. H. L. **Estudo das propriedades físico-químicas da poliuretana derivada do óleo de mamona com potencial aplicação na área médica**. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. p. 30, 2010.

PIAI, J. F. **Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de Quitosana/Sulfato de Condroitina e estudos de liberação controlada**. Universidade Estadual de Maringá. 2008.

PIETRZAK, W. S; VERSTYNEN, B. S; SARVER, D. R. Bioabsorbable fixation devices: status for craniomaxillofacial surgeon. **Journal of Craniofacial Surgery**. v. 2, p. 92-96, 1997.

PONS, A. H.; OLIVEIRA, L. M. P. **Citotoxicidade na doença de Chagas**. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=166>. Acesso em: 24/05/2011.

PREIS, I.; LANGER, R.S. A single-step immunization by sustained antigen release. **Journal of Immunology**. v.28, n.2, p.193-197, 1979.

PRETTO, J. B. **Potencial antimicrobiano de extratos, frações e compostos puros obtidos de algumas plantas da flora catarinense**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. p. 29, 2005.

POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. **Relatório GT Marco Regulatório**. Fórum de Competitividade em Nanotecnologia. p. 4, 2010.

POPE, C. A; BURNETT, R. T; THURSTON, G. D; THUN, M. J; CALLE, E. E; KREWSKI, D; GODLESKI, J. J. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. **Circulation**. v. 109, p. 71–77, 2004.

PULLARKAT, P. A; DOMMERSNES, P; OTT, A. Osmotically driven shape transformations in axons. **Phys. Rev. Lett**. 2006.

RATHJEN, C. M; PARK, C; GOODRICH, P. R; WALGENBACH, D. D. The Effect of Preparation Temperature on Some Properties of a Temperature-Sensitive Hydrogel. **Polymers Gels and Networks**. v. 3, p. 101-115, 1995.

REICH, G. Near-infrared spectroscopy and imaging: basic principles and pharmaceutical applications. **Advanced Drug Deliver Review**. v.57, p.1109-1143, 2005.

REIS, A. V; CAVALCANTI, O. A; RUBIRA, A. F; MUNIZ, E. C. Synthesis and characterization of pH-responsive hydrogels based on chemically modified Arabic gum polysaccharide. **Polymer**. v. 47, n. 2023, 2006.

REIS, A. C. B. P. **Encapsulação de fármacos peptídicos pelo método de emulsificação/gelificação interna**. Tese de Doutorado. Universidade de Coimbra. p. 3-5, 2007.

REIS, A. V; GUILHERME, M. R; MATTOS, L. H. C; RUBIRA, A. F; TAMBOURGI, E. B; MUNIZ, E. C. Nanometer- and Submeter-Sized Hollow Spheres of Chondroitin Sulfate as a Potential Formulation Strategy for Anti-inflammatory Encapsulation. **Pharmaceutical Research**. 2008.

REIS, A. V; GUILHERME, M. R; ALMEIDA, E. A. M. S; KUNITA, M. H; MUNIZ, E. C; RUBIRA, A. F; TAMBOURGI, E. B. Copolymer Hydrogel spheres Consisting of Modified Sulfate Chondroitin-co-Poly(N-isopropylacrylamide). **Wiley Online Library**. 2010.

REIZNAUTT, Q. B. **Oligômeros de ésteres e poliésteres derivados de epóxi-ésteres do óleo de girassol: preparação e caracterização química e físico-química**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2008.

REPETTO, G. R; MARTINEZ, D; REPETTO, M. Malathion and dichlorvos after the oral administration so malathion and trichorfon. **Veterinary and Human Toxicology**. v. 37, n. 3, p. 306-309, 1995.

RIBEIRO, C. C. **Avaliação e identificação da toxicidade aguda e crônica do light-stick, sinalizador utilizado em pesca de espinhel, através de ensaios com diferentes organismos marinhos.** Trabalho de Conclusão de Curso. Centro universitário Monte Serrat. p. 17, 2010.

RICE, J. M. The carcinogenicity of acrylamide. **Mutation Research, Amsterdam.** v. 580, n. 1-2, p. 3-20, 2005.

RICHY, F.; BRUYERE, O; ETHGEN, O; CUCHERAT, M; HENROTIN Y.; REGINSTER, J. Y. Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: a comprehensive meta-analysis. **Archive Internacional of Medicine.** v. 163, p. 1514-1522, 2003.

ROBB, S. A; LEE, B. H; MCLEMORE, R; VERNON, B. L. Simultaneously Physically and Chemically Gelling Polymer System utilizing a poly(NIPAAm-co-cysteamine) Based Copolymer. **Biomacromolecules.** v. 8, n. 7, p. 2294–2300, 2007.

RODOVALHO, L. F. F. **Estudo da encapsulação da isotretinoína nas formas livre e associada a ciclodextrinas em niossomas.** Dissertação do Mestrado. Universidade Federal de Goiás. 2007.

ROGERO, S. O; LUGÃO, A. B; IKEDA, T. I; CRUZ, A. S. Testes in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Reserach.** v.6, n.3, p.317-320, 2003.

ROSA, T. R. O. **Obtenção de derivados anfifílicos da o-carboximetilquitosana e aplicação no aumento da solubilidade de fármaco pouco solúvel.** Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. p. 8, 2008.

ROSA, T. R. O; DEBRASSI, A; SILVA, R. M. L; BRESSAN, C; FREITAS, R. A; RODRIGUES, C. A. Synthesis of N-benzyl-O-carboxymethylchitosan and Application in the Solubilization Enhancement of a Poorly Water-Soluble Drug (Triamcinolone). **Journal of Applied Polymer Science.** v. 124, p. 4206–4212, 2012.

ROSEMAN, S. Reflections on glycobiology. **Journal Biological Chemistry.** v. 276, p. 41527-41542, 2001.

ROSSIGNOLI, P. S. **Determinação simultânea de glucosamina e condroitina em forma farmacêutica por espectroscopia no infravermelho com reflectância difusa e calibração multivariada.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. p. 11-12, 2006.

RUBINSTEIN, A.; NAKAR, D.; SINTOV, A. Colonic drug delivery: Enhanced release of indomethacin from cross-linked chondroitin matrix in rat cecal content. **Pharmacology Response.** v. 9, p. 276, 1992.

RUOSLAHTI, E.; YAMAGUCHI, Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. **Cell**. v. 64, p. 867-869, 1991.

SAEED, A; GEORGET, D. M. R; MAYES, A. G. Solid-State Thermal Stability and Degradation of a Family of Poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxymethylacrylamide) Copolymers. **Wiley Online Library**. 2010

SANTOS P. L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G.; BOAVENTURA, L. A. Biological screening of Annonaceos Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**. v. 10, n. 2-3, p. 209-212, 2003.

SANTOS, G. C. **Avaliação do efeito protetor do urucume da bixina sobre a genotoxicidade induzida pelo antitumoral cisplatina em células da linhagem PC12**. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Tese de Doutorado. 2008.

SANTOS, C. V. **Sulfato de condroitina: da matéria-prima à terapêutica**. Monografia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, p. 15,16,57,58, 2009

SCENIHR. **Scientific Committee on Emerging and newly Identified Health Risks** (SCENIHR). Opinion on the Appropriateness of Existing Methodologies to Assess the Potential Risks Associated with Engineered and Adventitious Products of Nanotechnologies. 2005.

SEITZ, J. A.; MEHTA, S. P.; YEAGER, J. L. Em Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica. **Fundação Calouste Gulbenkian**. Lisboa, n. 11, 2001.

SELVAMALAR, J. C. S; KRITHIGA, T; PENLIDIS, A; NANJUNDAN, S. Copolymerization of 4-benzyloxycarbonylphenyl methacrylate with glycidyl methacrylate: synthesis, characterization, reactivity ratios and application as adhesives. **Reactive and Functional Polymers**. v. 56, p. 89-101, 2003.

SERDA, R. E; GO, J. H; BHAVANE, R. C; LIU, X. W; CHIAPPINI, C; DECUZZI, P; FERRARI, M. The association of silicon particles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature. **Biomaterials**. v. 30, p. 2440–2448, 2009.

SHERSTOV, A. Y. U.; KIVMAN, G. Y. A., VASSILIEV, A. Y. E.; GELPERINA, S. E.; ANTROPOV, A. S.; ANISSIMOVA, E. V.; GULYAEV, A. E. **Interaction of nanoparticle-bound ampicillin with the leucocytes of peripheral blood** . III Conferency of Pharmacology Science Clinical. p.26, 1996.

SHIN, J. Y. Chemical structure and physical properties of cyclic olefin copolymers. **Pure Applied Chemistry**. v. 77, p. 801, 2005.

SIEPMANN, J.; SIEPMANN, F. Mathematical modeling of drug delivery. **Internacional Journl of Pharmaceutics**. v. 364, p. 328, 2008.

SILVA FILHO, J. F. **Estudo dos Parâmetros de Síntese do Gel Termossensível Poli(N-isopropilacrilamida)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2005.

SILVA, F. B. **Síntese e caracterização de hidrogéis de Poli[(n-isopropilacrilamida)-co-(ácido metacrílico)] e sua aplicação como sistemas de liberação controlada de medicamentos**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. 2006

SILVA, T. L. **Avaliação da toxicidade e estudo da atividade do extrato etanólico seco dos bulbos de eleutherine plicata herb (iridaceae) sobre alguns parâmetros do estresse oxidativo na malária experimental in vivo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 2012.

SILVA, M. S; COCENZA, D. S; ROSA, A. H; FRACETO, L. F. Efeito da associação do herbicida clomazone a nanoesferas de alginato/quitosana na adsorção em solos. **Quimica Nova**. v. 35, n. 1, p. 102-107, 2012.

SINFRÔNIO, F. S. M. **Avaliação termoanalítica da reciclagem de polietileno e polietileno tereftalato usando materiais micro e mesoporosos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal da Paraíba. 2006.

SINHA, V. R.; KUMRIA, R. A novel compression-coated doughnut-shaped tablet design for zero-order sustained release. **Internacional Journal of Pharmacology**. v. 19, p. 224, 2001.

SINGH, S. P; RAHMAN, M. F; MURTY, U. S. N; MAHBOOB, M; GROVER, P. Comparative study of genotoxicity and tissue distribution of nano and micron sized iron oxide in rats after acute oral treatment. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 266, p. 56–66, 2013.

SIRAJUDDIN, M; ALI, S; HAIDER, A; SHAH, N. A; SHAH, A; KHAN, M. R. Synthesis, characterization, biological screenings and interaction with calf thymus DNA as well as electrochemical studies of adducts formed by azomethine [2-((3,5-dimethylphenylimino)methyl)phenol] and organotin(IV) chlorides. **Polyhedron**. v. 40, p. 19–31, 2012.

SNIDER, D.A.; ADDICKS W.; OWENS W. Polymorphism in generic drug product development. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 56, p. 391-395, 2004.

SORGELOOS, P et al. **The culture of Artemia salina on ricebran: The conversion of a waste product into highly nutritive animal protein**. 10th Annual Meeting of the WMS. p. 25–27, 1978.

SOUSA, R. G.; BARROS, E. M.; SOUZA, R. M.; LINHARES, A. L.; NETO, E. A., FREITAS, R. F. S. **Caracterização Ténodinâmica de Géis Termossensíveis no Contexto de Ponto Crítico e Transição de Fases**. Anais do Congresso Brasileiro de Polímeros. São Paulo, p. 608, 439-443, 1993.

SOUSA, R. G.; FREITAS, R. F. S. Determinação do Diagrama de Fases do Gel Termossensível Poli(N-Isopropilacrilamida). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. p. 32, 1995.

SOUSA, R. G.; PRIOR-CABANILLAS, A.; QUIJADA-GARRIDO, I.; BARALES-RIENDA, J. M. Dependence of Copolymer Composition, Swelling History, and Drug Concentration on the Loading of Diltiazem hydrochloride (DIL.HCl) into Poly[(N-isopropylacrylamide)-co-(methacrylic acid)] Hydrogels and its Release Behaviour from Hydrogel Slabs. **Journal of Controlled Release**. v. 102, p. 595-606, 2005.

SOUZA, C. E. **Avaliação da atividade in vitro de nanoemulsões e nanocápsulas de fluconazol contra candida spp**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto. 2007.

SOUSA, A. **Híbridos de Gel Polimérico em Sílica Mesoporosa Estruturalmente Ordenada para Liberação Controlada de Fármacos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais. p. 64, 2009.

SOUZA, C. F. **Galactomanana de sementes de Caesalpinia ferrea var. ferrea: estrutura, modificação química e caracterização de propriedades**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Paraná. p. 48, 2009.

SMETANA, K. The influence of hydrogel functional groups on cell behaviour. **Journal of Biomedical Materials Research**. v. 24, p. 463–470, 1990.

SMETANA, K. Cell biology of hydrogels. **Biomaterials**. v. 14, n. 14, p. 1046–1050, 1993.

SPANINGER, K; SYTKOWSKI, A. J; DEBELJAK, N. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR evaluation of chronic erythropoietin treatment effect on the SH-SY5Y and PC12 cells. **Cent. Eur. J. Chem**. v. 11, n. 3, p. 348-357, 2013.

SU, M; ZHAO, M; LUO, Y; LIN, X; XU, L; HE, H; XU, H; TANG, X. Evaluation of the efficacy, toxicity and safety of vinorelbine incorporated in a lipid emulsion. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 411, p. 188–196, 2011.

SUN, Z; SHU, D; CHEN, H; HE, C; TANG, S; ZHANG, J. Microstructure and supercapacitive properties of busenite-type manganese oxide with a large basal spacing. **Journal of Power Sources**. v. 216, p. 425-433, 2012.

SUNG, J. H; JI, J. H; PARK, J. D; YOON, J. U; KIM, D. S; JEON, K. S; SONG, M. Y; JEONG, J; HAN, B. S; HAN, J. H; CHUNG, Y. H; CHANG, H. K; LEE, J. H; CHO, M. H; KELMAN, B. J; YU, I. J. Subchronic inhalation toxicity of silver nanoparticles. **Toxicological Science**. v. 108, n. 2, p. 452-461, 2009.

SUNG, J. H; JI, J. H; PARK, J. D; SONG, M. Y; SONG, K. S; RYU, H. R; YOON, J. U; JEON, K. S; JEONG, J; HAN, B. S; CHUNG, Y. H; CHANG, H. K; LEE, J. H; KIM, D. W; KELMAN, B. J; YU, L. J. Subchronic inhalation toxicity of gold nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**. v. 8, p. 16, 2011.

TAKEDA, N; NAKAMURA, E; YOKOYAMA, M; OKANO, T. Temperature-responsive polymeric carriers incorporating hydrophobic monomers for effective transfection in small doses. **Journal of Controlled Release**. v. 95, p. 343, 2004.

TANAKA, N., K; IMAI, K; OKIMOTO, S; UEDA, Y; TOKUNAGA, R; IBUKI, K; HIGAKI, T; KIMURA, T. O. Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine. **Journal of Controlled Release**. v. 108, p. 386- 95, 2005.

TANAKA, N. K; IMAI, K; OKIMOTO, S; UEDA, Y; TOKUNAGA, R; IBUKI, K; HIGAKI; KIMURA. T. Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nilvadipine (II): in vivo evaluation. **Journal of Controlled Release**. v. 112, p. 51-56, 2006.

TANGERINO, L. M. B. **Estudo das propriedades antibianas de copolímeros derivados do eugenol**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Itajubá. p. 99-100, 105-106, 2006.

TERZAGHI, C; BUFFAGNI, M; CANTELLI, D; BONFANTI, P; CAMATINI, M. Physical-chemical and ecotoxicological evaluation of water based drilling fluids used in italian off-shore. **Chemosphere**. v. 37, n. 14, p. 2859-2871, 1998.

TEIXEIRA , P; DINIZ , D. G. A. ; LIMA , E. M. **Obtenção e caracterização físico-química de sistemas poliméricos contendo isotretinoína**. Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica. 2006.

THACHARODI, D; RAO, K. P. Rate-controlling biopolymer membranes as transdermal delivery systems for nifedipine: development and in vitro evaluations. **Biomaterials** v. 17, p. 1307-1311, 1996.

TOFFOLETTO, O; TAVARES, A.; CASARINI, D. E.; REDUBLO, B. M.; RIBEIRO, A. B. Farmacocinética da associação de glucosamina e sulfato de condroitina em humanos sadios do sexo masculino. **ACTA Ortopedica Brasileira**. v. 5, p. 13, 2005.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALCARENGHI, D. **Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana ferro(III) solúvel**. Dissertação de Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí. p. 6, 2006.

VAN DEN HEUVEL, M. J; CLARK, D. G; FIELDER, R. J; KOUNDAKJIAN, P. P; OLIVER, G. J. A; PELLING, D; TOMLINSON, N. J; WALKER, A. P. The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. **Food and Chemical Toxicology**. v. 28, p. 469-482, 1990.

VANIN, M; SANTANA, C. C; TORRIANI, I. L; PRIVELIC, T; DUEK, E. A. R. Estudo da degradação “In Vitro” de blendas de PHB/PLLA na forma de filmes. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 14, n. 3, p. 187-193, 2004.

VEIGA, L. F. ; VITAL, N. Testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia* sp. In: NASCIMENTO, I. A; SOUSA, E. C. P. M.; NIPPER, M. (eds.). **Métodos em Ecotoxicologia Marinha**. São Paulo, p. 111-112, 2002.

VEIGA, L. F; VITAL, N. A; PORTELA, M. R; OLIVEIRA, F. F. **Avaliação de faixa de sensibilidade de Artemia salina ao Lauril Sulfato de Sódio**. PETROBRÁS/CENPES/SUPESQ/DITER. p. 64, 1989.

VENDRUSCOLO, C. W; ANDREAZZ, I. F; GANTER, J. L. M. S; FERRERO, C; BRESOLIN, M. B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 296, p. 1-11, 2005.

VENKATARAMAN, S; ONG, W. L; ONG, Z. Y; LOO, S. C. J; RACHEL, P. L; YANG, Y. Y. The role of PEG architecture and molecular weight in the gene transfection performance of PEGylated poly(dimethylaminoethyl methacrylate) based cationic polymers. **Biomaterials**. v. 32, p. 2369-2378, 2011.

VIEIRA, N. A. B. **Síntese, Caracterização e Estudos em Solução de Terpolímeros Anfífilicos Termo-sensíveis e Sensíveis ao pH: Uma Perspectiva para Obtenção de Sistemas Transportadores de Fármacos**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. 2006.

VIHOLA, H.; LAUKKANEN, A.; VALTOLA, L.; TENHU, H.; HIRVONEN, J. Cytotoxicity of Thermosensitive Polymers poly(N-isopropylacrylamine), poly(N-vinylcaprolactam), and amphiphilically modified poly(N-vinylcaprolactam). **Journal of Biomaterials**. n. 26, p. 3055-3064, 2005.

VILHENA, T. C. **Avaliação da Toxicidade e dos efeitos do extrato etanólico seco das cascas de Himatanthus articulatus (Vahl) Woodson (Apocynaceae) sobre as alterações oxidativas na Malária Experimental in vivo.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. 2012.

VILLANOVA, J. C. O; ORÉFICE, R. L.; CUNHA, A. S. Aplicações Farmacêuticas de Polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.** v. 20, n. 1, p. 53-55, 2010.

WANGA, L. F; SHENA, S. S; LU, S. C. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate – methacrylate hydrogels. **Carbohydrate Polymers.** n. 52, p. 389–396, 2003.

WANG, Y. C; LEE, K. R; LAI, J. Y. Pervaporation of Aqueous Alcohol Mixtures Through a Chemically Grafted Glycidyl Methacrylate on to Poly(4-methyl-1-pentene) Membrane. **European Polymer Journal.** v. 32, n. 4, p. 493-499, 1996.

WANG, L.; SHEN, S. S.; LU, S. C. Synthesis and characterization of chondroitin sulfate-methacrylate hydrogels. **Carbohydrates Polymer.** v. 52, p. 389, 2003.

WANG, J; ZHAN,Y; FANG, J; GAO, H. Nonisothermal Degradation Kinetics for Epoxy Resin Systems Containing Polym ethylphen ylsilsesquioxane. **Journal of Applied Polymer Science.** v . 123, p. 1024–1031, 2011.

WANG, Y. T ; WANG, C. S; YIN, H. Y; WANG, L. L; XIE, H. F; CHENG, R. S. Carboxyl-terminated butadiene-acrylonitrile-toughened epoxy/carboxyl-modified carbon nanotube nanocomposites: Thermal and mechanical properties. **Express Polymer Letters.** v.6, n.9, p. 719–728, 2012.

WATERMAN, K. C. A Critical Review of Gastric Retentive Controlled Drug Delivery. **Pharmaceutical Development Technology.** v. 12, p. 1, 2007.

WENDHAUSEN, P. A. P.; RODRIGUES, G. V.; MARCHETTO, O. **Análises Térmicas:** caracterização de materiais III. Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

WENDLANDT, W. W. Thermal Analysis. **Chemical analysis.** v. 3, p. 810, 1986.

WU, J; ZHONG, F; LI, Y; SHOEMAKER, C. F; XIA, W. Preparation and characterization of pullulan and chitosan and pullulan carboxymethyl chitosan blended films. **Food Hydrocolloids.** v. 30, p. 82-91, 2013.

XI, J; ZHOU, L; DAÍ, H. Drug-loaded chondroitin sulfate-based nanogels: Preparation and Characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v. 100, p.107–115, 2012.

XIA, X; HU, Z; MARQUEZ, M. Physically Bonded Nanoparticle Networks, a Novel Drug Delivery System. **Journal of Controlled Release.** v. 103, p. 21-30, 2005.

XIE, H.R; HU, L.S; LI, G.Y. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. **Chin. Med. J.** v. 123, p. 1086, 2010.

XINMING, L. Polymeric hydrogels for novel **contact lens**-based ophthalmic drug delivery systems: A review . **Contact Lens & Anterior Eye.** v. 31, p. 57, 2008.

XIONG, D; FANG, T; YU, L; SIMA, X; ZHU, W. Effects of nano-scale TiO₂, ZnO and their bulk counterparts on zebrafish: Acute toxicity, oxidative stress and oxidative damage. **Science of the Total Environment.** v. 409, p. 1444–1452, 2011.

YAMAMOTO, Y; FUJIGAYA, T; NIIDOME, Y; NAKASHIMA, N. Fundamental properties of oligo double-stranded DNA/single-walled carbon nanotube nanobiohybrids. **Nanoscale.** v. 2, p. 1767–1772, 2010.

YANAGISHITA, M. Function of proteoglycans in the extracellular matrix. **Acta Pathologica Japonica.** 43:283-293, 1993.

YING, L; KANG, E. T; NEOH, K. G. Characterization of membranes prepared from blends of poly(acrylic acid)-graft-poly(vinylidene fluoride) with poly(N-isopropylacrylamide) and their temperature-and pH-sensitive filtration. **Journal of Membrane Science.** n. 224, p. 93–106, 2003.

YANG, Z; HAN, B; FU, D; LIU, W. Acute toxicity of high dosage carboxymethyl chito-san and its effect on the blood parameters in rats. **J Mater Sci: Mater Med.** v. 23, p. 457–462, 2012.

ZALFEN, A. M. Controlled release of drugs from multi-component biomaterials. **Acta biomaterialia.** v. 4, p. 1788, 2008.

ZHANG, J. F; KATO, K; UYAMA, Y; IKADA, Y. Surface Graft Polymerization of Glycidil Methacrylate onto Polyethylene and the Adhesion with Epoxy Resin. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry.** v. 33, p. 2629-2638, 1995.

ZHANG, X. D; WU, H. Y; WU, D; WANG, Y. Y; CHANG, J. H; ZHAI, Z. B; MENG, A. M; LIU, P. X; ZHANG, L. A; FAN, F. Y. Toxicologic effects of gold nanoparticles in vivo by different administration routes. **International Journal of Nanomedicine.** v. 5, p. 771–781, 2010.

ZHANG, Y; ZHENG, M; KISSEL, T; AGARWAL, S. Design and Biophysical Characterization of Bioresponsive Degradable Poly(dimethylaminoethyl methacrylate) Based Polymers for In Vitro DNA Transfection. **Biomacromolecules.** v.13, p. 313–322, 2011.

ZHANG, H; ZHANG, H; LI, X; MAI, Z; WEI, W; LI, Y. Crosslink able sulfonated poly (diallyl-bisp henol ether ether ketone) membranes for vanadium redox flow battery application. **Journal of Power Sources.** v. 217, p. 309-315, 2012.

ZHENG, W.; SAUER, D.; MCGINITY, J. W. Influence of hydroxyethylcellulose on the drug release properties of theophylline pellets coated with Eudragit RS 30 D. **European Journal of Pharmacology and Biopharmacology**. v. 59, p. 147, 2005.

ZSAKÓ, J. Kinetic analysis of thermogravimetric data XXIX: Remarks on the 'many curves' methods. **Journal of Thermal Analysis Calorimetry**. p. 1845, 1996.

Anexos

ANEXO 1- AUTORIZAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA ANIMAL DA UFPA



comitê de ética em pesquisa
com animais de experimentação



PARECER BIO134-13

Projeto: Avaliação toxicológica do copolímero Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida para uso Farmacêutico

Coordenador: Prof. Dr. Flavio de Vasconcelos

Área Temática: Farmácia

Vigência: 08/2012 a 08/2014

Nº no CEPAE-UFPA: 134-13

O projeto acima identificado foi avaliado pelo Comitê de Ética Em Pesquisa Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE). O tema eleito para a investigação e de alto teor científico justificando a utilização do modelo animal proposto. Os procedimentos experimentais utilizados seguem as normas locais e internacionais para tratamento e manipulação de animais de experimentação. Portanto, o CEPAE, através de seu presidente, no uso das atribuições delegadas pela portaria Nº 3988/2011 do Reitor da Universidade Federal do Pará, resolve **APROVAR** a utilização de animais de experimentação nas atividades do projeto em questão, no período de vigência estabelecido. As atividades experimentais fora do período de vigência devem receber nova autorização deste comitê.

Belém, 01 de agosto de 2012

Wallace Gomes Lessi
Prof. Dr. Wallace Gomes Lessi
Presidente do CEPAE-UFPA



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

SUELLEN CHRISTTINE DA COSTA SANCHES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA PRELIMINAR DO COPOLÍMERO SULFATO
DE CONDROITINA-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA USO
FARMACÊUTICO**

**BELÉM - PA
2013**

SUELLEN CHRISTTINE DA COSTA SANCHES

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO
TOXICOLÓGICA PRELIMINAR DO COPOLÍMERO SULFATO
DE CONDROITINA-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA USO
FARMACÊUTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-Orientadora: Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa

BELÉM - PA
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Sanches, Suellen Christtine da Costa.

Caracterização físico-química e avaliação toxicológica preliminar do copolímero sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida para uso farmacêutico / Suellen Christtine da Costa Sanches ; orientador, Flávio de Vasconcelos, co-orientadora, Roseane Maria Ribeiro Costa. — 2013

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Belém, 2013.

1. Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida. 2. Nanotoxicologia. 3. Carreador de fármacos. 4. Análise Térmica 5. Células PC-12. I. Título.

CDD: 22. ed.: 615.7040724

FOLHA DE APROVAÇÃO

SUELLEN CHRISTTINE DA COSTA SANCHES

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA PRELIMINAR DO COPOLÍMERO SULFATO DE CONDROITINA-co-N-ISOPROPILACRILAMIDA PARA USO FARMACÊUTICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos

Co-Orientadora: Prof. Dra. Roseane Maria Ribeiro Costa

Aprovada em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. Flávio de Vasconcelos (Orientador)

Prof. Dra. Jaqueline Rodrigues da Silva

Prof. Dr. José Otávio Carrera Silva Junior

BELÉM - PA
2013

Aos meus pais, Álvaro e Dinair Sanches, pelo apoio, paciência, compreensão, dedicação incondicionais e essenciais para que pudesse superar todas as dificuldades e conseguir alcançar meus objetivos.

A vocês dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e guiar meus passos até este momento.

Ao meu orientador, Dr. Flávio de Vasconcelos e minha co-orientadora Dra. Roseane Costa pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento deste estudo.

A EMBRAPA Amazônia Oriental pela colaboração no estudo.

Aos pesquisadores do Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ) e Instituto Evandro Chagas (IEC) que me auxiliaram durante a etapa experimental.

Ao meu namorado, Amilton Gomes, pelo companheirismo e incentivo importantes para a realização deste estudo.

Aos amigos do laboratório de Controle de Qualidade e Toxicologia, especialmente Adriana Veiga, Ana Carolina Costa, Afonso Vasconcelos, Eliana Nascimento, Polyane Alencar, Raimundo Costa, Taylon Aguiar, Thiago Leite e Thiago Vilhena pelo apoio nas etapas experimentais do estudo, pela amizade sincera, pelos momentos de descontração essenciais para transpor os obstáculos vividos, principalmente durante o período de conclusão dos resultados.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, conscientemente ou não para a finalização desta pesquisa.

Muito Obrigada.

“As pesquisas que fazemos são apenas uma gota de um imenso oceano ainda
inexplorado”
Carver

RESUMO

SANCHES, S.C.C. **Caracterização físico-química e avaliação toxicológica preliminar do copolímero sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida para uso farmacêutico**. 2013. 154 p. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém/PA, 2013.

A Indústria Farmacêutica utiliza polímeros em forma de nanopartículas em formulações de liberação controlada e vetorizada por possuírem baixo custo em relação a demais métodos de preparações de formas farmacêuticas, aparentemente não serem reconhecidos pelo sistema de defesa do organismo, proporcionar melhora da eficácia, diminuição da toxicidade e da dose de fármaco administrado. O sulfato de condroitina-co-N-isopropilacrilamida (SCM + NIPAAm) é um copolímero proposto para este fim, a partir da reação de um polímero sintético, o poli N-isopropilacrilamida (PNIPAAm), com características termossensíveis, com um natural, o Sulfato de Condroitina (SC), com características bioadesivas. Assim, a copolimerização pode ser capaz de somar estas propriedades e aperfeiçoar o seu uso como um veículo para liberação controlada. Este trabalho objetivou, portanto, realizar a caracterização físico-química das partículas de sulfato de condroitina e N-isopropilacrilamida e do copolímero SCM+NIPAAm (2,5 % e 5%) e do SCM+PNIPAAm 2,5% e uma avaliação toxicológica parcial de um destes copolímeros que apresentar as melhores propriedades de um eficiente carreador de fármacos, selecionado a partir dos ensaios de caracterização físico-química. Para determinar a estrutura química dos sistemas particulados e analisar os seus componentes químicos, foi realizada a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR); Para analisar a morfologia das partículas, foi usado a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); A Termogravimetria/ Termogravimetria Derivada e Análise Térmica Diferencial (TG/DTG) foi usada para avaliar o comportamento térmico dos sistemas particulados, bem como auxiliar na análise de Cinética de Degradação (CD, método de Flynn-Wall-Ozawa); Foi ainda realizado a técnica de degradação *in vitro* e a determinação carga superficial e tamanho de partículas (análise do Potencial Zeta, PZ). Para avaliar a toxicidade, foi realizado o bioensaio em microcrustáceo *Artemia salina* (24 e 48 h), viabilidade celular (citotoxicidade) em células PC-12 (método do MTT) e também a toxicidade aguda oral em camundongos. As análises de RMN, FTIR e MEV demonstraram semelhança quanto ao aspecto estrutural e morfológico entre os copolímeros estudados. As análises de TG demonstraram que o SCM+NIPAAm 5% apresentou maior estabilidade térmica em relação aos demais copolímeros avaliados, uma vez que sua decomposição polimérica ocorre em temperaturas superiores, em torno de 233°C. O DTA demonstrou valores de temperaturas concordantes com os eventos térmicos de decomposição apresentados pelas curvas das análises TG. Sua estabilidade foi confirmada através da CD e estudo de degradação *in vitro*, apresentando, respectivamente, $E_a > 100 \text{ kJ mol}^{-1}$ e perda de 48% da sua massa inicial após três meses. Além disso, SCM+NIPAAm 5% apresentou diâmetro de partícula inferior a 200 nm e índice de polidispersão de 0,35, além do PZ $> -30\text{mV}$, características de um promissor candidato a carreador de fármacos. Em relação às avaliações toxicológicas, o SCM+NIPAAm 5% não apresentou toxicidade no bioensaio de *A. salina* ($CL_{50} > 1000$) e no modelo celular avaliado, dentro das concentrações e circunstâncias de exposição estudadas. O SCM+NIPAAm 5%, na dose oral de 2000 mg/kg, não apresentou nenhum sinal evidente de toxicidade em camundongos, o que foi corroborado pela ausência de alterações anatomo-histopatológicas. A copolimerização do Sulfato de Condroitina e N-isopropilacrilamida na concentração estudada, dada suas características físico-químicas e toxicológicas preliminares, apresenta propriedades que contribuem para a proposta de um sistema que constitui uma nova forma de liberação controlada, especialmente de fármacos.

Palavras-chave: Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida; Nanotoxicologia; Carreador de fármacos; Análise Térmica; Células PC-12.

ABSTRACT

SANCHES, S.C.C. **Physicochemical characterization and preliminary toxicological evaluation of the copolymer chondroitin sulfate-co-N-isopropylacrylamide for pharmaceutical purposes** 2013. 154 p. Dissertation (Master's Degree) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém/PA - Brazil, 2013.

The pharmaceutical industry uses polymers as nanoparticles in controlled release formulations and vector for having low cost compared to other methods of preparation of pharmaceutical dosage forms, apparently not being recognized by the body's defense system, provide improved efficacy, reduce toxicity and the dose of administered drug. The sulfate of chondroitin-co-N-isopropylacrylamide (SCM + NIPAAm) is a copolymer proposed for this purpose, from a synthetic polymer reaction, poly N-isopropylacrylamide (PNIPAAm) with thermosensitive characteristics with a natural, Chondroitin sulfate (CS), with bioadhesive characteristics. Thus, the copolymerization may be able to add these properties and to improve its use as a vehicle for controlled-release. This study aimed to characterize physico-chemical of sulfate chondroitin particles and N-isopropylacrylamide and SCM+NIPAAm copolymer (2.5% and 5%) and SCM+PNIPAAm 2.5% and a partial toxicological evaluation of one of these copolymers presenting the best properties of an efficient carrier of drugs, selected from the trials of physic-chemical characterization. To determine the chemical structure of the particulate systems and analyze the chemical components, it was performed Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (RMN) and Infrared Fourier Transformed Spectroscopy (FTIR), to analyze the morphology of the particles, it was used Electron Microscopy (SEM), The Thermogravimetry and Differential Thermal Analysis (TG/DTA) was used to evaluate the thermal behavior of particulate systems, as well as assist in the analysis of kinetics of degradation (CD, Flynn-Wall-Ozawa method); it was also made in vitro degradation technique and surface charge determining and particles size (Zeta potential analysis, PZ). To evaluate the toxicity, it was performed bioassay in *Artemia salina* (24 and 48 hours), cell viability (cytotoxicity) on PC-12 cells (MTT method), and also acute oral toxicity in mice. The NMR, FTIR and SEM analysis showed similarity regarding the structural and morphologic aspects between the studied copolymers. TG analyzes showed that SCM+NIPAAm 5% showed higher thermal stability compared to the other copolymers evaluated, since its polymer decomposition occurs at temperatures above around 233 °C. DTA demonstrated temperature values consistent with decomposition thermal events provided by the curves of TG analysis. The stability was confirmed by CD and in vitro degradation study, presenting, respectively, $E_a > 100 \text{ kJ mol}^{-1}$ and 48% of its initial weight after three months. Furthermore, SCM+NIPAAm 5% presented particle diameter of less than 200 nm and polydispersity index of 0.35, and the $PZ > -30\text{mV}$, characteristics of a promising candidate as a drug carrier. Regarding toxicological evaluations, SCM+NIPAAm 5% did not show toxicity on bioassay *A. salina* ($LC_{50} > 1000$) and in the cellular model evaluated within the concentrations and circumstances of exposure studied. The SCM+NIPAAm 5%, in the oral dose of 2000 mg/kg, did not show any obvious sign of toxicity in mice, which was confirmed by the absence of anatomical and histopathological changes. The copolymerization of chondroitin sulfate and N-isopropylacrylamide in the studied concentration, given its physical-chemical characteristics and toxicological preliminary, presents properties that contribute to propose a system which is a new form of controlled release, especially drugs.

Keywords: Chondroitin Sulfate-co-N-isopropylacrylamide; Nanotoxicology; Drug Carriers; Thermal analysis; PC-12 Cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrativo para formação de um polímero.....	18
Figura 2	Tipos de Copolímeros.....	19
Figura 3	Polimerização do Etileno.....	20
Figura 4	Propriedades poliméricas.....	21
Figura 5	Esquema ilustrativo da divisão das nanopartículas em nanocápsulas e nanoesferas.....	22
Figura 6	Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multidose (a) e sistema de liberação controlada (b), sendo A a administração do fármaco	29
Figura 7	Sistemas de liberação de fármacos e polímeros que atuam nas diferentes regiões do trato gastrointestinal (TGI).....	34
Figura 8	a) Sistema de liberação tipo matricial; b) reservatório; e c) osmótico (oral).....	35
Figura 9	Estrutura química do Sulfato de Condroitina.....	39
Figura 10	Reações típicas do grupamento epóxi do metacrilato de glicidila.....	43
Figura 11	Esquema de polimerização do metacrilato de glicidila.....	43
Figura 12	a) Duas diferentes rotas de reação com o Metacrilato de Glicidila: abertura do anel epóxi e a transesterificação. b) Desenho estrutural da modificação química do Sulfato de Condroitina pelo metacrilato de Glicidila através abertura do anel epóxi e da transesterificação.....	44
Figura 13	Estrutura Química do NIPAAm.....	46
Figura 14	Estrutura Química do PNIPAAm.....	46
Figura 15	Representação esquemática da transição de fase para um polímero termossensível.....	46
Figura 16	Solução de um polímero termo-sensível antes (a) e depois (b) da LCST, respectivamente.....	47
Figura 17	Comportamento estímulo-resposta de microcápsulas transportadoras de fármacos, com polímero termossensível na estrutura da casca.....	49
Figura 18	Sulfato de Condroitina modificado pelo Metacrilato de Glicidila.....	80
Figura 19	Espectro de RMN ¹ H obtido de 30 mg do SCM em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b) e vinílico (c).....	81
Figura 20	Estrutura e Espectro de RMN ¹ H a partir de 30 mg do NIPAAm dissolvido em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b) e metínico (c).....	82
Figura 21	Estrutura química do Sulfato de Condroitina modificado (SCM) e Copolímero Sulfato de Condroitina modificado + N-isopropilacrilamida (SCM + NIPAAm).....	82
Figura 22	Espectro de RMN ¹ H obtido de 30 mg do copolímero SCM+NIPAAm 5% em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b), metílico (c), metilênico (d) e metínico (e).....	83
Figura 23	Espectro de RMN ¹ H obtido de 30 mg do copolímero SCM+PNIPAAm 2,5% em água deuterada (D ₂ O). Os sinais referem-se aos grupos metílico (a), metilênico (b), metílico (c), metilênico (d) e metínico (e).....	84

Figura 24	Espectro FTIR obtido de 1mg do SC modificado pelo GMA com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$	85
Figura 25	Espectro FTIR obtido de 1mg do NIPAAm com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$	86
Figura 26	Espectro FTIR obtido de 1 mg do SCM+NIPAAm 5% com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$	87
Figura 27	Espectro FTIR obtido de 1 mg do SCM+PNIPAAm 2,5% com pastilhas de KBr submetido a uma resolução de 2 cm^{-1} e faixa de $4000\text{ a }400\text{ cm}^{-1}$	88
Figura 28	Micrografias obtidas a partir da Microscopia Eletrônica de Varredura do polímero SCM (a) com magnitude de 1000x e dos copolímeros SCM +NIPAAm 5% (b), SCM+NIPAAm 2,5% (c) e SCM+PNIPAAm 2,5% (d) com magnitude de 2000x.....	90
Figura 29	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra NIPAAm submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	92
Figura 30	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra NIPAAm submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	92
Figura 31	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	94
Figura 32	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	95
Figura 33	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	96
Figura 34	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	97
Figura 35	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	98
Figura 36	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+NIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	99
Figura 37	Curvas TG obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+PNIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	101
Figura 38	Curvas DTA obtidas a partir de 5 mg da amostra SCM+PNIPAAm 2,5% submetida a diferentes razões de aquecimento (5°C , 10°C e $20^{\circ}\text{C}/\text{min}^{-1}$) em cadinho de alumina e atmosfera dinâmica de nitrogênio (N_2).....	102
Figura 39	Logaritmo da razão de aquecimento em função do inverso da temperatura para os níveis de decomposição térmica em SCM+NIPAAm 5%.....	103
Figura 40	Resultado do estudo de degradação <i>in vitro</i> do copolímero SCM+NIPAAm 5%.....	106
Figura 41	Distribuição do tamanho médio de partículas do copolímero SCM+NIPAAm 5%.....	108
Figura 42	Efeito de diferentes concentrações do copolímero SCM+NIPAAm 5% na viabilidade de células PC12 incubadas por 24h a 37°C em DMEM. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Experimentos realizados em sextuplicata. *** Significativo para $p < 0,0001$ (em relação ao controle e demais concentrações do copolímero). ^{NS} Valores não significativos entre si ou comparados ao Controle.....	114
Figura 43	Efeito de diferentes concentrações do copolímero SCM+NIPAAm 5% na viabilidade de células PC12 incubadas por 48 h a 37°C em DMEM. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão. Experimentos realizados em sextuplicata. *** Significativo para $p < 0,0001$ (em relação ao controle e demais concentrações do copolímero). ^{NS} Valores não significativos entre si ou comparados ao Controle.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipo e Distribuição das Glicosaminoglicanas.....	37
Tabela 2	Descrição dos polímeros avaliados neste trabalho.....	68
Tabela 3	Eventos térmicos de TG obtidas do NIPAAm.....	91
Tabela 4	Eventos térmicos de DTA do NIPAAm.....	92
Tabela 5	Eventos térmicos de TG do SCM.....	94
Tabela 6	Eventos térmicos de DTA do SCM.....	95
Tabela 7	Eventos térmicos de TG do SCM+NIPAAm 5%.....	96
Tabela 8	Eventos térmicos de DTA do SCM+NIPAAm 5%.....	97
Tabela 9	Eventos térmicos de TG do SCM+NIPAAm 2,5%.....	98
Tabela 10	Eventos térmicos de DTA do SCM+NIPAAm 2,5%.....	99
Tabela 11	Eventos térmicos de TG do SCM+PNIPAAm 2,5%.....	100
Tabela 12	Eventos térmicos de DTA do SCM+PNIPAAm 2,5%.....	101
Tabela 13	Parâmetros cinéticos de decomposição térmica para SCM+NIPAAm 5%.....	104
Tabela 14	Resultados da toxicidade do SCM+NIPAAm 5% no bioensaio em <i>Artemia salina</i>	112
Tabela 15	Resultados da variação de massa corporal, consumo médio de ração e água por grupo em camundongos machos tratados com dose oral única do copolímero SCM + NIPAAm 5% (2000 mg/Kg) e observados durante 15 dias.....	119

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

A	- Fator pré-exponencial
ANOVA	- Análise de Variância
ATCC	- American Type Culture Collection
CL ₅₀	- Concentração Letal 50%
COBEA	- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	- Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DE ₅₀	- Dose efetiva 50%
DL ₅₀	- Dose letal 50%
DMEM	- <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DTA	- Análise térmica diferencial
Ea	- Energia de ativação
ECM	- Matriz extracelular da cartilagem
FTIR	- Espectroscopia do infravermelho com transformada de Fourier
Gags	- Glicosaminoglicanas
GMA	- Metacrilato de glicidila
GRT's	- Gastrorretensivos
IPAA	- Isopropilacrilamida
IPN	- Interpenetrantes
LCST	- " <i>lower critical solution temperature</i> "
Log A	- Pré-exponencial
MET	- Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	- Microscopia Eletrônica de Varredura
MO	- Microscopia ótica
MTT	- Brometo de metiltetrazólio
NIPAAm	- N-isopropilacrilamida
OECD	- Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PAA	- Poliacrilamida
PBS	- Solução salina tamponada
PEO	- Poli(óxido de etileno)
PMP	- poli(4-metil-1-penteno)
PNIPAAm	- Poli(N-isopropilacrilamida)
REM	- Radiação eletromagnética
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMN ¹ H	- Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SC	- Sulfato de condroitina
SCENIHR	- Comitê Científico da Comissão Europeia de Emergentes e Recentemente Identificados Riscos para a Saúde
SCM	- Sulfato de Condroitina modificado por Metacrilato de glicidila
SCM+NIPAAm	- Copolímero Sulfato de Condroitina-co-N-isopropilacrilamida
Semi-ipns	- Semi-interpenetrantes
-T _Δ S	- Entrópico
Tg	- Temperatura de transição vítrea
TG	- Análise termogravimétrica
UCST	- " <i>upper critical solution temperature</i> "
α	- Níveis conversionais
β	- Razões de aquecimento
ζ	- Potencial Zeta
μV	- Microvolts

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

EDTA	Etilenodiamino tetra-acético
TiO ₂	Óxido de titânio
Al ₂ O ₃	Óxido de alumínio
KBr	Brometo de potássio
HCl	Ácido clorídrico
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
D ₂ O	Água deuterada
TSP-d43	'(tri) propiônico-2,2,3,3-d ₄ de ácido sal sódico
NaHCO ₃	bicarbonato de sódio
N ₂	Nitrogênio
OH	Hidroxila
DMSO	Dimetilsulfóxido
N-H ou -NH ₃ ⁺	Grupo amina
C=OOH ou -COO ⁻	Grupo carboxila
CH ₃	Grupo metílico
CH	Grupo metínico
C=O	Grupo carbonila
C=C	Dupla de carbono
N-H	Amida
CH ₂	Grupo metilênico
-OSO ₃ ⁻	Grupos sulfidríla

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1	Polímeros	18
2.2	O uso de polímeros na nanotecnologia	21
2.3	Polímeros em sistemas inovadores de liberação de fármacos	28
2.3.1	SISTEMAS ORAIS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS.....	32
2.3.2	SISTEMAS MATRICIAIS.....	32
2.3.3	SISTEMAS RESERVATÓRIOS.....	33
2.3.4	SISTEMA GASTRORRETENSIVO.....	35
2.4	Sulfato de condroitina	36
2.4.1	COMPOSIÇÃO DO SULFATO DE CONDRITINA.....	36
2.4.1.1	Glicosaminoglicanas	36
2.4.1.2	Proteoglicanas.....	37
2.4.2	CARACTERÍSTICAS DO SULFATO DE CONDRITINA.....	38
2.4.3	MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO SULFATO DE CONDRITINA PELO METACRILATO DE GLICIDILA.....	42
2.5	Poli(N- isopropilacrilamida)	45
2.6	Métodos de Caracterização Físico-Química	51
2.6.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	51
2.6.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	51
2.6.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	52
2.6.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL.....	52
2.6.5	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PELO MÉTODO DE FLYNN-WALL-OZAWA.....	52
2.6.6	DEGRADAÇÃO <i>in vitro</i>	54
2.6.7	TAMANHO DE PARTÍCULA.....	55
2.6.8	POTENCIAL ZETA.....	55
2.7	Avaliação toxicológica dos polímeros	56
2.8	Métodos para avaliação toxicológica	63
2.8.1	BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i> leach.....	63

2.8.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	64
2.8.3	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA ORAL.....	65
3	OBJETIVOS.....	67
3.1	Objetivo geral.....	67
3.2	Objetivos específicos.....	67
4	MATERIAL E METÓDOS.....	68
4.1	Materiais.....	68
4.2	Métodos.....	69
4.2.1	SÍNTESE DO COPOLÍMERO SULFATO DE CONDRITINA-CO-N-ISOPROPILACRILAMIDA.....	69
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	70
4.2.2.1	Ressonância magnética nuclear.....	70
4.2.2.2	Espectroscopia no infravermelho com transformada de fourier.....	70
4.2.2.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	70
4.2.2.4	Análise termogravimétrica e análise térmica diferencial.....	71
4.2.2.5	Cinética de degradação pelo método de Flynn-Wall-Ozawa.....	71
4.2.2.6	Degradação <i>in vitro</i>	71
4.2.2.7	Tamanho de partícula.....	72
4.2.2.8	Potencial zeta.....	72
4.2.3	AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA TOXICIDADE.....	72
4.2.3.1	Bioensaio de toxicidade em <i>Artemia Salina</i> leach.....	72
a)	Preparação do copolímero SCM + NIPAAm 5% e realização do ensaio.....	73
4.2.3.2	Avaliação da citotoxicidade.....	74
a)	Preparação do copolímero SCM + NIPAAm 5% para os ensaios <i>in vitro</i>	74
b)	Ensaio de Viabilidade Celular.....	75
4.2.3.3	Avaliação da toxicidade aguda oral.....	76
a)	Procedimento para avaliação da toxicidade aguda oral.....	77
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	79
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1	Caracterização físico-química.....	80
5.1.1	RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.....	80

5.1.2	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER.....	85
5.1.3	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	89
5.1.4	ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA E ANÁLISE TÉRMICA DIFERENCIAL	91
5.1.5	CINÉTICA DE DEGRADAÇÃO PELO METÓDO DE FLYNN-WALL-OZAWA.....	103
5.1.6	DEGRADAÇÃO <i>IN VITRO</i>	106
5.1.7	TAMANHO DE PARTÍCULA.....	108
5.1.8	POTENCIAL ZETA.....	110
5.2	Avaliação preliminar da toxicidade.....	112
5.2.1	BIOENSAIO DE TOXICIDADE EM <i>Artemia salina</i> Leach.....	112
5.2.2	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE.....	113
5.2.3	TOXICIDADE AGUDA ORAL.....	117
6	CONCLUSÕES.....	123
	REFERÊNCIAS.....	124

ANEXOS

ANEXO 1- Autorização do Comitê de Ética Animal da UFPA

ANEXO 2- Tabela de Avaliação do Ensaio Hipocrático (Teste de Toxicidade Aguda)