UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

Janaina Aline Galvão Barros

“Reticulação da Poli (N-vinil-2-pirrolidona) e copolímeros por processos químicos”

SÃO PAULO

31 de Agosto de 2007

Janaina Aline Galvão Barros

**“Reticulação da Poli (N-vinil-2-pirrolidona) e
copolímeros por processos químicos”**

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química
Orgânica).

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique Catalani

SÃO PAULO

2007

***Aos meus pais e irmãos pelo
apoio, incentivo, paciência e
amor.***

"Nós não podemos resolver os problemas usando a mesmo pensamento que tivemos quando os problemas foram criados."

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Luiz Henrique Catalani pela a forma como orientou meu trabalho, pela paciência, confiança. Estou grata pela liberdade de ação que me permitiu, que foi decisiva para que este trabalho contribuísse para o meu desenvolvimento pessoal.

Aos amigos de laboratório, Guilhermino, Vânia, Ricardo, Danielle, Renata, Flávia, Aline, Antônio, Romeu, Luiz Carlos, Reginaldo, Lílian, Patrícia, pelos anos de convívio e amizade.

À Silvia, secretária e amiga, pelas levantadas de moral, pela força, paciência e dedicação.

Aos amigos do Instituto de Química, Lolo, Erick, Marcelo, Luiz Fernando, Ana Maria, Mara, Mimi, Celly, Décio, Xud's, por me passarem seus conhecimentos e habilidades nos momentos em que precisei.

Ao Dr. Willi Baader, Dr. Yoshio, Dr. Omar Seoud, Dr. Jivaldo, Dra. Márcia Temperini, Dra. Maria Regina e Dra. Nicole DeMarquette, pela confiança e orientação em partes do trabalho.

Aos colegas da Escola Politécnica Jeanne, Márcio e Danilo pelos ensaios de CET de reologia.

À Maria Cecília C.S.M. Gomes por me auxiliar na ortografia desta tese.

À Cnpq, pela bolsa concedida.

Enfim, a todos amigos e colegas que me apoiaram e incentivaram durante a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!!!!

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Janaina Aline Galvão Barros

Local e data de nascimento: São Paulo, 23/09/1976

EDUCAÇÃO

- EESG “Brasílio Machado”, São Paulo (1993).
- Universidade de São Paulo, São Paulo (2002).

Bacharel em Química

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

Wisdom idiomas, São Paulo, 2004.

OCUPAÇÃO

Bolsista de Doutorado, CNPq, 07/2002 a 07/2007.

PUBLICAÇÕES (Artigos Completos e Resumos em Congressos)

Artigos:

1. Fachine, G.J.M., Barros, J.A.G., Catalani, L.H. *Polymer*, 45, 4705, 2004.
2. Fachine, G.J.M., Barros, J.A.G., Alcântara, M.R., Catalani, L.H. *Polymer*, 47, 2629, 2006.
3. Barros, J.A.G., Fachine, G.J.M., Alcântara, M.R., Catalani, L.H. *Polymer*, 47, 8414, 2006.

Patente:

CATALANI, Luiz Henrique; BARROS, Janaina Aline Galvão; FECHINE, Guilhermino Jose Macedo. *Processo de obtenção de gel hidrofílico por reticulação de uma solução aquosa de um ou mais polímeros hidrofílicos, gel hidrofílico, curativo, micro-esfera, método de tratamento de queimaduras, método de tratamento de pele, método de embolização e uso.*

Congressos:

BARROS, J.A.G., FECHINE, G.J.M., ALCÂNTARA, M.R., CATALANI, L.H. "Chitosan and poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-co-acrolein) hydrogel by Schiff base formation." § Macro 2006 – World Polymer Congress, 2006, Rio de Janeiro.

FECHINE, G.J.M., BARROS, J.A.G., ALCÂNTARA, M.R., CATALANI, L.H. "Rheological study of the poly(N-2-vinyl pyrrolidone) hydrogel." 8th Brazilian Polymer Conference (CBPol), 2005, Águas de Lindóia.

BARROS, J. A. G., CATALANI, L. H., IZUMI, C. S. M., TEMPERINI, M. L. A. "Investigação da interação entre Fe^{3+} e hidrogéis a base de PVP via reação Fenton na presença e ausência de fluoreto." § 27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latino-americano de Química, 2004, Salvador.

FECHINE, G. J. M., BARROS, J. A. G., CATALANI, L. H. "Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel production by Photo-Fenton reactions." § 9º Simpósio Latino americano de Polímeros e 7º Congresso Ibero americano de Polímeros, 2004, Valencia.

BARROS, J. A. G., FECHINE, G. J. M., CATALANI, L. H. "Produção de hidrogéis a base de Poli(N-vinil-2-pirrolidona) via reação de Fenton." § 9º Simpósio Latino americano de Polímeros e 7º Congresso Ibero americano de Polímeros, 2004, Valencia.

BARROS, J. A. G., FECHINE, G. J. M., CATALANI, L. H. "Estudo comparativo da reticulação de Hidrogéis de PVP por reação de Fenton e Foto-Fenton." § 26ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2003, Poços de Caldas.

BARROS, J. A. G., LOPERGOLO, L. C., CATALANI, L. H., LUGÃO, A. B. "Preparação de hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona) por reação de Fenton na presença de sais: efeito da morfologia" 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas.

BARROS, J. A. G., LOPERGOLO, L. C., CATALANI, L. H., LUGÃO, A. B. "Produção de hidrogéis a base de PVP induzida por reação de Fenton." 24ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química- Poços de Caldas., 2001, Poços de Caldas.

CATALANI, L. H., BARROS, J. A. G., FECHINE, G. J. M., "Alternative technologies for PVP hydrogel production." Proc. 25th Meeting of European Society for Biomaterials, 2001. (Congresso), London.

BARROS, J. A. G., LOPÉRGOLLO, L. C., CATALANI, L. H., LUGÃO, A. B. "Produção de hidrogéis a base de PVP induzida via reação Fenton." 8º SIICUSP. Simpósio de Iniciação científica, 2000.

LOPÉRGOLLO, L. C., BARROS, J. A. G., CATALANI, L. H., LUGÃO, A. B. "Estudo da Biocompatibilidade de membranas à base de de poli(N-vinil-2-pirrolidona) produzidas por radiação ultravioleta. "Anais do 6º Congresso Brasileiro de Polímeros/ IX International Macromolecular Colloquium, 2000.

BARROS, J. A. G., CATALANI, L. H., PONCE, P. "Produção de PVP via reação enzimática." 7º SIICUSP. Simpósio de Iniciação Científica, 1999, São Paulo.

Índice de Siglas.....	I
Índice de Figuras	IV
Índice de Tabelas.....	VII
Índice de equações.....	VIII
Resumo.....	X
Abstract	XI
1. Introdução	1
1.1. Biomateriais	1
1.2. Hidrogéis.....	3
1.2.1. Hidrogéis de Poli(N-vinil-2-pirrolidona)	6
1.2.2. Curativos de hidrogel.....	11
2. Objetivos e Aspectos relevantes do trabalho	18
3. Considerações Gerais	20
3.1. Reação de Fenton	20
3.2. Caracterização da Estrutura dos Hidrogéis	23
3.3. Análise da Estrutura da Água	28
3.4. Análise da adição de sais na produção do hidrogel - Íons da série de Hofmeister.	31
4. Parte Experimental	37
4.1. Materiais	37
4.1.1. Purificação dos monômeros	38
4.1.1.1. Purificação da N-vinil-2-pirrolidona.....	38
4.1.1.2. Purificação da acroleína.	38
4.1.1.3. Purificação do acetato de vinila	38
4.1.1.4. Purificação do metacrilato de metila.....	39
4.2. Equipamentos e técnicas.....	39
4.2.1. Determinação da Massa Molar.....	40
4.2.1.1. Osmometria	40
4.2.2.2. Cromatografia por exclusão de tamanho (CET)	42
4.2.2.3. Espalhamento de Luz	42
4.3. Métodos e Processos	43
4.3.1. Obtenção de hidrogel de PVP por Reação de Fenton	43
4.3.2. Preparação e Caracterização dos copolímeros.....	44
4.3.2.1. Hidrólise dos copolímeros	44
4.3.2.1.1. Metanólise do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)	44
4.3.2.1.2. Hidrólise do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)	45

4.3.3. Obtenção dos hidrogéis de copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona produzidos por reticulações químicas mais brandas.....	46
4.3.3.1. Hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) e Quitosana	46
4.3.3.2. Hidrogel do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico).....	46
4.3.3.2.1. Reticulação com Glutaraldeído.....	46
4.3.3.2.2. Reticulação com íons borato	47
4.3.3.2.3. Hidrogel Físico.....	47
4.3.3.3. Hidrogel do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico) com íons Ca^{2+}	48
4.3.4. Caracterização da Quitosana	48
4.3.4.1 Purificação da Quitosana.....	48
4.3.4.2. Cálculo do grau de acetilação da quitosana.....	49
4.3.4.2.1. Análise Elementar.....	49
4.3.4.2.2. Espectroscopia no Infravermelho	49
4.3.4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN-H^1)	50
4.3.5. Fração de gel.....	51
4.3.6. Ensaio de intumescimento dos hidrogéis	52
4.3.7. Análise da estrutura da água contida no hidrogel	53
4.3.7.1. Espectroscopia no Infravermelho	53
4.3.7.2. DSC	54
4.3.7.3. TG.....	54
4.3.8. Cinética de reticulação dos hidrogéis	54
4.3.9. Análise de Biocompatibilidade.....	55
4.3.10. Análise do Tamanho de Poro	57
4.3.10.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	57
4.3.10.2. Reologia.....	57
5. Resultados e Discussão	58
5.1. Processos oxidativos avançados na reticulação de polímeros	58
5.1.1. Planejamento Fatorial.....	59
5.1.2. Estudo da velocidade de formação dos hidrogéis produzidos via Fenton.....	72
5.1.3. Avaliação da citotoxicidade do hidrogel produzido via reação de Fenton	76
5.1.4. Cálculo do tamanho de poro.....	77
5.1.5. Determinação de água na estrutura do hidrogel	88
5.1.5.1. Espectroscopia no Infravermelho	88
5.1.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial	91
5.1.5.3. Termogravimetria.....	93
5.1.6. Adição de sais	94
5.1.7. Estudo dos complexos.....	98

5.2. Métodos alternativos de reticulação química do poli(N-vinil-2-pirrolidona)	107
5.2.1. Produção e Composição Química dos copolímeros.....	108
5.2.1.1. Análise Elementar.....	109
5.2.1.2. RMN-H ¹	114
5.2.1.3. Análise da massa molar	116
5.2.2. Hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) e Quitosana	117
5.2.2.1. Caracterização da Quitosana	119
5.2.2.1.1. Grau de Acetilação	120
5.2.2.1.2. Determinação da massa molar da Quitosana	121
5.2.2.1.3 Análise de Termogravimetria das quitosana comerciais	122
5.2.2.2. Análise de fração de gel do hidrogel de imina.....	124
5.2.2.3. Análise de Intumescimento do hidrogel do copolímero de PVPACR-quitosana	125
5.2.2.4. Cinética de reticulação do hidrogel do copolímero de PVPACR – quitosana.	127
5.2.2.5. Estudo do comportamento reológico do hidrogel do copolímero de PVPACR - quitosana	128
5.2.2.6. Adição de Cianoborohidreto	131
5.2.2.6.1. Análise no Infravermelho	132
5.2.2.6.2. Cinética da produção do hidrogel de imina na presença de cianoborohidreto.....	133
5.2.2.6.3. Estudo do comportamento do hidrogel de imina na presença de cianoborohidreto de sódio	135
5.2.3. Hidrogel do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)	137
5.2.3.1. Metanólise do copolímero.....	139
5.2.3.1.1. Medidas do grau de metanólise dos copolímeros de poli(vinil-2-pirrolidona-co- acetato de vinila).....	140
5.2.3.2. Reticulação do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico) com glutaraldeído.....	141
5.2.3.2.1. Análise de conteúdo de gel e intumescimento dos hidrogéis de álcool vinílico.	141
5.2.3.3. Reticulação com íons borato	145
5.2.3.3.1. Análise de conteúdo de gel e grau de intumescimento para os hidrogéis de poli(álcool vinílico) na presença de íons borato.....	146
5.2.3.4. Hidrogel Físico.....	147
5.2.3.4.1. Análise de conteúdo de gel e grau de intumescimento para os hidrogéis físicos	148
5.2.4. Hidrogel de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)	151
5.2.4.1. Hidrólise do copolímero poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico).....	152
5.2.4.2. Análise do hidrogel iônico.....	152
6. Conclusão	156
7. Anexos.....	160
7.1. Anexo I.....	160

7.2. Anexo II.....	162
7.3. Anexo III: Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio	164
7.4. Anexo IV: Efeito dos solventes D ₂ O e H ₂ O no infravermelho da PVP.....	164
8. Referências Bibliográficas.....	166

Índice de Siglas

Siglas	Definições
AC	Acroleína
AIBN	Azoisobutironitrila
ANOVA	Análise de variância
AOP	Processos oxidativos avançados
ATR	Reflectância total atenuada
CET	Cromatografia por exclusão de tamanho
CMC	Carboximetilcelulose
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
DSST	Teste dinâmico de varredura da tensão
ξ	Rede polimérica
EDA	Etilenodiamina
EGDMA	Etileno glicol dimetacrilato
G	Ácido gulurônico
G'	Módulo de armazenamento
G''	Módulo de perda
GA	Grau de acetilação
GI	Grau de intumescimento
GM	Grau de metanólise
HAc	Ácido acético
IA	Ácido itacônico
IC	Índice de citotoxicidade
IPN	Rede interpenetrante
IV	Infravermelho
IZ	Índice de zona
KBr	Brometo de potássio

LCST	Temperatura crítica inferior de solubilização
Luviskol® 37	Poli(acetato de vinila-co-N-vinil-2-pirrolidona) razão molar 3:7
Luviskol® 37H	Poli(acetato de vinila-co-N-vinil-2-pirrolidona) razão molar 3:7 hidrolisado
Luviskol® 64	Poli(acetato de vinila-co-N-vinil-2-pirrolidona) razão molar 6:4
Luviskol® 64H	Poli(acetato de vinila-co-N-vinil-2-pirrolidona) razão molar 6:4 hidrolisado
$\overline{M_c}$	Massa molar média entre duas ligações sucessivas
M	Ácido manúrico
MBA	N.N'-metileno bisacrilamida
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMA	Metacrilato de metila
MS	Média dos quadrados
NaAc	Acetato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
PAA	Poli(ácido acrílico)
PDEAAM	Poli(N,N-dietilacrilamida)
PDEAEM	poli(metacrilato de dietilaminoetil)
PEO	Poli(óxido de etileno)
PHEMA	Poli(metacrilato de 2-hidroxietila)
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PNIPAAm	Poli(isopropilacrilamida)
PVA	Poli(álcool vinílico)
PVC	Poli(cloreto de vinila)
PVP	Poli(N-vinil-2-pirrolidona)
PVPACR	Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína)
PVPMA	Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico)
PVPMMA	Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)
PVPVAC	Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)
PVPVAL	Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico)

QH	Quitosana de massa molar alta
QL	Amostra de quitosana liofilizada
QM	Quitosana de massa molar média
QR	Amostra de quitosana real
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SAOS	Cisalhamento oscilatório de tensão controlada
SS	Soma dos quadrados
TG	Termogravimetria
TMPTA	Trimetilol propano
UV-Vis	Ultravioleta
$V_{2,s}$	Volume da fração polimérica no estado intumescido
VAC	Acetato de vinila
VP	N-vinil-2-pirrolidona
ρ_x	Densidade de reticulação

Índice de Figuras

Cápítulo 1

Figura 1.1:.....	5
Figura 1.2:.....	7
Figura 1.3:.....	9
Figura 1.4:.....	11
Figura 1.5:.....	15
Figura 1.6:.....	17

Cápítulo 3

Figura 3.1:.....	20
Figura 3.2:.....	22
Figura 3.3:.....	23
Figura 3.4:.....	29
Figura 3.5:.....	31
Figura 3.6:.....	33

Cápítulo 4

Figura 4.1:.....	41
Figura 4.2:.....	43
Figura 4.3:.....	46

Cápítulo 5

Figura 5.1:.....	68
Figura 5.2:.....	69
Figura 5.3:.....	70
Figura 5.4:.....	71
Figura 5.5:.....	73
Figura 5.6:.....	75
Figura 5.7:.....	76

Figura 5.8:.....	79
Figura 5.9:.....	80
Figura 5.10:.....	81
Figura 5.11:.....	82
Figura 5.12:.....	84
Figura 5.13:.....	84
Figura 5.14:.....	85
Figura 5.15:.....	85
Figura 5.16:.....	86
Figura 5.17:.....	86
Figura 5.18:.....	87
Figura 5.19:.....	90
Figura 5.20:.....	92
Figura 5.21:.....	93
Figura 5.22:.....	94
Figura 5.23:.....	96
Figura 5.24:.....	97
Figura 5.25:.....	99
Figura 5.26:.....	100
Figura 5.27:.....	101
Figura 5.28:.....	102
Figura 5.29:.....	102
Figura 5.30:.....	103
Figura 5.31:.....	104
Figura 5.32:.....	108
Figura 5.33:.....	110
Figura 5.34:.....	111
Figura 5.35:.....	115
Figura 5.36:.....	118
Figura 5.37:.....	119
Figura 5.38:.....	123
Figura 5.39:.....	125
Figura 5.40:.....	126
Figura 5.41:.....	127
Figura 5.42:.....	128
Figura 5.43:.....	129
Figura 5.44:.....	130

Figura 5.45:.....	131
Figura 5.46:.....	132
Figura 5.47:.....	134
Figura 5.48:.....	135
Figura 5.49:.....	136
Figura 5.50:.....	137
Figura 5.51:.....	138
Figura 5.52:.....	139
Figura 5.53:.....	143
Figura 5.54:.....	143
Figura 5.55:.....	144
Figura 5.56:.....	146
Figura 5.57:.....	148
Figura 5.58:.....	149
Figura 5.59:.....	150
Figura 5.60:.....	152
Figura 5.61:.....	153
Figura 5.62:.....	153
Figura 5.63:.....	155

Índice de Tabelas

Cápitulo 1

Tabela 1.1:.....	2
------------------	---

Cápitulo 4

Tabela 4.1:.....	37
------------------	----

Cápitulo 5

Tabela 5.1:.....	58
Tabela 5.2:.....	60
Tabela 5.3:.....	61
Tabela 5.4:.....	63
Tabela 5.5:.....	64
Tabela 5.6:.....	65
Tabela 5.7:.....	67
Tabela 5.8:.....	74
Tabela 5.9:.....	78
Tabela 5.10:.....	83
Tabela 5.11:.....	92
Tabela 5.12:.....	97
Tabela 5.13:.....	109
Tabela 5.14:.....	114
Tabela 5.15:.....	117
Tabela 5.16:.....	120
Tabela 5.17:.....	122
Tabela 5.18:.....	124
Tabela 5.19:.....	141
Tabela 5.20:.....	142
Tabela 5.21:.....	151

Índice de equações

Cápítulo 3

Eq. 3.1		21
Eq. 3.2		21
Eq. 3.3		21
Eq. 3.4		21
Eq. 3.5		22
Eq. 3.6		24
Eq. 3.7		25
Eq. 3.8		25
Eq. 3.9		26
Eq. 3.10		26
Eq. 3.11		26
Eq. 3.12		27
Eq. 3.13		27
Eq. 3.14		27
Eq. 3.15		30
Eq. 3.16		30
Eq. 3.17		35
Eq. 3.18		36
Eq. 3.19		36

Cápítulo 4

Eq. 4.1		41
Eq. 4.2		49
Eq. 4.3		50
Eq. 4.4		50
Eq. 4.5		51
Eq. 4.6		51
Eq. 4.7		52
Eq. 4.8		52
Eq. 4.9		53

Cpulo 5

Eq. 5.163

Eq. 5.263

Eq. 5.365

Eq. 5.5106

Eq. 5.6106

Eq. 5.7106

Eq. 5.8110

Eq. 5.9113

Eq.5.10113

Eq. 5.11114

Eq. 5.12140

Resumo

(Barros, J.A.G., “Reticulação da Poli(N-vinil-2-pirrolidona) e copolímeros por processos químicos”, 2007, 178p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química Orgânica – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo).

Hidrogéis são materiais poliméricos com habilidade em intumescer em água e fluidos biológicos sem, contudo, se dissolver. Devido às suas propriedades de maciez e biocompatibilidade, estes materiais têm tido um crescimento enorme na área de engenharia de tecido, encapsulamento de células e liberação de drogas. Este trabalho visa a produção de hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona) e seus copolímeros a partir de reticulações químicas.

Como metodologia alternativa de produção de hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona), foi estudada a reticulação do PVP por reação de Fenton, onde as concentrações dos reagentes foram avaliadas a fim de produzir um hidrogel com características semelhantes aos hidrogéis de PVP por radiação ionizante. O grande diferencial desta metodologia foi a rápida cinética de gelificação apresentada, creditando um potencial de aplicação inédito.

A partir de reticulações químicas mais brandas, foi estudada a produção de hidrogéis de copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona e aldeídos com quitosana, e íons divalentes. Além de estudadas as propriedades relativas ao hidrogel tais como: conteúdo de gel, grau de intumescimento, cinética de reação, citotoxicidade, densidade de reticulação, massa molar média entre as ligações cruzadas e tamanho de poro.

Palavras chave: Poli(N-vinil-2-pirrolidona), copolímeros, reação de Fenton, hidrogel, reticulação.

Abstract

(Barros, J.A.G., "Poly (N-vinyl-2- pyrrolidone) and copolymers crosslinking by chemical process", 2007, 178p. PhD Thesis – Graduate Program in Organic Chemistry – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo).

Hydrogels are polymeric materials that have the ability to absorb water and biological fluids in their three-dimensional polymeric matrix without dissolution. Due to their interesting properties, such as softness and biocompatibility, there is a growing interest in their application in tissue engineering, cell encapsulation and drug delivery system. This work aims at the study of hydrogels from poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and copolymers produced by chemical crosslinking methods.

PVP crosslinking by Fenton reaction was studied as an alternative methodology to produce poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels. The reagents concentrations were evaluated, in order to produce a hydrogel with the same properties of the hydrogels prepared by high energy radiation. The advantage of this methodology is its fast jellification kinetic, warranting new potential unprecedented applications.

From mild chemical crosslinking methods, the production of hydrogels from copolymers of N-vinyl-2-pyrrolidone and aldehydes with chitosan, and divalent ions was studied. Hydrogels properties as: gel content, swelling ratio, reaction kinetics, cytotoxicity, crosslinking density, molecular weight and pore size were investigated.

Key words: Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone), copolymers, Fenton reaction, hydrogel, crosslinking.

1. Introdução

1.1. Biomateriais

Denomina-se biomaterial todo material utilizado para substituir no todo ou em parte os sistemas biológicos. Os biomateriais podem ser metálicos, cerâmicos, poliméricos (sintéticos ou naturais), compósitos ou biorrecobrimentos¹.

Biomateriais possuem como característica fundamental a biocompatibilidade, ou seja, são materiais que, dependendo de sua aplicabilidade, não podem induzir reações alérgicas ou inflamatórias.

A utilização de biomateriais tem favorecido uma melhora no nível de vida das pessoas, projetando em um aumento da expectativa de vida, de saúde em geral e no bem estar da população.

No intuito de se produzir novos dispositivos, têm-se tornado crescente o interesse em pesquisas no campo de biomateriais. Diversas metodologias são utilizadas para caracterizar estes materiais no intuito de avaliar suas possíveis aplicações. Algumas metodologias são relacionadas a propriedades físicas e outras as propriedades mecânicas. Propriedades tais como: resistência, dureza, durabilidade, estabilidade, flexibilidade, elasticidade e porosidade do material são analisadas além de propriedades relacionadas à compatibilidade dos materiais, como testes de natureza hematológica.

A biocompatibilidade de um material é determinada após a identificação das propriedades requeridas para a aplicação em questão, além de se correlacionar a microestrutura com as propriedades desejadas. Após esta etapa, deve-se avaliar o custo da tecnologia envolvida e a disponibilidade de matéria prima. Enfim, todos os

componentes que podem influenciar no preço final do produto para que se torne atraente no mercado.

A aplicação de polímeros sintéticos na área médica tem crescido substancialmente nos últimos 30 anos. Na tabela 1.1 são mostradas algumas das numerosas aplicações de polímeros sintéticos em medicina.

Tabela 1.1: Aplicações biomédicas de polímeros².

Instrumentos médicos cirúrgicos	Sistemas substituintes ou melhoradores de partes do corpo		Sistemas com função terapêutica
	<i>Externamente</i>	<i>Internamente</i>	
Seringas	Lentes de contato	Próteses ortopédicas	Sistemas de liberação de drogas
	Corações artificiais	Implantes cardiovasculares	
Cateteres	Bombas de insulina	“Stents”	Biosensores
	Rins artificiais	Mamoplastia	
Curativos	Fígados artificiais	Reconstrução maxilofacial	Bombas de insulina
	Peles artificiais	Reconstrução das cordas vocais	
Suturas	Reconstrução de órgãos sexuais	Tendões artificiais	
	Cartilagem articular		

1.2. Hidrogéis

Hidrogel é um material polimérico reticulado que retém uma significativa fração de água em sua estrutura, sem se dissolver. Um hidrogel pode ser obtido por reticulações covalentes ou interações físicas entre as cadeias poliméricas.

As reticulações covalentes podem ser formadas a partir da reação entre monômeros vinílicos e monômeros bifuncionais; por métodos de radiação de energia (radiação γ , radiação ultravioleta), e outros. As reticulações físicas são obtidas a partir da interação de forças eletrostáticas, formação de ligações de hidrogênio e cristalitos, interações hidrofóbicas, e etc.

Hidrogel é uma classe de biomateriais que teve como ponto de partida o trabalho pioneiro de Wichterle e Lim³ na síntese do hidrogel de poli(metacrilato de 2-hidroxietila) [PHEMA]. A importância dos hidrogéis como biomateriais se deve à semelhança de suas propriedades físicas com os tecidos vivos, tais como elevado conteúdo de água, consistência macia e elástica.

Os hidrogéis podem ser naturais ou sintéticos, devem apresentar excelente biocompatibilidade, podendo ser utilizados como sensores (eletrodos), substratos de culturas de microorganismos, membranas de hemodiálise, lentes de contato flexíveis, enxertos vasculares, imobilização de enzimas, sistemas de liberação controlada de drogas incorporadas à sua composição, na área de queimaduras, na regeneração ou substituição dos tecidos biológicos entre outros^{4,5,6}. Em geral, estes materiais devem apresentar resistência ao processo de degradação e adequadas propriedades mecânicas⁷.

Há uma classe de hidrogéis sensíveis a estímulos, também chamada de hidrogéis inteligentes. Estes materiais têm a capacidade de mudar seu

comportamento de absorção de solvente, permeabilidade e força mecânica em resposta a estímulos externos, tais como: pequenas mudanças de pH, força iônica, temperatura e outros⁸.

Hidrogéis de poli(isopropilacrilamida) (PNIPAAm) e poli(N,N-dietilacrilamida) (PDEAAM) são hidrogéis que possuem baixa temperatura crítica de solubilidade (25°C a 32°C)(LCST-Temperatura crítica inferior de solubilização) e, ao sofrerem um aumento de temperatura acima da LCST, sua estrutura se retrai, eliminando o solvente preso em sua estrutura tridimensional. Materiais que possuem este comportamento são denominados dependentes negativos (ou inversos) de temperatura⁹.

Os hidrogéis dependentes positivos de temperatura apresentam uma retração da rede polimérica quando há uma diminuição da temperatura do meio. Este comportamento pode ser observado em hidrogéis (IPN) de poli(ácido acrílico) e poliacrilamida¹⁰.

Apesar de sua importância, hidrogéis que apresentam sensibilidade à mudança de temperatura sofrem certas limitações em aplicações biomédicas, pois os monômeros e agentes reticulantes conhecidos não são biocompatíveis, podendo ser carcinogênicos, mutagênicos ou tóxicos ao organismo.

Os hidrogéis que são sensíveis à mudança de pH do meio, ou seja, aceitam ou doam prótons em resposta a mudança de pH do meio, possuem em sua estrutura grupos básicos ou ácidos respectivamente (figura 1.1). Hidrogéis de poli(ácido acrílico) (PAA) se ionizam com valores baixos de pH, enquanto hidrogéis de poli(metacrilato de dietilaminoetil) (PDEAEM) se ionizam a valores de pH mais altos. O intumescimento nestes materiais quando em sua forma iônica é devido, principalmente, às repulsões eletrostáticas entre as cargas presentes na cadeia

polimérica. A extensão de seu intumescimento é altamente influenciada pelo pH, força iônica e tipos de contra íons¹¹.

Figura 1.1: Representação esquemática do mecanismo de atuação de hidrogéis sensíveis a mudança de pH.

Há ainda materiais que são sensíveis a estímulos físicos como ultrassom, campo magnético, luz, pressão e a estímulos elétricos. O interesse nesta gama enorme de diferentes materiais tem se tornado crescente, principalmente na área de liberação de drogas¹⁰.

O desenvolvimento de hidrogéis como recobrimento temporário de pele ou como curativo tornou-se um alvo de grande interesse comercial. O primeiro curativo de hidrogel foi produzido pela polimerização simultânea de acrilamida e metileno-bisacrilamida, em soluções aquosas contendo alguns aditivos¹². Desde então,

inúmeras pesquisas têm sido feitas nesta área, investigando diferentes processos e polímeros.

1.2.1. Hidrogéis de Poli(N-vinil-2-pirrolidona)

Após a metade do século 20, o poli(N-vinil-2-pirrolidona) (PVP) foi usado como plasma sanguíneo em vítimas da segunda guerra mundial. Devido a sua alta biocompatibilidade e não toxicidade, os hidrogéis de PVP possuem inúmeras aplicações na área médica como hidrogéis compatíveis ao sangue, lentes de contato, fígado artificial e outros².

Charlesby e Alexander¹³ foram os primeiros pesquisadores a relatar que o PVP forma ligações cruzadas quando soluções aquosas do polímero são submetidas à radiação γ . Posteriormente, muitos pesquisadores investigaram a formação de gel a partir das soluções irradiadas de PVP.

Chapiro e Legris^{14,15} estudaram o efeito da dose de radiação, a massa molecular, a concentração polimérica e a influência de solventes na reticulação de PVP. Estudos mais recentes foram focados também na conversão de monômeros de N-vinil-2-pirrolidona em hidrogel, na reticulação de PVP na presença de outros materiais como ágar e poli(óxido de etileno) (PEO)¹⁶, preparação de hidrogéis de PVP através do uso de monômeros multifuncionais tais como o etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e trimetilol propano (TMPTA) (Figura 1.2). Além disto, foram estudadas várias características do processo e dos hidrogéis como dose de radiação, grau de intumescimento, elongação na ruptura, resistência à tensão, comportamento de difusão, etc.

Figura 1.2: Alguns monômeros multifuncionais para reticular polímeros de PVP.

A utilização de radiação ionizante está entre os processos de produção de hidrogel de PVP mais comuns. Kaplan e Güner¹⁷ estudaram o comportamento de intumescimento do hidrogel de PVP por sistemas binários PVP/água e ternário PVP/persulfato de potássio/água em soluções de uréia, e verificaram que, dependendo da quantidade de persulfato, pode haver cisão e reticulação da cadeia polimérica. Yu et al¹⁸ estudaram a síntese do hidrogel de PVP, poli(álcool vinílico) (PVA) e quitosana por radiação γ como alternativa no uso de curativos.

Lopes e Felisberti¹⁹ estudaram a aplicabilidade de hidrogéis de PVP-gelatina usando persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) e glutaraldeído como agente reticulante para aplicação na área de liberação de drogas transdérmicas.

Para melhorar as propriedades dos hidrogéis de PVP e aumentar a área de aplicabilidade destes materiais, há na literatura inúmeros estudos de produção

destes hidrogéis por radiação ionizante na presença de aditivos, tais como: sais, polímeros, monômeros e etc.

Na área de hidrogéis sensíveis a estímulos externos, El-Rehim et al²⁰ recentemente estudaram a irradiação de PVP na presença de ácido acrílico para tornar o material sensível a estímulos de pH e proposto como gel carregador de drogas. Ravichandran et al²¹ estudaram a síntese de hidrogéis (IPN) de copolímeros de ácido acrílico e N-vinil-2-pirrolidona polimerizados na presença de polietilenoglicol e N.N'-metileno bisacrilamida (MBA) (figura 1.2), como gel liberador de droga em fluidos gástricos.

No tratamento oncológico é conhecido que lipossomos encapsulados por PVP têm seu tempo de circulação *in vivo* efetivamente prolongado²², e que o PVP, quando usado em sistemas de liberação de drogas, aumenta o tempo de circulação da droga no plasma. Guowei e colaboradores²³ têm estudado a síntese de nanoesferas de hidrogéis de PVP e PVA contendo partículas magnéticas de ferro. Este sistema exibe uma passiva liberação de droga que pode aumentar a eficácia do tratamento terapêutico em câncer.

Hidrogéis também podem ser sintetizados por interações eletrostáticas, como por exemplo, ligações de hidrogênio, força iônica e etc. Yu et al²⁴ estudaram a produção de nanopartículas de nitrato de prata em curativos de PVP e PVA para evitar a contaminação e infecção. O hidrogel é reticulado por ciclos de congelamento e descongelamento de soluções de PVP com PVA. Além das ligações de hidrogênio entre as cadeias do PVP e PVA há formação de cristalitos, o que torna o hidrogel mais estável. Hidrogéis de PVP também podem ser produzidos pela ação de agentes reticulantes iônicos. Por exemplo, Kharlampieva e colaboradores²⁵ estudaram a produção de um material sensível a estímulo de pH sintetizado com

PVP e poli(ácido metacrílico) (PMAA), na presença de etilenodiamina (EDA) como agente reticulante. Este hidrogel pode ser utilizado como controlador da liberação de drogas.

Blendas são misturas de dois ou mais polímeros, e são alternativas mais simples do que desenvolver ou sintetizar novos polímeros. A partir de hidrogéis de blendas de PVP-ágar e PVP-carragenana ativadas por radiação de microondas na presença de um iniciador redox (persulfato de potássio), Prasad et al²⁶ estudaram estes materiais como ativos carregadores de drogas, além do uso como curativos (Figura 1.3).

Figura 1.3: Mecanismo proposto da formação da blenda de ágar-PVP.

Como mencionado anteriormente é comum a síntese de géis de PVP a partir dos seus monômeros, na presença de monômeros multifuncionais como agente reticulantes. Guven et al²⁷ estudaram o comportamento de hidrogéis de PVP, sintetizado a partir do seu monômero (N-vinil-2-pirrolidona) na presença de EGDMA e TMPTA sob radiação γ , para avaliar potenciais sistemas de imobilização enzimática. Çaykara et al²⁸ estudaram a síntese hidrogéis sensíveis a estímulos térmicos de copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona e ácido crotonico na presença do agente reticulante EGDMA por radiação γ . Bajpai e colaboradores²⁹ estudaram a síntese de um hidrogel sensível a pH, a partir de N-vinil-2-pirrolidona com ácido acrílico na presença de N,N'-metileno bisacrilamida (MBA), como liberador de vitamina B12.

Um outro processo de produção de hidrogel é a síntese por radiação ultravioleta (UV). O grupo de pesquisa de Devine³⁰ estudou a polimerização de N-vinil-2-pirrolidona e ácido acrílico por UV na presença do agente reticulante EGDMA, na produção de um material multifuncional para aplicações biomédicas. Chen e colaboradores³¹ estudaram polimerização concomitante à reticulação via radiação UV do N-vinil-2-pirrolidona e ácido itacônico na presença do monômero bifuncional MBA, para produção de hidrogéis estimulados por variação de pH, que possam ser utilizados na área de liberação de fármacos (figura 1.4).

Figura 1.4: Hidrogel de copolímero de N-vinil-2-pirrolidona reticulado por UV.

Ainda utilizando da técnica de reticulação via UV, porém a partir do polímero, Lopérgolo e colaboradores³² estudaram a irradiação do poli(N-vinil-2-pirrolinona) como metodologia alternativa aos métodos de reticulação do PVP por radiação de alta energia, na produção de hidrogéis usados como curativos.

1.2.2. Curativos de hidrogel

Em anos recentes foi sugerido que uma variedade de feridas crônicas tais como úlceras em diabéticos, queimaduras e áreas de doação de pele pudessem

cicatrizar mais rápido se ficassem oclusas e assim mantidas úmidas. Deste modo se tornou crescente o estudo na área de curativos.

Os curativos podem ser classificados segundo o tipo de material usado para a sua confecção. Podemos distinguir em duas categorias, segundo a origem do material³³.

- *Curativos Biológicos*: são aqueles derivados de tecidos naturais a partir de várias formulações de combinações de colágeno, elastina e lipídeos. Curativos variam de aloenxerto (doadores da mesma espécie), hetero-enxerto de animais (porcos e cães, por exemplo) a membranas embrionárias.

Os curativos derivados de colágeno de origem bovina tais como Hy Cure[®], Fibracol Plus[®], Promogran[®], são aplicados a feridas em qualquer fase do processo de cicatrização. O colágeno promove granulação e epitelização, pois funciona como substrato para hemostasia e quimiotaxia, para elementos celulares envolvidos no processo de cicatrização.

O Integra[®] é um outro curativo derivado do colágeno que possui em sua composição glicosaminoglicano e silicone na camada externa. Este curativo é indicado para uso em feridas limpas e queimaduras, pois promove crescimento celular e síntese de colágeno. A presença de silicone atua como barreira à infecção e proteção mecânica.

- *Curativos Sintéticos*: são aqueles derivados de produtos manufaturados ou desenvolvidos em laboratório. São curativos laminados compostos de duas ou mais camadas, onde a camada externa determina a durabilidade e elasticidade, além de controlar a taxa de evaporação da água. A camada interna atua como absorvente de secreções é aderente à pele, além de oferecer elasticidade ao material.

Os curativos sintéticos são muitos, e vão desde os hidrocolóides até os hidrogéis. Os hidrocolóides, por exemplo, possuem em sua composição carboximetilcelulose (CMC) como agente colóide. Os curativos mais conhecidos são Granuflex[®], Epigard[®], Biobrane[®], Duoderm[®], Hydrocoll[®], Tegaserb[®], Restore[®], Replicare[®], Comfeel[®] e Askina Biofilm[®]. Estes materiais agem na absorção dos fluidos da lesão, formando um gel hidrofílico que mantém o meio úmido.

Dentre os curativos sintéticos de hidrogéis encontram-se os hidrogéis amorfos que contêm quantidades de colágeno, alginato ou complexos de carboidratos. Os hidrogéis amorfos são reticulados não covalentemente e podem doar umidade a feridas ressecadas, mas, devido à viscosidade do material, há dificuldade em se fixar no sítio da ferida³⁴.

Dentre os hidrogéis de alginatos atualmente comerciáveis estão: Algoderm[®], Acquacell[®], Curasorb[®], Kaltostat[®], Melgisorb[®], Seasorb[®], Sorbsan[®], Sorbalgon[®], Sorbalgon Plus[®], Suprasorb[®], Restore Calcicare[®] e Tegagen[®]. Estes materiais ao entrarem em contato com o exsudato ou sangue formam um gel fibroso, hidrofílico, hemostático e rico em cálcio que interage com os íons de sódio da ferida, absorvendo o excesso de exsudato e/ou sangue e mantendo o meio úmido.

Dentre os curativos provenientes de hidrogéis covalentes atualmente conhecidos encontram-se: Intrasite gel[®], Dermagran[®], Duoderm gel[®], Hydrosorb[®], Hydrosorb Plus[®], Hypligel[®], Nu-Gel[®], Elasto-gel[®], Purilon[®], que são hidrogéis transparentes compostos por água, propileno glicol e carboximetilcelulose ou água e PVP. São indicados para feridas secas com pouco exsudato ou com necrose, pois auxilia na remoção de crostas. Quando associado ao alginato, pode ser utilizado em feridas com moderada produção de exsudato.

Os curativos de hidrogel retêm a secreção da região lesada ao mesmo tempo em que a mantém hidratada. Suas principais vantagens devem-se à hidratação proporcionada e à sensação refrescante que causa, pois ocorre redução da dor inerente aos ferimentos secos (muito provavelmente pela prevenção da exposição dos terminais nervosos ao ambiente).

Na área de queimados, os curativos devem possuir características tais como: redução da perda de fluidos corpóreos pelo paciente; controle da infecção; aderência à pele; ser poroso; ter a dimensão necessária; propriedades mecânicas compatíveis; baixa taxa de biodegradação e ausência de antigenicidade³⁵.

Nos anos 90 surge a preparação do Aqua-Gel[®] do inventor Dr. Janusz Rosiak, um hidrogel produzido para ser utilizado na área de queimados. O Aqua-Gel[®] é um hidrogel à base de PVP, onde a reticulação é feita a partir da radiação γ da solução aquosa do polímero.

A irradiação da solução aquosa de PVP resulta na formação de macroradicais (na cadeia polimérica) e radicais $\text{HO}^\bullet$ formados durante a radiólise do solvente. A reticulação é resultante da recombinação mútua de macroradicais formados, e como resultado deste processo há formação de ligações covalentes entre estas moléculas. Se a quantidade destas novas ligações for suficientemente grande, aparece no sistema uma fração de gel insolúvel (Figura 1.5).

Direto

onde P é a molécula polimérica

Indireto

Figura 1.5: Formação do radical polimérico.

Segundo informações fornecidas por profissionais da área médica que atuam no tratamento de queimados, tais materiais não são efetivamente utilizados nos hospitais públicos brasileiros devido ao seu alto custo, porém, quando utilizados, apresentam bons resultados na recuperação do paciente³⁶.

Uma das desvantagens de se obter um hidrogel por radiação ionizante, é a indisponibilidade do método, pois a radiação requer um acelerador de elétrons ou fontes de raios γ ³⁷. Tais instalações são raras devido ao alto custo de sua montagem, que por sua vez reflete no custo do produto.

Além da radiação ionizante, a reticulação de polímeros hidrofílicos como o PVP para obtenção de hidrogel, pode ser feita a partir da radiação UV e alguns processos químicos³⁸.

Lopérgolo et al³⁹ desenvolveram uma nova técnica de reticulação baseada na radiação ultravioleta como metodologia alternativa. Desta forma, seria possível diminuir os custos de obtenção da membrana de PVP e viabilizar a produção deste

material por indústrias de pequeno/médio porte. Neste caso uma solução aquosa de PVP é reticulada por radiação UV-C ($\lambda_{\text{emissão}}=254\text{nm}$) irradiada por lâmpadas de mercúrio de baixa pressão em diferentes doses.

Também visando uma alternativa de obtenção de hidrogéis de PVP, Fachine e colaboradores⁴⁰ desenvolveram duas novas técnicas em que a reticulação de PVP pode ser obtida:

1. aplicando à metodologia de Lopérgolo peróxido de hidrogênio, para acelerar o processo de reticulação do polímero e;
2. via reação de Foto-Fenton, onde a solução de aquosa de PVP é reticulada na presença de sais de ferro III e peróxido de hidrogênio, utilizando-se lâmpadas de mercúrio de média pressão ($\lambda_{\text{emissão}}=360\text{nm}$), também comercialmente mais viáveis.

Em ambos os processos, radical hidroxila é gerado em solução, que reage com o polímero, aos moldes do processo via radiação ionizantes, gerando macrorradicais. No primeiro caso, o radical hidroxila é formado na foto-homólise de H_2O_2 . No segundo, íon férrico hidratado é foto reduzido a Fe^{2+} e $\text{HO}^\bullet$. O íon ferroso reage com o H_2O_2 presente, gerando um segundo radical $\text{HO}^\bullet$ via um processo redox Fenton térmico (Figura 1.6).

Figura 1.6: Produção de radical hidroxila pelo sistema Foto-Fenton.

2. Objetivos e Aspectos relevantes do trabalho

Membranas comerciais do hidrogel de poli(N-vinil-2-pirrolidona) apresentam geometria padrão, ou seja, suas soluções poliméricas são reticuladas em sua própria embalagem por radiação ionizante. Ao mesmo que esta técnica possui inúmeras vantagens tais como: alta velocidade de processamento, reticulação e esterilização concomitantes, este é processo muito dispendioso, pois há a necessidade de terceirização do serviço de irradiação para reticulação das membranas, além dos custos de transporte. No Brasil, por exemplo, há apenas três núcleos de fontes de alta energia que terceirizam seus serviços, todos, porém situados na região sudeste do país.

Na área de saúde pública, o interesse seria o uso de um material que pudesse recobrir áreas de queimados, onde as placas de membranas mencionadas acima não alcançam regiões, como por exemplo, aquelas entre os dedos das mãos e pés. Já no setor empresarial, seria a produção de um material onde não seja necessária a terceirização de serviços, porém que mantesse todas as propriedades e vantagens do hidrogel produzido por radiação ionizante.

Como melhoria de processo foi investigado o uso da reação de Fenton térmica como uma metodologia na substituição da radiação ionizante no processo de reticulação do poli(N-vinil-2-pirrolidona). Também foram investigados, métodos alternativos de reticulação química a partir de copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona, para hidrogéis que pudessem ser reticulados *in situ*, permitindo sua aplicação em sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos, curativos e etc.

Estes materiais devem manter as características dos hidrogéis por radiação ionizante, tais como: possuir um bom grau de reticulação, ser atóxico e poder ser aplicado na área de biomateriais.

3. Considerações Gerais

3.1. Reação de Fenton

Processos oxidativos avançados (AOP) são processos de alta eficiência de degradação oxidativa, que visam a eliminação total de dejetos orgânicos de efluentes através da mineralização total dos mesmos. A maioria destes processos tem como principal promotor o radical hidroxila ($\text{HO}\cdot$), responsável pelo processo oxidativo.

Um exemplo de AOP são os processos que utilizam sais ferrosos em presença de peróxido de hidrogênio, mais popularmente conhecido como reação de Fenton^{41,42}. Embora ainda existam discussões a respeito deste mecanismo e de quais espécies intermediárias estariam envolvidas⁴³, Walling e muitos outros pesquisadores^{44,45,46} mostraram que no sistema Fenton térmico há uma formação eficiente de radicais hidroxilas, produzidos pela oxidação de sais ferrosos em presença de peróxido de hidrogênio (figura 3.1).

Figura 3.1: Representação esquemática das etapas principais promovidas pela reação de Fenton.

O principal problema encontrado neste sistema de oxidação é a sua baixa reciclagem do ferro, devido a baixa velocidade da reação descrita na Etapa 3.

Estudos recentes têm revelado que a eficiência deste sistema apresenta uma dependência muito grande na relação $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ ⁴⁷, visto que a eficiência oxidativa do reagente de Fenton é limitada pela velocidade de geração de $HO^\bullet$, por isso a necessidade de estudos cuidadosos em cada caso.

Walling⁴⁸ percebeu que quando a reação de Fenton se processa sob excesso de H_2O_2 , além da competição do Fe^{2+} por peróxido, há um passo envolvido, onde radicais hidroxila também reagem com o peróxido gerando radicais superóxido. Ou seja, o peróxido atua como capturador de radicais hidroxila (eq. 3.1). Além disso, a recombinação de radicais hidroxila produzindo H_2O_2 pode ser um passo importante (eq. 3.2)

Segundo a literatura, na ausência de compostos orgânicos, reações de Fenton em pH ácido (pH=3) e em excesso de Fe^{2+} se processam por mais um outro passo, onde acontece a oxidação de Fe^{2+} (eq. 3.3) e redução de Fe^{3+} (eq. 3.4), com a produção de O_2 .

Radicais hidroxila reagem com compostos orgânicos de vários modos, sendo que a abstração de hidrogênio é uma das mais importantes (eq. 3.5).

Portanto, nestes processos oxidativos a competição pelo radical de carbono formado ($\text{R}^\bullet$) é dada pelos valores relativos de $[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{RH}]$ e $[\text{Fe}^{3+}]$ presentes. A oxidação ocorre preferencialmente em sistemas com alta $[\text{H}_2\text{O}_2]$, enquanto que a dimerização, ou reticulação (no caso de polímeros) ocorre em sistemas com alta concentração de $[\text{RH}]$ (Figura 3.2).

Figura 3.2: Possíveis caminhos pelos quais $\text{R}^\bullet$ pode se processar.

No caso de polímeros, a reticulação ocorre devido à recombinação de dois macrorradicais de carbono ($\text{R}^\bullet$) através da formação de ligações covalentes entre estes radicais, o que pode fornecer uma fração insolúvel, conhecida como fração gel.

Em hidrogéis produzidos por radiação de alta energia, estas reticulações ocorrem a partir da radiólise da água, com a formação de radicais hidroxilas ($\text{HO}^\bullet$). Esta espécie é o principal promotor da reticulação de sistemas

hidrofílicos, devido a abstração de um hidrogênio da cadeia polimérica, produzindo macrorradicais de carbono ($P^\bullet$) (figura 3.3).

Figura 3.3: Reticulação polimérica a partir da radiólise da água.

Como citado anteriormente, reação de Fenton também ocorre por meio de produção de radicais hidroxilas formados pela oxidação de sais ferrosos em presença de peróxido de hidrogênio. Como veremos, estes radicais hidroxila produzidos também são os responsáveis pela reticulação do PVP via reação de Fenton.

3.2. Caracterização da Estrutura dos Hidrogéis

Três importantes parâmetros podem definir a estrutura dos hidrogéis, o volume da fração polimérica no estado intumescido ($V_{2,s}$); a massa molar média entre duas ligações sucessivas ($\overline{M_c}$); e o tamanho de poro. O comportamento de intumescimento dos hidrogéis pode ser descrito por uma variedade de modelos termodinâmicos não ideais. O principal objetivo de todos estes modelos é tentar explicar o comportamento de intumescimento, o tamanho de poro e parâmetros relacionados.

A partir de medidas de equilíbrio de intumescimento dos hidrogéis é possível calcular o tamanho de poro da rede polimérica⁴⁹. De acordo com o modelo de Flory-Rehner, o intumescimento de um hidrogel depende da densidade de reticulação (ρ_x), a qual está relacionada com a massa molar média entre duas ligações cruzadas ($\overline{M_c}$).

Devido ao comportamento termodinâmico não ideal das redes poliméricas em soluções de eletrólitos, não há uma teoria que possa descrever exatamente comportamento dos hidrogéis. A análise de Flory-Rehner e suas várias modificações são usualmente utilizadas para descrever aproximadamente estes comportamentos. O modelo original, introduzido para sistemas reticulados em meio sólido (e.g. borracha), foi adaptado por Peppas e Merrill considerando situações onde ligações cruzadas são introduzidas no sistema intumescido⁴⁹.

Quando a rede polimérica está em contato com uma solução aquosa, a rede começa a intumescer devido a compatibilidade termodinâmica das cadeias poliméricas com a água. A força de intumescimento é contra balanceada por força retrativas induzidas pelas ligações cruzadas da rede polimérica. O equilíbrio de intumescimento é alcançado quando as duas forças se igualam.

Com medidas realizadas à temperatura e pressão constante, a mudança do potencial químico da água pode ser calculada pela eq. 3.6:

Eq. 3.6

$$\mu_1 - \mu_{1,0} = \Delta\mu_{mix} + \Delta\mu_{elastic}$$

onde: μ_1 é o potencial químico da água no sistema

$\mu_{1,0}$ é o potencial químico da água intumescida

$\Delta\mu_{\text{mix}}$ e $\Delta\mu_{\text{elastic}}$ são as contribuições da mistura e da rede para a mudança do potencial químico total.

A diferença do potencial químico, $\Delta\mu_{\text{mix}}$, pode ser determinada a partir de processos termodinâmicos de mistura de polímero-água (eq. 3.7). O outro parâmetro, $\Delta\mu_{\text{elastic}}$, pode ser determinado a partir da aplicação da teoria da elasticidade da borracha (eq. 3.8).

Eq. 3.7
$$\Delta\mu_{\text{mix}} = RT \left[\ln(1 - v_{2,s}) + v_{2,s} + \chi v_{2,s}^2 \right]$$

Eq. 3.8
$$\Delta\mu_{\text{elastic}} = \frac{RT}{d_p \overline{V}_1 \overline{M}_c} \left(1 - \frac{2\overline{M}_c}{\overline{M}_n} \right) \left(v_{2,s}^{1/3} - \frac{v_{2,s}}{2} \right)$$

onde : χ = parâmetro de interação soluto-solvente (para o sistema PVP-água é 0,49)⁴⁹.

$\overline{V}_1$ = volume molar do solvente (mL.mol⁻¹)

d_p = é a densidade do polímero ($d_p = 1270 \text{ kg/m}^3$ para o PVP)⁵⁰

$V_{2,s}$ = volume da fração gel no estado de equilíbrio intumescido

$\overline{M}_n$ = massa molar do PVP $\overline{M}_n = 360.000(\text{g/mol})$

$\overline{M}_c$ = massa molar média entre ligações cruzadas

A eq. 3.8 é aplicada para hidrogéis que são reticulados na ausência de solvente. Para se calcular $\overline{M}_c$ para sistemas reticulados na presença de água, as

eq. 3.6 – 3.8 juntamente com contribuição elástica da água induzida fornecem o valor de $\overline{M}_c$ estimado segundo as eq. 3.9 e 3.10^{51, 52}:

Eq. 3.9

$$\rho_x = - \frac{\frac{1}{d_p V_1} [\ln(1 - V_{2,s}) + V_{2,s} + \chi V_{2,s}^2]}{V_{2,r} \left[\left(\frac{V_{2,s}}{V_{2,r}} \right)^{1/3} - \frac{1}{2} \left(\frac{V_{2,s}}{V_{2,r}} \right) \right]}$$

Eq. 3.10

$$\rho_x = \frac{1}{M_c} - \frac{2}{M_n}$$

onde: ρ_x = densidade de reticulação (mol.mL^{-1})

$V_{2,r}$ = volume da fração gel no estado relaxado

$V_{2,s}$ = volume da fração gel no estado de equilíbrio intumescido

As frações molares $V_{2,r}$ e $V_{2,s}$ das amostras do hidrogel podem ser calculadas a partir da volume polimérico na solução (eq. 3.11):

Eq. 3.11

$$V_p = \frac{w_p}{d_p}$$

onde w_p é a massa do polímero e d_p é a densidade do polímero.

O volume da fração polimérica no estado intumescido ($V_{2,s}$) pode ser determinado a partir de experimentos de intumescimento. A partir de medidas massa e volume, é possível calcular os valores das frações molares (eqs. 3.12 e 3.13).

Eq. 3.12

$$V_{2,s} = \frac{V_p}{V_s}$$

Eq. 3.13

$$V_{2,r} = \frac{V_p}{V_r}$$

onde: V_s é o volume do hidrogel intumescido e V_r é o volume do hidrogel seco.

O tamanho do poro da rede polimérica (ξ)⁵³ no estado intumescido indica a distância entre duas junções consecutivas e pode ser calculado a partir da eq. 3.14:

Eq. 3.14

$$\xi = 0.1V_{2,s}^{-1/3}(C_n N)^{1/2} \ell$$

onde: C_n = coeficiente de rigidez (6,9 foi usado o do poli(metacrilato de metila⁵⁴);

ℓ = comprimento de uma ligação individual C-C (0,154 nm)⁴⁰;

N = número de meros entre ligações ($N = 2\overline{M_c}/M$), onde M é a massa molar de um mero (para o PVP é 111g/kmol).

3.3. Análise da Estrutura da Água

A presença de água em polímeros afeta suas propriedades em diversas formas; por exemplo, o efeito de plasticidade pode diminuir consideravelmente a resistência mecânica do material. Ao estudar o estado da água absorvida na estrutura dos materiais hidrofílicos, é possível obter mais informações a respeito das propriedades de difusão e permeabilização de espécies moleculares e polímeros hidrofílicos.

Quando um gel seco começa absorver água, as primeiras moléculas de água que penetram a matriz polimérica irão hidratar primeiro as “porções” polares do material, levando a formação da chamada *água de fronteira primária*. Quando todos os grupos polares estiverem hidratados, a rede intumescce e expõe as porções apolares, as quais interagem com as moléculas de água, formando a *água de fronteira hidrofóbica ou água de fronteira secundária*. As águas de fronteira primária e secundária são freqüentemente combinadas e simplesmente chamadas de “água de fronteira total”.

Após todas as porções polares e apolares estarem interagindo com as águas de fronteira, a rede polimérica ainda permite a absorção de água até atingir seu grau de equilíbrio. Esta água adicional é chamada de “água livre” e é a responsável por preencher os espaços entre as redes poliméricas (Figura 3.4)^{55,56}.

Figura 3.4: Representação esquemática adaptada dos diferentes “tipos” de água presentes na rede polimérica de um hidrogel⁵⁷.

A evidência de água de fronteira primária e secundária se baseia na presença de água não “congelável” com liberdade de movimentação menor do que a água livre.

Existem alguns métodos usados para estimar a quantidade relativa de água livre e de fronteira, como uma fração do conteúdo total de água. Técnicas como: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC); Ressonância Magnética Nuclear (RMN); Difração de raio-X; Termogravimetria (TG) e Espalhamento de Luz têm sido utilizadas para analisar os vários estados da água em hidrogéis e relacioná-los em diferentes “ambientes” na estrutura interna do material⁵⁸.

O uso de DSC é baseado na hipótese de que apenas as águas livres podem ser congeladas e que as medidas endotérmicas ao aquecer o gel congelado

representem a fusão das moléculas congeladas da água livre na amostra. A quantidade de água livre (w_c) é obtida a partir da eq. 3.15:

Eq. 3.15

$$w_c = \frac{Q}{\Delta H}$$

onde ΔH é o calor de fusão da água congelável, pois assume ser igual da água pura ($\Delta H = 333,5 \text{ J.g}^{-1}$); e Q é calor absorvido durante o processo de fusão da água congelável no hidrogel; e é calculado a partir da área do pico endotérmico⁵⁹.

A massa da água de fronteira (w_b) é obtida pela diferença da massa total de água absorvida (w_t) e a massa total de água congelável (w_c) (eq. 3.16).

Eq. 3.16

$$w_b = w_t - w_c$$

Polímeros hidrofílicos geralmente possuem em sua estrutura grupos polares (grupos $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, $-\text{COO}^-$) que podem fazer ligações de hidrogênio com a moléculas de água. As moléculas de água “ligadas” às porções polares da cadeia polimérica, têm sua ligação de hidrogênio alterada em relação às ligações de hidrogênio presentes na água livre. Além disso, as moléculas de água na superfície destes polímeros terão seu caráter de ligação de hidrogênio reduzido devido a redução da acessibilidade para outras moléculas de água (Figura 3.5). A observação de que parte da água em sistemas orgânicos não congela em 0°C , confirma esta situação.

Figura 3.5: Ambiente macromolecular conceitual para as moléculas de água.

Moléculas de água podem ser localizadas em locais fortemente adsorvidas ou ligadas. Portanto os movimentos moleculares e as interações nestes ambientes podem ser diferentes.

A espectroscopia no infravermelho tem se tornado uma ótima técnica para determinar a água livre e as águas de fronteira em diferentes amostras tais como polímeros, hidrogéis e proteínas via frequência vibracional⁶⁰. Estudos por infravermelho diferenciam os diferentes tipos de água através da análise do comportamento das ligações de hidrogênio em amostras poliméricas com diferentes graus de umidade.

3.4. Análise da adição de sais na produção do hidrogel - Íons da série de Hofmeister.

Os íons da série de Hofmeister geralmente são alvos de estudos devido a sua capacidade em alterar a estrutura da água, ou seja, estes íons têm a propriedade de modificar as ligações naturais da estrutura da água, sendo este efeito similar ao aumento da temperatura ou da pressão⁶¹. Desta forma, como os íons alteram a

formação natural das ligações de hidrogênio, as moléculas de água se ordenam de forma diferente ao redor de cada íon.

A água líquida possui uma estrutura organizada e tetraédrica⁶² e, ao dissolver um sal na mesma, são compreendidas três regiões distintas em relação às interações íon-água:

- a) as moléculas de água adjacentes ao íon são fortemente orientadas e tem perda de liberdade de rotação;
- b) a camada posterior de solvente (no caso a água) pode ser fracamente afetada pelo campo eletrostático do íon e parcialmente orientada (camada de hidratação secundária);
- c) dependendo da distância do centro iônico, o campo eletrostático do íon pode ser insignificante e a estrutura da água não é afetada pelo mesmo, conservando a estrutura tetraédrica característica da água pura.

Os íons são então classificados em mais (ou menos) hidratados quanto mais (ou menos) moléculas de água se organizam ao redor do mesmo. Os íons capazes de organizar mais moléculas de água ao seu redor, ou seja, aumentar a estrutura da água são chamados de cosmotrópicos, enquanto os íons caotrópicos são aqueles que têm a função de diminuir a estrutura da água ao seu redor (figura 3.6).

Figura 3.6: Escala da propriedade de hidratação de alguns íons da série de Hofmeister⁶³.

Uma outra característica importante a respeito dos íons da série de Hofmeister está em relação ao seu tamanho. Os ânions hidratam mais do que cátions de mesmo raio iônico. A presença de ânions no sistema permite que os átomos de hidrogênio se aproximem dos íons mais eficientemente do que átomos de oxigênio, aumentando hidratação do ânion⁶⁴.

Em relação à carga atômica dos íons, temos que íons monovalentes normalmente são considerados caotrópicos devido sua baixa densidade de carga apresentando, portanto, uma interação mais fraca com a água do que a interação “água-água”. Em contrapartida, íons menores, com múltiplas cargas são considerados cosmotrópicos, ou seja, são “estruturadores” da água, pois exibem uma interação maior com a água do que a interação “água-água”, devido sua alta densidade de carga⁶⁵.

Para se ter uma melhor compreensão do comportamento dos íons da série de Hofmeister, deve-se levar em consideração a interação entrópica. O movimento das partículas em uma solução não é associado a uma força mecânica (causada por um potencial), mas sim pela variação da entropia do sistema, e são denominadas “forças entrópicas”⁶⁶.

Ao adicionar certa substância na água, haverá uma variação de entropia, rearranjando as moléculas da mesma. Portanto, íons que causam uma pequena variação da entropia, ou seja, não induzem uma grande desorganização das moléculas de água ao seu redor, são mais bem hidratados⁶⁷.

É possível se determinar o efeito estrutural que o íon provoca nas moléculas de água através de medidas da entropia de hidratação do íon (ΔS_{hid}) e da viscosidade da água. O íon é chamado “estruturante” ou cosmotrópico quando $\Delta S_{\text{hid}} < 0$. E se $\Delta S_{\text{hid}} > 0$, o íon é denominado caotrópico.

3.5. Reologia - Cálculo dos parâmetros de rede

Reologia é a ciência que trata das deformações e fluxo de materiais causados pela aplicação de um campo de forças^{68,69}. Materiais viscoelásticos apresentam tanto características de materiais sólidos como de líquidos, respondendo à ação das deformações com uma combinação de respostas elásticas e viscosas.

A morfologia e, conseqüentemente, as propriedades mecânicas destes materiais e de suas composições, são determinadas por estas deformações e tensões. Assim, torna-se necessário conhecer o comportamento destes materiais. As caracterizações reológicas de elastômeros baseiam-se na resistência destes materiais às forças aplicadas durante as operações de processamento.

A partir da reologia analítica é possível determinar a microestrutura de um material e sua resposta viscoelástica. Medidas reológicas oferecem uma caracterização quantitativa das propriedades viscoelásticas de hidrogéis sob condições definidas, através da determinação dos módulos de armazenamento

(elástico) (G') e perda (viscoso) (G'') e, a partir destes, parâmetros de rede podem ser calculados.

A partir da teoria de elasticidade da borracha é possível ter uma melhor compreensão sobre o comportamento mecânico dos hidrogéis. Com base nesta teoria é possível analisar a estrutura do polímero e determinar a massa molecular entre as ligações cruzadas.

Borrachas são materiais que respondem a uma força de deformação de maneira rápida e totalmente reversível. Seu comportamento reversível é de até ~1000% de alongação. Borrachas normais são pouco reticuladas e apresentam um grande volume livre que permite responder à força de deformação com um rápido rearranjo dos segmentos poliméricos de sua estrutura. No estado intumescido, a maioria dos hidrogéis possui o mesmo comportamento das borrachas normais.

Na análise de uma curva oscilatória ideal é possível encontrar uma região linear viscoelástica em uma frequência de deformação intermediária. Neste intervalo linear viscoelástico, os parâmetros de rede podem ser obtidos a partir de dados de G' (módulo elástico). Valores de massa molar média ($\overline{M}_c$) entre as ligações cruzadas são calculados a partir da teoria clássica da elasticidade da borracha (eq. 3.17)⁷⁰:

Eq. 3.17

$$\overline{M}_c = \frac{\rho RT}{G'}$$

onde: ρ é a densidade do polímero, R é a constante dos gases e T é a temperatura (K).

A partir do módulo elástico obtido na região viscoelástica são obtidos também a densidade de reticulação (ρ_x) (eq. 3.18)⁷¹ e o tamanho de poro (ξ) (eq. 3.19):

Eq. 3.18

$$\rho_x = \frac{G' N_A}{RT}$$

Eq. 3.19

$$\xi = \left(\sqrt[3]{\rho_x} \right)^{-1}$$

onde: N_A é o número de Avogrado.

4. Parte Experimental

4.1. Materiais

Na tabela 4.1 estão catalogados os reagentes utilizados e sua procedência.

Tabela 4.1: Relação dos principais reagentes utilizados neste trabalho.

Nome	Procedência	Fórmula	Nome	Procedência	Fórmula
PVP Luviskol® K-90	Basf	$(C_6H_9NO)_n$	Água Deuterada	Aldrich	D_2O
Solução 30% de peróxido de hidrogênio	Merck	H_2O_2	PVA	Aldrich	$(C_2H_4O)_n$
Cloreto Ferroso	Aldrich	$FeCl_2$	Luviskol® VA64	BASF	$(C_6H_9NO)_m(C_4H_6O_2)_n$
Ácido acético glacial	Quimex	CH_3COOH	Luviskol® VA37E	BASF	$(C_4H_6O_2)_m(C_6H_9NO)_n$
Acetato de sódio	Sigma	CH_3COONa	Sulfato de cálcio	Aldrich	$CaSO_4$
Fosfato de sódio monobásico	Mallinckrodt	NaH_2PO_4	AIBN	Aldrich	$C_8H_{12}N_4$
Fosfato de sódio dibásico	Synth	Na_2HPO_4	Ácido clorídrico	Synth	HCl
N-vinil-2-pirrolidona	Aldrich	C_6H_9NO	Catecol	Aldrich	$C_6H_6O_2$
Acroleína	Aldrich	C_3H_4O	Glutaraldeído	Aldrich	$C_5H_8O_2$
Acetato de vinila	Aldrich	$C_4H_6O_2$	Hidróxido de sódio	Mallinckrodt	$NaOH$
Metacrilato de Metila	Aldrich	$C_5H_8O_2$	Borato de sódio	Synth	$Na_2B_4O_7$
Éter etílico	Sigma	C_2H_6O	PVP K16-18	Acros Organic	$(C_6H_9NO)_n$
Etanol Absoluto	Mallinckrodt	C_2H_6O	Mowiol®	Clariant	$(C_2H_4O)_n$
Metanol	Synth	CH_3O	Cloreto de sódio	Synth	$NaCl$
Acetato de potássio	Synth	CH_3COOK	Fluoreto de sódio	Synth	NaF

Quitosana de massa molar alta	Aldrich	$C_{12}H_{24}N_2O_9$	Quitosana de massa molar média	Aldrich	$C_{12}H_{24}N_2O_9$
Cianoborohidreto de sódio	Aldrich	$NaBH_3CN$	Soluções tampões pH 4, 7,4 e 10.	Synth	

4.1.1. Purificação dos monômeros

4.1.1.1. Purificação da N-vinil-2-pirrolidona.

A purificação do monômero N-vinil-2-pirrolidona (Aldrich) foi realizada a partir da destilação à pressão reduzida sob atmosfera inerte, na presença de catecol para evitar a polimerização do monômero.

Bp° 93°; $d=1,040\text{g.mL}^{-1}$; $\eta=1,5120$ e $M= 11,14\text{g.mol}^{-1}$.

4.1.1.2. Purificação da acroleína.

O monômero acroleína (Aldrich) foi purificado seguindo procedimento descrito em literatura⁷². Primeiramente foi feita a destilação fracionada sob atmosfera inerte. O destilado foi seco com $CaSO_4$ anidro por 24 horas, filtrado e submetido à destilação a vácuo.

Bp° 52,1°; $d=0,839\text{g.mL}^{-1}$; $\eta=1,3992$ e $M= 56,1\text{g.mol}^{-1}$.

4.1.1.3. Purificação do acetato de vinila

Antes da destilação do monômero sob atmosfera de N_2 , o acetato de vinila foi seco em $CaCl_2$ por 24 horas.

Bp^0 72,3°; $d=0,938\text{g.mL}^{-1}$; $\eta=1,396$ e $M= 86,1\text{g.mol}^{-1}$.

4.1.1.4. Purificação do metacrilato de metila

O monômero metacrilato de metila (Aldrich) foi purificado seguindo procedimento descrito em literatura⁷³. Lavou-se duas vezes com solução aquosa de NaOH 5% e duas vezes com água destilada.

O monômero foi seco com CaCl_2 por 24 horas e então destilado com CaH_2 sob atmosfera inerte a pressão reduzida.

$Bp^0= 46^\circ/100\text{ mmHg}$; $d=0,937\text{ g.mL}^{-1}$; $\eta=1,4144$ e $M= 100,1\text{g.mol}^{-1}$.

4.2. Equipamentos e técnicas

Com o auxílio dos equipamentos situados na Central Analítica do Instituto de Química (IQ-USP), foram registrados os espectros de RMN- ^1H nos espectrômetros Varian 200 MHz (para os copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona) e Bruker Modelo DRX 500 (para a quitosana); os espectros de infravermelho foram registrados no espectrômetro FTIR Bomem MB 100 (faixa de operação $350 - 4000\text{ cm}^{-1}$); as determinações de análise elementar foram realizadas no Perkin Elmer CHN; e as micrografias foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL (FEG 7401F).

Os ensaios de reologia para análise cinética e algumas características dos hidrogéis foram feitos no reômetro placa/placa Modular Compact (PHYSICA MCR 300 – PAAR PHYSICA) situado no laboratório da Prof. Dra. Maria Regina Alcântara.

O valor do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') para análises de tamanho de poro foram realizados no reômetro ARES L2 (TA Instruments) situado no laboratório da Prof. Dra. Nicole Demarquette (EPUSP).

Medidas de viscosidade foram obtidas com viscosímetro de Ubbelohde (Schott 531-10, Capilar N^o. 1c) situado no laboratório do Prof. Dr. Omar El Seoud.

A análise de conteúdo de água na quitosana foi realizada no TG Schimadzu 51H situado no laboratório do Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos.

Com o auxílio dos aparelhos DSC-30 TA4000 e 2950 TG-2950 TA situados no laboratório do Prof. Dr. Yoskio Kawano, foram realizados a análise de conteúdo de água nos hidrogéis.

Os espectros Raman foram obtidos pelo espectrômetro Bruker RFS100/S situado no laboratório da Prof. Dra. Márcia Temperini.

As soluções de pH controlado foram medidas no pH meter 430 (Corning).

A preparação dos copolímeros foi realizada na estufa a vácuo MA 030/12 (Marconi).

As amostras de hidrogel e polímeros foram secos no liofilizador Micro Modulyo (THERMO SAVANT) acoplado à bomba VLP 200 (THERMO SAVANT).

4.2.1. Determinação da Massa Molar

4.2.1.1. Osmometria

A osmometria de membrana é uma técnica absoluta baseada nas propriedades coligativas dos compostos, que fornece massa molar numérica ($\overline{M}_n$).

O cálculo de massa molar é obtido a partir de medidas de pressão osmótica reduzida (π/c_2) de quatro soluções de concentrações diferentes. O valor de π/c_2 é determinado para cada concentração e valores de π/c_2 *versus* c_2 é plotado, extrapolando se a curva (no caso uma reta) a concentração zero. O coeficiente angular da reta fornece o valor de A_2 , e o intercepto da reta no eixo das ordenadas fornece o valor de $\overline{M}_n$ (Figura 4.1).

Figura 4.1: Representação da determinação da massa molar numérica média.

As pressões osmóticas de quatro soluções de diferentes concentrações foram medidas em um osmômetro OSMOMAT da GONOTEC modelo 090, com membranas de acetato de celulose de corte em 5kDa e 10kDa, de acordo com a eq. 4.1:

Eq. 4.1

$$\frac{\pi}{c} = RT \left(\frac{1}{\overline{M}_n} + A_2 c \right)$$

onde R é a constante universal dos gases; T é a temperatura absoluta e A_2 é o segundo coeficiente virial.

4.2.2.2. Cromatografia por exclusão de tamanho (CET)

As amostras foram analisadas em um cromatógrafo líquido SHIMADZU LC-10AD com detectores de índice de refração e UV (Class-LC10). O detector UV foi programado para detecção em comprimento de onda de 254 nm. As colunas usadas foram Ultrahydrogel[®] (120, 250, 500 e 2000)(300 x 7,8 mm) da Water. A caracterização dos copolímeros foi realizada usando como fase móvel água destilada e acetonitrila (0,03M) com fluxo de 1,0 mL/min. Para atribuir o valor das massas molares por CET, foi obtido uma curva de calibração com padrões de poli(óxido de etileno) (PEO) de massas molares ($\overline{M}_w$) 860.000, 348.000, 88.200, 24.800 e 1200.

4.2.2.3. Espalhamento de Luz

A determinação da massa molar ponderal foi obtida a partir do espalhamento de luz de quatro soluções de concentrações diferentes. Estas soluções são previamente filtradas com filtros de poro 0,22 μ m ou 0,45 μ m, para retirada de partículas em suspensão. A intensidade de luz espalhada foi medida no goniômetro DAWN da Wyatt Technology Inc, cuja fonte de luz do aparelho é de um laser de He-Ne (632,8nm) de 5mW de potência e permite a medida de espalhamento entre os ângulos de 22,5° a 147°. O tolueno foi utilizado como solvente de referência e a normalização foi realizada com esferas de látex padrão com diâmetro de 0,21 μ m (Duke Inc.). Este equipamento encontra-se no laboratório do Prof. Dr. Mário José Politi.

4.3. Métodos e Processos

4.3.1. Obtenção de hidrogel de PVP por Reação de Fenton

Foram preparadas soluções aquosas de PVP K-90 de concentrações 80, 120 e 200 g.L⁻¹. O PVP e a água são pesados e misturados sob agitação magnética e deixados de repouso por pelo menos 12 horas. Os hidrogéis foram produzidos a partir da mistura de duas diferentes soluções de PVP à temperatura ambiente: solução A contendo PVP e H₂O₂, e solução B, contendo PVP e FeCl₂ (Figura 4.2).

Figura 4.2:Preparação dos hidrogéis via reação de Fenton.

Foram variadas as concentrações de H₂O₂ (10mM - 100mM) e de FeCl₂ (5mM - 10mM). Para analisar a influência de pH, soluções de PVP também foram preparadas em soluções tampão de acetato 0,1M (pH 2,5) e fosfato 0,1M (pH 7,0).

As soluções estoques de peróxido de hidrogênio foram analisadas no UV, para ajuste de concentração (vide anexo III).

4.3.2. Preparação e Caracterização dos copolímeros

Todos os comonômeros N-vinil-2-pirrolidona (VP), acetato de vinila (VAc), metacrilato de metila (MMA) e acroleína (AC) foram previamente purificados e estocados sobre atmosfera inerte de N₂ no freezer a -3°C.

Na intenção de produzir um material com características próximas ao polímero de PVP comercial, os copolímeros foram produzidos a partir de misturas contendo 90% de N-vinil-2-pirrolidona e 10% de um segundo comonômero.

Para a copolimerização radicalar, utilizou-se 0,05% (em massa) de AIBN como iniciador. Comonômeros e iniciador foram misturados em uma ampola e borbulhados em N₂ por 15 minutos. A ampola foi lacrada e submetida a uma estufa a vácuo com temperatura de 65-70 °C durante três dias.

A purificação foi realizada com a dissolução dos copolímeros em etanol absoluto e posterior precipitação em éter etílico, em até três ciclos. Para a retirada de solvente, os copolímeros foram secos em estufa a vácuo.

A determinação da porcentagem de incorporação dos comonômeros foi feita por análise elementar de CHN. A análise da estrutura dos copolímeros foi feita a partir dos espectros de Infravermelho e RMN-H¹.

4.3.2.1. Hidrólise dos copolímeros

4.3.2.1.1. Metanólise do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)

Os copolímeros secos de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila) (PVPVAC), Luviskol[®] 37 e Luviskol[®] 64 foram dissolvidos em metanol. A metanólise foi iniciada com a adição de uma solução metanólica de NaOH de 4x10⁻³g.mL⁻¹ em

uma proporção de 0,005-0,02 mol de NaOH/mol de acetato de vinila. A solução foi aquecida a 45° C com agitação durante 30 minutos. O material foi precipitado em éter (0°C) e lavado com água deionizada por até 4 vezes e então seco na estufa à 50°C.

Após metanólise os copolímeros passaram a ser denominados, respectivamente, por poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico)(PVPVAL), Luviskol® 37H e Luviskol® 64H.

4.3.2.1.2. Hidrólise do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)

A esterificação mais comum de ácidos carboxílicos envolve a reação com um álcool, catalisada por ácido sulfúrico. A hidrólise do éster foi feita a partir da dissolução do copolímero em metanol e adição de uma solução 96% de H₂SO₄ na proporção de 1:100.

Após completa solubilização do copolímero poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila) (PVPMMA) a temperatura ambiente, o sistema foi aquecido a 60°C, por 2 horas. A solução foi vertida em éter (0°C), após ter atingido temperatura ambiente, para precipitação do copolímero. O sólido foi lavado sucessivamente com água destilada e seco na estufa até massa constante. Após hidrólise o copolímero foi denominado poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico)(PVPMA).

4.3.3. Obtenção dos hidrogéis de copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona produzidos por reticulações químicas mais brandas

4.3.3.1. Hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) e Quitosana

Foram preparadas soluções 80 e 120 g.L⁻¹ do copolímero de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) (PVPACR) e soluções 20 g.L⁻¹ de quitosana (massa molar alta e média) em uma solução de ácido acético de pH 2,5. As soluções foram misturadas sob agitação magnética segundo as seguintes proporções (PVPACR: Quitosana): 4:1; 6:1; 8:1; 12:1, até a obtenção de um gel (figura 4.3).

Figura 4.3: Preparação dos hidrogéis via formação de Base de Schiff.

4.3.3.2. Hidrogel do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico)

4.3.3.2.1. Reticulação com Glutaraldeído

Utilizando-se do “Método de Korsmeyer e Peppas⁷³” para reticulação de poli(álcool vinílico), foram preparadas soluções 10% de PVPVAL, Mowiol®, PVA

Aldrich[®], Luviskol[®] 37H e Luviskol[®] 64H em H₂O, a temperatura 80-90°C até dissolução total e resfriadas a temperatura ambiente.

Para cada 100mL de polímero, foram adicionados 20mL de metanol 50%, 30mL de uma solução 10% de ácido acético e 10mL de uma solução 1% de ácido sulfúrico. As soluções foram vertidas em placas de Petri deixando-as em repouso por 24 horas. É necessária a presença de ácido sulfúrico, metanol e ácido acético para a formação de grupos acetal entre o glutaraldeído e as hidroxilas do polímero⁷⁴.

4.3.3.2.2. Reticulação com íons borato

Filmes de Luviskol[®] 64H e PVPVAL foram obtidos a partir de soluções aquosas 10%. As soluções foram colocadas em placas de Petri, para evaporação do solvente, e os filmes obtidos foram submetidos a vácuo por 48 horas a temperatura ambiente.

Após a secagem, os filmes foram imersos em uma solução de borato de sódio 0,6M a 25°C por 15 minutos. Retirou-se o filme, secou-se sob vácuo por 48 horas a 25°C até massa constante.

4.3.3.2.3. Hidrogel Físico

Foram preparadas soluções 15% de PVA em água deionizada à temperatura de 80-90°C, resfriadas até a temperatura ambiente, estocadas em tubos Falcon e

congeladas até a temperatura de -20°C . As medidas de fração de gel foram feitas a partir de cinco ciclos de congelamento e descongelamento da amostra.

4.3.3.3. Hidrogel do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico) com íons Ca^{2+} .

Soluções 8% de PVPMA preparadas em água destilada foram misturadas com uma solução CaSO_4 0,1M a temperatura ambiente. A solução foi deixada de repouso por 24 horas e os possíveis hidrogéis foram analisados.

4.3.4. Caracterização da Quitosana

4.3.4.1 Purificação da Quitosana

As quitosanas (média e alta massa molecular) foram previamente purificadas antes de suas análises devido à presença de impurezas tais como proteínas e restos da carcaças de crustáceos.

Amostras de quitosana foram preparadas com solução de ácido acético (HAc) pH 2,5 até dissolução total, precipitadas com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 1M e lavadas com água deionizada até pH 7,0.

O precipitado foi novamente dissolvido em HAc pH 2,5 e a solução foi filtrada em papel de filtro qualitativo. Uma nova precipitação da quitosana com NaOH 1M foi realizada.

O precipitado de quitosana é sólido muito fino e a retirada do NaOH da solução foi feita através de diálise. A solução (contendo o precipitado) foi colocada em sacos de diálise, onde foi feita a troca de água deionizada a cada uma hora, até obtenção de pH 7,0. A solução presente no saco de diálise foi seca no liofilizador até massa constante.

4.3.4.2. Cálculo do grau de acetilação da quitosana

4.3.4.2.1. Análise Elementar

A partir da análise elementar é possível caracterizar o grau de acetilação (GA) da quitosana pela razão carbono/nitrogênio (C/N) em amostras secas de quitosana, segundo a eq. 4.2⁷⁵:

Eq. 4.2

$$GA(\%) = \left[\frac{(8,695 - \%N)}{8,695 - 6,896} \right] * 100$$

onde: 8,695 é a %N na quitosana totalmente desacetilada e 6,896 é a %N na quitina totalmente acetilada.

4.3.4.2.2. Espectroscopia no Infravermelho

O grau de acetilação da quitosana também pode ser obtido pela análise espectroscópica no infravermelho, a partir da análise da intensidade das bandas

$\sim 1655\text{ cm}^{-1}$ (correspondente ao estiramento da carbonila da amida) e $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$ (correspondente aos estiramentos de OH e NH sobrepostos).

O grau de acetilação foi determinado pela eq. 4.3⁷⁶ a partir de análise em pastilhas de KBr:

Eq. 4.3

$$GA\% = \left(\frac{A_{1655}\text{cm}^{-1}}{A_{3450}\text{cm}^{-1}} \times 100 \right) : 1,33$$

onde: GA é o grau de acetilação em porcentagem; A_{1655} é o valor da absorbância no comprimento de onda de $\sim 1655\text{cm}^{-1}$; A_{3450} é o valor de absorbância no comprimento de onda de $\sim 3450\text{cm}^{-1}$; e 1,33 é uma constante.

4.3.4.2.3. Ressonância Magnética Nuclear de Prótons (RMN- H^1)

Para a detecção do grau de acetilação da quitosana por ressonância, foram preparadas amostras de 10mg/mL em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$. O grau de acetilação (GA) foi calculado pela eq. 4.4⁷⁷:

Eq. 4.4

$$GA = \left(\frac{\frac{1}{3} A_{CH_3}}{A_{H_2}} \right) \times 100$$

onde: A_{CH_3} é a área do pico na região de 2,1 ppm atribuído aos núcleos de hidrogênios da metila do grupo acetamido do anel glicopirranose; A_{H_2} é a área do

pico em 3,2 ppm atribuído ao núcleo do hidrogênio na posição 2 do anel glucosamino.

4.3.5. Fração de gel

As análises de fração de gel foram realizadas após os hidrogéis permanecerem em repouso por cerca de 12 horas ou até atingir o equilíbrio, pois alguns hidrogéis apresentam sinerese, ou seja, após a síntese o gel pode sofrer um processo de “expulsão” de água. O equilíbrio é alcançado quando todo o conteúdo de água “expulsa” é absorvido novamente pelo gel.

Depois de alcançado o equilíbrio, amostras de gel (triplicata) são pesadas, embrulhadas em membranas de nylon e colocadas em um extrator de Soxhlet por até 36 horas para extração da parte não reticulada. O solvente utilizado nas extrações foi água destilada.

Após extração as membranas foram secas até massa constante. O cálculo da fração *sol* (polímero solúvel; eq. 4.5) e fração *gel* (polímero reticulado; eq. 4.6) são obtidos pelas equações abaixo⁷⁸:

Eq. 4.5
$$S(\%) = \left(\frac{w_g - w_o}{w_g} \right) \times 100$$

Eq. 4.6
$$G(\%) = 100 - S(\%)$$

onde: S(%) = porcentagem da fração sol; G(%) = porcentagem da fração gel; w_g = massa inicial de PVP na amostra; w_o = massa do gel seco.

4.3.6. Ensaio de intumescimento dos hidrogéis

A habilidade em absorver grandes quantidades de água é o que determina a maciez, porosidade e a permeabilidade em hidrogéis. Estas propriedades em curativos é que controlam a difusão e o transporte de oxigênio, nutrientes essenciais e resíduos metabólicos através da rede polimérica.

O processo de intumescimento devido à absorção de água na estrutura do hidrogel pode ser dividido em três passos:

- (a) difusão das moléculas de água dentro da rede polimérica;
- (b) relaxação das cadeias poliméricas;
- (c) expansão da matriz polimérica.

A determinação do grau de intumescimento do hidrogéis foi feito pela imersão de uma amostra do hidrogel em água, onde este absorverá água até alcançar o equilíbrio (48 h). A determinação do grau de intumescimento pode ser realizada de duas maneiras: (1) por comparação das mudanças dimensionais do material totalmente intumescido com aquelas do material não intumescido, ou seja, do material obtido logo após a reticulação (eq. 4.7); (2) por comparação das mudanças dimensionais com o material seco (eq. 4.8).

Eq. 4.7

$$\% I = \frac{mf - mi}{mf} \times 100$$

Eq. 4.8

$$\% I = \frac{mf - ms}{ms} \times 100$$

onde: $I\%$ é o grau de intumescimento em porcentagem, mf é a massa final em gramas, mi é a massa inicial em gramas e ms é a massa seca.

O conteúdo de água absorvido também pode ser analisado pelo seu grau de intumescimento (GI), que é calculado a partir da massa do gel seco (m_s) e da massa do gel intumescido (m_i) (eq. 4.9):

Eq. 4.9

$$GI = \frac{m_s}{m_i}$$

4.3.7. Análise da estrutura da água contida no hidrogel

4.3.7.1. Espectroscopia no Infravermelho

Para analisar o comportamento das ligações de hidrogênio presentes entre a retículo polimérico e os diferentes estados da água no hidrogel (águas de fronteira primária e secundária, e água livre), amostras de filmes de hidrogel seco foram equilibrados com a atmosfera em diferentes graus de umidade e seus espectros no Infravermelho foram registrados no FTIR Bomem MB100, espectrômetro com o método de ATR (reflectância total atenuada). Pelo menos 256 scans foram registrados para cada experimento. A resolução no comprimento de onda foi de 2 cm^{-1} .

4.3.7.2. DSC

Para analisar o conteúdo de água e os diferentes tipos de água presentes na estrutura do hidrogel a partir do seu ponto de fusão, amostras do gel foram analisadas por DSC, utilizando-se um fluxo de N₂ de 50ml/min. O experimento seguiu a seguinte sequência: as amostras foram esfriadas de 25°C a -40°C a uma velocidade de 10°C/min; após este período foram aquecidas de -40°C a -10°C a uma velocidade de 10°C/min e, finalmente, aquecidas de -10°C a 5°C a uma velocidade de 0,3°C/min. A partir do pico endotérmico referente à fusão da água, é possível obter a quantidade de água livre no hidrogel.

4.3.7.3. TG

Na intenção de detectar o conteúdo de água presente em uma cadeia polimérica, amostras do material foram submetidas à análise de TG sob fluxo de N₂ de 50mL/min e aquecidas a uma velocidade de 10°C/min. As amostras foram submetidas a uma varredura de temperatura de 25°C a 500°C.

4.3.8. Cinética de reticulação dos hidrogéis

A análise da cinética de reticulação dos hidrogéis foi realizada em um reômetro placa/placa. Soluções são colocadas no reômetro e a mistura é feita com o auxílio da rotação da placa superior sob uma taxa de cisalhamento constante. A mudança da viscosidade foi analisada em tempo real.

4.3.9. Análise de Biocompatibilidade

Como fase inicial do teste de biocompatibilidade de um material com potencial para aplicações médicas, foram feitos testes de citotoxicidade para detectar se o material em questão provoca morte das células ou outros efeitos negativos nas funções celulares.

As técnicas utilizadas foram: *in vitro*, para identificar efeitos adversos que material em potencial possa acarretar às células; e teste de citotoxicidade *in vivo*, neste caso o material não deve causar morte nas células nem afetar suas funções celulares.

O uso de técnicas de cultura de células⁷⁹ pode detectar se ocorre a lise das células, a inibição do crescimento celular e outros efeitos que possam ser causados nas células pelo material e/ou extrato do material.

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita através da análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes vitais ou não), da proliferação celular, de atividade biossintética, etc.

Existem dois tipos de testes *in vitro*: métodos de contato direto e métodos de contato indireto. Neste trabalho, análises da citotoxicidade foram feitas via método de contato indireto. No primeiro caso, o teste foi realizado com extrato do hidrogel, e no segundo caso, com substâncias do hidrogel separadas das células por uma barreira de difusão, no caso ágar.

Todos os testes foram realizados no Instituto Adolfo Lutz. Foram utilizadas células da linhagem celular NCTC Clone 929 de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1). Estas células foram semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular.

No primeiro teste, extratos do hidrogel foram colocados em contato com as células de cultura. Uma suspensão de células de cultura foi preparada em garrafa de cultura celular. Solução de tripsina foi usada para o destaque das células e o número de células foi contado em hemocitômetro. A suspensão foi acertada para obtenção de 5×10^4 células por mL e alíquotas de 0,2mL foram distribuídos em poços da microplaca. A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% CO₂ por 24 horas, até atingir a confluência desejada. Controles positivo e negativo receberam o mesmo procedimento da amostra. Após o período de 24 horas foram trocados os meios por meio-uso fresco contendo 50µg do corante vermelho neutro⁸⁰ e incubados por 3h. A placa foi lavada com solução de cloreto de cálcio em formaldeído, seguido da adição em cada poço da placa de 0,2 mL de solução de ácido acético em etanol. A placa foi agitada e levada a um leitor de Elisa em 540nm e a toxicidade foi determinada pela medida da viabilidade celular através da incorporação do vermelho neutro.

No segundo teste o meio de cultura líquido foi substituído pelo meio de cultura sólido, que é composto de partes iguais do meio duas vezes mais concentrado e ágar com vermelho neutro. Para a incorporação do vermelho neutro, amostras dos extratos do hidrogel foram colocadas sobre o meio de cultura sólido e incubados por 24 horas. Como controle positivo foi utilizado látex tóxico e como controle negativo, discos de papel de filtro atóxico; foi medido o índice de zona (IZ), que é a área não corada pelo corante vital. Os testes foram realizados em quadruplicatas em placas separadas.

O teste *in vivo* analisou a irritação dérmica primária. A verificação da ação irritante foi feita em 6 coelhos albinos, amostras do hidrogel foram aplicadas na

região dorsal depilada e após 24 e 72 horas foram feitas as leituras de edema e eritema.

4.3.10. Análise do Tamanho de Poro

4.3.10.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Os ensaios para detecção de tamanho de poro por MEV, amostras de hidrogéis de PVP extraídos e liofilizados foram recobertos com ouro pela técnica de sputtering. O tamanho de poro foi analisado em hidrogéis sintetizados a diferentes concentrações de Fe^{2+} , H_2O_2 e PVP.

4.3.10.2. Reologia

O valor do módulo elástico (G') e do módulo viscoso (G'') foram analisados para hidrogéis de PVP sintetizados em diferentes condições. Os ensaios foram realizados a 25°C com a câmara aberta. Para encontrar a região viscoelástica foi feito o ensaio de DSST (Teste dinâmico de varredura da tensão) variando a deformação. Encontrada a região viscoelástica, foram feito ensaios de SAOS (Cisalhamento oscilatório de tensão controlada) para encontrar a região linear, onde a oscilação (ω) foi variada (0,1 -1 rad/s). Na região linear, a partir do valores de G' , é possível calcular o tamanho de poro do material.

5. Resultados e Discussão

5.1. Processos oxidativos avançados na reticulação de polímeros

Para o estudo dos processos oxidativos avançados, foi utilizado o PVP Luviskol K90. Suas principais características são mostradas na tabela 5.1:

Tabela 5.1: Principais características do PVP K90.

Propriedades	Valores
Aparência	Pó branco
pH (10% solução aquosa)	5,0-9,0
Nitrogênio (%)	11,5-12,8
Massa molar ponderal média ($\overline{M}_w$)	$1,2 \times 10^3$ - $2,0 \times 10^3$ kDa
Massa molar numérica média ($\overline{M}_n$)	300-500 kDa
T°C max. de estabilidade	210
T _g (°C)	180
Parâmetro de solubilidade (δ)	12,6
Tamanho médio das partículas (μm)	200
Densidade ($\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	0,4-0,6

O PVP foi escolhido devido seu histórico na formação de hidrogéis. Como descrito na Introdução, hidrogéis de PVP têm sido preparados através do uso de radiações de alta energia como feixe de elétrons e radiação γ ⁸¹. O evento primário nestes casos é a radiólise da água que gera radicais hidroxila. Estes, por sua vez, reagem rapidamente com PVP, gerando macroradicais que se recombina formando ligações cruzadas. Nossa hipótese, portanto, era de que reações de

Fenton, que também geram radicais hidroxila, poderiam gerar a mesma sequência de reações.

O PVP é um material altamente biocompatível⁸², sendo que após a metade do século 20 já era usado como plasma sangüíneo em vítimas da segunda guerra mundial⁸³. Devido as suas propriedades de biocompatibilidade e hidrofiliidade, este material tem sido proposto como efetiva e interessante matriz na engenharia de tecidos.

5.1.1. Planejamento Fatorial

Foi estudado, inicialmente, um grande número de parâmetros, principalmente aqueles relacionados às concentrações dos reagentes de Fenton como $[\text{Fe}^{2+}]$, $[\text{H}_2\text{O}_2]$ e $[\text{PVP}]$ (tabelas 5.2 e 5.3). Porém, não foi encontrada qualquer tendência que explicasse a variabilidade dos mesmos em função dos eventos moleculares envolvidos, impossibilitando a previsão das propriedades do hidrogel em função dos parâmetros do sistema.

Tabela 5.2: Alguns parâmetros do hidrogel via reação de Fenton com $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$

[PVP] = 80g.L⁻¹ e [Fe²⁺] = 5mM				
[H₂O₂] (mM)	pH 2,5		pH 7,0	
	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento
20	44,3 (± 4,1)	24,6 (± 2,1)	70 (± 13)	45,9 (± 8,1)
40	71 (± 15)	25 (± 8)	72,9 (± 14,6)	41 (± 3)
70	74,2 (± 14,6)	21,8 (± 6,4)	81,8 (± 13,3)	31 (± 2)
[PVP] = 100g.L⁻¹ e [Fe²⁺] = 5mM				
[H₂O₂] (mM)	pH 2,5		pH 7,0	
	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento
20	13,6 (± 6,1)	16,7 (± 4,2)	55,6 (± 4,9)	41 (± 3)
40	68,2 (± 9,8)	42,9(± 7,3)	72,9 (± 14,6)	41 (± 3)
50	63,5 (± 12,3)	28,7 (± 11,4)	68,2 (± 6,1)	40,1 (± 3,8)
[PVP] = 200g.L⁻¹ e [Fe²⁺] = 5mM				
[H₂O₂] (mM)	pH 2,5		pH 7,0	
	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento
10	57,1 (± 1,2)	-	52,1 (± 0,6)	-

Tabela 5.3: Alguns parâmetros do hidrogel via reação de Fenton com $[\text{Fe}^{2+}] = 7,5\text{mM}$

[PVP] = 80g.L⁻¹ e [Fe²⁺] = 7,5mM				
[H₂O₂] (mM)	pH 2,5		pH 7,0	
	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento
10	90,9 (± 1,8)	33,0 (± 1)	59,9 (± 4,7)	32,1 (± 2,6)
50	78,1 (± 4,8)	14,0 (± 3)	80,6 (± 7,1)	30 (± 3)
100	70,4 (± 6,7)	18 (± 2)	87,1 (± 7,7)	24,7 (± 0,8)

[PVP] = 120g.L⁻¹ e [Fe²⁺] = 7,5mM				
[H₂O₂] (mM)	pH 2,5		pH 7,0	
	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento	Conteúdo de Gel (%)	Grau de intumescimento
10	65,3 (± 2,3)	14,7 (± 0,7)	79,4 (± 2,3)	33,6 (± 1,2)
50	76,8 (± 7,3)	18,6 (± 2,3)	67,2 (± 4,7)	25,3 (± 1,6)
100	93,2 (± 6,2)	15,9 (± 2,5)	72,2 (± 2,7)	40 (± 2)

Segundo a literatura, para que seja produzida uma máxima quantidade de radicais hidroxila, a reação de Fenton deve, preferencialmente, ocorrer em meio ácido. Porém, nosso interesse é na produção de um material que fosse obtido próximo ao pH fisiológico para futuras aplicações na área biomédica. Por isso, paralelamente aos ensaios de reação de Fenton em pH ácido, foram realizados estudos em pH 7,0.

As cinéticas da reação de Fenton realizadas em pH ácido já são bem conhecidas, e têm se mostrado dependentes das concentrações de Fe^{2+} e H_2O_2 . A oxidação ou a reticulação do sistema, vai depender da razão entre as concentrações dos reagentes de Fenton. Torna-se necessário entender como a reação de Fenton se processa em pH 7,0 e analisar qual a região limite de trabalho

O planejamento fatorial é utilizado para analisar as interações entre todas as variáveis em sistemas complexos, como a Fenton térmica, no intuito de minimizar o

número de experimentos necessários e encontrar a região de melhores resultados. Um dos problemas mais comuns é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse. Na verdade, é necessário descobrir como a resposta depende das variáveis em questão. Em um bom planejamento, o experimento é projetado de forma a se obter o tipo de informação desejada.

Torna-se necessário decidir quais são os fatores e as respostas de interesse. Os fatores são conhecidos como variáveis independentes e as respostas são as variáveis dependentes. Os termos variável dependente e independente aplicam-se principalmente à pesquisa experimental, onde algumas variáveis são manipuladas, e, neste sentido, são "independentes", enquanto as outras variáveis são "dependentes" da manipulação ou das condições experimentais, ou seja, são medidas ou registradas.

No planejamento fatorial especificam-se os níveis de cada variável analisada, isto é, os valores das variáveis nos experimentos. As variáveis estão relacionadas e seus valores correspondem sistematicamente uns aos outros para aquela amostra de observações. Um planejamento estudado em apenas dois níveis é o mais simples de todos, e é comum identificá-los como: nível superior (+) e nível inferior (-), como demonstrado na tabela 5.4 para as variáveis independentes do hidrogel de PVP. Um planejamento de dois níveis exige a realização de 2^k ensaios diferentes, chamado de planejamento fatorial 2^k , onde k é o número de variáveis independentes (fatores), que neste caso é 3, ou seja, 2^3 .

Tabela 5.4: Fatores níveis das variáveis independentes para os hidrogéis de PVP obtido por reação de Fenton.

Variáveis Independentes	Legenda	Baixo (-1)	Alto (+1)
[PVP] (g/L)	x	80	120
[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺]	y	1	10
pH	z	2,5	7,0

Todos os experimentos foram analisados em triplicatas, em um total de 24 ensaios. O tratamento estatístico foi realizado com o auxílio do programa Statistica 5.0 (StatSoft Inc.), baseado na análise de variância (ANOVA). Este conceito é obtido através das médias dos quadrados (MS) (eq. 5.2) das variáveis independentes de sua interação e seu resíduo. A média dos quadrados (MS) é calculada da soma dos quadrados (SS) (eq. 5.1) dividido pelo grau de liberdade (df).

Eq. 5.1

$$SS = \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n (x_{ij} - 1/nk \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n x_{ij})^2$$

Eq. 5.2

$$MS = SS / df$$

Na tabela 5.5 são mostradas as respostas experimentais obtidas em função do planejamento fatorial 2³ para o hidrogel de PVP em cada combinação de fatores. Aos valores alto e baixo de cada variável são atribuídos índices +1 e -1, respectivamente.

Tabela 5.5: Resultados principais do Planejamento Fatorial.

Variáveis Limites ^a	(%) Gel	Grau de Intumescimento	Densidade de Reticulação	Tamanho de Poro
x, y, z	(%)		(10 ⁻⁶ mol/cm ³)	(nm)
+1, +1, +1	68 ± 3	15 ± 4	11 ± 1	6,1 ± 0,1
+1, +1, -1	64 ± 2	15 ± 1	10,6 ± 0,3	5,7 ± 0,2
+1, -1, +1	67 ± 2	24 ± 1	8,8 ± 0,2	6,9 ± 0,2
+1, -1, -1	61 ± 1	27 ± 2	8,5 ± 0,2	7,3 ± 0,2
-1, +1, +1	77,9 ± 0,3	32 ± 2	8,1 ± 0,1	7,7 ± 0,1
-1, +1, -1	93 ± 4	23,4 ± 0,6	8,8 ± 0,1	6,9 ± 0,1
-1, -1, +1	63 ± 5	27,6 ± 0,6	8,32 ± 0,05	7,4 ± 0,1
-1, -1, -1	88 ± 1	17 ± 1	9,9 ± 0,2	6,1 ± 0,1

^aObservar a tabela 5.2 para identificar os valores legendados e os valores limites.

Na tabela 5.6 estão sendo representados os principais efeitos das variáveis independentes e suas respectivas combinações. Os principais efeitos representam como o sistema age ao mudar as variáveis independentes do nível baixo ao nível alto. Quando este efeito é aumentado, ele é indicado pelo sinal positivo (+) e quando este efeito é decrescido, é indicado pelo sinal negativo (-).

Tabela 5.6: Resultados dos principais efeitos para todas as variáveis independentes e suas interações.

	Principais Efeitos			
	(%) Gel	Grau de Intumescimento	Densidade de Reticulação ($\times 10^{-7}$)	Tamanho de Poro
[PVP] (x)	-15,37	-4,91	9,5	-0,53
[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺] (y)	5,67	-2,74	7,4	-0,33
pH (z)	-7,57	3,80	-0,4	0,49
x – y	-3,74	-7,78	14,0	-0,91
x – z	12,21	-5,43	7,4	-0,54
y – z	2,12	0,35	2,1	0,04
x – y – z	-3,09	1,50	-0,2	0,28

Em qualquer relação entre variáveis existem duas propriedades elementares: a magnitude ("tamanho") e a confiabilidade da relação. A magnitude é medida a partir da relação entre as duas variáveis; já a confiabilidade, está relacionada com a "representatividade" do resultado encontrado em uma amostra específica.

O valor do nível-p representa um índice decrescente da confiabilidade de um resultado, o nível-p de 0,05 é costumeiramente tratado como um "limite aceitável" de erro. Através do nível de significância escolhido e o grau de liberdade, é possível obter F_0 , que é um valor tabelado.

Para se avaliar a qualidade do ajuste de qualquer modelo, torna-se necessário fazer a análise de variância (valor de F), que é a divisão entre variâncias: a variância dos erros controlados (s^2_i) pela variância dos erros não-controlados (s^2_r), esta última conhecida como resíduo: $F = (s^2_i) / (s^2_r)$. A variância é então calculada pela eq. 5.3:

Eq. 5.3

$$\text{nível} - p = P[F(k-1), k(n-1) > F_0]$$

onde: k é o número populacional; e n é o tamanho da amostra.

Se o valor de F calculado for maior que o F_0 , então o efeito é considerado estatisticamente relevante.

A tabela 5.7 mostra o nível de significância de todas as variáveis dependentes através do valor de F e do valor- p . A variável [PVP] é a que tem efeito mais pronunciado na determinação de conteúdo de gel, pois seu valor de F é o maior valor numérico absoluto de efeito principal. Como o valor- p representa a confiabilidade do resultado, ou seja, quanto menor o valor- p , mais confiável é o resultado. A variável [PVP] possui a maior confiabilidade dos resultados.

Tabela 5.7: F-teste^a e probabilidade (valor-p) para todas as variáveis independentes: (%) Gel; grau de intumescimento; densidade de reticulação e tamanho de poro.

<i>F-estimado (valor -p)</i>				
	Gel (%)	Grau de Intumescimento	Densidade de Reticulação	Tamanho de poro
[PVP] (x)	221,01	48,40	13,20	110,84
	(8,74×10 ⁻¹¹)	(3,23×10 ⁻⁶)	(2,23×10 ⁻³)	(1,34×10 ⁻⁸)
[H ₂ O ₂]/[Fe ²⁺] (y)	30,11	15,07	7,85	41,83
	(4,97×10 ⁻⁵)	(1,32×10 ⁻³)	(1,28×10 ⁻²)	(7,77×10 ⁻⁶)
pH (z)	53,65	29,11	2,38	91,75
	(1,71×10 ⁻⁶)	(5,95×10 ⁻⁵)	(0,142193)	(4,98×10 ⁻⁸)
x – y	13,09	121,60	29,78	317,94
	(2,31×10 ⁻³)	(6,93×10 ⁻⁹)	(5,30×10 ⁻⁵)	(5,57×10 ⁻¹²)
x – z	139,35	59,20	7,92	112,92
	(2,61×10 ⁻⁹)	(9,12×10 ⁻⁷)	(1,25×10 ⁻²)	(1,17×10 ⁻⁸)
y – z	4,22	0,26	0,68	0,49
	(5,66×10 ⁻²)	(6,20×10 ⁻¹)	(4,21×10 ⁻¹)	(4,91×10 ⁻¹)
x – y – z	8,94	4,56	0,70	30,45
	(8,67×10 ⁻³)	(4,83×10 ⁻¹)	(4,14×10 ⁻¹)	(4,70×10 ⁻⁵)

^aF teórico (F₀) = 4,49 para α = 0,05 e grau de liberdade (df) = 16

O valor de conteúdo de gel representa a quantidade de polímero reticulado em relação ao total de polímero presente. Como a reticulação é dependente da difusão dos macrorradicais em direção um ao outro, o processo se torna mais efetivo quando a concentração do polímero no meio é aumentada. Vale lembrar que a recombinação de macrorradicais compete com sua decomposição em duas moléculas menores.

A variável pH possui uma alta representatividade, ou seja, representa alto valor de F e baixo valor-p. Segundo a figura 5.1, as equações sugerem que um meio

reacional ácido (mais presença de H^+) produz a máxima quantidade de radicais hidroxila ($HO\cdot$) no sistema Fenton.

Figura 5.1: Análise de conteúdo de gel. (A) pH 2,5 e (B) pH 7,0.

Com base nos dados da tabela 5.6, o principal efeito na análise de conteúdo de gel é atribuído à interação [PVP]-pH. Conforme a figura 5.1, onde [PVP], $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ e influência do pH estão sendo estudados, os melhores resultados para conteúdo de gel (%Gel) é atribuído ao sistema: $[PVP] = 80 g.L^{-1}$, $pH = 2,5$ e $[H_2O_2]/[Fe^{2+}] = 10$.

Uma solução muito concentrada diminui o espaço para a mobilidade das cadeias poliméricas, ou seja, diminui a entropia do sistema, evitando o contato entre cadeias mais afastadas; conseqüentemente, quando na presença de reagentes de Fenton, evita uma possível reticulação entre estas cadeias. Como o conteúdo de gel está intimamente relacionado à [PVP], o sistema mostrou que o valor de $[PVP] = 80 g.L^{-1}$ ser o mais indicado para a produção do hidrogel e, como mencionado

anteriormente, a reação de Fenton ocorre preferencialmente a pH mais ácido, por isso maiores conteúdos de gel foram observados na região de pH = 2,5.

A análise do grau de Intumescimento para dos hidrogéis de PVP produzidos por reação de Fenton mostra um maior efeito entre as variáveis independentes [PVP] e $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, como retratado na tabela 5.6. O valor-p, valor de confiabilidade, também é mais representativo (tabela 5.7). As interações entre $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ e pH não são significativas, e podem ser confirmadas devido ao seu baixo valor-p.

Figura 5.2: Análise do grau de intumescimento (A) pH 2,5 e (B) pH 7,0.

Polímeros reticulados têm massa molar microscopicamente infinita, pois não é possível identificar uma cadeia única e isolada, sendo, portanto, caracterizados por uma rede tridimensional formada pela junção de vários segmentos de cadeia polimérica. Esses materiais não sofrem processo de dissolução, porém, sofrem um processo de inchamento (intumescimento) produzindo géis de polímero-solvente. O

grau de intumescimento reflete a interação polímero-solvente e o grau de reticulação do polímero.

Na reação de Fenton, a formação de radicais está intimamente relacionada à razão $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$. Os radicais produzidos são os responsáveis pela reticulação do PVP; por isso, ao se encontrar uma região ótima da $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, mais efetiva será a reticulação. Como o grau de intumescimento reflete também o grau de reticulação, os principais parâmetros que influenciam no seu resultado são [PVP] e $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$.

(A)

(B)

Figura 5.3: Análise da densidade de reticulação (A) pH 2,5 e (B) pH 7,0.

A densidade de reticulação do PVP por reação de Fenton mostrou-se dependente de parâmetros tais como a razão $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, o pH do meio reacional e a [PVP], ou seja, a densidade de reticulação está relacionada à quantidade de radicais hidroxilas ($HO\cdot$) produzidos. Ao avaliar-se a densidade de reticulação, analisando as tabelas 5.6 e 5.7, os principais efeitos encontrados são atribuídos à interação entre as variáveis [PVP] e $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$. A variável valor de pH mostrou

não interferir nos resultados de densidade de reticulação. A figura 5.3 mostra que os maiores valores de densidade de reticulação são obtidos para os níveis mais altos das variáveis $[PVP]$ e $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$.

Quanto maior a razão $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$, mais radicais hidroxilas serão produzidos; como o aumento da $[H_2O_2]$ influencia na disputa entre reticulação e oxidação (degradação) do sistema, o aumento da concentração polimérica é importante, para que o ambiente, no caso a solução polimérica, consuma o máximo da quantidade de radicais $HO^\bullet$ produzidos na forma de reticulação entre as cadeias, ao invés da oxidação do sistema.

Figura 5.4: Análise do tamanho de poro (A) pH 2,5 e (B) pH 7,0.

Conforme a figura 5.4, e de acordo com as tabelas 5.6 e 5.7, o tamanho de poro tem alta dependência na interação das três variáveis $[PVP]$, valor de pH e $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$. A região onde são encontrados os maiores valores de tamanho de poro coincidem com os menores valores de densidade de reticulação e também com os maiores valores de grau de intumescimento. Para pH 2,5, a $[PVP]$ não

influencia no resultado, porém é a região onde se encontra a menor razão $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$. Em pH 7,0, região de maiores valores de tamanho de poro, são encontrados as menores [PVP] e menor razão de $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$.

A razão $[\text{H}_2\text{O}_2]/[\text{Fe}^{2+}]$ demonstrou ser o fator mais importante em relação à estrutura do hidrogel, pois como mencionado anteriormente, este é o fator responsável pela produção de $\text{HO}^\bullet$, que por sua vez leva à formação de ligações cruzadas. Se a concentração polimérica for suficiente para que a reticulação seja mais eficiente que a degradação do polímero, então, menores serão os poros da rede tridimensional de PVP, e menor será o conteúdo de água que a rede poderá absorver.

Os resultados encontrados para pH 2,5 e a pH 7,0 em algumas variáveis são diferentes, devido a diferenças na cinética de reticulação em cada caso.

5.1.2. Estudo da velocidade de formação dos hidrogéis produzidos via Fenton

As reações de reticulação via reação de Fenton ocorrem por meio de produção de radicais hidroxilas formados pela oxidação de sais ferrosos em presença de peróxido de hidrogênio. Radicais hidroxilas ($\text{HO}^\bullet$) na presença de PVP podem gerar macrorradicais a partir da abstração de hidrogênio de três distintas posições. Na figura 5.5 são apresentados os possíveis radicais formados, levando em consideração a estabilidade dos mesmos.

Figura 5.5: Prováveis radicais formados pela presença de radicais hidroxilas obtidos pela reação de Fenton⁸⁴.

A velocidade de abstração é dependente da energia de dissociação da ligação X-H para a formação do radical. Cálculos termodinâmicos demonstram que ligações C-H α -posicionados a um heteroátomo ou um grupo carbonila, possuem menor energia, principalmente devido à estabilização do radical nestas posições (tabela 5.8).

A partir da análise dos calores de formação de compostos incorporando diferentes grupos funcionais aos fragmentos radicalares, é possível encontrar a energia correspondente à estabilização do fragmento radicalar. Esta energia reflete a estabilização do centro radicalar no ambiente estrutural.

Tabela 5.8: Energias de ligação das ligações C-H⁸⁵.

Tipo de Ligação	Energia de Ligação (kcal/mol)
$\text{H}_3\text{C}-\text{H}$	104
101
94,5
92
91

Quando soluções de PVP contendo peróxido são misturadas a uma outra solução de PVP contendo cloreto de ferro (II), um gel consistente é obtido instantaneamente. Muitas foram as tentativas em se estudar a cinética de gelificação, porém praticamente todas foram frustradas. A razão é que a velocidade de reticulação é muito mais rápida que a difusão dos reagentes, gerando uma interface de viscosidade crescente entre as duas soluções.

A técnica de fluxo poderia fornecer a cinética inicial de reticulação, porém, devido ao rápido aumento de viscosidade na interface das duas soluções de PVP, esta técnica foi descartada.

Com o auxílio da técnica de reometria rotacional, foi analisado o perfil da cinética aparente de reticulação. A figura 5.6 representa uma curva típica de viscosidade dinâmica em função do tempo apresentada pelos hidrogéis de PVP por reação de Fenton. O ponto inicial é referente à solução de PVP não reticulada, após 60 segundos é iniciada a reação, obtendo um hidrogel em poucos minutos com uma viscosidade 25 vezes maior que o da solução inicial.

Figura 5.6: Gráfico representativo da análise da viscosidade dinâmica para o hidrogel de PVP produzido por reação de Fenton. [PVP]= 80g.L⁻¹; [Fe²⁺]= 5mM e [H₂O₂]= 50mM em pH 2,5 (tampão acetato 0,1M), obtido a 25°C.

O hidrogel de PVP apresenta duas fases de cinética distintas, onde na primeira fase, instantânea, há um aumento brusco da viscosidade, e que não pode ser monitorado pela técnica utilizada. A segunda fase, lenta, representa o tempo total necessário para que a reação cesse.

5.1.3. Avaliação da citotoxicidade do hidrogel produzido via reação de Fenton

As análises de citotoxicidade *in vitro* por método de difusão em ágar feitas no Instituto Adolf Lutz (Anexo I), identificou que a amostra de hidrogel testada não apresentou nenhum efeito tóxico, sob e ao redor da amostra para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCCL-1)^{86, 87}.

Foi analisada também a porcentagem relativa da viabilidade celular das membranas de hidrogel obtidas a partir da reação de Fenton, representada na Figura 5.7. O índice de citotoxicidade (IC-50%) é representado pelo extrato que danifica a metade da população celular.

Figura 5.7: Curva de supressão de colônias. Ensaio de citotoxicidade do hidrogel via reação de Fenton.

O controle negativo PVC não produz efeito citotóxico; e o controle positivo, solução de 0,02% de fenol apresenta efeito citotóxico de maneira reprodutível. O

índice de citotoxicidade, IC50(%), indica a concentração do extrato necessário para matar metade da população celular. Como representado na Figura 5.7, as membranas de hidrogel são consideradas estéreis, pois não apresentam efeitos citotóxicos nem em altas concentrações do extrato do material de hidrogel.

Para teste *in vivo* na análise de irritação dérmica primária^{88, 89, 90}, as amostras apresentaram resultados satisfatórios, ou seja, não irritante (Anexo II).

5.1.4. Cálculo do tamanho de poro

A determinação da distribuição do tamanho de poro em hidrogéis pode ser realizada por diferentes técnicas amplamente utilizadas⁹¹, entre elas:

- (a) Medidas de intumescimento;
- (b) Porosimetria por intrusão de mercúrio;
- (c) Medidas de BET (Brunauer, Emmett e Teller);
- (d) Microscopia eletrônica;

Neste trabalho foram feitas avaliações do tamanho de poro a partir de três técnicas diferentes: (1) utilizando o tratamento de Flory –Rehner para propriedade de intumescimento, (2) por Reologia Oscilatória, e (3) por MEV.

A equação de Flory-Rehner descreve aproximadamente o comportamento de intumescimento dos hidrogéis a partir de modelos termodinâmicos não ideais. A tabela 5.9 mostra valores de tamanho de poro calculados por esta técnica, de acordo com a eq. 3.14. Para comparação, estão apresentados os valores de tamanho de poro calculados por reologia e microscopia eletrônica de varredura.

Tabela 5.9: Valores de tamanho de poro da rede polimérica (ξ) (nm) obtidos por três diferentes técnicas:

		Flory-Rehner (nm)	Reologia (nm)	MEV (μm)
[Fe ²⁺] (mM)	5	7,7 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 3
	7,5	-	35,5 $\pm$ 0,4	7 $\pm$ 4
	10	-	38,6 $\pm$ 0,5	7 $\pm$ 3
[H ₂ O ₂](mM)	10	6,7 $\pm$ 0,2	36,9 $\pm$ 0,6	6 $\pm$ 3
	50	7,7 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 3
	100	7,3 $\pm$ 0,8	32,7 $\pm$ 0,5	5 $\pm$ 2
[PVP] (g.L ⁻¹)	80	7,7 $\pm$ 0,1	34,6 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 3
	120	6,0 $\pm$ 0,1	30,0 $\pm$ 0,4	6 $\pm$ 3
	200	6,8 $\pm$ 0,1	27,2 $\pm$ 0,6	6 $\pm$ 2

Ao se analisar a estrutura de rede polimérica, técnicas reológicas podem oferecer uma caracterização quantitativa das propriedades viscoelásticas de uma determinada substância sob condições pré-definidas,

Para encontrar a região viscoelástica, foi utilizado o método dinâmico oscilatório (DSST), o qual analisou a variação da deformação (γ) ao submeter uma frequência angular (ω) oscilatória. Na figura 5.8 estão representados curvas típicas dos hidrogéis de PVP produzidos via reação de Fenton, onde a curva (1) em vermelho representa a variação de baixo para altos valores de frequência angular e na curva (2) está representada a variação a partir de altos para baixos valores de frequência angular.

Figura 5.8: Esboço de uma curva típica obtida pelos hidrogéis de PVP para a obtenção da região viscoelástica, sob temperatura de 25°C.

Encontrada a região viscoelástica (deformação de 1 a 10%), os ensaios são realizados variando a frequência angular (ω) de forma a obter uma região linear de G' a partir das medidas oscilatórias. Esta região linear referente ao módulo elástico fornece informações a respeito dos parâmetros de rede.

Na figura 5.9 está representado o ensaio de obtenção do módulo elástico para os hidrogéis produzidos pela variação da concentração de íons ferrosos.

Figura 5.9: Comportamento do módulo elástico (G') com variação da frequência angular (ω) em função da concentração de Fe^{2+} , para hidrogéis de $[\text{PVP}] = 80 \text{ g.L}^{-1}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ produzidos por reação de Fenton, à 25°C .

Na figura 5.10 está representado o ensaio de obtenção do módulo elástico para os hidrogéis produzidos pela variação da concentração de peróxido.

Figura 5.10: Comportamento do módulo elástico (G') com variação da frequência angular (ω) em função da concentração de H_2O_2 , para hidrogéis de $[PVP] = 80 \text{ g.L}^{-1}$ e $[Fe^{2+}] = 5\text{mM}$ produzidos por reação de Fenton, à 25°C .

Na figura 5.11 está representado o ensaio de obtenção do módulo elástico para os hidrogéis produzidos pela variação da concentração de polímero.

Figura 5.11: Comportamento do módulo elástico (G') com variação da frequência angular (ω) em função da concentração de PVP, para hidrogéis de $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$ e $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ produzidos por reação de Fenton, à 25°C .

Uma curva oscilatória ideal em um determinado intervalo de frequência angular mostra uma região de platô referente à elasticidade do hidrogel. Em todos os ensaios (figuras de 5.9 a 5.11) esta região foi encontrada no intervalo de de 0,1 a 1 rad.s^{-1} . A partir dos valores de G' obtidos na região viscoelástica e aplicando as equações (eqs. 3.17 a 3.19), é possível calcular alguns parâmetros de rede, os quais estão demonstrados na tabela 5.10.

Tabela 5.10: Parâmetro de rede para os hidrogéis examinados, calculados a partir dos valores do módulo elástico (G') da região de frequência angular (ω) 0,1-1 rad.s⁻¹.

		$\overline{M}_c$ (g.mol ⁻¹)/10 ⁻⁷	ρ_x (m ⁻³)/10 ⁻²²	ξ (nm)
(a) [Fe ²⁺]	5	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	34,6 ± 0,2
	7,5	2,7 ± 0,1	2,2 ± 0,1	35,5 ± 0,4
	10	3,5 ± 0,1	1,8 ± 0,1	38,6 ± 0,5
(b) [H ₂ O ₂]	10	3,0 ± 0,1	2,0 ± 0,1	36,9 ± 0,6
	50	2,5 ± 0,5	2,4 ± 0,1	34,6 ± 0,2
	100	2,1 ± 0,1	2,9 ± 0,1	32,7 ± 0,5
(c) [PVP]	80	2,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	34,6 ± 0,2
	120	2,2 ± 0,1	2,8 ± 0,1	30,0 ± 0,4
	200	1,2 ± 0,1	5,0 ± 0,3	27,2 ± 0,6

a) [PVP] = 80g.L⁻¹ e [H₂O₂] = 50mM. b) [PVP] = 80g.L⁻¹ e [Fe²⁺] = 5mM. c) [Fe²⁺] = 5mM e [H₂O₂] = 50mM.

Pode-se, portanto, observar que, tanto através da técnica de determinação do tamanho de poro por intumescimento quanto por reologia, obtem-se valores de tamanho de poros da ordem de dezenas de nanômetros. Claramente, estes dados referem-se a um espaço molecular, ou seja, a “vazios” intermoleculares, formados por distâncias entre as macromoléculas, em um estado de estiramento criado pelo intumescimento parcial do gel. Estes nanoporos permitem a percolação relativamente rápida de moléculas de tamanho pequeno a médio, e possibilita a utilização destes hidrogéis como dispositivos de liberação controlada de drogas. A proximidade entre os valores obtidos pelas duas técnicas favorecem uma confiabilidade aos dados obtidos.

Por microscopia eletrônica de varredura (MEV) também é possível analisar estrutura de poros em hidrogéis. As análises de tamanho de poro para hidrogéis de PVP estão representadas nas figuras de 5.12 a 5.18.

Figura 5.12: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. $[PVP] = 80\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 10\text{mM}$ obtidos à 25°C .

Figura 5.13: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. $[PVP] = 80\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ obtidos à 25°C .

Figura 5.14: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. $[PVP] = 80\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 100\text{mM}$ obtidos à 25°C .

Figura 5.15: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. $[PVP] = 80\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Fe}^{2+}] = 7,5\text{mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ obtidos à 25°C .

Figura 5.16: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. [PVP] = 80g.L⁻¹; [Fe²⁺]=10mM, [H₂O₂] = 50mM obtidos à 25°C.

Figura 5.17: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. [PVP] = 120g.L⁻¹; [Fe²⁺]=5mM, [H₂O₂] = 50mM obtidos à 25°C.

Figura 5.18: Micrografia (MEV) do hidrogel de PVP. $[PVP] = 200\text{g.L}^{-1}$; $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ obtidos à 25°C .

A partir das microscopias, é possível perceber a presença de poros de escala micrométrica. A presença destes microporos pode ser explicada pelo fato de que em polímeros reticulados na presença de solventes, pode haver mudança dos parâmetros de interação polímero-solvente à medida que o polímero sofre reticulação⁹².

A mudança no parâmetro de interação modifica a tendência do material em absorver o solvente do meio, apresentando um processo de sinerese (expulsão da água, decorrente da aproximação das moléculas devido à formação de gel e redução de volume); porém, este processo é lento, visto a baixa velocidade de relaxação das cadeias poliméricas⁹³. Parte do solvente “excedente” (solvente expulso) é separado no interior do gel na forma de gotas, acarretando em uma deformação local da rede. Esta deformação, contudo, é responsável pela formação

de microporos, visto que na separação de fase parte do solvente passa da fase gel para a fase líquida aumentando o raio da gota.

Nota-se, porém, que a morfologia observada não garante uma completa interligação entre os poros, sugerindo que a percolação de partículas maiores (de tamanho micrométrico) através de todo o gel não seja possível. Por outro lado, esta “microporosidade” pode ser uma vantagem na liberação de partículas menores, visto o grande aumento de área específica do material em contato com o meio externo.

5.1.5. Determinação de água na estrutura do hidrogel

O estado da água foi analisado no hidrogel de PVP obtido via reação de Fenton. A natureza e a quantidade de diferentes tipos de água nos polímeros dependem dos métodos experimentais usados e outros fatores tais como: intumescimento; temperatura, densidade de reticulação e assim por diante.

Foram utilizadas três técnicas diferentes para determinar os diferentes tipos de água: Infravermelho-ATR, DSC e TG. A técnica mais amplamente utilizada é o DSC, o qual fornece informações sobre os estados da água incorporada dentro da rede polimérica.

5.1.5.1. Espectroscopia no Infravermelho

É conhecido que a ligação de hidrogênio existente na água pura é diferente das ligações de hidrogênio na cadeia polimérica, e que a molécula de água isolada

possui três diferentes modos vibracionais: modos de estiramento simétrico e assimétrico e modo de deformação. Devido às interações intermoleculares o espectro da água é, entretanto, bem mais complexo⁹⁴. Mudanças na frequência, na intensidade e perfil do espectro no infravermelho, podem ser usados para interpretar a atividade molecular das águas de fronteira e livre.

Na região no infravermelho de $3800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ (banda da água) há três componentes⁹⁴: onde a de comprimento de onda menor é relativo ao *overtone* da deformação angular, que é aumentada pela ressonância de Fermi juntamente com o estiramento em $\sim 3450\text{ cm}^{-1}$, segunda componente e, a terceira componente é referente ao estiramento em $\sim 3600\text{ cm}^{-1}$. Esta região do infravermelho é atribuída ao modo de estiramento OH (ν_{OH}), e foi selecionada para a investigação dos tipos de água presentes na rede do hidrogel de PVP via reação de Fenton. Observa-se na figura 5.19 o perfil dos espectros no Infravermelho a partir de filmes de hidrogel de PVP em diferentes níveis de umidade relativa, na medida em que o retículo polimérico absorve água, a banda de estiramento OH vai se tornando mais simétrica.

Figura 5.19: Espectro no Infravermelho-ATR na região de 4000-2500 cm^{-1} para filmes do hidrogel de PVP via reação de Fenton em diferentes umidades relativas, obtidos a temperatura ambiente com resolução de 2 cm^{-1} . [PVP] = 80 g.L^{-1} , [H_2O_2] = 50mM, [Fe^{2+}] = 5mM e pH=7,0.

É geralmente aceito que a banda de estiramento OH referente à 3257 cm^{-1} é atribuída as moléculas de água que apresentam ligação de hidrogênio mais forte⁹⁵, ou seja, as moléculas que estão mais fortemente ligadas às frações polares do retículo polimérico. Com isso pode-se dizer que a proporção da água de fronteira é maior no hidrogel com conteúdos de água mais baixos.

Nas amostras de hidrogel com maior conteúdo de água, a banda de estiramento OH se desloca para frequências mais altas (3393 cm^{-1}); isto implica dizer que as ligações de hidrogênio entre a água livre e as porções polares da cadeia polimérica são mais fracas devido a intercalação com a água de fronteira.

Ping e colaboradores⁹⁵ na investigação dos estados da água em alguns polímeros hidrofílicos mencionam que o número médio de moléculas de água por C=O do grupamento amida é de 4,2 e que cada grupo C=O pode estar diretamente

ligado a apenas duas moléculas de água via ligação de hidrogênio. Este alto número de moléculas de água indica que a interação do grupo C=O com a água é suficientemente alta para manter as moléculas de água na segunda camada de absorção em águas de fronteira.

5.1.5.2. Calorimetria Exploratória Diferencial

Em termogramas de DSC, a água livre é representada pelo pico de fusão endotérmico em aproximadamente 0°C. Os dois tipos de água, livre e de fronteira, foram determinados por DSC (figura 5.20), e as quantidades relativas foram calculadas a partir das eqs. 3.15 e 3.16. Na tabela 5.9 são encontrados os valores de água livre e água de fronteira para uma amostra de hidrogel de PVP via reação de Fenton.

Figura 5.20: Termogramas de DSC da amostra intumescida do hidrogéis de PVP obtido por reação de Fenton. (A.1) A curva de cristalização da água (esfriamento) e (A.2) a curva de fusão da água (aquecimento). (B) Curva de fusão da água (aquecimento) ampliada. [PVP]= 80 g.L⁻¹, [Fe²⁺]= 5mM, [H₂O₂]= 50mM e pH = 7,0.

Tabela 5.11: Valores de calor de fusão e quantidade de água livre e água de fronteira no hidrogel de PVP produzido por Fenton.

Tipo de água	% Massa	ΔH (J/g)
Água Livre	82	275,6
Água de fronteira	10	-

[PVP]= 80 g.L⁻¹, [Fe²⁺]= 5mM, [H₂O₂]= 50mM e pH = 7,0.

Embora na figura 5.20B não tenha sido possível detectar o pico referente a água de fronteira, os cálculos obtidos a partir das eqs. 3.15 e 3.16 informam que há pelo menos 10% de água de fronteira.

5.1.5.3. Termogravimetria

Para detectar o conteúdo de água de fronteira em hidrogéis secos de PVP via reação de Fenton, foram feitas análises dos termogramas de TG de amostras de hidrogel que foram secas por três diferentes métodos (estufa, estufa a vácuo e liofilizada); os termogramas, porém, apresentaram praticamente o mesmo perfil em relação à detecção da água. Na figura 5.21 está representado o termograma para amostra do hidrogel seco em estufa a vácuo a 60 °C.

Figura 5.21: Termograma para amostras de hidrogel de PVP seco em estufa a vácuo, obtido sob atmosfera inerte (vazão de gás 50mL/min) e razão de aquecimento 10°C/min em suporte de platina. (A) Termograma completo e (B) Região de perda de água ampliada. [PVP]= 80 g.L⁻¹, [H₂O₂]= 50mM, [Fe²⁺]=5mM e pH= 7,0.

Pela figura 5.21A, é possível notar dois picos de derivada, sendo o primeiro referente à desidratação do polímero, ou seja, perda da água de fronteira (próximo a 100°C); o segundo, representando a decomposição do hidrogel (próximo a 400°C).

O conteúdo de água de fronteira representado pela figura 5.21B é equivalente a pelo menos 15% da massa total da amostra.

Ao analisar os estados (tipos) da água em amostras de hidrogel intumescido no termograma representado pela figura 5.22, não é possível, porém, diferenciar os “tipos” de água presentes no hidrogel intumescido, visto que a figura é representada apenas por um pico de derivada intenso referente à desidratação do polímero; esta água, contudo, é atribuída ao estado de água livre no hidrogel.

Figura 5.22: Termograma para amostra intumescida de hidrogel do PVP, obtido sob atmosfera inerte (vazão de gás 50mL/min) e razão de aquecimento 10°C/min em suporte de platina. [PVP]= 80 g.L⁻¹, [H₂O₂]= 50mM, [Fe²⁺]=5mM e pH= 7,0.

5.1.6. Adição de sais

Polímeros solúveis em água são conhecidos por apresentarem associações complexas em soluções aquosas. A adição de diferentes tipos de aditivos orgânicos e inorgânicos pode mudar a associação molecular existente entre o polímero e as

moléculas do solvente. Estudos com a adição de sais inorgânicos mostraram influenciar a dinâmica e as propriedades termodinâmicas de polímeros como PEO^{96,97} e PVP^{98, 99, 100}. As propriedades afetadas mostraram ser dependentes da natureza do sal, da concentração e da temperatura.

Alguns trabalhos mostram que as propriedades de intumescimento de hidrogéis na presença de sais inorgânicos podem ser drasticamente modificadas. Hidrogéis de PVP apresentam uma tendência à desidratação na presença de cátions de baixa densidade de carga e a uma maior hidratação na presença de cátions de alta densidade de carga^{101, 102, 103}.

Sais inorgânicos em meio aquoso mudam a estrutura física da água e baseado neste conceito é que se têm estudado extensivamente os efeitos dos sais em soluções poliméricas¹⁰⁴. Acredita-se que a presença dos sais inorgânicos aumente os poros dos hidrogéis no processo de reticulação, devido à solvatação destes íons com o solvente.

A figura 5.23a mostra como a presença de sais na síntese de hidrogéis modifica drasticamente as propriedades dos mesmos. Em todos os casos, observou-se uma diminuição na porcentagem de gel em relação ao hidrogel obtidos na ausência de sais.

Figura 5.23: Análise de porcentagem de gel (A) e porcentagem de intumescimento (B) para os hidrogéis de Fenton produzidos na presença de sais inorgânicos. $[PVP]=80\text{g.L}^{-1}$, $[H_2O_2]=50\text{mM}$, $[Fe^{2+}]=5\text{mM}$ e pH 7,0.

Os íons da série de Hofmeister têm a propriedade de modificar as ligações naturais da estrutura da água com uma ordenação diferente ao redor de cada íon. Os íons menos hidratados, ou caotrópicos, diminuem a ordem da estrutura da água, enquanto os íons cosmotrópicos aumentam a estruturação da água ao seu redor.

Em relação ao raio dos íons adicionados, a figura 5.23B mostra que a presença de sais aumenta a quantidade de água absorvida no retículo polimérico em relação ao intumescimento obtido na ausência dos mesmos, e que a presença de NaCl aumenta mais a estruturação da água, ou seja, aumenta a absorção de água pelo retículo polimérico. Isto se deve não só a presença de íons Cl^- , que possui um raio iônico maior do que o dos íons F^- , mas também porque o raio do Na^+ é maior que o raio do Li^+ (tabela 5.12). Segundo Jiang e colaboradores¹⁰⁵, a espectroscopia Raman mostrou que número de ligações de hidrogênio ao redor de íons haletos aumenta com o aumento do raio iônico.

Tabela 5.12: Raio iônico e densidade de carga superficial ($\sigma = ze/4\pi r^2$) de alguns íons, onde z é o número de cargas, e é a carga do elétron e r é o raio iônico¹⁰⁶.

Íon	Raio iônico (Å)	Densidade de carga superficial (σ)(mC/m ²)
Cl ⁻	1,84	-378
F ⁻	1,33	-721
Na ⁺	1,02	1225
Li ⁺	0,76	2207

$e = -1,602.10^{-19}C$

Em relação ao tamanho médio de poro (figura 5.24), nota-se que a presença de sais é responsável por um aumento do poro na estrutura dos hidrogéis, como mencionado anteriormente, e que assim como no comportamento do grau de intumescimento, o tamanho destes poros está diretamente relacionado ao raio iônico destes sais.

Figura 5.24: Análise de tamanho de poro (ξ) dos hidrogéis de PVP produzidos na presença de sais inorgânicos.

5.1.7. Estudo dos complexos

A estrutura química do PVP sugere uma habilidade em formar complexos em pH ácido¹⁰⁷. Liu e colaboradores afirmam que o PVP é um homopolímero que coordena fracamente com cátions metálicos, tais como: Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} e outros, devido à ligação de coordenação entre o oxigênio da carbonila ou o nitrogênio no anel lactâmico¹⁰⁸ com os íons metálicos. Maturama e colaboradores¹⁰⁹ estudaram o PVP como agente extrator de cátions metálicos como Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Cr^{3+} e Fe^{3+} . Ao estudar a química do PVP, Tokman e colaboradores¹¹⁰ pré-concentraram Co^{2+} , Ni^{2+} com soluções aquosas de PVP pela técnica de precipitação e, assim como Liu¹⁰⁸, concluíram que é formada uma ligação coordenativa destes metais com o oxigênio e nitrogênio devido a alta polaridade do anel lactâmico.

A metodologia de reticulação de PVP via reação de Fenton utiliza Fe^{2+} e peróxido de hidrogênio, produzindo Fe^{3+} a partir de um processo de oxidação. O Fe^{3+} obtido como produto complexa-se com o PVP, produzindo uma coloração marrom¹¹¹, efeito ausente no gel reticulado por outras vias (UV, radiação γ , etc) em razão da ausência de íons ferro.

A ligação de coordenação entre PVP e Fe^{3+} foi estudada em etanol absoluto, água e água deuterada (D_2O) a 25°C. Abordamos a formação de um complexo instável entre Fe^{3+} e PVP através de espectroscopia vibracional (IV e Raman) e espectroscopia no UV-Visível.

O complexo PVP- Fe^{3+} foi obtido a partir da precipitação de 10mL de uma solução de PVP-K90 1M em etanol absoluto com 7mL de uma solução etanólica 0,15M de Fe^{3+} . O precipitado foi lavado com acetona e seco na estufa e os espectros foram analisados. Na condição que foram produzidos, segundo Liu e

colaboradores¹⁰⁸, a razão molar entre o número de unidades de vinilpirrolidona por cátion metálico para o complexo PVP-Fe³⁺ é 6:1.

Wuepper e colaboradores¹¹² reportaram que o deslocamento da banda da carbonila ($\nu_{C=O}$) no espectro de 2-pirrolidona na presença de íons metálicos alcalinos é devida à ligação coordenativa entre o oxigênio da carbonila da 2-pirrolidona e os íons metálicos. Ao analisar os espectros no infravermelho para o complexo seco de PVP-Fe³⁺ (figura 5.25), nota-se um deslocamento hipsocrômico da banda de carbonila do anel pirrolidínico, em relação ao espectro do PVP. Este deslocamento pode ser atribuído à ligação coordenativa ($C=O \cdots Fe^{3+}$), tornando o pico mais assimétrico.

Figura 5.25: Espectro no Infravermelho em KBr para (a) PVP K90 ($\overline{M}_w = 360.000$), (b) complexo PVP K90-Fe³⁺ e (c) complexo PVP K16-Fe³⁺ secos e obtidos a 25°C.

Biedermann e Graf¹¹³ afirmam que o ferro forma um complexo de coordenação pentavalente com a carbonila do PVP cuja composição bruta pode ser representada

da seguinte forma $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_9\text{NO})_5]_n$. A interação entre os íons ferro e a carbonila é devido à transferência do par de elétrons disponíveis no nitrogênio para os cátions metálicos afetando a polarizabilidade da vizinhança do átomo de oxigênio na carbonila (figura 5.26).

Figura 5.26: Estruturas mesoméricas presentes no PVP¹¹⁴.

Em adição a esta interação, Liu e colaboradores¹⁰⁹ mencionam uma possível doação do par e elétrons do oxigênio da carbonila para os cátions metálicos.

A espectroscopia no UV-Vis é outro método conveniente de investigação de compostos de coordenação. Na figura 5.27 são mostrados os complexos PVP-Fe^{2+} e PVP-Fe^{3+} em soluções aquosas.

Figura 5.27: Espectros no UV-Vis para soluções aquosas de PVP, PVP-Fe²⁺ e PVP-Fe³⁺ obtidos à 25°C. [PVP]= 80 g.L⁻¹, [Fe²⁺]= 5mM e [Fe³⁺]= 5mM.

A partir dos espectros representados na figura 5.27 nota-se que, para o complexo PVP-Fe³⁺, é encontrada uma absorção máxima em torno de 300nm. Contudo, não é possível encontrar uma região de absorção máxima para complexo PVP-Fe²⁺.

Em soluções aquosas, todos os íons metálicos estão presentes sob a forma de íons hidratados que são, por sua vez, na maioria dos casos, compostos de coordenação bem definidos. Os íons Fe²⁺ e Fe³⁺, neste caso, se encontram na forma dos aquo-complexos [Fe(H₂O)₆]²⁺ e [Fe(H₂O)₆]³⁺, respectivamente. Porém, a oxidação do [Fe(H₂O)₆]²⁺ a [Fe(H₂O)₆]³⁺ pode ser efetivada simplesmente pelo oxigênio do ar, efeito explicado a partir do diagrama de óxido-redução de Latimer (figura 5.28).

Figura 5.28: Diagrama de potencial de oxidação de Latimer.

Tendo-se conhecimento a respeito da formação do complexo de PVP e ferro, foram analisados, por espectroscopia Raman, os complexos presentes nos hidrogéis de PVP via reação de Fenton. Amostras de hidrogéis liofilizados foram analisadas na presença e na ausência de Fe^{3+} (figura 5.29).

Figura 5.29: Espectros Raman dos hidrogéis liofilizados de PVP excitado em 1064nm, obtidos por (A) UV [PVP]= 80 g.L⁻¹, e (B) reação de Fenton, onde [PVP]= 80 g.L⁻¹, [H₂O₂] = 50mM e [Fe²⁺]= 5mM em pH 7,0 à 25°C.

Assim como na análise no infravermelho para os complexos de PVP (figura 5.25), as amostras do hidrogel liofilizado de PVP na presença de ferro (reação de Fenton) apresentam um deslocamento da banda da carbonila para frequências mais baixas ($\nu_{\text{C=O}} = 1667\text{cm}^{-1}$) em relação aos hidrogéis liofilizados de PVP produzidos

via UV ($\nu_{\text{C=O}} = 1670\text{cm}^{-1}$) (figura 5.29), indicando a formação da ligação de coordenação entre a carbonila do PVP e o Fe^{3+} .

Foram analisados também os espectros Raman dos hidrogéis de PVP intumescidos em D_2O (figura 5.30). Substituiu-se H_2O por D_2O em virtude da coincidência da frequência da banda de estiramento de C=O com a banda de deformação angular da água.

Figura 5.30: Espectros Raman dos hidrogéis de PVP intumescido em D_2O excitado em 1064nm. (A) hidrogéis produzidos por reação de Fenton, onde $[\text{PVP}] = 80\text{ g.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$ em pH 7,0, e (B) hidrogéis produzidos por UV com $[\text{PVP}] = 80\text{ g.L}^{-1}$, obtidos à 25°C .

O espectro Raman obtido para o hidrogel de PVP produzido via reação de Fenton e intumescido em D_2O (figura 5.30) não indica a formação de ligação coordenativa entre o Fe^{3+} e a carbonila do PVP, pois não há variação na banda da carbonila ($\nu_{\text{C=O}} 1648\text{ cm}^{-1}$). Isto acontece porque o número de moléculas de D_2O coordenando com a carbonila do PVP é maior que o de Fe^{3+} .

Além disso, nota-se que, em relação ao espectro do hidrogel liofilizado, houve um deslocamento para campo mais alto de 22cm^{-1} para o hidrogel via UV e de 19cm^{-1} para o hidrogel via reação de Fenton. Mesmo em amostras secas, verifica-se a presença de água denominada *água de fronteira* e, ao comparar as forças de ligação de hidrogênio entre as moléculas de H_2O e D_2O com a carbonila, é esperado frequência de vibração da ligação (ν) maior para H_2O em relação a D_2O . Essa relação, juntamente com a energia potencial, faz com que, em amostras intumescidas com D_2O , a absorção máxima da carbonila se desloque para campo mais alto. (Anexo IV)

Na figura 5.31 são comparados os espectros Raman para os complexos secos de PVP-Fe^{3+} obtido a partir de soluções etanólicas e do PVP-Fe^{3+} nos hidrogéis via Fenton.

Figura 5.31: Espectros Raman dos complexos PVP-Fe^{3+} excitados em 1064nm , obtidos a 25°C . (A) Complexo no hidrogel liofilizado produzido por reação de Fenton, onde $[\text{PVP}] = 80\text{ g.L}^{-1}$, $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\text{mM}$ e $[\text{Fe}^{2+}] = 5\text{mM}$ em $\text{pH } 7,0$, e (B) complexo produzido a partir de soluções etanólicas de PVP e Fe^{3+} .

A partir da figura 5.31, em virtude do alargamento da banda da carbonila na região entre 1500 e 1750cm⁻¹, observa-se que a coordenação entre o PVP e o íon férrico é mais pronunciada no complexo PVP-Fe³⁺ obtido a partir de soluções etanólicas, cuja razão Fe³⁺: PVP é maior (6:1), em relação ao complexo no hidrogel seco (1:14). O espectro Raman para o complexo PVP-Fe³⁺ obtido a partir de soluções etanólicas indica um alargamento da $\nu_{C=O}$ (~1580 cm⁻¹), em relação ao complexo de amostras do hidrogel onde tal efeito não é observado.

Em soluções aquosas, a água atua como ligante monodentado, com apenas um átomo doador de elétrons, o oxigênio. Já os resíduos de vinilpirrolidona da PVP, atuam como ligante multidentado, pois, como mencionado anteriormente, os íons metálicos podem se coordenar com o oxigênio da carbonila e/ou com o nitrogênio do anel lactâmico (pirrolidínico).

Os ligantes "coordenados" e os ligantes "livres" se permutam constantemente dentro e fora da esfera de coordenação do complexo. E a estabilidade destes compostos de coordenação depende que sua energia livre de formação a partir dos elementos ($\Delta G^{\circ}_{\text{form}}$) seja negativa, ou seja, a estabilidade de um complexo está relacionada à espontaneidade em certas condições.

Os ligantes (água e PVP) são moléculas termodinamicamente estáveis, então, usa-se como critério de estabilidade de um complexo a variação de energia livre da reação:

Em soluções aquosas, íons metálicos existem sob a forma hidratada e o número de moléculas de água de coordenação com um íon metálico depende

principalmente do tamanho e do estado de oxidação; no caso do Fe^{3+} o número de coordenação é 6 $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$ (íon hexaquoferro(III)).

A formação do aquo-complexo a partir do complexo PVP- Fe^{3+} depende essencialmente da substituição das moléculas do ligante (L) coordenadas ao íon metálico (M) por moléculas de água, eq. 5.4:

A estabilidade dos complexos em solução aquosa, obtida pela substituição dos ligantes coordenados (no caso o PVP) por moléculas de água, é indicada através da constante de equilíbrio da reação de formação (K) e do seu ΔG relacionados pela eq. 5.5¹¹⁵:

$$\text{Eq. 5.5} \quad \Delta G^\circ = -2,303RT \log K$$

Como a concentração da água é praticamente constante ($\sim 55,5 \text{ mol.L}^{-1}$), a tendência de um complexo PVP- Fe^{3+} , representado como $[\text{FeL}_y]^{3+}$, ser formado em solução aquosa a partir do Fe^{3+} (hidratado) e dos resíduos pirrolidínicos da PVP (L) (hidratados) é expressa pelo valor numérico da constante de equilíbrio, K, da reação de formação:

onde y é o número de coordenação. Quanto maior for o valor de K , maior será a tendência do composto a se formar e menor a sua tendência a se dissociar, isto é, maior a estabilidade do complexo.

Esperava-se observar a formação do complexo de coordenação PVP-Fe³⁺, contudo, devido à baixa relação de [Fe³⁺] e [PVP], não foi possível a detecção da ligação coordenativa.

5.2. Métodos alternativos de reticulação química do poli(N-vinil-2-pirrolidona)

Hidrogéis apresentam inúmeras aplicações nas áreas médica e farmacêutica e, muitas vezes, são produzidos a partir da polimerização com o uso de monômeros multifuncionais. Contudo, algumas formas monoméricas residuais são tóxicas, o que diminui a chance desta classe de material ser usada na área de biomateriais. Uma maneira de contornar esta toxicidade é sua produção a partir do polímero pronto.

A literatura indica que o PVP pode ser reticulado por radiação UV e radiação γ . Como metodologia alternativa, estudamos a reticulação do PVP via reação de Fenton; porém, para reticulações *in situ*, esta metodologia não é apropriada devido à formação de subprodutos altamente oxidantes, o que levaria à morte celular.

Na intenção de realizar reticulações químicas mais brandas para a produção de hidrogéis de PVP que pudessem ser reticulados *in situ*, e que possam ser aplicados em sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos, curativos e etc, foram sintetizados três copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona contendo grupos reativos diferentes.

5.2.1. Produção e Composição Química dos copolímeros

O interesse em introduzir monômeros reativos na estrutura de PVP nos levou a produzir copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona e três diferentes comonômeros: acroleína (AC), acetato de vinila (VAC) e metacrilato de metila (MMA). Estes copolímeros foram produzidos por adição radicalar, utilizando-se azo-isobutironitrila (AIBN) como iniciador.

A massa molar final em qualquer polimerização por adição é dependente da razão [iniciador]:[monômero]. Na copolimerização de VP e MMA, nas proporções de 1 mol de monômero total para concentrações de iniciador de 0,05 a 0,15 mol foram utilizadas como reações teste para determinar a quantidade de iniciador a ser utilizada. A figura 5.32 mostra três relações [iniciador]:[monômero total] distintas.

Figura 5.32: Análise da massa molar do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila) em função da [iniciador]:[monômero], realizado por osmometria de membrana, a partir de quatro soluções poliméricas de diferentes concentrações, experimento realizado em etanol a 25°C.

Segundo a figura 5.32, os valores de massa molar numérica média ($\overline{M}_n$) são maiores quando se utiliza menores concentrações de AIBN, tal como esperado. Portanto, os copolímeros sintetizados neste trabalho foram obtidos a partir da razão molar [iniciador]:[monômero] 0,05.

5.2.1.1. Análise Elementar

Os copolímeros sintetizados contêm uma sequência aleatória; sua composição final dependente das quantidades adicionadas de cada monômero (fração molar na alimentação) e das respectivas reatividades, frente à reação radicalar. A composição copolimérica não pode ser determinada apenas pelo conhecimento das velocidades de homopolimerização dos dois comonômeros, mas também da atividade química do radical formado, visto que são dependentes também da unidade monomérica do final da cadeia.

Para uma melhor compreensão das propriedades e características de um copolímero, é importante caracterizar a fração molar de incorporação dos comonômeros. Na tabela 5.13 estão representados dados da literatura referentes aos valores das reatividades monoméricas.

Tabela 5.13: Valores teóricos das reatividades monoméricas na copolimerização da N-vinil-2-pirrolidona (M_1)¹¹⁶.

Monômero1/Monômero2	r_1	r_2
N-vinil-2-pirrolidona/ metacrilato de metila	$0,02 \pm 0,02$	5,0
N-vinil-2-pirrolidona/ acetato de vinila	$3,3 \pm 0,15$	$0,2 \pm 0,015$
N-vinil-2-pirrolidona/ acroleína	-	-

Partindo-se dos valores teóricos de reatividade monomérica e aplicando a eq. 5.7 (equação da composição copolimérica em função da fração molar na alimentação), é possível prever a incorporação dos comonômeros no polímero.

Eq. 5.7

$$F_1 = \frac{r_1 f_1^2 + f_1 f_2}{r_1 f_1^2 + 2 f_1 f_2 + r_2 f_2^2}$$

onde F_1 é a fração molar incorporada do monômero 1 no copolímero, f_1 e f_2 são frações molares na alimentação e r_1 e r_2 são reatividades dos monômeros 1 e 2 respectivamente.

Nas figura 5.33 e 5.34 estão sendo representados, repectivamente, as possíveis frações molares para os copolímeros poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila) e poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila) em função da fração molar da N-vinil-2-pirrolidona na alimentação.

Figura 5.33: Representação gráfica da fração molar do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila). ■ F_1 fração molar incorporada da N-vinil-2-pirrolidona; ● F_2 fração molar incorporada do metacrilato de metila, a partir de dados da literatura.

Figura 5.34: Representação gráfica da fração molar do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila). ■ F_1 fração molar incorporada da N-vinil-2-pirrolidona; ● F_2 fração molar incorporada do acetato de vinila, a partir de dados da literatura.

É possível prever, contudo, que uma reação de copolimerização contendo 0,9 mol de N-vinil-2-pirrolidona na alimentação para 0,1 mol de metacrilato de metila, pode apresentar uma fração molar de 56,9% de metacrilato de metila no copolímero; e para uma reação de copolimerização contendo 0,9 mol de N-vinil-2-pirrolidona na alimentação para 0,1 mol de acetato de vinila, a fração molar no copolímero será de 3,2% de acetato de vinila.

Vale lembrar que a equação de copolimerização descreve apenas a composição copolimérica instantânea. Na maioria das copolimerizações, os comonômeros não são incorporados na cadeia polimérica resultante com a mesma proporção da alimentação, visto que há uma mudança da composição durante a reação, ou seja, à medida que a reação procede haverá menos monômeros mais reativos, visto que reagem primeiro.

À medida que a conversão monomérica cresce, a composição copolimérica ao longo da cadeia torna-se cada vez mais heterogênea, ou seja, a composição inicial pode ser bem distinta da composição terminal. Esta é a razão da dificuldade em interpretar a microestrutura de copolímeros em termos das razões das reatividades relativas.

A razão entre as reatividades apenas provém importante informação sobre o crescimento das cadeias poliméricas. A análise elementar é geralmente utilizada para obter a composição copolimérica média total.

A partir dos resultados de % atômica obtidos por análise elementar e a equação de incorporação monomérica para cada copolímero, é possível encontrar o percentual real de cada comonômero na estrutura polimérica (tabela 5.14). As equações 5.8, 5.9 e 5.10 expressam o cálculo do valor do comonômero extra (M_2), ou seja, acetato de vinila para o poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila), metacrilato de metila para o poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila) e acroleína para o poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína).

1. Cálculo de incorporação do comonômero acetato de vinila.

$$\begin{aligned}
 & (C_6H_9NO)_{100-M} (C_4H_6O_2)_M \\
 & C_{600-6M} H_{900-9M} N_{100-M} O_{100-M} C_{4M} H_{6M} O_{2M} \\
 & C_{600-2M} H_{900-3M} O_{100+M} N_{100-M} \\
 & \% N = \frac{100N - NM}{600C - 2CM + 900H - 3HM + 100O + OM + 100N - NM} \\
 & \% N = \frac{1400,67N - 14,0067M}{7206 - 24,02M + 907,11 - 3,0237M + 1599,4 + 15,994M + 1400,67 - 14,0067M}
 \end{aligned}$$

Eq. 5.8

$$\% N = \frac{1400,67 - 14,0067M}{11113,18 - 25,0564M}$$

2. Cálculo de incorporação do comonômero metacrilato de metila

$$\% N = \frac{100N - NM}{600C - MC + 900H - MH + 100O + MO + 100N - MN}$$

$$\% N = \frac{1400,67N - 14,0067M}{7206,6 - 12,01M + 907,11 - 1,0079M + 1599,4 + 15,994M + 14,0067 - 14,0067M}$$

Eq. 5.9

$$\% N = \frac{1400,67 - 14,0067M}{11114,32 - 11,0262M}$$

3. Cálculo de incorporação do comonômero acroleína

$$\% N = \frac{100N - NM}{600C - 3MC + 900H - 5MH + 100O + 100N - MN}$$

$$\% N = \frac{1400,67N - 14,0067M}{7206,6 - 36,033M + 907,11 - 5,0395M + 1599,4 + 1400,67 - 14,0067M}$$

Eq. 5.10

$$\%N = \frac{1400,67 - 14,0067M}{1114,32 - 55,0792M}$$

Sendo: M é o percentual de incorporação do comonômero

%N é o valor do percentual de Nitrogênio experimental

C, H, O e N são os pesos atômicos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio, respectivamente.

Tabela 5.14: Percentual de incorporação do comonômero extra (M_2) a partir dos dados obtidos por análise elementar.

Copolímeros	Fração Molar de incorporação		
	Valor Teórico	Análise Elementar	
		%N	Resultado
Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)	3,2	10,9 ± 0,2	16,5
Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)	56,9	9,2 ± 0,2	29,2
Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína)	-	10,6 ± 0,5	26,7

Os resultados obtidos por análise elementar (tabela 5.14) confirmam que os valores de incorporação copolimérica real são diferentes dos valores teóricos (tabela 5.13).

5.2.1.2. RMN- H^1

Nosso interesse com o uso da técnica de RMN foi de comprovar se houve incorporação do comonômero reativo (M_2). Portanto, foi realizado apenas a análise

dos espectros 1D de RMN- H^1 dos copolímeros, onde o espectro do poli(N-vinil-2-pirrolidona) homopolímero (figura 5.35) foi usado como referência. Também, em virtude da baixa incorporação do monômero reativo, é importante ressaltar que a detecção por RMN - H^1 é mais facilmente obtida do que por RMN - C^{13} .

Figura 5.35: Espectro de RMN H^1 para poli(N-vinil-2-pirrolidona), obtido em D_2O a $25^\circ C$.

Os espectros obtidos pelos copolímeros apresentaram mudanças discretas em relação ao espectro de PVP na figura 5.35. Em virtude do alargamento das bandas na região de 1 a 4,5 ppm, os picos referentes aos comonômeros incorporados (acroleína, acetato de vinila e metacrilato de metila) são em sua

maioria sobrepostos pelos picos dos prótons contidos na comonômero de N-vinil-2-pirrolidona, dificultando a atribuição dos picos.

Contudo, a detecção de incorporação monomérica foi mais facilmente observada para o poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) em razão da presença do pico de deslocamento químico em ~9,4 ppm, atribuído ao próton contido no grupo aldeído.

Porém, a partir dos resultados obtidos por análise elementar foi possível concluir a incorporação monomérica em cada caso.

5.2.1.3. Análise da massa molar

A análise da massa molar dos copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona foi realizada utilizando duas técnicas diferentes. A partir da medida da pressão osmótica de uma série limitada de soluções de diferentes concentrações é possível obter os valores de massa molar numérica média por osmometria de membrana. Por CET a análise é feita a partir do tempo de retenção em comparação a padrões de PEO de massa molar conhecida.

Os valores de massa molar dos copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona obtidos por CET e por osmometria estão listados na tabela 5.15.

Tabela 5.15: Massas molares obtidas por Osmometria de Membrana e CET para os copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona.

Copolímero	Osmometria ^a		CET ^b	
	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_n$	$\overline{M}_w$	$\frac{\overline{M}_w}{\overline{M}_n}$
Poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)	137.000	147.000	180.000	1,22
Poli(vinilpirolidona-co-acroleína)	290.000	240.000	260.000	1,06
Poli(vinilpirolidona-co-acetato de vinila)	188.000	210.000	240.000	1,14

a. análise realizada a partir de quatro soluções de concentração diferente 0,25-1,00g/100mL em água destilada a 40°C.

b. análise realizada em água destilada e acetonitrila (0,03M)

Embora as duas técnicas se baseiem em diferentes métodos, os valores de massa molar obtidos são aproximados.

5.2.2. Hidrogéis de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) e Quitosana

A quitosana é obtida a partir da desacetilação da quitina (Figura 5.36) e é um biopolímero de baixa hidrofiliçidade, que pode reticular com diversos dialdeídos (glutaraldeído, formaldeído e etc) via formação de base de Schiff.

Figura 5.36: Representação esquemática da estrutura primária da quitina (a) e quitosana (b).

Dialdeídos pequenos geralmente apresentam toxicidade, tornando inaceitável a aplicação destes polímeros no campo de biomateriais. Por esta razão, como alternativa à reticulação de quitosana por aldeídos, foi proposta a síntese e aplicação da poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) (PVPACR). Este polialdeído pode produzir reticulação da quitosana com pequena chance de apresentar a toxicidade de aldeídos pequenos, visto sua baixa difusibilidade. Além disso, este aditivo deve aumentar a hidrofiliabilidade da quitosana, devido a presença de comonômeros derivados da N-vinil-2-pirrolidona em sua matriz polimérica.

Base de Schiff ou iminas são grupos funcionais resultantes da condensação de uma amina e um aldeído ou cetona¹¹⁷, através da formação de uma dupla ligação entre um átomo de carbono e nitrogênio. O processo tem como intermediário a formação de carbinolamina (um hemiacetal – T^0), a partir de dois caminhos, um via o intermediário T^+ , e outro por etapas via intermediário $T^\pm$ (figura 5.37).

5.2.2.1.1. Grau de Acetilação

O grau de acetilação representa a fração de unidades amina e acetil ao longo da cadeia de quitosana e é um dos principais parâmetros para sua caracterização. Quanto menor o grau de acetilação, maior o número de grupos amino livres na cadeia. Por sua vez, o grau de acetilação tem influência direta com a solubilidade do biopolímero, o qual está relacionado à quantidade de grupos amino protonados.

O grau de acetilação da quitosana foi analisado por três técnicas amplamente aplicadas. Na tabela 5.16 encontram-se os resultados obtidos a partir dos resultados de Análise Elementar, Infravermelho e RMN-H¹, segundo os procedimentos descritos em: 4.3.4.2.1, 4.3.4.2.2 e 4.3.4.2.3 respectivamente.

Tabela 5.16: Valores do grau de acetilação para as quitosanas da Aldrich, realizados a 25°C.

Quitosana	Técnicas					
	Infravermelho ^a		Análise Elementar ^b		RMN H ^{1c}	
	Exp ^a	GA(%)	Exp	GA(%)	Exp ^b	GA(%)
Massa molar média (QM)	T ₁₆₅₀ =88,5%	24,2	%C=43,6	23,6	A _{CH3} =227	15,6
	T ₃₄₅₀ =68,4%		%H=6,6 %N=8,3		A _{H2} =485	
Massa molar alta (QH)	T ₁₆₅₀ =91,3%	22,7	%C=43,8	25,6	A _{CH3} =284	20,6
	T ₃₄₅₀ =73,9%		%H=6,7 %N=8,2		A _{H2} =459	

a. dados da banda de absorção (em transmitância) do espectro IV em pastilha KBr.

b. área relativa dos picos a partir de soluções 10mg/mL em D₂O, 300MHz.

Dados na literatura a respeito da caracterização do grau de acetilação indicam que os valores obtidos por RMN-H¹ são mais confiáveis. Técnicas como análise elementar e espectroscopia no infravermelho são muito sensíveis à presença de

água incorporada na cadeia polimérica. No caso da análise elementar, a leitura das medidas dos valores das porcentagens de CHN podem ser desviados, devido à presença de água. Já na espectroscopia no infravermelho onde há sobreposição de bandas referentes aos estiramentos NH e OH na região entre 3440-3480 cm^{-1} , a mínima presença de água pode interferir nos resultados finais.

Com base na tabela 5.16 os resultados obtidos por análise elementar apresentaram a mesma tendência para o grau de acetilação em relação aos dados obtidos por ressonância, ou seja, tanto os resultados obtidos por análise elementar quanto por ressonância, indicam que a quitosana de massa molar alta possui um maior grau de acetilação.

5.2.2.1.2. Determinação da massa molar da Quitosana

Analisar a massa molar de polissacarídeos e entender como seu valor interfere nas características físico-químicas destes materiais tem sido um verdadeiro desafio para pesquisadores deste campo de pesquisa. Métodos como: medidas viscosimétricas, CET e espalhamento de luz têm sido utilizados, porém, medidas por espalhamento de luz se mostraram uma metodologia mais confiável¹¹⁹.

Neste trabalho, a análise das massas molares das quitosanas de massa molar alta e média foi obtida por espalhamento de luz para quatro soluções de diferentes concentrações. O valor de $\frac{\partial n}{\partial c}$ foi de 0,160 cm^3/g , valor este encontrado em vários outros trabalhos na literatura¹²⁰. Além disso, as massas molares das quitosanas também foram analisadas por osmometria de membrana, a partir de quatro soluções de diferentes concentrações.

Tabela 5.17: Valores de massas molares obtidos por osmometria de membrana e espalhamento de luz.

Quitosana	Osmometria	Espalhamento de Luz
	$(\overline{M}_n)^a$	$(\overline{M}_w)^b$
Massa molar média	97.000	95.000
Massa molar alta	128.0000	130.000

a. ensaio realizado com soluções de quitosanas comerciais de 0,25 a 1,0g/100mL em 0,02M HAc/0,1M NaCl, pH=4,5 a 30°C.

b. ensaio realizado a partir de soluções de quitosana comercial de 0,1 a 0,5g/100mL em tampão 0,2M NaAc/0,2M HAc pH 4,5 a 25°C, com eliminação dos dois primeiros e dos dois últimos ângulos. QM $A_2 = -2,25 \times 10^{-3} \text{ mL.mol.g}^{-2}$. QH $A_2 = -2,27 \times 10^{-3} \text{ mL.mol.g}^{-2}$.

Segundo dados da tabela 5.17 os resultados obtidos para massa molar de quitosana por osmometria de membrana são praticamente os mesmos obtidos por espalhamento de luz, embora tratem de duas definições distintas de massa molar. Isto parece indicar uma polidispersividade $(\overline{M}_w / \overline{M}_n)$ bastante baixa, próximo a 1.

5.2.2.1.3 Análise de Termogravimetria das quitosana comerciais

Quando polímeros hidrofílicos estão presentes em uma atmosfera úmida, moléculas de água na forma de vapor tendem hidratar a cadeia polimérica até que o equilíbrio termodinâmico seja eventualmente alcançado. O teor de água presente em quitosana pode ser obtido por termogravimetria. Santos e colaboradores⁷⁸ afirmam que a quitosana tem alguma afinidade pela água, pois no estado sólido as macromoléculas podem apresentar estruturas distorcidas, que são facilmente hidratadas.

Experimentos de termogravimetria para a quitosana comercial foram realizados sob atmosfera inerte (N_2) e apresentaram um processo de

desidratação, seguido da decomposição do biopolímero. Todas as amostras seguiram o mesmo perfil, na figura 5.38 está representado o termograma das amostras de quitosana comercial de massa molar média molar média, onde uma é amostra real (amostra sem secagem) e a outra uma amostra liofilizada.

Figura 5.38: Termograma para amostras de quitosana comercial de massa molar média (QM) sob atmosfera inerte (vazão de gás 50mL/min) Sendo amostra liofilizada, e amostra real. A massa das amostras foi de aproximadamente 15mg; e razão de aquecimento de 10°C/min em suporte de platina.

Na tabela 5.18 são representados os processos decorrentes da desidratação seguida da decomposição das amostras de quitosana.

Tabela 5.18: Resultados de Termografia na decomposição das amostras comerciais de quitosana sob atmosfera inerte. QR (amostra real) e QL (amostra liofilizada).

Evento Térmico	Intervalo de Temperatura (°C)	Perda de massa ou resíduo
QR.nH ₂ O → QR + n H ₂ O	25-115	2,5%
QR → RC*	247-500	50%
QL.nH ₂ O → QL + n H ₂ O	25-115	11,3%
QL → RC*	?-500	45%

* Resíduo carbonizado

Análise dos termogramas demonstra a necessidade da secagem das amostras antes de se proceder às análises de determinação do grau de acetilação.

5.2.2.2. Análise de fração de gel do hidrogel de imina

A figura 5.39 mostra que as frações de gel obtidas para os hidrogéis de imina apresentam altos valores. Para ambos hidrogéis obtidos a partir de biopolímeros comerciais, a concentração do copolímero PVPACR mostrou não interferir nos resultados de conteúdo de gel.

Figura 5.39: Análise de conteúdo de gel realizado a 25°C para os hidrogéis produzidos (A) por quitosana de massa molar média e (B) por quitosana de massa molar alta. [QM]=20 g.L⁻¹ e [QH]= 20g.L⁻¹.

5.2.2.3. Análise de Intumescimento do hidrogel do copolímero de PVPACR-quitosana

A partir de amostras liofilizadas de hidrogel foram feitas análises de intumescimento em amostras imersas em tampão fosfato pH 7 (por 48 h) à temperatura ambiente. A figura 5.40 apresenta os valores de grau de intumescimento para os hidrogéis produzidos com quitosana comercial de alta e média massa molar.

Figura 5.40: Análise de grau de intumescimento para os hidrogéis produzidos (A) QM e (B) QH, obtidos a partir de soluções 20g.L⁻¹ de quitosana e soluções 80g.L⁻¹ de PVPACR, experimentos realizados a 25°C.

Os hidrogéis produzidos com o biopolímero de massa molar alta apresentaram uma dependência em relação à concentração do copolímero PVPACR, onde o aumento da concentração do mesmo interfere nos valores de grau de intumescimento. Neste caso o PVPACR age como reticulante da quitosana, pois o aumento de sua concentração é inversamente proporcional à capacidade de absorção de água no retículo do hidrogel, ou seja, quanto maior a concentração de PVPACR mais ligações cruzadas e menor absorção de água.

Já em hidrogéis produzidos com quitosana comercial de massa molar média, o aumento na concentração de PVPACR não apresentou dependência em relação à concentração de PVPACR, o que pode estar relacionado ao fato de ter sido encontrado o limite referente à reticulação máxima da quitosana.

5.2.2.4. Cinética de reticulação do hidrogel do copolímero de PVPACR – quitosana.

A análise da cinética de produção de um hidrogel pode ser realizada a partir de medidas viscosimétricas. Foi medido o comportamento viscosimétrico de soluções de quitosana comercial em função do tempo sob taxa de cisalhamento constante ($n=60$ rpm). Segundo a figura 5.41, não há variação no valor de viscosidade.

Figura 5.41: Análise viscosimétrica em função do tempo realizada a 25°C de soluções de quitosana 20 g.L⁻¹ sendo: (a) ■ quitosana de massa molar média (QM); e (b) ■ quitosana de massa molar alta (QH).

Soluções de quitosana comercial e de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) foram misturadas *in situ* e medida viscosimétrica da produção do hidrogel foi analisada sob taxa de cisalhamento constante ($n=60$ rpm). Com base na figura 5.42 a valor da viscosidade tem um aumento contínuo em até 10

minutos onde a partir deste tempo não há praticamente variação do seu valor de viscosidade.

Figura 5.42: Curva cinética viscosimétrica para o hidrogel de PVPACR-quitosana realizada a 25°C, a partir de soluções de quitosana 20g.L⁻¹, sendo: ■ QH com PVPACR 120g.L⁻¹; ● QH com PVPACR 80g.L⁻¹; ■ QM com PVPACR 120g.L⁻¹; ● QM com PVPACR 80g.L⁻¹.

5.2.2.5. Estudo do comportamento reológico do hidrogel do copolímero de PVPACR - quitosana

A avaliação reológica de uma série de hidrogéis de quitosana é conhecida devido a sua grande aplicação, envolvendo materiais tais como polímeros biologicamente ativos e materiais para imobilização de proteínas¹²⁰.

Amostras do hidrogel de imina foram analisadas em um reômetro rotacional sob taxa de cisalhamento constante ($n=60$ rpm) (figura 5.43), onde foi analisado seu comportamento viscosimétrico em função da temperatura.

Figura 5.43: Análise viscosimétrica dos hidrogéis de imina submetidos à variação da temperatura, a partir de soluções de quitosana 20g.L^{-1} , sendo: ■ QH com PVPACR 120g.L^{-1} ; ■ QH com PVPACR 80g.L^{-1} ; ● QM com PVPACR 120g.L^{-1} ; ● QM com PVPACR 80g.L^{-1} .

A partir da figura 5.43, observa-se que todas as amostras apresentaram decaimento no valor da viscosidade, ou seja, o hidrogel perde sua viscosidade passando da fase gel para a fase sol. O aumento da temperatura parece deslocar o equilíbrio base de Schiff/amina-aldeído.

O comportamento reológico da viscosidade do hidrogel também foi analisado em função da variação da taxa de cisalhamento (figura 5.44).

Figura 5.44: Análise viscosimétrica dos hidrogéis de imina em função da taxa de cisalhamento realizado a 25°C a partir de soluções de quitosana 20g.L⁻¹, onde: ■ QH com PVPACR 120g.L⁻¹; ● QH com PVPACR 80g.L⁻¹; ■ QM com PVPACR 120g.L⁻¹; ● QH com PVPACR 80g.L⁻¹.

Segundo a figura 5.44 os hidrogéis de imina perdem sua viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento, ou seja, apresenta fluidez por cisalhamento (“shear-thinning”), típico de materiais pseudoplásticos. Esta é uma característica interessante e rara, de materiais ditos “inteligentes”, que pode ser explorada em diversas aplicações biomédicas.

O comportamento reológico destes hidrogéis pode ser atribuído à perturbação do equilíbrio imina (forma reticulada)/aldeído (forma não reticulada), pelas forças mecânicas atuantes.

5.2.2.6. Adição de Cianoborohidreto

Hidrogéis de imina produzidos a partir de quitosana e poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acroleína) apresentam uma boa cinética de reticulação, alto conteúdo de gel; porém, uma grande instabilidade mecânica. Resultados mostram que estes hidrogéis são instáveis à variação de temperatura, e apresentam certa fragilidade à variação da taxa de cisalhamento.

Segundo a literatura, é sabido que o cianoborohidreto (figura 5.45) é um hidreto capaz de reduzir lentamente iminas a amins, assim como aldeídos a álcoois¹²¹. Propomos, portanto, produzir a imina em presença do cianoborohidreto de tal maneira, que a imina formada seja reduzida à amina, impedindo a volta da forma não reticulada. A baixa atividade redutora do cianoborohidreto serve à competição pela imina, que se forma rapidamente, *versus* a redução de seu par-precursor, o aldeído.

Figura 5.45: Reação de formação de base de Schiff seguida da redução da imina à amina pelo cianoborohidreto de sódio.

5.2.2.6.1. Análise no Infravermelho

Na figura 5.46 são mostrados os espectros no Infravermelho da quitosana, do hidrogel de imina e do hidrogel de PVPACR-quitosana reduzido na presença de cianoborohidreto de sódio.

Figura 5.46: Espectros no Infravermelho em KBr a 25°C de amostras secas de quitosana (—), do hidrogel de imina (—) e do hidrogel de imina reduzido por cianoborohidreto de sódio (—).

A partir da análise dos espectros no infravermelho para a quitosana e para a base de Schiff (figura 5.46), nota-se que a maioria das absorções referentes à quitosana, estão presentes no hidrogel de imina. Na região de $\sim 3500\text{cm}^{-1}$ são encontradas as absorções referentes ao estiramento axial OH e ao estiramento N-H sobrepostos, de ~ 1600 a $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ são encontradas as absorções referentes a deformação angular N-H, a deformação angular simétrica de CH_3 da amida, estiramento CN da amida e estiramento CN na amina. Nas regiões de

absorções com comprimento de onda menores que 900 cm^{-1} , são encontradas as bandas relativas às estruturas polissacarídicas. Observa-se também que o espectro do hidrogel apresenta uma absorção em 1575 cm^{-1} , a qual é referente à banda de estiramento da ligação C=N ($\nu_{\text{C=N}}$) na imina.

O espectro do hidrogel de imina reduzido por cianoborohidreto mostra uma diminuição da intensidade da banda de estiramento da ligação C=N ($\nu_{\text{C=N}}$) na imina, aumentando a intensidade da banda de deformação angular N-H da amina produzida.

5.2.2.6.2. Cinética da produção do hidrogel de imina na presença de cianoborohidreto

Assim como procedimento realizado para os hidrogéis de imina, seguiu-se o mesmo protocolo reológico na análise da viscosidade das amostras de quitosana e hidrogel. Na figura 5.47 está apresentado o comportamento viscosimétrico de amostras de quitosana na presença de cianoborohidreto.

Figura 5.47: Análise viscosimétrica realizada a 25°C sob taxa de cisalhamento constante (60 rpm) da solução 20g.L⁻¹ de quitosana de massa molar média ■, e da solução 20 g.L⁻¹ de quitosana de massa molar média com cianoborohidreto 20g.L⁻¹ ▲.

Assim como a solução de quitosana, a amostra com cianoborohidreto apresenta uma viscosidade constante em relação ao tempo. O aumento de viscosidade apresentado pela amostra de quitosana com cianoborohidreto é referente ao aumento da quantidade de massa na solução, visto que para uma redução completa de imina à amina, é necessário o mesmo equivalente molar de cianoborohidreto para unidades piranose da quitosana reticuladas. Em função da alta concentração da solução, foi utilizada a mesma razão em massa de cianoborohidreto e quitosana.

A figura 5.48 mostra o perfil cinético da formação de pontes de imina com conseqüente redução devido à presença de cianoborohidreto, realizado a taxa de cisalhamento constante ($n = 60\text{rpm}$).

Figura 5.48: Curva cinética da produção do hidrogel do copolímero PVPAC-quitosana na presença de cianoborohidreto, realizado a 25°C. $[PVPACR] = 80\text{g.L}^{-1}$, $[QM] = 20\text{g.L}^{-1}$ e $[\text{NaCNBH}_3] = 20\text{g.L}^{-1}$.

A partir da figura 5.48 é possível perceber que o redutor não interfere no perfil da curva cinética; porém, o hidrogel foi obtido em apenas 80 segundos, ou seja, o redutor eliminou o equilíbrio dinâmico entre a base de Schiff (forma reticulada) e o par amina-aldeído (forma não reticulada), devido à redução da imina à amina.

5.2.2.6.3. Estudo do comportamento do hidrogel de imina na presença de cianoborohidreto de sódio

Sendo o cianoborohidreto um redutor de iminas e, portanto, estabilizando o o equilíbrio fase sol (amina-aldeído)/ fase gel (base de Schiff) que o hidrogel

apresenta, foi analisado comportamento do hidrogel na presença deste redutor. A figura 5.49 representa o comportamento viscosimétrico do hidrogel quando submetido à variação de temperatura, realizado sob taxa de cisalhamento constante ($n=60\text{rpm}$).

Figura 5.49: Análise viscosimétrica em função da temperatura do hidrogel de PVPACR-quitosana na presença de cianoborohidreto. $[\text{PVPACR}] = 80 \text{ g.L}^{-1}$, $[\text{QM}] = 20 \text{ g.L}^{-1}$ e $[\text{NaCNBH}_3] = 20 \text{ g.L}^{-1}$.

Em relação à variação de temperatura, o hidrogel na presença NaCNBH_3 manteve-se em forma de gel.

O aumento da taxa de cisalhamento também pode demonstrar a estabilidade destes hidrogéis e analisar como o mesmo se comporta ao se variar à taxa de cisalhamento (figura 5.50).

Figura 5.50: Análise viscosimétrica em função da taxa de cisalhamento realizado a 25°C do hidrogel de PVPACR-quitosana na presença de cianoborohidreto. [PVPACR] = 80 g.L⁻¹, [QM] = 20 g.L⁻¹ e [NaCNBH₃] = 20g.L⁻¹.

Como mencionado anteriormente, hidrogéis de imina quando submetido ao aumento da taxa de cisalhamento apresentam variação da viscosidade passando da fase gel para a fase sol. Contudo, como mostrado na figura 5.50, mesmo na presença de NaCNBH₃ este comportamento se mantém. Este resultado, portanto, não mostra-se referente ao deslocamento do equilíbrio imina/aldeído em hidrogéis de imina, mas referente à quebra irreversível da rede tridimensional do hidrogel.

5.2.3. Hidrogel do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)

O PVA pode ser reticulado através do uso de agentes reticulantes bifuncionais¹²². Alguns dos agentes reticulantes mais utilizados para produzir

hidrogéis de PVA incluem glutaraldeído, acetaldeído, formaldeído e outros monoaldeídos (figura 5.51). Estes agentes reticulantes, contudo, apresentam algum grau de toxicidade, que ficam presentes na estrutura do hidrogel de PVA, tornando o material inaceitável para aplicações farmacêuticas.

Figura 5.51: Figura esquemática da reticulação do PVA com glutaraldeído.

Entre outras metodologias para obtenção de hidrogel de PVA se incluem: feixe de elétrons e radiação γ . Estes métodos possuem a vantagem de se obter um material livre de toxicidade, visto que não usam agentes reticulantes.

Uma metodologia alternativa são preparações que envolvem a produção de uma reticulação física. Além de não ter a necessidade de utilização de agentes reticulantes, esta é uma metodologia barata de obtenção de hidrogéis frente aos obtidos por radiação.

Com a intenção de utilizar os métodos de reticulação de PVA como metodologia de reticulação mais branda para hidrogéis de PVP, foi sintetizado o

poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila) (PVPVAC) que, após metanólise, será convertido a poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico) (PVPVAL).

5.2.3.1. Metanólise do copolímero

Polímeros de acetato de vinila, ao sofrerem metanólise, fornecem unidades monoméricas de álcool vinílico. O grau de hidrólise (metanólise) influencia diretamente nas propriedades químicas do material, tais como solubilidade, cristalinidade¹²³ e no poder de intumescimento do PVA.

A partir do copolímero (PVPVAC), foi realizada a metanólise para sua conversão em poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico) (PVPVAL) como representado na figura 5.52.

Figura 5.52: Representação esquemática da metanólise do PVPVAC.

O cálculo do grau de metanólise indica qual a porcentagem de unidade monomérica de álcool vinílico presente na cadeia do PVPVAL.

5.2.3.1.1. Medidas do grau de metanólise dos copolímeros de poli(vinil-2-pirrolidona-co-acetato de vinila)

O grau de metanólise (GM) em polímeros de acetato de vinila é determinado pela análise de espectros no infravermelho, no qual o *GM* é obtido a partir da razão entre as áreas de intensidades de absorção¹²⁴, isto é, da razão entre as áreas equivalentes ao pico da banda de estiramento (ν_{OH}) do grupo hidroxila (3400 cm^{-1}), com a soma das áreas dos picos das bandas ν_{OH} e da banda ($\nu_{C=O}$) do grupo carbonila em 1750 cm^{-1} . A partir da equação modificada do trabalho de Bai¹²⁵, foi possível calcular o grau de metanólise (Eq.5.11).

$$\text{Eq. 5.11} \quad GM = \left(\frac{\left(\frac{A_{OH}}{A_{OH} + A_{C=O}} \right)_{\text{n\~{a}ohidrolisado}} - \left(\frac{A_{OH}}{A_{OH} + A_{C=O}} \right)_{\text{hidrolisado}}}{\left(\frac{A_{OH}}{A_{OH} + A_{C=O}} \right)_{\text{n\~{a}ohidrolisado}}} \right) \times 100$$

É importante ressaltar que nos espectros de IV dos copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona, há absorções referentes à banda da carbonila do grupo acetato e também aquela presente no anel pirrolidínico (amida). Portanto, ao caracterizar a razão entre as áreas do copolímero não hidrolisado e hidrolisado, deve-se ter em mente que a absorção total da carbonila é referente à banda $\nu_{C=O}$ do grupo amida e do grupo éster.

Na tabela 5.19 estão representados aos valores de grau de metanólise para alguns copolímeros comerciais. Observa-se, contudo, que a metanólise em todos os casos não foi total, ou seja, ainda há grupos ésteres presentes na cadeia polimérica.

Tabela 5.19: Cálculo do grau de metanólise.

Copolímero	A _{OH}	A _{C=O}	GM
Luviskol 37	3360,7	4726,5	91%
Luviskol 37H	4903,8	1276	
Luviskol 64	6682,9	10136,0	59%
Luviskol 64H	4220,1	2464,2	
PVPVAC	10868	3995	4,2%
PVPVAL	7391,6	2551,2	

*obtido a partir de espectros no infravermelho em KBr a 25°C.

A presença do monômero de N-vinil-2-pirrolidona parece interferir nos resultados de metanólise, ou seja, uma maior razão molar de N-vinil-2-pirrolidona nos copolímeros parece diminuir a capacidade de reação, tornando o grau de metanólise menor.

5.2.3.2. Reticulação do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-álcool vinílico) com glutaraldeído

5.2.3.2.1. Análise de conteúdo de gel e intumescimento dos hidrogéis de álcool vinílico.

A partir da análise das massas molares (tabela 5.20), observou-se que o copolímero PVPVAL apresentou maior massa molar ($\overline{M}_w$) frente aos polímeros comerciais.

Tabela 5.20: Valores de $\overline{M}_w$ e $\overline{M}_n$ dos polímeros utilizados.

Polímeros	$\overline{M}_w$	$\overline{M}_n$
Mowiol ^{®b}	100.000	60.000
Luviskol ^{®a} 37	45.000-55.000	11.000-18.000
Luviskol ^{®a} 64	45.000-55.000	11.000-18.000
PVA Aldrich 30.000-70.000 ^a	30.000-70.000	-
PVPVAL ^b	240.000	210.000

a. Valores nominais

b. Valores calculados por CET em água destilada e acetonitrila 0,03M a 25°C.

Inicialmente, foi feita a análise do comportamento da reticulação de polímeros de álcool vinílico e dos copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona e álcool vinílico na presença de glutaraldeído em três diferentes concentrações: 0,75%; 1,00% e 1,25%. Contudo, somente os polímeros comerciais Mowiol[®], Luviskol[®] 37 e PVA Aldrich[®] apresentaram algum grau de reticulação. Os resultados de conteúdo de gel e intumescimento para estes polímeros se encontram nas figuras 5.53 a 5.55.

(A)

(B)

Figura 5.53: Hidrogéis produzidos a partir de soluções 10% de PVA Aldrich 30.000-70.000. (A) Conteúdo de gel e (B) Grau de Intumescimento, ensaios realizados a 25°C.

(A)

(B)

Figura 5.54: Hidrogéis produzidos a partir de soluções 10% Luviskol® 37. (A) Conteúdo de gel e (B) Grau de Intumescimento, ensaios realizados a 25°C.

Figura 5.55: Hidrogéis produzidos a partir de soluções 10% de Mowiol[®]. (A) Análise de % gel e (B) Grau de Intumescimento, ensaios realizados a 25°C.

Para a maioria dos hidrogéis, a análise de conteúdo de gel revela uma dependência em relação à concentração de glutaraldeído, ou seja, hidrogéis produzidos com maiores concentrações de glutaraldeído possuem maior conteúdo de gel. No entanto, o hidrogel produzido a partir do copolímero comercial Luviskol[®] 37, apresentou um valor de conteúdo de gel constante. Isto se deve à baixa presença de monômeros de álcool vinílico, em comparação aos outros polímeros, visto que a reticulação acontece via reação entre o grupo hidroxila e o grupo aldeído.

Os valores de conteúdo de gel também mostraram uma dependência em relação à massa molar. Por exemplo, o Mowiol[®], que apresenta maior massa molar obteve maiores valores de conteúdo de gel.

A análise do grau de intumescimento mostrou apenas uma dependência em relação à concentração de glutaraldeído, onde o aumento da concentração do

agente reticulante foi responsável pelo decréscimo de absorção de água no retículo do hidrogel. A maior concentração de glutaraldeído no meio reacional gera um aumento do número de ligações cruzadas. Conseqüentemente, ocorreu formação de poros de diâmetro menor, interferindo no grau de intumescimento.

Contudo, a estrutura polimérica, ou seja, o tamanho da cadeia (massa molar) e a presença de comonômeros de N-vinil-2-pirrolidona, parecem não interferir nos resultados de intumescimento.

Devido ao baixo grau de metanólise apresentado pelos copolímeros Luviskol[®] 64 e PVPVAL e, conseqüentemente, baixa presença de grupos OH na cadeia polimérica, a reticulação não foi efetiva, visto que a mesma é realizada entre as unidades do monômero de álcool vinílico na posição 1,3, as quais favorecem a reação química entre as hidroxilas do álcool vinílico e os grupos aldeído do glutaraldeído.

Com isso, a reticulação entre os grupos hidroxilas do PVPVAL e os grupos aldeídicos do PVPACR, não é possível devido à baixa disponibilidade de unidades monoméricas de álcool vinílico nas posições 1,3 no PVPVAL.

5.2.3.3. Reticulação com íons borato

Além das reticulações covalentes, polímeros de PVA podem formar complexos termo-reversíveis com o ânion borato em soluções aquosas. Segundo literatura¹²⁵, soluções de PVA sofrem um aumento na viscosidade na presença de ânions borato, atribuído à reticulação do polímero.

5.2.3.3.1. Análise de conteúdo de gel e grau de intumescimento para os hidrogéis de poli(álcool vinílico) na presença de íons borato

Primeiramente foram produzidos de filmes a partir de soluções aquosas com 10% dos copolímeros Luviskol® 37 e PVPVAL. Os filmes foram imersos em solução de borato de sódio. No entanto, os filmes de PVPVAL quando imersos em soluções de borato de sódio foram totalmente dissolvidos, ou seja, não houve reticulação. Os filmes de Luviskol® 37, porém, não se dissolveram prontamente, mas durante a análise de conteúdo de gel, onde há necessidade de fazer a extração em água da parte solúvel do material, houve diluição do filme.

Quanto mais hidrolisado for o PVA, maior sua cristalinidade e conseqüentemente mais lenta sua dissolução. O PVA comercial utilizado possui alto grau de hidrólise, logo, filmes obtidos a partir dos mesmos tem uma tendência menor em se dissolver frente aos filmes do copolímero Luviskol® 37, o qual apresentou baixo grau de hidrólise.

A reticulação por esta metodologia não foi possível, pois as reticulações entre os íons borato e o PVA, são formadas da mesma forma que as reticulações com glutaraldeído, ou seja, nas posições 1,3 (figura 5.56)¹²⁶.

Figura 5.56: Estrutura do complexo de PVA com ânions borato.

5.2.3.4. Hidrogel Físico

Na tentativa de se produzir um hidrogel livre da presença de monômeros multifuncionais (agente reticulante) tóxicos, foi feita a análise da reticulação de copolímeros de álcool vinílico pelo método de congelamento e descongelamento polimérico.

Este é um processo alternativo de produção de hidrogéis à base de PVA, onde a reticulação é realizada por interações físicas, sem a necessidade de agentes reticulantes. Esta metodologia se mostra interessante, pois os hidrogéis produzidos possuem baixo custo frente aos hidrogéis obtidos por radiação¹²⁷.

É importante salientar que um aumento na densidade de reticulação destes materiais decresce o volume de água absorvida na estrutura dos hidrogéis de PVA, decrescendo também a velocidade de difusão do coeficiente de drogas para os hidrogéis, que são utilizados como carregadores de droga.

Soluções 15% de PVA formam hidrogéis quando submetidos a um processo cíclico de congelamento (até -20°C) e descongelamento à temperatura ambiente. Este processo fornece um hidrogel estável, que é formado devido à presença de “cristalitos” em algumas regiões entre as cadeias poliméricas. Estes “cristalitos” são considerados os pontos de reticulação do sistema, responsáveis pela produção do hidrogel (figura 5.57).

Figura 5.57: Formação de cristalitas através do processo de congelamento e descongelamento de uma solução de PVA.

5.2.3.4.1. Análise de conteúdo de gel e grau de intumescimento para os hidrogéis físicos

Como este processo é dependente da massa molar polimérica¹²², primeiramente foram analisadas as reticulações dos polímeros comerciais PVA Aldrich[®] de massas molares $\overline{M}_w$ (30.000-70.000) e $\overline{M}_w$ (70.000-100.000).

As soluções poliméricas de ambos os polímeros de PVA formaram hidrogéis. Porém, os hidrogéis produzidos com a solução de PVA de maior massa molar ($\overline{M}_w$ 70.000-100.000) foram os únicos que apresentaram maior estabilidade frente aos ciclos de congelamento e descongelamento (figura 5.58), visto a possibilidade de poder analisá-lo durante 2 ciclos a mais. Este resultado confirma a dependência do sistema com a massa molar.

Figura 5.58: Análise de conteúdo de gel. (A) para soluções 15% de PVA ($\overline{M}_w$ 70.000-100.000) e (B) para soluções 15% de PVA ($\overline{M}_w$ 30.000-70.000), obtidos a 25°C.

Os resultados de grau de intumescimento, porém, não mostraram uma dependência com a massa molar, apenas com o número de ciclos de congelamento e descongelamento. Segundo a figura 5.59, o aumento do número ciclos de congelamento e descongelamento diminuem o grau de intumescimento do hidrogel, indicando a formação de mais ligações cruzadas, ou seja, mais interações entre as cadeias poliméricas.

Figura 5.59: Análise do grau de intumescimento. (A) PVA ($\overline{M}_w$ 70.000-100.000) e (B) PVA ($\overline{M}_w$ 30.000-70.000).

Estes resultados indicam que a reticulação do PVPVAL por esta metodologia não é possível devido à presença de poucos monômeros de álcool vinílico na cadeia polimérica.

O tempo em que o polímero fica congelado, talvez aumente a concentração de cristalitos no hidrogel. Soluções de PVA ($\overline{M}_w$ 70.000-100.000) foram submetidas a um período de congelamento de 48 horas entre os ciclos. Na tabela 5.21 são mostrados os valores de conteúdo de gel e grau de intumescimento obtido.

Tabela 5.21: Análise de alguns parâmetros físicos do gel submetido a 48 horas de congelamento.

	% Gel	Grau de intumescimento
1º ciclo	45,1 ± 4,3	10,5 ± 0,1
2º ciclo	26,1 ± 6,3	7,2 ± 0,1
3º ciclo	12,9 ± 0,9	7 ± 1

Análise realizada a 25° C, a partir de hidrogéis produzidos a partir de soluções 15% de PVA.

O sistema, além de apresentar uma dependência com os números de ciclos de congelamento e descongelamento, aos quais os hidrogéis são submetidos, é sensível ao tempo de congelamento, visto a diminuição no valor de conteúdo de gel e do grau de intumescimento.

5.2.4. Hidrogel de poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-metacrilato de metila)

Reticulações covalentes têm sido muito utilizadas para o controle da estabilidade estrutural e das propriedades mecânicas. Contudo, alguns agentes reticulantes são geralmente tóxicos para células e, portanto, não indicados para reticulação *in situ*.

Com interesse nas áreas de encapsulação de célula e de engenharia de tecido, foi feita uma tentativa em produzir um hidrogel para reticulação *in situ*, a partir da reticulação iônica do poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico) (PVPMA) com Ca^{2+} . Segue-se a mesma metodologia de reticulação de alginatos, onde sais de Ca^{2+} e/ou outros dications são responsáveis pela reticulação polimérica, a partir da interação iônica entre os grupos carboxilatos (R-COO^-) do e cátions divalentes.

5.2.4.1. Hidrólise do copolímero poli(N-vinil-2-pirrolidona-co-ácido metacrílico)

Primeiramente foi realizada a hidrólise do PVPMMA a PVPMA para a conversão do grupo metacrilato a ácido carboxílico (figura 5.60).

Figura 5.60: Representação esquemática da hidrólise do copolímero PVPMMA.

O grau de hidrólise foi calculado a partir da análise da área dos picos do PVPMMA, pois, como mencionado, não é possível fazer as atribuições corretas dos picos em virtude do alargamento das bandas da região de 1 a 4,5ppm. Na tabela 5.22 estão tabeladas as integrais encontradas para PVPMMA e PVPMA.

Tabela 5.22: Cálculo das integrais para amostras de PVPMMA e PVPMA referentes a hidrólise do grupo MeO em D₂O a 25°C.

Copolímeros	Integral	Grau de hidrólise
PVPMMA	8,99.10 ⁶	75%
PVPMA	2,25.10 ⁶	

5.2.4.2. Análise do hidrogel iônico

Alginatos, polissacarídeos oriundos das algas, são copolímeros naturais formados pela seqüência de dois monômeros, α -L-ácido gulurônico (G) e β -D-ácido manurônico (M) (figura 5.64) que, na presença de íons divalentes, tais como Ca²⁺,

Ba^{2+} e Sr^{2+} em soluções aquosas, sofrem reticulação devido à ligação iônica entre cátions divalentes e os grupos carboxilatos (R-COO^-) dos alginatos.

Figura 5.61: Representação das unidades monoméricas dos alginatos.

Dependendo da composição e da distribuição seqüencial dos resíduos monoméricos na estrutura, os alginatos podem se precipitar ou formar hidrogéis¹²⁸.

Caracterização por fracionamento químico e ressonância magnética nuclear (RMN), juntamente com modelamento estatístico, mostrou que a ocorrência de G e M em moléculas de alginato é organizada em blocos e não de uma forma randômica (figura 5.62). A ligação química para a produção do hidrogel, está estritamente relacionada ao conteúdo de resíduo gulurônico, ou mais precisamente, ao comprimento dos blocos do monômero ácido gulurônico¹²⁹.

Figura 5.62: Representação da disposição monomérica em alginatos.

Hidrogéis obtidos a partir de copolímeros com grupos funcionais carboxílicos são passíveis de incorporação de drogas em seu retículo polimérico, além de outras aplicações bioativas^{129,130,131}.

O interesse em analisar o grau de intumescimento de hidrogéis originários de polieletrólitos de ácidos ou bases fracos se deve à dependência de sua acidez ou basicidade e em relação às variáveis que podem influenciar no grau de intumescimento (densidade de reticulação, pH, ação dos contra íons do ácido e a força iônica)^{132, 133, 134}.

O copolímero PVPMA possui em sua estrutura grupos carboxílicos; portanto, foi investigada uma possível reticulação com íons cálcio. Seguindo procedimento descrito em 4.3.3.3, soluções 8% de PVPMA em água destilada foram misturadas com uma solução CaSO_4 em deixada em repouso por 24 horas. Contudo, não se observou formação de gel.

A baixa quantidade de grupos carboxilatos no PVPMA é resultante da baixa incorporação de monômeros de metacrilato de metila, ou seja, 29,4% (tabela 5.14), e não da hidrólise, pois, como o resultado mostrado na tabela, o grau de hidrólise é relativamente alto (75%). Para que ocorra a reticulação deste sistema, é necessário que os grupos carboxilatos na cadeia polimérica estejam arranjados em bloco (“núcleos” de interação egg-box) de forma a ocorrer a ligação iônica com os íons Ca^{2+} (figura 5.63), visto que a reticulação das unidades monoméricas de ácido gulurônico em alginatos mostra-se dependente desta disponibilidade¹²⁹.

Figura 5.63: Figura esquemática da produção de hidrogéis de Alginato.

6. Conclusão

A reação de Fenton sabidamente gera radicais hidroxila através de reação redox entre peróxido de hidrogênio e íons ferrosos. A produção destes radicais em presença de poli(N-vinil-2-pirrolidona) gera um hidrogel de características similares àqueles produzidos por outras técnicas^{39,40}. Um grande diferencial, entretanto, se destaca neste caso que é o fato da gelificação ser bastante rápida, gerando o gel de forma quase "instantânea". Tal fato credita a este método um potencial de aplicação inédito.

As vantagens deste processo incluem desde a não necessidade de terceirização do processo para reticulação das membranas via radiação de alta energia, como é o caso das membranas Aqua-gel[®], além do fato de sua produção não exigir formatação fixa, podendo as mesmas atingir locais de difícil acesso como a região entre os dedos dos pés e mãos.

Embora o sistema Fenton seja dependente do pH da solução, a reação de Fenton processada em pH=7,0, próximo ao pH fisiológico, mostrou-se equivalente aos resultados obtidos em pH=2,5. Porém, o sistema mostrou-se dependente da razão entre as concentrações dos reagentes de Fenton, onde a razão ótima de $[H_2O_2]/[Fe^{2+}]$ se dá no intervalo entre 5 e 10 para a produção do hidrogel.

Hidrogéis de PVP mostraram absorver grande quantidade de água. Uma comparação entre os resultados obtidos por TG, infravermelho e DSC detectou, contudo, a existência de dois tipos diferentes de água: água livre e água de fronteira, onde a primeira é dependente da quantidade máxima de solvente que o hidrogel pode absorver. Por ser um hidrogel hidrofílico, devido à presença de grupos polares como amida e carbonila, o hidrogel no estado seco apresentou um conteúdo de água de fronteira fixo em torno de 15%. Esse valor mostra a existência de grande

quantidade de ligações de hidrogênio entre a água e as frações polares do hidrogel de PVP, visto que polímeros hidrofóbicos, como poli(dimetilsiloxano) e poli(acetato de vinila) estudados por Ping⁹⁵, apresentam, respectivamente, 0,9% e 3% de água.

Em relação à estrutura do hidrogel, a adição de sais mostrou-se responsável por algumas modificações estruturais, tais como: diminuição do conteúdo de gel, variação do grau de intumescimento e variação do tamanho de poro. Estas modificações mostraram ser dependentes do raio iônico dos íons adicionados. Dentre os sais estudados, os sais de sódio apresentaram um comportamento cosmotrópico, visto sua tendência em aumentar a estruturação da água no hidrogel, resultando em aumento do grau de intumescimento. Estes são resultados preliminares que precisam ser confirmados com o estudo de um maior número de íons, para que se possa analisar o real comportamento do hidrogel frente a íons da série de Hofmeister.

Os hidrogéis de PVP produzidos via reação de Fenton apresentaram em sua estrutura diferentes tipos de poros: um aqui denominado “nanoporo”, com diâmetros da ordem de dezenas de nanômetros, e outro tipo denominado “microporo”, o qual deve ser formado por processo de separação de fase durante a produção do hidrogel e apresenta diâmetros da ordem de unidades de microns. Estes microporos, contudo, apresentam uma morfologia onde, aparentemente, não há interligação entre os mesmos. O processo de difusão através dos nanoporos, entretanto, seria o responsável pelo transporte lento de solutos e gases através da rede polimérica, conferindo a estes materiais a possibilidade de sua aplicação em um grande número de dispositivos.

É sabido que o poli(N-vinil-2-pirrolidona) complexa-se com íons metálicos. Análises dos espectros Raman, IV e UV detectaram que os hidrogéis de PVP

apresentam fraca complexação com Fe^{3+} . A complexação, mesmo que fraca, atribui ao gel uma propriedade e grande importância na área de curativos, como por exemplo a introdução de compostos imidazol-prata, que apresentam atividade antimicrobiana¹³⁵, e sua utilização como auxiliador no processo de cicatrização.

A utilização de reação de Fenton para a reticulação de PVP mostrou-se uma ótima alternativa de produção de hidrogel, porém por se tratar de um processo altamente oxidativo, a mesma não é apropriada para reticulações *in situ*, em situações sensíveis a este processo. Na tentativa de encontrar metodologias mais brandas de reticulação de PVP, foram produzidos copolímeros de N-vinil-2-pirrolidona na presença de monômeros reativos, os quais seriam responsáveis pelas reticulações.

A partir de um copolímero de N-vinil-2-pirrolidona e acroleína foi obtido um hidrogel com quitosana, através da produção de ligações imina entre os mesmos. A redução das ligações imina a aminas com cianoborohidreto mostrou ser uma alternativa de estabilização da estrutura do hidrogel. Isto demonstra que o equilíbrio dinâmico de condensação entre resíduos dos dois polímeros pode ser um parâmetro controlável e, ao mesmo tempo, uma propriedade interessante que pode ser explorada. Além disso, este hidrogel tem um potencial uso como curativos e sistemas para liberação controlada de drogas, devido à compatibilidade do PVP com o organismo, adicionado às propriedades da quitosana de ligante e aglutinante^{136,137}, fungicida¹³⁸, boa permeabilidade a gás, compatibilidade imunogênica, baixa toxicidade e boa bioabsorção¹³⁹.

Ainda visando reticulações por via mais brandas, tentou-se produzir hidrogéis a partir do PVPVAL e PVPMA. Em ambos os casos, a produção do hidrogel mostrou-se dependente da incorporação monomérica de acetato de vinila e

metacrilato de metila, respectivamente, e sua subsequente hidrólise a álcool vinílico e ácido metacrílico.

No caso do PVPVAL, a baixa quantidade monômeros de álcool vinílico nas posições 1,3, responsáveis pela reticulação com grupos aldeídos e/ou complexação com grupos boratos, foi responsável pela não produção do hidrogel.

Para o PVPMA, a baixa disponibilidade de grupos carboxilatos arranjados em bloco foi a responsável para que não houvesse formação de ligação iônica entre estes grupos e o Ca^{2+} e conseqüentemente reticulação do polímero.

7. Anexos

7.1. Anexo I

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO ADOLFO LUIZ
SEÇÃO DE CULTURAS CELULARES
Av. Dr. Arnaldo, 355 - São Paulo - SP - CEP: 01246-902
Telefone: 0xx (11) 3068-2910

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*
(REATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*)
METODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

LINHAGEM CELULAR: NCTC Clone 929, células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1) são semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio 2x concentrado e ágar com vermelho neutro. As amostras são colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24 horas. Observa-se macro e microscopicamente o índice de zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras são testadas em quadruplicatas em placas separadas.

IZ	DESCRIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
0	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5- 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Amostras sólidas: são colocadas diretamente sobre o meio de cobertura.

Amostras em pó: são colocadas dentro de 1 cilindro fixado sobre o meio de cobertura

Amostras líquidas: disco de papel de filtro atóxico são embebidos com a amostra e colocados sobre o meio de cobertura.

Amostras submetidas à extração: A relação da área de superfície do material e o volume do veículo de extração não deve ser maior que 6cm²/ml e menor do que 0,5cm²/ml. Quando a superfície da amostra for indeterminada pesar de 0,1 - 0,2g/ml. Os veículos de extração utilizados são: solução salina ou óleo de semente de algodão. As condições de extração recomendadas são 37°C-24hs, 50°C-72hs ou 70°C-24hs. Embeber o extrato em discos de papel de filtro e colocar sobre o meio de cobertura.

Controle positivo: fragmento de 0,5cm x 0,5cm de látex tóxico

Controle negativo: discos de papel de filtro atóxico com 0,5cm de diâmetro

Bibliografia: ASTM F895-84:1984-Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity
ISO 10993.5:1992-Biological evaluation for medical devices tests for cytotoxicity: *in vitro* methods
US Pharmacopéia XXV, 2002-Biological reactivity tests *in vitro*

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO*
(REATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*)

Requisitante: Instituto de Química da USP

Endereço: Av. Lineu Prestes, 748 bloco 11 inferior – São Paulo-SP

A/C: Luiz Henrique Catalani

Amostra Teste: nº 2671 - Livro teste VII - pag. 20

Descrição da Amostra: Hidrogel à base de PVP usado como curativo

ANÁLISE DE ORIENTAÇÃO nº: 5.228/03

PROCESSO nº: 2.984 (14.05.03)

AMOSTRA	ÍNDICE DE ZONA OBTIDO APÓS A LEITURA DAS PLACAS DE CULTURAS CELULARES			
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
	IZ	IZ	IZ	IZ
Hidrogel à base de PVP usado como curativo	0	0	0	0
- Controle Negativo	0	0	0	0
- Controle Positivo	4	4	4	4

Estes resultados têm valor restrito à amostra analisada, sendo vedado seu uso para fins de propaganda.

CONCLUSÃO: A amostra nº 2671 quando testada não apresentou nenhum efeito tóxico, sob e ao redor da amostra, para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1).

São Paulo, 02 de junho de 2003.

Dr.ª Aurea Silveira Cruz
Chefe da Seção de
Culturas Celulares-IAL
CRB 00544/84

7.2. Anexo II

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
Av. Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 26/05/2003

Hora: 16:44:28

Via: 1

Laudo de Análise 5226.00/2003

Número do Protocolo: BQ 2984/03

Modalidade de Análise: ORIENTAÇÃO

Programa: OUTROS

Nome do Produto: HIDROGEIN A BASE DE PVP

Número do Lote: NÃO CONSTA

Registro: NÃO CONSTA

Detentor: NÃO CONSTA

Logradouro: NÃO CONSTA

País: BRASIL

Local de Coleta: INSTITUTO DE QUÍMICA/USP

Requerente: PESSOA FÍSICA

Pessoa de Contato: O MESMO

Documento: S/Nº

Data de Entrada: 14/05/2003

Descrição da Amostra: ACONDICIONADA EM FRASCO PLÁSTICO
AMOSTRA 01
SOLICITANTE: LUIZ HENRIQUE CATALANI

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENAÇÃO DOS INSTITUTOS DE PESQUISA
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
DIVISÃO DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA
Av. Dr. Arnaldo, 355 - 01246-902 - São Paulo-SP Tel/Fax: (11) 3068.2800/3062.5363

Data: 26/05/2003

Hora: 16:44:28

Via: 1

Laudo de Análise 5226.00/2003

Unidade Analítica: SEÇÃO DE COSMÉTICOS E PRODUTOS DE HIGIENE

Nome do Ensaio: Irritação dérmica primária

Referência: DRAIZE (MANUAL INCQS/ FIOCRUZ)

Valor de Referência: Valor do índice de irritação dérmica para resultados satisfatórios: (0,0 - 0,9)

Resultado: Índice de irritação cutânea- I= 0,5- não irritante.
(Verificação da ação irritante local em coelhos, durante 24 e 72 horas com uma única aplicação na pele dorsal depilada de seis coelhos).

Conclusão: SATISFATÓRIO

Estes resultados têm valor restrito à amostra analisada, sendo vedado seu uso para fins de propaganda.

Conclusão: SATISFATÓRIA

Complemento da Conclusão: O produto foi considerado satisfatório quanto ao teste realizado.

Em, 23/05/2003

Vera Regina Rossi Lemes
Diretora Substituta Serviço de Química Aplicada
Divisão de Bromatologia e Química
Instituto Adolfo Lutz
ODAIR ZENEBON
Diretor-Divisão de
Bromatologia e Química
RG 2.679.306

7.3. Anexo III: Determinação da concentração de peróxido de hidrogênio

A concentração da solução estoque de H_2O_2 foi medida segundo a literatura¹⁴⁰, a partir de sua absorção no UV-vis no espectrômetro Multispec 1501 (Shimadzu), usando o coeficiente molar de extinção em 240nm como $43,6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, realizado a temperatura ambiente.

7.4. Anexo IV: Efeito dos solventes D_2O e H_2O no infravermelho da PVP

Embora hidrogênio e deutério possuam características químicas idênticas, diferem entre si em relação à massa atômica. O deutério tem uma massa atômica duas vezes maior que o hidrogênio. Com isso, a força da ligação de hidrogênio entre $\text{C}=\text{O}-\text{D}$ é maior que a da ligação $\text{C}=\text{O}-\text{H}$. A diferença de energia de ligação se deve ao fato que a ligação $\text{C}=\text{O}-\text{D}$ possuir uma energia de vibração do ponto zero mais baixa do que a ligação $\text{C}=\text{O}-\text{H}$.

A energia de vibração zero (E_0) depende da constante de força da vibração associada e da massa reduzida m ; portanto E_0 é menor para a ligação $\text{C}=\text{O}-\text{D}$ que para a ligação $\text{C}=\text{O}-\text{H}$ e, conseqüentemente, a energia de dissociação da ligação $\text{C}=\text{O}-\text{D}$ ($D_{\text{C}=\text{O}-\text{D}}$) é maior que a energia de dissociação da ligação $\text{C}=\text{O}-\text{H}$ ($D_{\text{C}=\text{O}-\text{H}}$).

$$E_0 = \frac{1}{2} h \nu = \frac{h}{4\pi} \sqrt{\frac{h(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}}$$

com:

$$\mu = \frac{m_1 m_2}{m_1 + m_2}; \quad E_0 = \frac{h}{4\pi} \sqrt{\frac{K}{\mu}}.$$

Figura 1: Diagrama de energia potencial para a ligação C=O-H e C=O-D.

A energia de ativação para a quebra da ligação de hidrogênio C=O-D é mais alta do que a quebra da ligação de hidrogênio C=O-H.

Figura 2: Diagrama da energia potencial da quebra da ligação de hidrogênio C=O-D e C=O-H.

8. Referências Bibliográficas

- ¹ Dumitriu S., *Polymeric Biomaterials*, Marcel Dekker, Inc., New York (1996).
- ² Peppas N.A., Huang Y., Torres-Lugo M., Ward J.H., Zhang J., "Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology". *Annu Rev. Biomed. Eng.* **2**: 9-29 (2000).
- ³ Wichterle O., e Lim D., "Hydrophilic gels for biological uses". *Nature*, **185**: 117-118 (1960).
- ⁴ Shenoy V.e Rosenblatt J., "Diffusion of Macromolecules in Collagen and Hyaluronic Acid, Rigid-Rod-Flexible Polymer, Composite Matrices". *Macromolecules*, **28(26)**: 8751-8758 (1995).
- ⁵ Sherwood J.K., Zeitlin L., Whaley K.J., Cone R. A, Saltzman M., "Controlled release of antibodies for long-term tropical passive immunoprotection of female mice against genital herpes". *Nature Biotechnology*, **14(4)**: 468-471, (1996).
- ⁶ Gatenholm P., Michalek J., Vacik J., "Synthesis and characterization of highly wettable hydrogel coatings for immobilization of marine bacteria." *Macromol. Symp.*, **109**: 127-133 (1996).
- ⁷ Barcellos I.O., Katine I.A., Soldi V., Pires A.T.N., "Influência do Comonômero e do Método de Polimerização na Cinética de Liberação de Fenobarbitona a partir de Hidrogéis". *Polímeros: Ciência e tecnologia*, **10(2)**: 110-115 (2000).
- ⁸ Kim J. H., Lee S.B., Kim S.J., Lee Y.M., "Rapid temperature/pH response of porous alginate-g-poly(Nisopropylacrylamide) hydrogels ". *Polymer*, **43**: 7549-7558 (2002).
- ⁹ Jeong B., Kim S.W., Bae Y. H., "Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54(11)**: 37-51 (2002).
- ¹⁰ Katono H., Maruyama A., Sanui K., Ogata N., Okano T., Sakurai Y. "Thermoresponsive swelling and drug release switching of interpenetrating polymer networks composed of poly(acrylamide-co-butyl methacrylate) and poly(acrylic acid)." *J. Control Release*, **16(1-2)**: 215-227 (1991).
- ¹¹ Kashyap N., Kumar N., Kumar R. "Smart gels for drug delivery applications". *Drug Delivery Technology*, **4(7)**: 32-39 (2004).

-
- ¹² Wokalek H., Run H., *Proceeding of Wound Dressing*. John Radcliffe Hospital, Oxford, 125-132 (1983).
- ¹³ Charlesby A., Alexander P., "Reticulation of polymers in aqueous solution by γ -rays". *J. Chimie. Physique et de Physico-Chimie Biologique*. **52**: 699–709 (1955).
- ¹⁴ Chapiro A., Legris C. "Formation de gels de poly(N-vinylpyrrolidone) par l'action des rayons gamma sur des solutions aqueuses de poly(N-vinylpyrrolidone)." *Eur. Polym. J.*, **21(1)**: 49–53 (1985).
- ¹⁵ Chapiro A. e Legris C., "Gel formation in the radiolysis of poly(N-vinylpyrrolidone)". *Radiat. Phys. Chem.*, **28 (2)**: 143–144 (1986).
- ¹⁶ Hilmy N., Darwis D., Hardiningsih L. "Poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels. 2. Hydrogel composites as wound dressing for tropical environment". *Radiat. Phys. Chem.*, **42(4-6)**: 911-914 (1993).
- ¹⁷ Kaplan H. e Güner A., "Swelling Behavior of Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) and Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/K₂S₂O₈ Hydrogels in Urea Solutions". *Advances in Polymer Technology*, **19(3)**: 210–217 (2000).
- ¹⁸ Yu H., Xu X., Chen X., Hao J., Jing X., "Medicated Wound Dressings Based on Poly(vinyl alcohol)/Poly(N-vinyl pyrrolidone)/Chitosan Hydrogels". *Journal of Applied Polymer Science*, **101**: 2453-2463 (2006).
- ¹⁹ Lopes C.M.A. e Felisberti M.I., "Mechanical behaviour and biocompatibility of poly(1-vinyl-2-pyrrolidinone)–gelatin IPN hydrogels " *Biomaterials*, **24**: 1279-1284 (2003).
- ²⁰ El-Rehim H.A., Hegazy E.A., Khalil F.H., Hamed N.A., "Radiation preparation of drug carriers based polyacrylic acid (PAAc) using poly(vinyl pyrrolidone) (PVP) as a template polymer". *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, **254**: 105-112 (2007).
- ²¹ Ravichandran P., Shantha K.L., Rao P., "Preparation, swelling characteristics and evaluation of hydrogels for stomach specific drug delivery". *Int. J. Pharm.*, **154**: 89-94 (1997).
- ²² Gaur U., Sahoo S.K., De T.K., Ghosh P.C., Maitra A., Ghosh P.K., "Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system". *International Journal of Pharmaceutics* **202**: 1–10 (2000).

-
- ²³ Guowei D., Adriane K., Chen X.Z., Jie C., Yinfeng L., "PVP magnetic nanospheres: Biocompatibility, in vitro and in vivo bleomycin release". *International Journal of Pharmaceutics*, **328**: 78-85 (2007).
- ²⁴ Yu H., Xu X., Chen X., Lu T., Zhang P., Jing X., "Preparation and Antibacterial Effects of PVA-PVP Hydrogels Containing Silver Nanoparticles". *Journal of Applied Polymer Science*, **103**:125-133 (2007).
- ²⁵ Kharlampieva E., Erel-Unal I., Sukhishvili S.A., "Amphoteric Surface Hydrogels Derived from Hydrogen-Bonded Multilayers: Reversible Loading of Dyes and Macromolecules". *Langmuir*, **23**: 175-181 (2007).
- ²⁶ Prasad K., Mehta G., Meena R., Siddhanta A.K. "Hydrogel-Forming Agar-graft-PVP and k-Carrageenan graft-PVP Blends: Rapid Synthesis and Characterization". *Journal of Applied Polymer Science*, **102**: 3654-3663 (2006).
- ²⁷ Güven O. e Sem M. "Preparation and characterization of poly(n-vinyl 2-pyrrolidone) hydrogels". *Polymer*, **32(13)**: 2491-2495 (1991).
- ²⁸ Çaykara T. e Kantoglu O. "Thermal behavior and network structure of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone-crotonic acid) hydrogels prepared by radiation-induced polymerization". *Polym. Adv. Technol.*, **15**:134–139 (2004).
- ²⁹ Bajpai S.K., Dubey S., Saxena S., "Flow Through Diffusion Cell Method: A Better Approach to Study Drug Release Behavior as Compared to Traditional Dissolution Test Method". *Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry*, **43**: 627-636 (2006).
- ³⁰ Devine D.M., Devery S.M., Lyons J.G., Geever L.M., Kennedy J.E., Higginbotham C.L., "Multifunctional polyvinylpyrrolidinone-polyacrylic acid copolymer hydrogels for biomedical applications ". *Int. J. Pharm.*, **326**: 50-59 (2006).
- ³¹ Chen K.S, Ku Y., Lin H., Yan T., Sheu D., Chen T., Lin F. "Preparation and characterization of pH sensitive poly(N-vinyl-2-pyrrolidone/itaconic acid) copolymer hydrogels". *Materials Chemistry and Physics*. **91**: 484–489 (2005).
- ³² Lopérgolo L.C., Lugão A.B., Catalani L.C. "Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels". *Polymer*. **44**: 6217–6222 (2003).

-
- ³³ Purna S.K., Babu M., "Collagen based dressings. a review". *Burns*. **26**: 54-62 (2000).
- ³⁴ Gokoo C., Burhop K.A. "A comparative study of wound dressings on full thickness wounds in micropigs". *Decubitus. Sep.* **6(5)**: 42-46 (1993).
- ³⁵ Ratner B .D., Hoffman A.S.; Schoen F. J., Lemons J.E., *Biomaterials science— An introduction to materials in medicine*. Academic Press, London, 484 (1996).
- ³⁶ Nicolosi J. G., Moraes A. M., VI Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Biomateriais destinados à terapia de queimaduras: Estudo entre o custom e o potencial de efetividade de curativos avançados.
- ³⁷ Rosiak J., *Hydrogel Dressings*. In: Clough R.C., Shalab S.W., *Radiation Effects on Polymers*, Washington. D.C: ACS. Books, **475**: 271-299 (1991).
- ³⁸ *Encyclopedia Polymer Science and Engeneering. Hydrogel*, New York. N.Y.: Wiley Interscience. **17**: 783-806 (1992).
- ³⁹ Lopérgolo L.C., Lugão A.B., Catalani L.C. "Direct UV photocrosslinking of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP) to produce hydrogels". *Polymer*. **44**: 6217–6222 (2003).
- ⁴⁰ Fecchine G. J. M., Barros J.A.G., Catalani L.H." Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogel production by ultraviolet radiation: new methodologies to accelerate crosslinking.". *Polymer*. **45**: 4705–4709 (2004).
- ⁴¹ Oliveros E., Legrini O., Hohl M., Muller T., Braun A.M., "Industrial waste water treatment: large scale development of a light-enhanced Fenton reaction". *Chem. Eng. Proc.* **36**: 397-405 (1997).
- ⁴² Goldstein S., Meyerstein D., "Comments on the Mechanism of the "Fenton-Like" Reaction". *Acc. Chem. Res.* **32(7)**: 547 (1999).
- ⁴³ Kremer M.L. "The Fenton reaction dependence of the rate on pH". *J. Phys. Chem. A*. **107**: 1734-1741 (2003).
- ⁴⁴ Neyens E., Baeyens J., "A review of Classic Fentons"s peroxidation as an advanced oxidation technique". *Journal of Hazardous Materials B*. **98**: 33-50 (2003).
- ⁴⁵ Sun Y., Pignatello J.J. "Photochemical reactions involved in the total mineralization of 2,4 D by $\text{Fe}^{3+}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ ". *Environ. Sci. Technol.* **27**: 304-310 (1993).

-
- ⁴⁶ Walling C. "Intermediates in the reactions of fenton type reagents". *Acc. Chem. Res.* **31**: 155-157 (1998).
- ⁴⁷ Kwon B.G., Lee D.S., Kang N., Yoon J., "Characteristics of p-chlorophenol oxidation by Fenton's reagent". *Wat. Res.* **33(9)**: 2110-2118 (1999).
- ⁴⁸ Walling C. "Fenton's reagent revisited ". *Accts of Chem. Res.*, **8**: 125-131 (1975).
- ⁴⁹ Peppas N.A., Barr-Howell B.D.. In: Peppas N.A., editor. "Characterization of the cross-linked structure of hydrogels". *Hydrogels in medicine and pharmacy*, **vol. 1**. Boca Raton: CRC Press; 27-56 (1986).
- ⁵⁰ Brandrup J., Immergut E.H., *Polymer Handbook*, New York, N.Y.: John Wiley & Sons (1989).
- ⁵¹ El -Salmawi K.M., El-Naggar A.M., Said H.M., Zahran A.H., "Graft Copolymers of Polypropylene Films. 1. Radiation-induced Grafting of Mixed Monomers". *Polymer International*, **42**: 225-234 (1997).
- ⁵² Peppas N.A, *Hydrogels in medicine and Pharmacy*, v.I, CRC Press, 27-56 (1998). Peppas N.A., Barr-Howell B.D.. In: Peppas N.A., editor. "Characterization of the cross-linked structure of hydrogels". *Hydrogels in medicine and pharmacy*, **vol. 1**. Boca Raton: CRC Press; 27-56 (1986).
- ⁵³ Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H., "Hydrogels in pharmaceutical formulations". *Euro. Jour. Pharm. Biophar.*, **50**: 27-46 (2000).
- ⁵⁴ Rosiak J.M., Olejniczak J., "Medical Application of radiation formed hydrogels". *Radiat. Phys. Chem.* **42(4-6)**: 903-906 (1993).
- ⁵⁵ Ito K., Ujihira Y., Yamashita T., Horie K., "Temperature dependence of free volume of polyacrylamide gels studied by positron lifetime measurements". *Rad. Phy.Chem.* **58**: 521-524 (2000).
- ⁵⁶ Hoffman A.S. "Hydrogels for biomedical applications" *Advanced Drug delivery Reviews.* **43**: 3-12 (2002).
- ⁵⁷ Chiellini F., Petrucci F., Ranucci E. & Solaro R., in *Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics* (eds. Chiellini, E., Sunamoto, J., Migliaresi, C., Ottenbrite, R. M. & Cohn, D.) 63-74 (Kluwer, New York, 1999).

-
- ⁵⁸ Ruiz J., Mantecón A., Cádiz V., "States of Water in Poly(vinyl alcohol) Derivative Hydrogels". *J. Polym. Sci.: Part B: Polymer Physics*. **31**: 1462-1467 (2003).
- ⁵⁹ Xiang Y.Q., Zhang Y., Chen D.J. "Novel dually responsive hydrogel with rapid deswelling rate." *Polym. Int.* **55**: 1407–1412 (2006).
- ⁶⁰ Lin S.Y., Wang S.L., Wei Y.S., Li M.J. "Temperature effect on water desorption from methylcellulose .Films studied by thermal FT-IR microspectroscopy". *Surface Science* **601**: 781–785 (2007).
- ⁶¹ Li C.X., Park B., Kim J.S., Lee H., "A new generalized model for predicting the density of single- and mixed-electrolyte solutions ". *Fluid Phase Equil.*, **145**: 1-14 (1998).
- ⁶² Stilingier F. H., "Water Revisited". *Science*, **209**: 451-457 (1980).
- ⁶³ <http://www.sbu.ac.uk/water/hofmeister.html>
- ⁶⁴ Kropman M. F., Bakker H. J., "Shells Dynamics of Water Molecules in Aqueous Solvation". *Science*, **241**: 2118-2120 (2001).
- ⁶⁵ Muller N., *J. Solution Chem.*, **17**: 661-672 (1988).
- ⁶⁶ Israelachvili J. N., McGuiggan P. M., "Forces between surfaces in liquids". *Science*, **241**: 795-800 (1988).
- ⁶⁷ Friedman H. L., Krishnan C. V., in F. Franks (Ed), "*Water A comprehensive treatise*", Vol. 3, Plenum Press, New York, (1973).
- ⁶⁸ Macosko C.W., *Rheology Principles, Measurements and Application*, Wiley-VCH, New York (1994).
- ⁶⁹ Leblanc J. L., - "Rhéologie des Élastomères et Mise en Oeuvre des Polymères", Artel, Belgique (1996).
- ⁷⁰ Ward I.M., Hadley D.W., "*An Introduction to the Mechanical Properties of Solid Polymers*", John Wiley & Sons, 2nd Edition, Chapter 3 (1993).
- ⁷¹ Chung J.T., Vlugt-Wensink K.D.F., Hennink W.E., Zhang Z., *International Journal of Pharmaceutics*, **288(59)**: 51-61 (2005).

-
- ⁷² Perrin, D.D., Armarego, W.L.F., “*Purifications of Laboratory Chemicals*”, Pergamon Press, 4^a ed. (1998).
- ⁷³ Korsmeyer R.W. and Peppas N.A., “Effect of the morphology of hydrophilic polymer matrices on the diffusion and release of water soluble drugs”. *J.Membr. Sci.* **9**: 211-227 (1981).
- ⁷⁴ Hassan C.M. and Peppas N.A., “Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods”. *Advances in Polymer Science*, **153**: 37-65 (1999).
- ⁷⁵ Kasaai M.R., Arul J., Charlet G., “Intrinsic Viscosity–Molecular Weight Relationship for Chitosan”. *J.Poly. Sci.: Part B: Poly. Phys.* **38**: 2591-2598 (2000).
- ⁷⁶ Struszczyk H., “Microcrystalline chitosan. I. Preparation and properties of microcrystalline chitosan”. *J.Appl. Poly. Sci.* **33(1)**: 177-189 (1987).
- ⁷⁷ Santos J.E., Soares J.P., Dockal E.R., Campana Filho S.P., Cavaleiro E.T.G., “Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens”. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. **13(4)**: 242-249 (2003).
- ⁷⁸ Yoshii F., Makuuchi K., Darwis D., Iriawan T., Razzak M.T., Rosiak J.M., “Heat resistance poly(vinyl alcohol) hydrogel”. *Radiat. Phys. Chem.*, **46(2)**: 169-174 (1995).
- ⁷⁹ Freshney R. I., *Animal cell culture - A practical approach*, IRL Press (1989).
- ⁸⁰ Ciapetti G., Granchi D., Verri E., Savarino L., Cavedagna D., Pizzoferrato A., “Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials”. *Biomaterials*, **17**: 1259-1264 (1996).
- ⁸¹ Rosiak JM, Rucinska-Rybus A, Pekala W. US Patent No 4,871,490, (1989).
- ⁸² Savva, M., Torchilin, V.P., Huang, L., “PVP: a “pretender” molecule”. *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* **25**: 134–135 (1998).
- ⁸³ Robinson, B.V., Sullivan, F.M., Borzelleca, J.F., Schwartz, S.L., 1990. *Storage of PVP in Humans: A Critical Review of the Kinetics and Toxicology of Polyvinylpyrrolidone(Povidone)*. Lewis, USA, pp. 85–103.

-
- ⁸⁴ Barros J.A.G., Fachine G.J.M., Alcantara M.R., Catalani L.H., "Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) hydrogels produced by Fenton reaction". *Polymer*, **47**: 8414-8419 (2006).
- ⁸⁵ Carey F.A., Sundberg R.J., "Advanced Organic Chemistry – Part A: Structure and Mechanisms", 3ª edição, Plenum Press, New York (1993).
- ⁸⁶ Ciapetti G, Granchi D, Verri E, Savarino L, Cavedagna D, Pizzoferrato A. "Application of a combination of neutral red and amido black staining for rapid, reliable cytotoxicity testing of biomaterials". *Biomaterials*; **17(13)**: 1259–64 (1996).
- ⁸⁷ International Organization for Standardization. Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for cytotoxicity:in vitro methods. ISO 10993 (1992).
- ⁸⁸ Draize J.H. "Dermal toxicity in appraisal of the safety of chemicals in foods, drugs and cosmetics." Association of Food and Drug Officials of the United States,Austin, Texas, (1959).
- ⁸⁹ Manual of quality—INCQS/RJ. Quality Health Control National Institute/Rio de Janeiro, Brazil. POP (standard operational procedure) # 653330.003. Primary skin irritation assay (1999).
- ⁹⁰ American Society for Testing and Materials. Standard practice for testing biomaterials in rabbits for primary skin irritation. ASTM F 719–81 (1996).
- ⁹¹ Stenekes R.J.H., Smedt S.C., Demeester J., Sun G., Zhang Z., Hennink E.E., "Pore sizes in hydrated dextran microspheres". *Biomacromolecules*. **1**: 696-703 (2000).
- ⁹² Dušek K., "Phase separation during the formation of three-dimensional polymers". *J. Poly. Sci. Part C*. **16**: 1289-1299 (1967).
- ⁹³ Dušek K. e Sedláček B., "Structure and properties of hydrophilic polymers and their gels. XI. Microsyneresis in swollen poly (ethylene glycol methacrylate) gels induced by changes of temperature". *Coll. Czechoslov. Chem. Commun.***34**: 136-157 (1969).
- ⁹⁴ Venyaminov S.Y. e Prendergast F.G. "Water (H₂O and D₂O) Molar Absorptivity in the 1000–4000 cm⁻¹ Range and Quantitative Infrared Spectroscopy of Aqueous Solutions." *Analytical Biochemistry*, **248**: 234–245 (1997).
- ⁹⁵ Ping Z.H., Nguyen Q.T., Chen S.M., Zhou J.Q., Ding Y.D. "States of water in different hydrophilic polymers- DSC and FTIR studies." *Polymer*, **42**: 8461-8467 (2001).

-
- ⁹⁶ Ataman M., "Properties of aqueous salt solutions of poly(ethylene oxide). Clouds points, θ temperatures". *Colloid. Polym. Sci.* **265(1)**: 19–25 (1987).
- ⁹⁷ Ataman M., "Solution properties of poly(ethylene oxide) as determined by viscosimetric measurements in aqueous salt solutions". *J. Macromol. Sci. Chem.* **A24(8)**: 967–976 (1987).
- ⁹⁸ Güner A., Ataman M., "Effects of inorganic salts on the properties of aqueous poly(vinylpyrrolidone) solutions". *Colloid. Polym. Sci.* **272(2)**: 175–180 (1994).
- ⁹⁹ Güner A. "Properties of aqueous salt solutions of polyvinylpyrrolidone. 1. Viscosity characteristics". *J. Appl. Polym. Sci.* **62**: 785–788 (1996).
- ¹⁰⁰ Güner A., Ataman M., "Properties of Aqueous Salt solutions of poly(vinylpyrrolidone): II. polymer dimensions and thermodynamic quantities ". *Polym. Int.* **44**: 30–34 (1997).
- ¹⁰¹ Takano M., Ogata K., Kawauchi S., Satoh M., Komiyama J., "Ion-specific swelling behavior of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) gel: Correlations with water hydrogen bond and non-freezable water". *Polym. Gels Networks*, **6**: 217-232 (1999).
- ¹⁰² Liu Q., Hedberg E.L., Liu Zewen, Bahulekar R., Meslenyi R.K., Mikos A.G., "Preparation of macroporous poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels by enhanced phase separation". *Biomaterials*. **21(2)**: 2163-2169 (2000).
- ¹⁰³ Muta H., Miwa M., Satoh M., "Ion-specific swelling of hydrophilic polymer gels". *Polymer*. **42(14)**: 6313-6316 (2001).
- ¹⁰⁴ Rzaev Z.M.O., Salamova U.U., Altindal S., Masimov A.A., "Effect of inorganic salts on the main parameters of the dilute aqueous poly(vinylpyrrolidone) solutions". *Polymer*. **37(12)**: 2415-2421 (1995).
- ¹⁰⁵ Jiang Z., Chen F., Yang H., Guan Y., "Hydrogen bonded structure of water and aqueous solutions of sodium halides: a Raman spectroscopic study". *J. Mol. Struct.* **707**: 83-88(2004).
- ¹⁰⁶ Earnshaw A.; *Chemistry of the Elements*, 2nd Edition, Elsevier, New York (1997).
- ¹⁰⁷ Lahiri S., Sarkar S., "Separation of iron and cobalt using ⁵⁹Fe and ⁶⁰Co by dialysis of polyvinylpyrrolidone–metal complexes: A greener approach". *Applied Radiation and Isotopes*. **65**: 387–391 (2007).

-
- ¹⁰⁸ Liu M., Yan X., Liu H., Yu W., "An investigation of the interaction between polyvinylpyrrolidone and metal cations". *React.Func.Poly.* **44**: 55-64 (2000).
- ¹⁰⁹ Maturana H.A., Peric I.M., Pooley S.A., Rivas B.L. "Poly(Nvinylpyrrolidone) as metal ion liquid-liquid extractant". *Polym. Bull.* **45**: 425-429 (2000).
- ¹¹⁰ Tokman N., Akman S., Ozeroglu C., "Determination of lead, copper and manganese by graphite furnace atomic absorption spectrometry after separation/concentration using a water-soluble polymer". *Talanta* **63**: 699 (2004).
- ¹¹¹ Biedermann H.G.; Graf W.; "Reactions of metal carbonlys with poly-1-vinyl-2-pyrrolidone". *Zeits. Natur.* **30B**: 226-228 (1975).
- ¹¹² Wuepper J.L., Popov A.I., *J. Am. Chem. Soc.* **91**: 4352-4356 (1969).
- ¹¹³ Biedermann H.G.; Graf W.; "Reactions of metal carbonlys with poly-1-vinyl-2-pyrrolidone". *Zeits. Natur.* **30B**: 226-228 (1975).
- ¹¹⁴ de Faria D.L.A., Gil H.A.C., de Queiróz A.A.A., "The interaction between polyvinylpyrrolidone and I₂ as probed by Raman spectroscopy" *Journal of Molecular Structure*, **478**: 93-98 (1999).
- ¹¹⁵ Quagliano J.V., Vallarino L.M. "Química."- Editora Guanabara, 3ª edição (1973).
- ¹¹⁶ Mark-Bikalis- Overberger-Menses, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, **17**, 2nd Edition (1989).
- ¹¹⁷ <http://en.wikipedia.org/wiki/Molbank> (acessado em 2004).
- ¹¹⁸ Moreira Jr., P.F. *Dissertação de mestrado*: "Géis Covalentes de Quitosana com Poli (etilenoglicol)". São Paulo (1997).
- ¹¹⁹ Muzzarelli R.A.A., Lovch C., Emanuelli M., "The molecular weight of chitosans studied by laser light scattering". *Carbohydrate Research.* **164**: 433-442 (1987).
- ¹²⁰ Torres M.A., Beppu M.M., Santana C.C., Arruda E.J. "Viscous and viscoelastic properties of chitosan solutions and gels". *Braz. J. Food Technol.* **9(2)**: 101-108 (2006).
- ¹²¹ Kurita K., Mori S., Nishiyama Y., Harata M. "N-Alkylation of chitin and some characteristics of the novel derivatives". *Polymer Bulletin* **48**: 159-166 (2002).

-
- ¹²² Hassan C.M. and Peppas N.A., "Structure and applications of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods". *Advances in Polymer Science*, **153**: 37-65 (1999).
- ¹²³ Finch C.A., Poly (vinyl alcohol): properties and applications, Wiley, New York (1973).
- ¹²⁴ Bai Y.X., Qian J.W., Sun H.B., An Q.F. "Dilute solution behavior of partly hydrolyzed poly(vinyl acetate) in selective solvent mixtures and the pervaporation performance of their membranes in benzene/cyclohexane separation." *Journal of Membrane Science*, **279**: 418-423 (2006).
- ¹²⁵ Sinton S.W., "Complexation Chemistry of Sodium Borate with Poly(vinyl alcohol) and Small Diols. A ¹¹B NMR Study". *Macromolecules*, **20**: 2430-2441 (1987).
- ¹²⁶ Sinton S.W., "Complexation chemistry of sodium borate with poly(vinyl alcohol) and small diols. A ¹¹B NMR study". *Macromolecules*, **20**: 2430-2441 (1987).
- ¹²⁷ Hassan C.M., e Peppas N.A., "Structure and morphology of freeze/thawed PVA hydrogels". *Macromolecules*, **33**: 2472-2479 (2000).
- ¹²⁸ Kikuchi A., Okano T., "Pulsatile drug release control using hydrogels". *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **54**: 53-77 (2002).
- ¹²⁹ Park K.H., Na K., "Conjugation of Arg-Gly-Asp sequence into thermo-reversible gel as an extracellular matrix for 3T3-L1 fibroblast cell culture". *Biotechnol. Lett.*, **22**: 1553-1556 (2000).
- ¹³⁰ Irvine D.J., Mayes A.M., Griffith L.G., "Nanoscale clustering of RGD peptides at surfaces using comb polymers. 1. Synthesis and characterization of comb thin films". *Biomacromolecules*, **2**: 85-94 (2001).
- ¹³¹ Jo S., Engel P.S., Mikos A.G., "Synthesis of poly(ethylene glycol)-tethered poly(propylene fumarate) and its modification with GRGD peptide". *Polymer*, **41**: 7595-7604 (2000).
- ¹³² Durmaz S., Okay O., "Phase separation during the formation of poly(acrylamide) hydrogels". *Polymer*, **41**: 5729-5735 (2000).
- ¹³³ Ozturk V., Okay O., "Temperature sensitive poly(*N*-*t*-butylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels: synthesis and swelling behavior". *Polymer*, **43**: 5017-5026 (2002).

-
- ¹³⁴ Gundogan N., Melekaslan D., Okay O., "Rubber elasticity of poly(*N*-isopropylacrylamide) gels at various charge densities". *Macromolecules*, **35**: 5616-5622 (2002).
- ¹³⁵ Nomiya K., Takahashi S., Noguchi R., Nemoto S., Takayama T., Oda M. "Synthesis and Characterization of Water-Soluble Silver(I) Complexes with L-Histidine (H2his) and (S)-(-)-2-Pyrrolidone-5-carboxylic Acid (H2pyrrld) Showing a Wide Spectrum of Effective Antibacterial and Antifungal Activities. Crystal Structures of Chiral Helical Polymers [Ag(Hhis)]_n and {[Ag(Hpyrrld)]₂]_n in the Solid State." *Inorg. Chem.*, **39**: 3301-3311 (2000).
- ¹³⁶ Malette, W. "Chitosan: a new hemostatic." *Annals of Thoracic Surgery*, **36**: 55(1983).
- ¹³⁷ Craveiro A.A.; Craveiro A.C., Queiroz D.C. "Quitosana – A fibra do futuro" *Padetec*, 124p. (1999).
- ¹³⁸ Shahidi F.; Arachchi J.K.V., Jeon Y.J. "Food applications of chitin and chitosans." *Trends in Food Science & Technology*, **10**: 37-51 (1999).
- ¹³⁹ Kumar M.N.V.R. "A review of chitin and chitosan applications". *Reactive & Functional Polymers*, **46**: 1-27 (2000).
- ¹⁴⁰ Banerjee D., Kumar P.A., Kumar B., Madhusoodanan U.K., Kayak S., Jacob J., Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method". *Current Science*, **83(10)**: 1193-1194 (2002).