



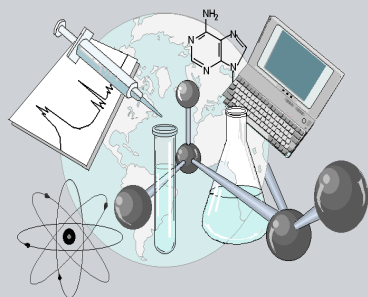
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“BIOMATERIAIS À BASE DE SULFATO DE
CONDROITINA, QUITOSANA E POLI(ÁCIDO
LÁTICO): DESENVOLVIMENTO,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÕES”**

Tese apresentada por **André Ricardo Fajardo** ao programa de Pós-graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Edvani C. Muniz



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, 2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ – UEM

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS – DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

ANDRÉ RICARDO FAJARDO

**“BIOMATERIAIS À BASE DE SULFATO DE CONDROITINA, QUITOSANA E
POLI(ÁCIDO LÁTICO): DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÕES”**

**MARINGÁ
2013**

ANDRÉ RICARDO FAJARDO

Tese de Doutorado

**“BIOMATERIAIS À BASE DE SULFATO DE CONDROITINA, QUITOSANA E
POLI(ÁCIDO LÁTICO): DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E
APLICAÇÕES”**

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz

**MARINGÁ
2013**

Dedico esta tese de doutorado a Deus, aos meus pais Cleuza e Olivio, à minha irmã Andressa e aos meus amigos pelo seu amor incondicional, apoio, dedicação, suporte e cumplicidade. Por acreditarem, por me ajudarem e por me motivarem a prosseguir nessa “grande aventura”.

"Ninguém é tão sábio que não tenha algo pra aprender e nem tão tolo que não tenha algo pra ensinar."

Blaise Pascal

"Eu nunca vejo o que já foi feito.
Eu somente vejo o que ainda falta para ser feito."

Marie Curie

"A melhor maneira de ter uma boa ideia é ter muitas ideias".

Linus Pauling

"O sinal mais seguro da sabedoria é a constante serenidade."

Michel de Montaigne

"É preciso ter dúvidas. Só os estúpidos têm uma confiança absoluta em si mesmos."

Orson Welles

"O insucesso é apenas uma oportunidade para recomeçar de novo com mais inteligência."

Henry Ford

AGRADECIMENTOS

Ao bom Deus pelos dons da sabedoria, paciência e perspicácia, por estar ao meu lado sempre guiando meus passos e mantendo minha alma serena mesmo nos momentos mais difíceis e solitários;

A meus pais Cleuza e Olivio, pilar forte de nossa família, pelo seu amor, zelo e incentivo;

A minha irmã Andressa pelo seu amor, companheirismo, dedicação e pela revisão desta Tese;

Ao Professor Dr. Edvani Curti Muniz, pela oportunidade, orientação, amizade, apoio e exemplo;

Aos Dr. Redouane Borsali e Dr. Sami Halila pela oportunidade de estágio-sanduíche no *Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales* (CERMAV) em Grenoble/França, pela orientação, amizade, apoio e exemplo;

Aos Professores Dr. Adley Forti Rubira e Dr. Eduardo Radovanovic pela contribuição, amizade, apoio e exemplo;

Aos amigos Dr. Francisco Helder Almeida Rodrigues e Dr. Antonio Guilherme Basso Pereira pela oportunidade de trabalharmos juntos, pelo auxílio na redação dos artigos e nas discussões dos resultados, pela amizade e apoio;

À Professora Dra. Assunta Borzacchiello e Dra. Mariagemiliana Dessi da Universidade de Nápoles – Nápoles/Itália pela realização dos experimentos e discussão dos resultados descritos no Capítulo 3 desta Tese, prestatividade e amizade;

Aos meus amigos doutores do Lab18: Dra. Juliana Francis Piai e Dr. Adonilson Reis Freitas, pelo apoio, prestatividade e amizade;

Aos meus amigos da “Família Lab18” (Cátia, Alessandro, Heveline, Elizângela, Letícia B, Fernanda, Vinícius, Marília, Laís, Letícia C, Bárbara, Valesca, Maruane, Pedro e Paulo), pelo apoio, prestatividade e amizade;

Aos meus amigos do Grupo de Materiais Poliméricos e Compósitos (GMPC) e aos Professores Dr. Emerson M. Giroto, Dra. Silvia L. Fávaro e Dr. Marcos Kunita;

Aos meus amigos Dra. Soraia Zaioncz e Dr. Clayton Fernandes de Souza por todo o suporte que me deram durante minha estadia em Grenoble/França, pela amizade, apoio, cumplicidade e pelos momentos inesquecíveis;

Aos meus amigos Luiz, Elizandra, Talitha, Lucas, Letícia, Cony, Reinaldo, Carina, Tales, Josiane, Tatiane, Samira e Andréa pela amizade, apoio e por tornarem o período que vivi em Grenoble memorável;

Aos meus amigos estudantes e permanentes do CERMAV, pela paciência, amizade, apoio;

Aos meus amigos pessoais; Marcos, Rodolfo, Olsen, Vinícius, Bruno e Leandro por serem meus “irmãos postiços”, por me apoiarem, por compartilharem comigo todos os bons e maus momentos e serem exemplos de pessoas;

Aos professores e a secretária (Claudemir e Cristina) do Programa de Pós-Graduação em Química desta universidade;

A CAPES pela concessão da bolsa de estudos e pela bolsa do programa de doutorado sanduíche no exterior (PDSE);

A todos os técnicos, estudantes e professores responsáveis por algumas das análises contidas nesta Tese;

A todos que de alguma forma contribuíram nas análises e na discussão dos resultados contidas (os) nesta Tese e por isso são dignos de agradecimento.

Contribuições em periódicos

1. Pereira, A. G. B; **Fajardo, A. R.**; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr Polym* 2013, *98*, 711-720.
2. Cândido, J. S.; Pereira, A. G. B; **Fajardo, A. R.**; Ricardo, N. M. P. S.; Feitosa, J. P. A.; Muniz, E. C.; Rodrigues, F. H. A. *Composit Part B-Eng* 2013, *51*, 243-256.
3. Lopes, L. C.; **Fajardo, A. R.**; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *J Appl Polym Sci* 2013, *128*, 3417-3424.
4. Rodrigues, F. H. A.; Pereira, A.G.B.; **Fajardo, A. R.**; Muniz, E. C. *J Appl Polym Sci* 2013, *128*, 3480-3489.
5. **Fajardo, A. R.**; Silva, M. B.; Lopes, L. C.; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *RSC Adv* 2013, *2*, 11095-11103.
6. Spagnol, C.; Rodrigues, F. H. A.; Pereira, A. G. B.; **Fajardo, A. R.**; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr Polym* 2012, *87*, 2038-2045.
7. Crispim, E. G.; Piai, J. F.; **Fajardo, A. R.**; Ramos, E. R. F.; Nakamura, T. U.; Nakamura, C. V.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Express Polym Lett* 2012, *6*, 383-395.
8. **Fajardo, A. R.**; Lopes, L. C.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Chem Eng J* 2012, *183*, 253-260.
9. Spagnol, C.; Rodrigues, F. H. A.; Pereira, A. G. B.; **Fajardo, A. R.**; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Cellulose* 2012, *19*, 1-13, 2012.
10. Paulino, A. T.; Pereira, A. G. B.; **Fajardo, A. R.**; Erickson, K.; Kipper, M. J.; Muniz, E. C.; Belfiore, L. A.; Tambourgi, E. B. *Carbohydr Polym* 2012, *90*, 1216-1225, 2012.
11. Rodrigues, F. H. A.; **Fajardo, A. R.**; Pereira, A. G. B.; Ricardo, N. M. P. S.; Feitosa, J. P. A.; Muniz, E. C. *J Polym Res* 2012, *19*, art. n° 1.
12. Müller, V.; Piai, J. F.; **Fajardo, A. R.**; Fávaro, S. L.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *J Nanomater* 2011, 1-6.
13. Martins, A. F.; Pereira, A. G. B.; **Fajardo, A. R.**; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr Polym* 2011, *86*, 1266-1272.
14. Paulino, A. T.; **Fajardo, A. R.**; Junior, A. P.; Muniz, E. C.; Tambourgi, E. B. *Polym Inter* 2011, *60*, 1324-1333.
15. **Fajardo, A. R.**; Lopes, L. C.; Valente, A. J. M.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Colloid Polym Sci* 2011, *289*, 1739-1748.
16. **Fajardo, A. R.**; Lopes, L. C.; Pereira, A. G. B.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr Polym* 2011, *87*, 1950-2045.

17. Spagnol, C.; Rodrigues, F. H. A.; Neto, A. G. V. C.; Pereira, A. G. B.; **Fajardo, A. R.**; Radovanovic, E.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Eur Polym J* 2011, *48*, 454-463.
18. **Fajardo, A. R.**; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr Polym* 2010, *80*, 934-943.
19. Guilherme, M. R.; **Fajardo, A. R.**; Moia, T. A.; Kunita, M. H.; Gonçalves, M. C.; Rubira, A. F. *Eur Polym* 2010, *46*, 1465-1474.
20. Piai, J. F.; Lopes, L. C.; **Fajardo, A. R.**; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *J Mol Liquid* 2010, *156*, 28-32.

Contribuições em periódicos a partir das informações contidas nesta Tese

1. **Fajardo, A. R.;** Lopes, L. C.; Caleare, A. O.; Britta, A. E.; Nakamura, C. V.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Mater Sci Eng C* 2013, 33, 588-595.
2. **Fajardo, A.R.;** Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *React Funct Polym* 2013 (aceito).
3. **Fajardo, A. R.;** Dessi, M.; Borzacchiello A.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Acta Biomat* 2013 (em processo de submissão).
4. **Fajardo, A. R.;** Guerry, A.; Britta, E. A.; Nakamura, C. V.; Muniz, E. C.; Borsali, R.; Halila, S. *Nano Res* 2013(em processo de submissão).

Prêmios e títulos

2011 - Melhor Pôster (*Poster Prize*) no 3º Encontro França-Brasil de Polímeros (3rd *French Brazilian Meeting on Polymers – FBPol*)

Currículo Lattes

Endereço eletrônico < <http://lattes.cnpq.br/5914976951761736> >

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvi
LISTA DE SÍMBOLOS	xix
ÍNDICE DE FIGURAS	xxi
ÍNDICE DE TABELAS	xxv
RESUMO	xxvi
ABSTRACT	xxviii

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. BIOMATERIAIS.....	1
1.2. BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS.....	2
1.2.1. Hidrogéis.....	2
1.2.2. Nanopartículas automontadas.....	5
1.3. BIOPOLÍMEROS.....	7
1.3.1. Quitosana.....	9
1.3.2. Sulfato de condroitina.....	12
1.4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	13
1.5. OBJETIVOS DO TRABALHO.....	17
1.5.1. Objetivos gerais.....	17
1.5.2. Objetivos específicos.....	17

CAPÍTULO 2 - HIDROGÉIS DE QUITOSANA/SULFATO DE CONDROITINA FORMADOS A PARTIR DE REDES QUÍMICA E FISICAMENTE RETICULADAS: DESENVOLVIMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

2.1. INTRODUÇÃO.....	19
2.2. EXPERIMENTAL.....	21
2.2.1. Materiais.....	21
2.2.2. Métodos.....	21
2.2.2.1. Técnicas de caracterização.....	21
2.2.2.2. Modificação química da QT e do SC com GMA.....	22
2.2.2.3. Preparação dos hidrogéis “dual-network”	23
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
2.3.1. Modificação química da QT e do SC com GMA.....	24

2.3.2. Caracterização dos hidrogéis.....	33
2.4. CONCLUSÃO.....	44
2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

CAPÍTULO 3 - SUBSTRATOS PARA CULTIVO CELULAR FORMADOS POR COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS DE QUITOSANA E SULFATO DE CONDROITINA

3.1. INTRODUÇÃO.....	50
3.2. EXPERIMENTAL.....	52
3.2.1. Materiais	52
3.2.2. Métodos.....	52
3.2.2.1. Técnicas de caracterização.....	52
3.2.2.2. Preparação do PEC QT/SC.....	53
3.2.2.3. Avaliação das propriedades reológicas.....	53
3.2.2.4. Análise morfológica e determinação do tamanho de poro dos complexos polieletrólíticos após intumescimento em diferentes pHs.....	54
3.2.2.5. Ensaios biológicos.....	55
3.2.2.5.1. Cultura celular.....	55
3.2.2.5.2. Ensaios de interação celular	55
3.2.2.5.3. Ensaio de viabilidade celular.....	56
3.2.2.5.4. Quantificação de DNA.....	57
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
3.3.1 Caracterização do complexo QT/SC.....	57
3.3.2. Ensaios biológicos.....	64
3.4 CONCLUSÕES.....	70
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

CAPÍTULO 4 - PREPARAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS DE QUITOSANA E SULFATO DE CONDROITINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO REVESTIMENTO DE FERIMENTOS

4.1. INTRODUÇÃO.....	75
4.2. EXPERIMENTAL.....	77
4.2.1. Materiais.....	77
4.2.2. Métodos.....	77
4.2.2.1 Técnicas de caracterização.....	77
4.2.2.2. Preparação das filmes de QT/SC.....	78

4.2.2.3. Ensaios de intumescimento.....	79
4.2.2.4. Ensaios de liberação de AgSD <i>in vitro</i>	80
4.2.2.5. Estudo da atividade bactericida.....	80
4.2.2.6. Ensaio de viabilidade celular.....	81
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	82
4.3.1. Análises de FTIR.....	82
4.3.2. Determinação do grau de intumescimento (S)	86
4.3.3. Propriedades mecânicas.....	90
4.3.4 Ensaios de liberação <i>in vitro</i> da AgSD.....	94
4.3.5. Estudo da atividade bactericida.....	98
4.3.6. Ensaio de viabilidade celular.....	99
4.4. CONCLUSÕES.....	100
4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	102

CAPÍTULO 5 - COPOLÍMEROS EM BLOCO DE SULFATO DE CONDROITINA-*b*-POLI(ÁCIDO LÁTICO): SÍNTESE VIA “CLICK CHEMISTRY” E PREPARAÇÃO DE MICELAS AUTOMONTADAS

5.1. INTRODUÇÃO.....	106
5.2. EXPERIMENTAL.....	107
5.2.1 Materiais.....	107
5.2.2 Métodos.....	108
5.2.2.1 Técnicas de caracterização.....	108
5.2.2.2 Síntese do SC funcionalizado na posição terminal com grupos alcinos (SC-alcino).....	109
5.2.2.3. Síntese do PLA _n funcionalizado na posição terminal com grupos azida (PLA _n -N ₃).....	110
5.2.2.4. Síntese os copolímeros em bloco SC- <i>b</i> -PLA _n	112
5.2.2.5. Determinação do valor da concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros em bloco por fluorescência.....	112
5.2.2.6. Caracterização da automontagem dos copolímeros em bloco SC- <i>b</i> -PLA _n	113
5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	116
5.3.1. Obtenção do SC-MM.....	116
5.3.2. Caracterização da síntese e da estrutura do SC-alcino.....	118
5.3.3. Caracterização da síntese e da estrutura do PLA _n -N ₃	122

5.3.4. Caracterização da síntese e da estrutura dos copolímeros em bloco SC- <i>b</i> -PLA.....	126
5.3.5. Automontagem dos copolímeros em bloco SC- <i>b</i> -PLA _n em água.....	129
5.4. CONCLUSÃO.....	140
5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	142
 CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	 146

APRESENTAÇÃO

Esta Tese de doutorado tem seu conteúdo dividido em seis Capítulos:

No Capítulo 1 – São feitas as considerações iniciais, são fornecidas definições e uma breve revisão bibliográfica sobre biomateriais, biomateriais poliméricos, hidrogéis, nanopartículas automontadas, biopolímeros, quitosana e sulfato de condroitina;

No Capítulo 2 – São apresentados os dados referentes à preparação e a caracterização de um novo tipo de hidrogel onde a sua rede tridimensional é formada pela combinação de reticulações químicas e físicas entre a quitosana (QT) e o sulfato de condroitina (SC);

No Capítulo 3 – São descritas a preparação e caracterização de um biomaterial através da complexação polieletrólítica da QT e do SC para atuar como substrato na cultura e no crescimento de células e tecidos. A viabilidade do substrato foi testada por meio de diversos ensaios biológicos;

No Capítulo 4 – São reportadas a preparação e caracterização de filmes através da reação de complexação polieletrólítica entre a QT e o SC, utilizando a metodologia “*casting*”. Estes filmes, os quais apresentam diferentes formulações, foram formados e carregados com o fármaco sulfadiazina de prata (AgSD) para atuarem como revestimento de ferimentos decorrentes de queimaduras;

No Capítulo 5 – São apresentadas informações sobre a síntese e a caracterização de um novo copolímero em bloco com característica anfifílica formado por SC e poli(ácido láctico) (PLA) utilizando uma reação de “*click chemistry*”. Além disso, é fornecida completa investigação do comportamento de automontagem deste copolímero em meio aquoso;

No Capítulo 6 - São feitas algumas considerações finais dos resultados obtidos e são apresentadas as perspectivas futuras dos biomateriais desenvolvidos nesta Tese. Cada um dos Capítulos 2, 3, 4, e 5 foi subdividido em cinco tópicos: (i) Introdução; (ii) Experimental; (iii) Resultados e Discussão; (iv) Conclusões e (v) Referências Bibliográficas.

LISTA DE ABREVIATURAS

AgSD	sulfadiazina de prata
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Ar	argônio
BSA	albumina do soro bovino
C₄	SC sulfatado na carbono 4 da unidade GalNAc
C₆	SC sulfatado na carbono 6 da unidade GalNAc
CDCl₃	clorofórmio deuterado
CMC	concentração micelar crítica [mg/ml]
D₂O	óxido de deutério ou água deuterada
DCM	diclorometano
DM	grau de metacrilção [%]
DMAP	4-(dimetilamino) piridina
DMEM	<i>"Dulbecco's Modified Eagle Medium"</i> (meio de cultura celular)
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamida
DMSO-d₆	dimetilsulfóxido deuterado
DP	grau de polimerização
ECM	matriz extracelular
Eq	equivalentes
Et₃N	triethylamina
GAG	glicosaminoglicano
GalNAc	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -galactosamina
GlcN	<i>D</i> -glicosamina
GlcNAc	<i>N</i> -acetil- <i>D</i> -glicosamina
GlcUa	ácido glicurônico
GMA	metacrilato de glicidila
I.C.	índice de circularidade
Mag	magnificação
MBA	<i>N,N'</i> -metilenobisacrilamida
MC	meio de cultura celular
MCS1	filme de QT/SC com razão de massa entre os QT:SC igual a 40/60 [% m/m]
MCS1-1	filme de QT/SC com razão de massa entre os QT:SC igual a 60/40 [% m/m] carregado com AgSD
MCS2	filme de QT/SC com razão de massa entre os QT:SC igual a 50/50 [% m/m]
MCS2-2	filme de QT/SC com razão de massa entre os QT:SC igual a

	50/50 [% m/m] carregado com AgSD
MCS3	filme de QT/SC com razão de massa entre os QT:SC igual a 60/40 [% m/m]
MCS3-3	filme de QT/SC com razão de massa entre os QT:SC igual a 60/40 [% m/m] carregado com AgSD
NaN₃	azida de sódio
NIH3T3	linha de células isoladas a partir de fibroblastos de camundongos
PBS	solução tampão salina
PEC	complexo polieletrólítico
PLA	poli(ácido láctico)
PLA₁₇₀₀	poli(ácido láctico) com massa molar igual a 1,700 [g/mol]
PLA₁₇₀₀-N₃	PLA ₁₇₀₀ funcionalizado na posição terminal com grupos azida
PLA₁₇₀₀-tosilado	PLA ₁₇₀₀ funcionalizado na posição terminal com grupos tosilato
PLA₆₅₀₀	poli(ácido láctico) com massa molar igual a 6,500 [g/mol]
PLA₆₅₀₀-N₃	PLA ₆₅₀₀ funcionalizado na posição terminal com grupos azida
PLA₆₅₀₀-tosilado	PLA ₆₅₀₀ funcionalizado na posição terminal com grupos tosilato
PLA_n	poli(ácido láctico) com diferentes massas molares
PLA_n-N₃	PLA _n funcionalizado na posição terminal com grupos azida
PLA_n-tosilado	PLA _n funcionalizado na posição terminal com grupos tosilato
QT	quitosana
QT-gel	hidrogel formado pela reticulação química da QT-mod
QT-gel/SC	hidrogel “ <i>dual-network</i> ” formado por redes quimicamente reticuladas de QT e redes fisicamente reticuladas de QT/SC
QT-mod	quitosana quimicamente modificada com GMA
SC	sulfato de condroitina
SC-alcino	SC funcionalizado na posição terminal com grupos alcino
SC-gel	hidrogel formado pela reticulação química do SC-mod
SC-gel/QT	hidrogel “ <i>dual-network</i> ” formado por redes quimicamente reticuladas de SC e redes fisicamente reticuladas de QT/SC
SC-MM	SC de menor massa molar
SC-mod	sulfato de condroitina quimicamente modificado com GMA
SRB	sulforodamina B
TsCl	cloreto de 4-toluenossulfonila

U.A.	unidade arbitrária
UR	unidade repetitiva
Vero	linha de células isoladas a partir do epitélio renal do macaco verde africano

Nota: Nesta Tese os termos abreviados referentes às diferentes técnicas instrumentais utilizadas encontram-se em conformidade com o padrão internacional e por esta razão são apresentados na forma da língua inglesa.

LISTA DE SÍMBOLOS

$[\eta]$	viscosidade intrínseca [dl/g]
$A(t)$	distribuição dos tempos de relaxação
A	área sinais de ressonância de NMR ^1H obtida por integração (Capítulo 2)
C	concentração [mg/ml]
$C(q,t)$	função de auto-correlação
D_{app}	difusão aparente
E	percentual de elongação máxima no ponto de ruptura [%]
f	frequência [Hz]
F_{max}	força máxima registrada no ponto de ruptura [N]
Fr_t	fração de soluto liberado em um tempo t [%]
Fr_{max}	fração máxima de soluto liberado [%]
G'	módulo de cisalhamento de estocagem [Pa]
G''	módulo de cisalhamento de perda [Pa]
I	força iônica [mol/l] (Capítulo 4)
I	intensidade de espalhamento (Capítulo 5)
I_0	intensidade de espalhamento para $q = 0$ (Capítulo 5)
I_1	intensidade da banda de absorção em 372 nm observada no espectro de fluorescência do pireno
I_3	intensidade da banda de absorção em 383 nm observada no espectro de fluorescência do pireno
k_l	constante de liberação [h^{-1}]
M_v	massa molar viscosimétrica [g/mol]
M_w	massa molar [g/mol]
$Mwco$	corte do peso molecular para membranas de filtração, ultrafiltração ou diálise
M_z	massa molar Z [g/mol]
n	número de replicatas
n	índice de refração (Capítulo 5)
P	perímetro do poro [μm]
q	módulo do vetor espalhamento [cm^{-2}]
R^2	coeficiente de correlação linear
R_H	raio hidrodinâmico [nm]
S	grau de intumescimento
t	tempo [s, min, h]
T	temperatura [$^{\circ}\text{C}$, K]
$t_{1/2}$	tempo necessário para que a concentração do soluto no solvente

	atinga 50 % do valor da $Fr_{\max}$ [h]
t_r	tempo de relaxação [s]
T_a	tensão de adesão [dina/cm]
T_r	tensão de ruptura [MPa]
W_o	peso dos filmes secos [mg]
W_{it}	peso dos filmes intumescidos [mg]
α	coeficiente de partição
γ	tensão de cisalhamento senoidal
Γ	frequência de relaxação [s^{-1}]
γ_o	amplitude da tensão de cisalhamento
η	viscosidade [cP]
θ	ângulo de difração (Capítulo 2) ou ângulo de contato (Capítulo 3) ou ângulo de espalhamento (Capítulo 5)
λ	comprimento de onda [nm, Å]
λ_{exc}	comprimento de onda de excitação [nm]
τ	tensão de cisalhamento [Pa]
ω	frequência de oscilação [Hz]

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

FIGURA 1.1. Ilustração da rede tridimensional que forma os hidrogéis.....	3
FIGURA 1.2. Esquema ilustrativo da automontagem de copolímeros em blocos anfífilos em meio aquoso.....	6
FIGURA 1.3. Unidade repetitiva da quitosana ($m > n$).....	10
FIGURA 1.4. Unidade repetitiva do sulfato de condroitina ($Y = H^+$ e $X = SO_3^-$ ou $Y = SO_3^-$ e $X = H^+$).....	12

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1. Esquema ilustrativo da reação de abertura do anel epóxido do GMA com os polissacarídeos QT e SC.....	26
FIGURA 2.2. Espectros de FTIR da (a) QT, (b) QT-mod e (c) GMA.....	27
FIGURA 2.3. Espectros de FTIR (a) SC, (b) SC-mod e (c) GMA.....	28
FIGURA 2.4. Espectro de NMR 1H (a) QT, (b) GMA e (c) QT-mod (300 MHz, solventes D_2O para QT pura e QT-mod e $CDCl_3$ para GMA, 298 K).....	29
FIGURA 2.5. Espectro de NMR 1H (a) SC, (b) GMA e (c) SC-mod (300 MHz, solventes D_2O para SC e SC-mod e $CDCl_3$ para GMA, 298 K).....	31
FIGURA 2.6. Espectros de FTIR (a) QT-mod, QT-gel e MBA e (b) SC-mod, SC-gel e MBA.....	33
FIGURA 2.7. Espectros de NMR ^{13}C no estado sólido (CP/MAS) dos hidrogéis químicos (a) QT-gel e (b) SC-gel na faixa espectral de 250 – 0 ppm (75 MHz, 298 K).....	34
FIGURA 2.8. Ilustração esquemática da rede polimérica do hidrogel “ <i>dual-network</i> ”.....	35
FIGURA 2.9. Percentual de polissacarídeo complexado aos hidrogéis quimicamente reticulados em função do tempo de imersão (em horas).....	36
FIGURA 2.10. Espectros de FTIR dos hidrogéis (a) QT-gel, QT-gel/SC(6-24h) e SC e (b) SC-gel, SC-gel/QT(6-24h) e QT.....	38
FIGURA 2.11. Difractogramas obtidos por XRD para os hidrogéis (a) QT-gel, QT-gel/SC(6-24h) e SC e (b) SC-gel, SC-gel/QT(6-24h) e QT.....	39
FIGURA 2.12. Curvas de TG (a,b) e DTG (c,d) obtidas para os hidrogéis QT-gel, QT-gel/SC(6-24h), SC-gel, SC-gel/QT(6-24h) e polissacarídeos.....	40
FIGURA 2.13. Imagens de SEM dos hidrogéis (a) QT-gel, (b) QT-gel/SC(24h), (c) SC-gel e (d) SC-gel/QT(24h) (imagens de superfícies fraturadas; Mag x100, barra de escala 100 μm).....	43

CAPÍTULO 3

FIGURA 3.1. Imagem fotográfica tomada em um dos ensaios de medida de ângulo de contato realizado com o complexo polieletrólítico.....	59
FIGURA 3.2. Imagens de SEM do complexo polieletrólítico QT/SC seco, após ter sido intumescido previamente em (a) solução tampão pH 2, (b) 6, (c) 7,4, (d) MC e (d) solução tampão pH 8 (imagens das superfícies fraturadas; Mag x2000, barra de escala 50 µm).....	62
FIGURA 3.3. Distribuição do tamanho de poros e porosidade do complexo polieletrólítico QT/SC seco, após ter sido intumescido previamente nas soluções tampão pH 2,0; 6,0; 7,4 e 8,0 e em meio de cultura celular (MC).....	63
FIGURA 3.4. Imagens de SEM do complexo polieletrólítico de QT/SC semeado com células NIH3T3 após 21 dias de cultura (Mag x2000 e x5000, barras de escala 50 e 20 µm).....	65
FIGURA 3.5. Imagens de SEM do complexo polieletrólítico de QT/SC semeado com células NIH3T3 após 21 dias de cultura (Mag x10000; barra de escala de 10 µm).....	66
FIGURA 3.6. Imagens de CLSM (a) de uma célula NIH3T3 e do (b-c) complexo polieletrólítico QT/SC semeado com células NIH3T3 (barra de escala 10 µm).....	68
FIGURA 3.7. Ensaios de viabilidade das células NIH3T3 semeadas sob o complexo de QT/SC e incubadas por diferentes períodos.....	69

CAPÍTULO 4

FIGURA 4.1. Estrutura química da sulfadiazina de prata (AgSD).....	77
FIGURA 4.2. Espectros de FTIR (a) dos filmes QT/SC não carregados e (b-d) dos filmes QT/SC carregados com AgSD.....	83
FIGURA 4.3. Grau de intumescimento (S) dos filmes MCS(1-3), MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3 quando imersos em diferentes pHs em função do tempo de imersão em horas.....	88
FIGURA 4.4. Curva média de tensão em função da deformação obtida para o filme MCS1.....	91
FIGURE 4.5. (a) Quantidade (em mg) e (b) fração liberada (em %) de AgSD em tampão fosfato (pH 7,4) em função do tempo de imersão em horas.....	94
FIGURA 4.5. Imagens fotográficas das placas inoculadas com as bactérias do tipo <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> . A - MCS1 (controle), A' - MCS1-1; B - MCS2 (controle), B' - MCS2-2; C - MCS3 (controle), C'- MCS3-3 (linha contínua delimita a área do controle	

e a linha pontilhada delimita a área entre o controle e a zona de inibição).....	96
FIGURA 4.7. Ensaio de viabilidade celular com os filmes MCS(1-3), MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3.....	100

CAPÍTULO 5

FIGURA 5.1. Imagem fotográfica do sistema utilizado na preparação das partículas automontadas.....	114
FIGURA 5.2. Estratégia de síntese dos copolímeros em bloco SC- <i>b</i> -PLA (Y = H ⁺ e X = SO ₃ ⁻ ou Y = SO ₃ ⁻ e X = H ⁺).....	119
FIGURA 5.3. Espectros de FTIR (a) do SC-MM e (b) do SC-alcino.....	120
FIGURA 5.4. Espectros de NMR ¹ H (a) do SC-MM e (b) do SC-alcino (400 MHz, D ₂ O, 353 K).....	121
FIGURA 5.5. Espectros de FTIR do (a) PLA ₁₇₀₀ , (b) PLA ₁₇₀₀ -tosilado e (c) PLA ₁₇₀₀ -N ₃	123
FIGURA 5.6. Espectros de NMR de ¹ H do (a) PLA ₁₇₀₀ , (b) PLA ₁₇₀₀ -tosilado e (c) PLA ₁₇₀₀ -N ₃	124
FIGURA 5.7. Espectros de FTIR do (a) SC-alcino, (b) PLA ₁₇₀₀ -N ₃ e (c) copolímero SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀	126
FIGURE 5.8. Espectros de NMR de ¹ H do (a) SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀ e (b) SC- <i>b</i> -PLA ₆₅₀₀ (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ /D ₂ O, 353 K).....	127
FIGURA 5.9. Espectro DOSY para SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀ solubilizado em uma mistura DMSO- <i>d</i> ₆ /D ₂ O (400 MHz, 353 K).....	128
FIGURA 5.10. Espectros de emissão de fluorescência do pireno e variação da razão I ₁ /I ₃ em função da concentração dos copolímeros SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀ (a,b) e SC- <i>b</i> -PLA ₆₅₀₀ (c,d) ([pireno] = 3 x 10 ⁻⁴ mg/ml).....	131
FIGURA 5.11. (a) Funções de correlação <i>C</i> (<i>q</i> , <i>t</i>) medidas nos ângulos de varredura de 60° (□), 90° (●) e 120° (Δ) e distribuição do tempo de relaxação a 90° (●) para o copolímero SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀ em meio aquoso, (b) distribuição do raio hidrodinâmico (R _H) em função do tempo de relaxação (distribuição não linearizada e linearizada em função do número de partículas em solução) e (c) variação da frequência de relaxação (<i>f</i>) em função do valor quadrático do vetor de onda (<i>q</i> ²) (condições: [SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀] = 3,0 mg/ml; temperatura = 25 °C).....	133
FIGURA 5.12. (a) Funções de correlação <i>C</i> (<i>q</i> , <i>t</i>) medidas nos ângulos de varredura de 60° (□), 90° (●) e 120° (Δ) e distribuição do tempo de relaxação a 90° (●) para o copolímero SC- <i>b</i> -PLA ₆₅₀₀ em meio aquoso, (b) distribuição do raio hidrodinâmico (R _H) em função do tempo de relaxação (distribuição não linearizada e linearizada em função do número de partículas em solução) e (c) variação da frequência de	

relaxação (I) em função do valor quadrático do vetor de onda (q^2) (condições: [SC- <i>b</i> -PLA ₆₅₀₀] = 3,0 mg/ml; temperatura = 25 °C).....	134
FIGURA 5.13. Imagens obtidas por SEM-FEG a partir dos sistemas formados pelos copolímeros (a) SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀ e (b) SC- <i>b</i> -PLA ₆₅₀₀ com as distribuições do diâmetro das nanopartículas. ([copolímero] = 0,1 mg/ml, Mag x24000, barra de escala 200 nm).....	136
FIGURA 5.14. Imagens obtidas por TEM a partir dos sistemas formados pelos copolímeros (a) SC- <i>b</i> -PLA ₁₇₀₀ e (b) SC- <i>b</i> -PLA ₆₅₀₀ com as distribuições do diâmetro das nanopartículas. ([copolímero] = 0,1 mg/ml, Mag x120000, barra de escala 100 nm).....	138

ÍNDICE DE TABELAS

CAPÍTULO 3

TABELA 3.1. Energias envolvidas em diferentes tipos de ligação.....	51
TABELA 3.2. Valores de G' e G'' , a 1 Hz, para as amostras de complexos intumescidos até o equilíbrio em soluções tampão com diferentes pHs e no meio de cultura (MC) a 37 °C	60

CAPÍTULO 4

TABELA 4.1. Composição dos filmes de QT/SC (carregados e não carregados com AgSD).....	79
TABELA 4.2. Razão molar entre os componentes dos filmes carregados e não carregados.....	85
TABELA 4.3. Propriedades mecânicas dos filmes determinados a partir de ensaios de tração.....	91
TABELA 4.4. Valores de Fr_{max} , α , k_l e $t_{1/2}$ para AgSD liberado a partir dos filmes de QT/SC. Os valores de k_l e $t_{1/2}$ foram obtidos a partir de modelos cinéticos reversíveis de 1ª e 2ª ordem.....	96
TABELA 4.5. Determinação da atividade bactericida das filmes de QT/SC carregadas com AgSD contra as bactérias do tipo <i>P. aeruginosa</i> e <i>S. aureus</i> por meio da determinação do halo de inibição.....	96

CAPÍTULO 5

TABELA 5.1. Distribuição das massas molares determinadas por GPC e viscosimetria para o SC e o SC-MM.....	117
---	-----

RESUMO

O uso de biopolímeros tem sido uma alternativa na preparação de novos materiais e na substituição dos polímeros derivados de petróleo e, em muitos casos, resultados extremamente interessantes têm sido observados. Isso ocorre, principalmente, na preparação de materiais para atuarem como biomateriais, os quais necessitam de propriedades específicas de acordo com o tipo de aplicação. Nesta Tese o potencial dos polissacarídeos quitosana (QT) e sulfato de condroitina (SC) no preparo de novos materiais foi explorada. Estes materiais tiveram sua aplicabilidade como biomateriais testada para diferentes finalidades. A partir da modificação química da QT com metacrilato de glicidila(GMA) foi possível obter um hidrogel quimicamente reticulado a base de QT que possui a capacidade de complexar com o SC formando, assim, um hidrogel com dois diferentes tipos de rede ("*dual-network*"); uma rede quimicamente e outra fisicamente reticulada. A metodologia desenvolvida para a preparação desse tipo de hidrogel permitiu também formar um hidrogel onde o SC, previamente modificado com GMA, foi quimicamente reticulado em uma primeira etapa e, então, complexado com QT na segunda etapa. Os dados obtidos a partir da completa caracterização estrutural e morfológica desses novos tipos de hidrogéis podem ser ferramentas úteis para desenvolver metodologias que possibilitem melhorar as propriedades de hidrogéis químicos já existentes ou, ainda, modulá-los para serem aplicados com maior especificidade, por exemplo, em sistemas de liberação controlada de fármacos. Ainda, fazendo uso da capacidade de complexação polieletrólítica entre a QT e o SC, foram obtidos substratos e filmes para atuarem como suportes (ou "*scaffolds*") para cultura de células e de materiais para serem usados como revestimentos de ferimentos. Ensaios biológicos demonstraram que o complexo QT/SC possui excelentes propriedades físico-químicas e biológicas para serem aplicados como substratos para cultura celular. Já os filmes de QT/SC, os quais foram carregados com o fármaco sulfadiazina de prata (AgSD), apresentaram excelentes propriedades mecânicas e ensaios realizados mostram que os mesmos podem atuar eficientemente na liberação controlada daquele fármaco. Além disso, ensaios de atividade bactericida e de viabilidade celular permitem inferir que os filmes QT/SC/AgSD possuem atividade bactericida contra as duas cepas de bactérias testadas, não apresentando toxicidade contra as células saudáveis, favorecendo ainda a proliferação das mesmas. Esses resultados revelam que os filmes formados possuem

potencial para serem utilizados como biomateriais para revestimento de ferimentos. Por fim, fazendo uso de diferentes técnicas usadas em síntese orgânica e de uma reação do tipo “*click chemistry*”, foi possível formar um copolímero em bloco entre o SC e o poli(ácido láctico) (PLA), o qual apresenta característica anfifílica. Conforme os dados obtidos a partir de diferentes técnicas de caracterização, observou-se que o copolímero SC-*b*-PLA apresenta a capacidade de se automontar em meio aquoso, formando estruturas micelares do tipo casca-carço, as quais podem atuar eficientemente como carreadores na liberação controlada de fármacos hidrofóbicos ou, ainda, formar filmes organizados para atuar na cultura de células e tecidos.

Palavras-chave: Biomateriais; quitosana; sulfato de condroitina; hidrogéis; complexos polieletrólíticos; cultura de células; revestimento de ferimentos; liberação controlada de fármaco; poli(ácido láctico); copolímeros em bloco; sistema automontado.

ABSTRACT

Biopolymers have been used as a good alternative to replace the petroleum based polymers especially in the obtainment of new materials for several applications. Herein, in particular cases, the use of biopolymers was targeted for obtaining materials with very interesting properties. The potential of the polysaccharides chitosan (CHT) and chondroitin sulfate (CS) to form novel materials to be applied as biomaterials was investigated in this Thesis. One of these materials was obtained through chemical reaction of CHT with glycidyl methacrylate (GMA) which enabled the product to form a chemically crosslinked hydrogel. Such hydrogel possesses ability for complexing with the CS chains by electrostatic interactions forming a hydrogel dual-network because both chemical and physical crosslinked networks are present. The methodology applied to form this kind of hydrogel allows forming another dual-network hydrogel where the CS, previously modified with GMA, was chemically crosslinked and furthering complexed with the CHT chains. The data obtained from the structural and morphological characterization of these two different hydrogels could be useful tools for proposal methodologies allowing the formation of chemical hydrogels with improved features. In addition, this kind of hydrogel (dual-network hydrogel) could be tailored to show some specific property, which target its application in more specific systems, for instance in drug delivery systems. The ability of CHT and CS to form polyelectrolyte complexes was still explored to form scaffolds and films to be applied in cell and tissue growth and wound healing. Biological assays performed with these materials showed that the CHT/CS complexes possess good physical, chemical and biological properties to efficiently act as scaffolds for cell culture. Once loaded with the drug Silver sulfadiazine (AgSD), the CHT/CS/AgSD films showed good mechanical properties and the *in vitro* AgSD release data confirm that such device could be efficiently applied in controlled drug release. Furthermore, bactericidal activity and cell viability assays allow inferring that the CHT/CS/AgSD films show bactericidal action against two different bacteria strains and they do not show toxic effects on healthy cells. These data demonstrate that the CHT/CS/AgSD films possess potential to be applied in wound healing. Finally, making use of a suitable “*click chemistry*” approach an original amphiphilic block copolymer based on CS and poly(lactic acid) (PLA) was synthesized. According to the data obtained from different characterization methods, the formation of self-assembled

structures from the CS-*b*-PLA copolymer chains in aqueous media was observed. The self-assembled structures showed typical core-shell morphology, which could be a promising device to encapsulate hydrophobic drug into the core region. Furthermore, this copolymer could form self-assembled films to be applied as scaffolds for cell growth or in tissue engineering.

Keywords: Biomaterials; chitosan; chondroitin sulfate; hydrogels; polyelectrolyte complex; cell growth; wound healing; controlled drug release; poly(lactic acid); block copolymer; self-assembly.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1. BIOMATERIAIS

Segundo a IUPAC (IUPAC, 2012) o termo “biomaterial” é utilizado para definir um “material empregado no contato com tecidos vivos, organismos ou microrganismos”. Outra definição, menos simples, também pode ser empregada. Um biomaterial é uma substância ou uma mistura de substâncias de origem natural ou não, que compreende o todo ou parte de uma estrutura viva ou dispositivo biomédico que realiza, aumenta ou substitui uma função natural. Estas substâncias possuem uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (AMARAL *et al.*, 2003). Alguns dos exemplos que podem ser citados como biomateriais são próteses, implantes, lentes de contato, marcapassos, enxertos e materiais usados em transplante. A evolução dos biomateriais é relativamente recente e conjuntamente com essa evolução surgiram também novos campos do conhecimento. A engenharia biomédica, biotecnologia, biomecânica, sistemas para liberação controlada de fármacos, engenharia de tecidos e medicina regenerativa são alguns exemplos (AMARAL *et al.*, 2003). A área dos biomateriais engloba o conhecimento e a colaboração de diversas especialidades, desde o comportamento mecânico até as funções biológicas em nível molecular nos tecidos, passando pela engenharia de materiais, onde são desenvolvidos sistemas com propriedades adequadas, além de determinadas aplicações no organismo. A evolução atual dos biomateriais depende, assim, dos avanços das diversas áreas, de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013), grande parte dos “materiais de uso em saúde” são enquadrados como biomateriais como, por exemplo, próteses, lentes, enxertos, “*stents*”, cateteres, tubos de circulação extracorpórea, substratos empregados na engenharia de tecidos, entre outros. Ao se levar em conta todas essas

aplicações, faz-se necessário definir um parâmetro fundamental para a viabilidade dos biomateriais: a biocompatibilidade. Dessa forma, a biocompatibilidade pode ser caracterizada como a capacidade do material responder favoravelmente a uma aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluídos biológicos (BOOTH *et al.*, 1989). Não existem materiais totalmente inertes, uma vez que há sempre uma resposta a qualquer substância estranha quando esta é inserida ou está em contato com um sistema vivo. Logo, ao alterar algumas propriedades dos materiais é possível minimizar ou controlar a resposta do tecido vivo. Além da biocompatibilidade, os biomateriais poliméricos não devem apresentar toxicidade e não causar irritação ou provocar quaisquer respostas fisiológicas adversas (BUDDY *et al.*, 2004). Nesse sentido, a bioatividade é também importante na funcionalidade de um biomaterial, já que só é bioativo quando há ao menos uma resposta biológica positiva específica na interface do material, por exemplo, permitir o crescimento ósseo e a ter uma ligação entre o tecido e o material (DUCHEYNE, 1987).

1.2. BIOMATERIAIS POLIMÉRICOS

Os polímeros biocompatíveis apresentam grande potencial em aplicações biomédicas, como no caso de placas ósseas, parafusos de fixação ou suturas (GILDING, 1981). As três principais classes de materiais utilizadas na preparação de biomateriais são: os metais, os polímeros e as cerâmicas. Pode-se ter ainda a combinações desses três tipos por meio da preparação de compósitos. A partir dessa perspectiva, o desenvolvimento de biomateriais com base em matrizes poliméricas tem proporcionado um grande avanço nesta área. Polímeros sintéticos e de origem natural têm sido aplicados no desenvolvimento de biomateriais estáveis em diversos formatos e dimensões para os mais diferentes tipos de aplicação.

1.2.1. Hidrogéis

Os hidrogéis são bons exemplos da crescente evolução dos biomateriais poliméricos. Atualmente, os hidrogéis são peças chave no desenvolvimento de novos sistemas para cultura

celular, emboloterapia (fechamento proposital de uma via sanguínea), liberação controlada de fármacos e agentes biológicos, curativos, testes celulares, entre outros. Hidrogéis são formados por redes tridimensionais de polímeros hidrofílicos capazes de absorver e reter grandes quantidades de água ou fluidos biológicos (OMIDIAN *et al.*, 2005; ZOHURIAAN-MEHR *et al.*, 2010). Além disso, esses são capazes de manter sua rede polimérica estável mesmo no estado intumescido. Essa propriedade resulta do fato de que as cadeias poliméricas hidrofílicas, que formam o hidrogel, estão reticuladas umas às outras assegurando assim a estabilidade do mesmo (ver Figura 1.1).

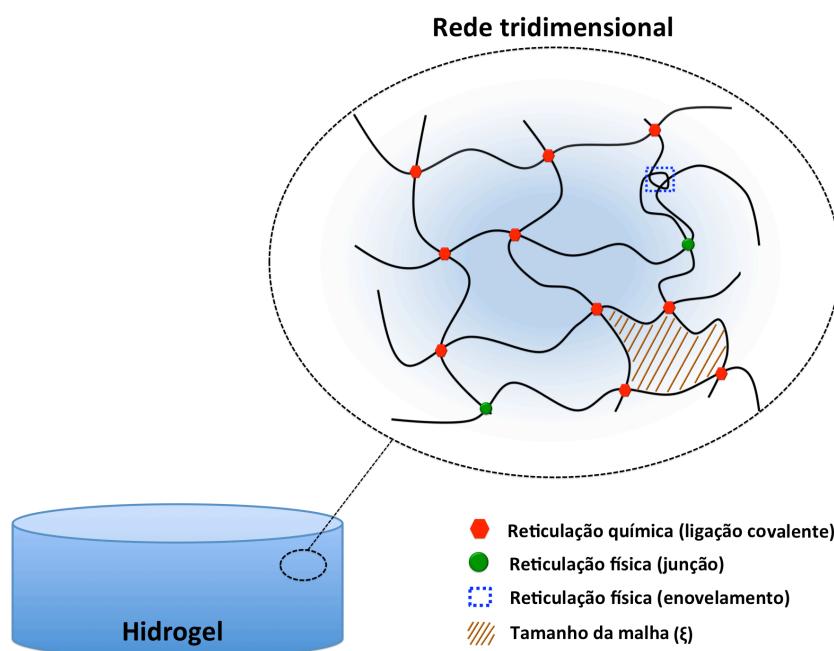


Figura 1.1. Ilustração da rede tridimensional que forma os hidrogéis.

A reticulação da rede tridimensional dos hidrogéis pode ocorrer por meio químico ou físico ou, ainda, por ambos. Nos hidrogéis quimicamente reticulados, ou hidrogéis químicos, as cadeias poliméricas estão reticuladas através de ligações covalentes, as quais são irreversíveis (TRABBIC-CARLSON *et al.*, 2003). Esse tipo de hidrogel tem sido utilizado como biomaterial em aplicações mais robustas como em casos de aplicações *in situ* em implantes em órgãos humanos e animais. Já os hidrogéis fisicamente reticulados, ou hidrogéis

físicos, possuem as cadeias poliméricas reticuladas apenas por interações físicas, principalmente interações eletrostáticas, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio (CERCHIARA *et al.*, 2002). Diferentemente do que ocorre com o hidrogel químico, nesse tipo de hidrogel pode ocorrer a desintegração da rede polimérica caso sejam enfraquecidas as interações físicas que a constitui. Devido a esse comportamento, os hidrogéis físicos são classificados como reversíveis. Logo, essa característica favorece, por exemplo, a aplicação desses como carreador em sistemas de liberação controlada de fármacos (HOARE *et al.*, 2008). Além da diferença entre o tipo de reticulação, os hidrogéis químicos e físicos também diferem no método de preparação. Hidrogéis químicos são preparados, principalmente, por: i) polimerização de monômeros na presença de um agente de reticulação, o qual atua como um co-monômero; ii) reticulação de cadeias poliméricas com ou sem a presença de agente de reticulação; iii) polimerização de monômeros (ou oligômeros) com grau médio de funcionalização maior que 2. Deve ser salientado que o agente de reticulação deve, também, possuir grau de funcionalização maior que 2.

Em relação aos hidrogéis físicos, estes podem ser preparados por meio de diferentes metodologias. A mais usual é a mistura de polímeros que apresentem grupos funcionais eletricamente carregados ou que em uma dada condição apresentem cargas elétricas (por exemplo, devido à variação do pH, força iônica, etc.) (FAJARDO *et al.* 2010; FAJARDO *et al.* 2012). Esses polímeros são chamados de polieletrólitos. Quando polieletrólitos de cargas opostas são misturados, em solução, ocorre a formação de complexos polieletrólíticos devido à forte atração eletrostática entre as cargas opostas (FAJARDO *et al.*, 2010; FAJARDO *et al.*, 2012). A reticulação física pode ocorrer, também, quando um polieletrólito é colocado na presença de íons di- e tri-valentes de carga elétrica oposta (GREGOR *et al.*, 1996). Ambas as metodologias permitem formar hidrogéis nos mais diferentes formatos e escalas de tamanho. Por exemplo, é crescente o número de publicações onde hidrogéis, na forma de filmes e membranas, são utilizados como substratos para cultivo de células e tecidos ou como revestimentos de ferimentos (NGOC QUYEN *et al.*, 2011; VAN VLIERBERGHE *et al.*,

2011). Ainda, micro- e nano-hidrogéis têm sido cada vez mais usados como carreadores em sistemas de liberação controlada de fármacos.

Na verdade, nas últimas duas décadas, os hidrogéis deixaram de ser apenas materiais capazes de reter água e passaram a ser desenvolvidos para diversas aplicações tecnológicas. Isso se deve, principalmente, à formação de uma nova classe de hidrogéis capazes de responder a estímulos externos e internos. Esses novos hidrogéis responsivos são capazes de alterar alguma de suas propriedades (como volume, porosidade, etc.) em função da variação de alguns parâmetros do meio no qual está inserido. Por exemplo, em condições específicas, um hidrogel no estado intumescido e que tenha propriedade responsiva pode ter sua rede colapsada em função da variação de algum estímulo externo fazendo com que o líquido absorvido seja liberado (MATHEW *et al.*, 2012). Essa propriedade responsiva de alguns hidrogéis foi um fator decisivo para dar início à aplicação dos mesmos em diferentes áreas (no caso, tecnológicas e biotecnológicas). Dentre essas áreas está a dos biomateriais, a qual tem se servido das interessantes propriedades dos hidrogéis, já que estes possuem consistência macia (ZHU *et al.*, 2011), elasticidade e similaridade com tecidos humanos (SLAUGHTER *et al.*, 2009) e a capacidade de absorção e retenção de uma grande quantidade de líquidos aquosos. Além disso, diversos estudos mostram que os hidrogéis apresentam biocompatibilidade com diferentes sistemas biológicos; uma propriedade fundamental para um candidato à biomaterial (SLAUGHTER *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2011).

1.2.2. Nanopartículas automontadas

Não somente os homopolímeros têm sido utilizados na obtenção de novos biomateriais, mas também os copolímeros. Um copolímero nada mais é do que um polímero formado por dois ou mais diferentes tipos de monômeros, ou seja, ele consiste de diferentes unidades repetitivas. Os copolímeros podem ser classificados de acordo com o arranjo dessas unidades repetitivas (ou unidades monoméricas) ao longo de sua cadeia. Dentre os tipos mais comuns de copolímeros podemos citar: os aleatórios; os alternados; os em bloco; os enxertados; os em estrela e os em escova.

Dentre esses exemplos, os copolímeros bloco apresentam, em muitos casos, característica anfifílica, isto é, um dos blocos possui característica hidrofílica enquanto o outro possui característica hidrofóbica. Copolímeros em bloco com característica anfifílica têm recebido grande destaque na preparação de novos biomateriais devido a sua habilidade de automontagem, a qual permite a preparação de estruturas com diferentes morfologias (micelas, vesículas, etc.) ou filmes finos (BORISOV *et al.*, 2011). Todos esses materiais possuem numerosas aplicações em sistema de liberação de fármacos, nanoreatores e “*nanotemplates*” (ROSLER *et al.*, 2001). Nanopartículas formadas pela automontagem dos copolímeros em bloco são um dos mais promissores nanocarreadores para liberação controlada de moléculas ativas com característica hidrofóbica ou hidrofílica. Isso ocorre, pois a automontagem de copolímeros em bloco com caráter anfifílico representa uma rota atraente para obtenção de materiais com estrutura definida. Quando em meio aquoso, por exemplo, os blocos hidrofóbicos formam a carço (“*core*”) da partícula, enquanto que os blocos hidrofílicos formam a casca (“*shell*”) (ver Figura 1.2).

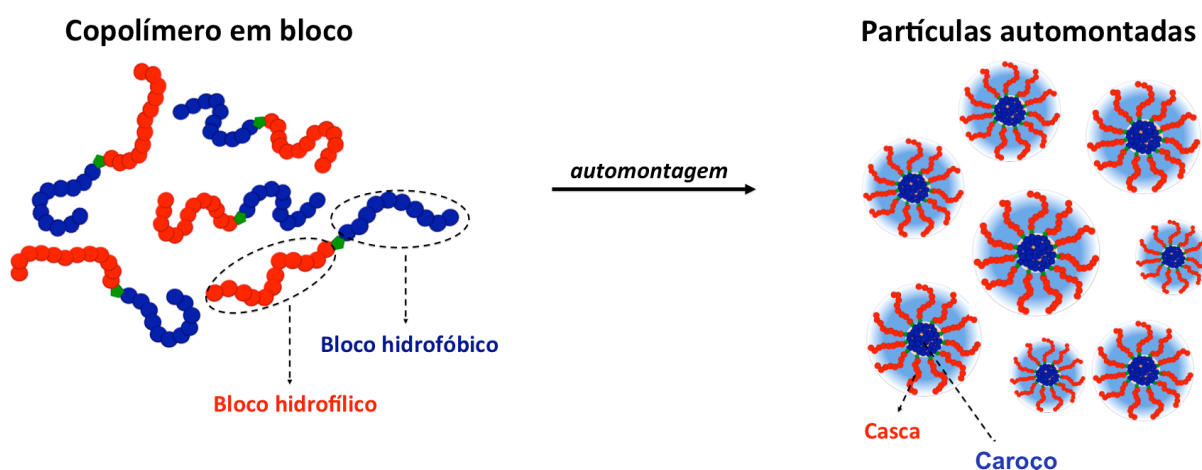


Figura 1.2. Esquema ilustrativo da automontagem de copolímeros em blocos, com caráter anfifílico, em meio aquoso.

A estrutura casca-carço cria um microambiente ideal para incorporação de fármacos hidrofóbicos na região do carço, enquanto que a casca hidrofílica é responsável por estabilizar a interface entre a carço hidrofóbica e o meio aquoso. Essa configuração também melhora a dispersão, inibe a agregação e interação com outros componentes hidrofóbicos, além de reduzir possíveis efeitos colaterais do fármaco (BRANCO *et al.*, 2009). Contudo, deve ser salientado que a estrutura formada pela automontagem irá depender de alguns fatores como a razão mássica (ou volumétrica) entre os segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos, concentração do copolímero em solução, do solvente, da temperatura, do pH, da força iônica, etc.

A associação de polímeros hidrofóbicos com biopolímeros como no caso dos polissacarídeos, os quais geralmente são considerados hidrofílicos, propiciam a preparação de copolímero com propriedades desejáveis visando sua aplicação como biomateriais. Sendo um dos blocos do copolímero formado por um polissacarídeo pode-se, por exemplo, aumentar a biocompatibilidade da estrutura automontada (MODOLON *et al.*, 2012). Além disso, a casca formada pela estrutura do polissacarídeo pode aumentar a absorvidade do mesmo pelo organismo (LEMARCHAND *et al.*, 2004).

1.3. BIOPOLÍMEROS

Biopolímeros são polímeros produzidos por organismos vivos. Celulose, proteínas, peptídeos, DNA e RNA são todos modelos de biopolímeros (MANO, 1989). A celulose é um dos exemplos mais comuns de biopolímeros e é o material orgânico mais abundante em nosso planeta. Já o biopolímero DNA é, sem dúvida, o mais importante, pois é o meio pelo qual a herança genética de um indivíduo é transferida aos seus descendentes.

A principal diferença entre os polímeros convencionais e os biopolímeros pode ser encontrada nas suas estruturas. Polímeros, incluindo os biopolímeros, são constituídos de unidades repetitivas chamadas de meros. Na maioria dos casos, os biopolímeros têm sua estrutura bem definida, embora essa não seja uma característica predominante. A exata composição química e a sequência, na qual essas unidades repetitivas estão ordenadas, são

características de sua estrutura primária, como no caso das proteínas. Muitos biopolímeros apresentam como principal característica uma estrutura complexa, a qual determina suas funções biológicas. Ao contrário disso, os polímeros sintéticos geralmente possuem estrutura simples e mais aleatória (ou estocástica). Isso faz com que estes apresentem, na maioria das vezes, uma distribuição de massas molares característica, o que geralmente não é observado nos biopolímeros.

Em contraste aos polímeros sintéticos, os biopolímeros tendem a ter uma estrutura bem definida. Cada molécula de uma determinada proteína, por exemplo, possui um sequenciamento similar do número de monômeros e, portanto, a incidência de distribuição de massas molares nas proteínas é baixa. Esse fenômeno é chamado de monodispersividade, que contrasta na, maioria das vezes, com a polidispersividade observada nos polímeros sintéticos. Além disso, esses polímeros de ocorrência natural têm complexos padrões de dobramento, incluindo as estruturas secundárias e terciárias, as quais surgem com base nas propriedades da estrutura primária (SWIFT, 1994; JÚNIOR, 2002).

Muitos biopolímeros são extraídos e purificados para o uso comercial e vários outros são estudados tanto para ampliar as aplicações já existentes quanto para as novas aplicações. Algumas dessas novas aplicações estão voltadas prioritariamente para substituição dos materiais derivados do petróleo (por exemplo, as embalagens plásticas), para tecnologia de alimentos, na demanda por alimentos convenientes e menos calóricos e para atuar na obtenção de biomateriais, fundamentais para o desenvolvimento da biotecnologia. Em um futuro próximo, os biopolímeros irão desempenhar um importante papel nessas áreas por meio de seu uso em plásticos biodegradáveis, tais como: os aditivos alimentares (incluindo análogos de lipídios), na engenharia de tecidos e também, como carreadores de fármacos. Desse modo, a ampla aplicabilidade dos biopolímeros deve-se ao fato dos mesmos apresentarem relativa biodegradabilidade e grande biocompatibilidade, além de serem obtidos a partir de recursos renováveis, aspectos muito interessantes e desejados na obtenção de novos materiais (KAPLAN, 1998).

Uma área emergente dentre as pesquisas com biopolímeros é a aplicação na preparação de novos materiais. Os biopolímeros vêm desempenhando um papel fundamental na nanotecnologia e na síntese de materiais biomiméticos. Por apresentarem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, os biopolímeros proporcionam a realização de diversas pesquisas de ponta como a sua utilização como substratos para a formação de arquiteturas moleculares. A formação de túbulos lipídicos e proteínas reticuladas sob estruturas biopoliméricas podem abrir novas oportunidades de um mercado altamente especializado para biopolímeros (HAYASHI, 1994). Outro exemplo é a preparação de hidrogéis a partir de biopolímeros, mais especificamente de polissacarídeos, para aplicação como biomateriais. Além de apresentar a biocompatibilidade exigida pelos biomateriais, os polissacarídeos são obtidos a partir de fontes renováveis e apresentam baixo custo de produção/obtenção. Soma-se a isso o desenvolvimento de novas metodologias e técnicas de modificação química, as quais permitem a inserção de grupos específicos nas estruturas dos polissacarídeos, tornando-os reticuláveis e até mesmo responsivos (CRISPIM *et al.*, 2012). Além da reticulação química, os polissacarídeos podem também produzir hidrogéis físicos por meio de complexação polieletrólítica, como é o caso da quitosana e do alginato (FAJARDO *et al.*, 2010; FAJARDO *et al.*, 2012).

1.3.1. Quitosana

Um dos polímeros amplamente utilizados na obtenção de biomateriais é a quitosana (QT), um copolímero linear da *D*-glicosamina e da *N*-acetil-*D*-glicosamina com ligação do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 1.3). É derivada do biopolímero quitina que, por sua vez, é o principal componente das conchas dos crustáceos, cutículas dos insetos e paredes das células dos fungos (KAS, 1997). Os principais parâmetros que influenciam nas características da quitosana são a sua massa molecular e o seu grau de desacetilação, os quais são determinados pelas condições selecionadas durante a sua preparação que, ao mesmo tempo, podem ser modificados em um estágio posterior. Por exemplo, a QT pode ser reacetilada e a massa molar pode ser diminuída por despolimerização ácida (BERGER, 2004). Outra característica

importante da QT é a sua insolubilidade em água pura. Contudo, é possível solubilizá-la em água contendo ácidos orgânicos como ácido acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos como ácido clorídrico diluído resultando em soluções viscosas. Logo, a solubilidade da QT está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na sua cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e, também, maior a solvatação destas pela água.

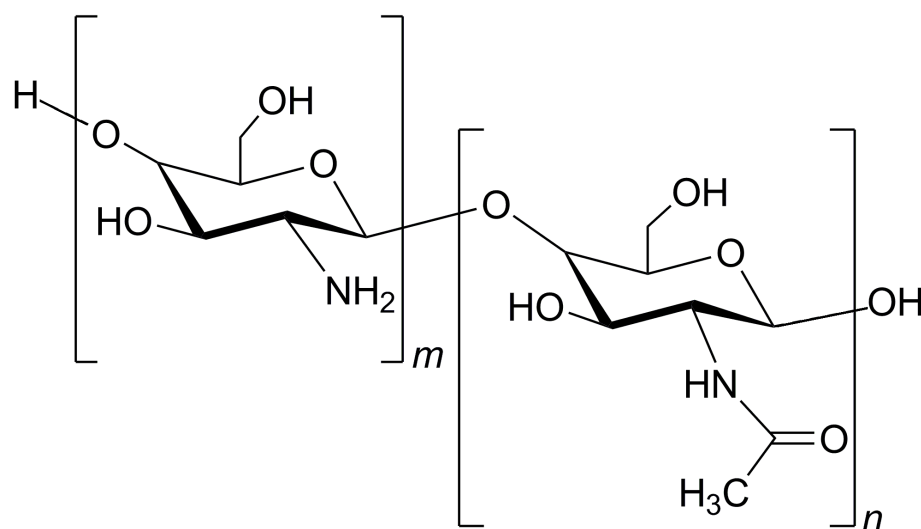


Figura 1.3. Unidade repetitiva da quitosana ($m > n$).

Na verdade, a QT tem sido objeto de muitas pesquisas, pois possui propriedades físicas únicas. Ela é um interessante polímero com boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, potencial hemostático, boa característica de preparação de filmes e atividade anti-infecciosa (RADHANKRISHNAN *et al.*, 1991; RAO *et al.*, 1997). Além disso, a quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas (lisozima, por exemplo) podendo assim, ser considerada biodegradável.

Esse versátil polímero tem encontrado aplicações em muitas indústrias primárias como a agricultura, de papel, têxtil, farmacológica, cosmética e no tratamento de água (HAMMAN, 2010). Por apresentar grupos amino e hidroxila em posições adjacentes, a quitosana é um polímero quelante natural que pode ser utilizado para remover íons de metais de transição de

águas poluídas (GUPTA *et al.*, 2000). Outro fator observado é a sua atuação na cicatrização de ferimentos ao possuir ação antitumoral e propriedades anticoagulantes, as quais permitem a sua utilização na medicina como transportadores de fármacos, para o reparo de nervos ou substratos porosos biodegradáveis para regeneração da pele. Desse modo, pesquisas sobre o uso de quitosana em sistemas de liberação controlada de fármacos indicam aplicações do tipo oral, parental, transdermal, ocular e nasal. Além disso, a QT tem sido utilizada na obtenção de sistemas implantados de liberação controlada (CAPITANI *et al.*, 2001).

Devido as suas diferentes aplicações, a QT tem sido formulada em pó, géis e filmes, esponjas, tabletes intragástricos e, especialmente, no formato de partículas esféricas (micro e macropartículas). Aliás, duas das suas propriedades mais importantes são a natureza catiônica e a alta densidade de carga em solução ácida, já forma complexos iônicos insolúveis com espécies polianiônicas solúveis em água em condições neutras. Isso faz com que os complexos polieletrólíticos, sendo a QT um dos seus componentes, apresentem um grande potencial para serem utilizados em aplicações biomédicas e/ou farmacêuticas.

1.3.2. Sulfato de Condroitina

O sulfato de condroitina (SC) integra a família dos glicosaminoglicanos (GAGs), sendo caracterizado como um copolímero alternado de $\beta(1,4)$ -D-ácido glicurônico e $\beta(1,3)$ -N-acetil-D-galactosamina, os quais podem ser sulfatados nos carbonos C₄ ou C₆ (Figura 1.4). O SC é considerado um importante componente estrutural de ligações dos tecidos, pois forma uma rede com o colágeno para permitir a passagem de macromoléculas com as proteínas globulares, sendo também, um componente chave da matriz cartilaginosa. Aliás, outra característica interessante do SC é a sua degradação por bactérias anaeróbicas, *B. thetaiotaomicron* e *B. ovatus*, que residem no intestino grosso (SALYERS, 1979; SALYERS *et al.*, 1980). Essa situação sugere que o SC seja, potencialmente, um bom candidato em carregador de fármacos para atuar na região do cólon (SINTOV *et al.*, 1995).

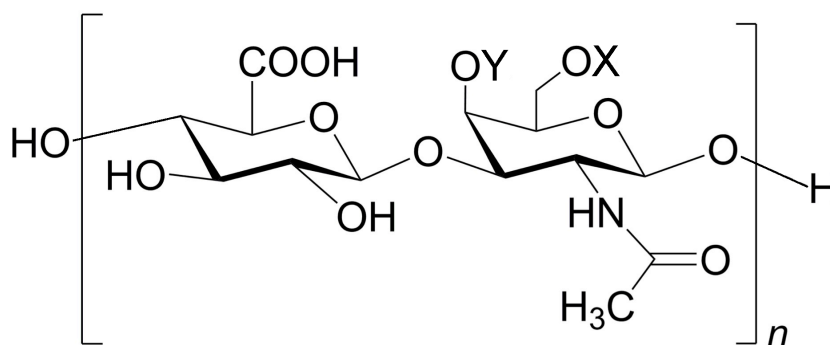


Figura 1.4. Unidade repetitiva do sulfato de condroitina ($Y = H^+$ e $X = SO_3^-$ ou $Y = SO_3^-$ e $X = H^+$).

Esse biopolímero, extraído comercialmente a partir da aorta bovina, é utilizado há bastante tempo no combate de doenças relacionadas à aterosclerose, trombose, hiperlipidemia e osteoartrite (RICHY *et al.*, 2003). Estudos clínicos já têm demonstrado efeitos terapêuticos do SC administrado via oral em pacientes com osteoporose, com a melhoria na função articular e redução de dores. No entanto, o fato do SC ser altamente solúvel em condições fisiológicas limita sua aplicação como veículo no estado sólido. Nesse sentido, por ser um polieletrólito com caráter aniônico, o SC pode formar complexos polieletrólíticos (PEC) pela interação eletrostática com substâncias positivamente carregadas podendo, assim, ser uma ótima estratégia para manter o SC no estado sólido. O SC pode, ainda, ser um interessante componente na preparação de novos copolímeros ao possibilitar a formação de materiais únicos com grande potencial em aplicações biológicas e farmacológicas.

1.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, I. *et al.* Biomateriais. In: *Biotecnologia*, Lidel, (2003).

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 15 jun. 2013.

BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 35-52 (2004).

BOOTH, C.; PRICE, C. Polymers as biomaterials. In: *Comprehensive Polymer Science - The Synthesis, Characterization, Reaction and Applications of Polymers*. Pergamon Press (1989).

BORISOV, O. V. *et al.* Self-Assembled Structures of Amphiphilic Ionic Block Copolymers: Theory, Self-Consistent Field Modeling and Experiment. *Self Organized Nanostructures of Amphiphilic Block Copolymers I*, v. 241, p. 57-129 (2011).

BRANCO, M. C.; SCHNEIDER, J. P. Self-assembling materials for therapeutic delivery. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 3, p. 817-831 (2009).

BUDDY, D. *et al.* *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. 3^a ed., Elsevier (2004).

CAPITANI, D. *et al.* NMR study of a novel chitosan-based hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v. 45, n. 3, p. 245-252 (2001).

CERCHIARA, T. *et al.* Physically cross-linked chitosan hydrogels as topical vehicles for hydrophilic drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 54, n. 11, p. 1453-1459 (2002).

CRISPIM, E. G. *et al.* Hydrogels based on chemically modified poly(vinyl alcohol) (PVA-GMA) and PVA-GMA/chondroitin sulfate: Preparation and characterization. *Express Polymer Letters*, v. 6, n. 5, p. 383-395 (2012).

DUCHEYNE, P. Bioceramics - Material Characteristics Versus Invivo Behavior. *Journal of Biomedical Materials Research-Applied Biomaterials*, v. 21, n. A2, p. 219-236 (1987).

FAJARDO, A. R. *et al.* Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 934-943 (2010).

FAJARDO, A. R. *et al.* Hydrogel based on an alginate-Ca²⁺/chondroitin sulfate matrix as a potential colon-specific drug delivery system. *RSC Advances*, v. 2, n. 29, p. 11095-11103 (2012).

GILDING, D. Biodegradable polymers. *In: Biocompatibility of Clinical Implants Materials*. CRC Press (1981).

GREGOR, J. E. *et al.* Interactions of calcium and aluminium ions with alginate. *Water Research*, v. 30, n. 6, p. 1319-1324 (1996).

GUPTA, K. C.; KUMAR, M. An overview on chitin and chitosan applications with an emphasis on controlled drug release formulations. *Journal of Macromolecular Science-Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, v. C40, n. 4, p. 273-308 (2000).

HAMMAN, J. H. Chitosan Based Polyelectrolyte Complexes as Potential Carrier Materials in Drug Delivery Systems. *Marine Drugs*, v. 8, n. 4, p. 1305-1322 (2010).

HAYASHI, T. Biodegradable Polymers For Biomedical Uses. *Progress in Polymer Science*, v. 19, n. 4, p. 663-702 (1994).

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, v. 49, n. 8, p. 1993-2007 (2008).

IUPAC Recommendations 2012. Terminology for biorelated polymers and applications. *Pure and Applied Chemistry*, v. 84, n. 2, p. 377-410 (2012).

JÚNIOR, S. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. 5ª ed., LTC (2002).

KAPLAN, D. Introduction to Biopolymers from renewable resources. *In: Biopolymers from renewable resources* Springer-Verlag, p. 1-29 (1998).

KAS, H. S. Chitosan: properties, preparations and application to microparticulate systems. *Journal of Microencapsulation*, v. 14, n. 6, p. 689-711 (1997).

LEMARCHAND, C.; GREF, R.; COUVREUR, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 58, n. 2, p. 327-341 (2004).

MANO, E. *Introdução à Polímeros*. 2^a ed., Edgar Blucher (1989).

MATHEW, A. *et al.* Curcumin Loaded-PLGA Nanoparticles Conjugated with Tet-1 Peptide for Potential Use in Alzheimer's Disease. *Plos One*, v. 7, n. 3 (2012).

MODOLON, S. D. M. *et al.* Sweet Block Copolymer Nanoparticles: Preparation and Self-Assembly of Fully Oligosaccharide-Based Amphiphile. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 4, p. 1129-1135 (2012).

NGOC QUYEN, T. *et al.* In Situ Forming and Rutin-Releasing Chitosan Hydrogels As Injectable Dressings for Dermal Wound Healing. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 8, p. 2872-2880 (2011).

OMIDIAN, H.; ROCCA, J. G.; PARK, K. Advances in superporous hydrogels. *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 1, p. 3-12 (2005).

RADHANKRISHNAN, V. *et al.* Haemostatic potential of chitosan. *Biomedicine*, v. 2, p. 3 (1991).

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 34, n. 1, p. 21-28 (1997).

RICHY, F. *et al.* Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis - A comprehensive meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, v. 163, n. 13, p. 1514-1522 (2003).

ROSLER, A.; VANDERMEULEN, G. W. M.; KLOK, H. A. Advanced drug delivery devices via self-assembly of amphiphilic block copolymers. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 53, n. 1, p. 95-108 (2001).

SALYERS, A. A. Energy-Sources Of Major Intestinal Fermentative Anaerobes. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 32, n. 1, p. 158-163 (1979).

SALYERS, A. A.; OBRIEN, M. Cellular Location Of Enzymes Involved In Chondroitin Sulfate Breakdown By Bacteroides-Thetaiotaomicron. *Journal of Bacteriology*, v. 143, n. 2, p. 772-780 (1980).

SINTOV, A.; DICAPUA, N.; RUBINSTEIN, A. Cross-Linked Chondroitin Sulfate - Characterization For Drug-Delivery Purposes. *Biomaterials*, v. 16, n. 6, p. 473-478 (1995).

SLAUGHTER, B. V. *et al.* Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced Materials*, v. 21, n. 32-33, p. 3307-3329 (2009).

SWIFT, G. Water-Soluble Polymers. *Polymer Degradation and Stability*, v. 45, n. 2, p. 215-231 (1994).

TRABBIC-CARLSON, K.; SETTON, L. A.; CHILKOTI, A. Swelling and mechanical behaviors of chemically cross-linked hydrogels of elastin-like polypeptides. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 3, p. 572-580 (2003).

VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 5, p. 1387-1408 (2011).

YOSHIDA, R. *et al.* Pulsatile Drug-Delivery Systems Using Hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 11, n. 1-2, p. 85-108 (1993).

ZHU, J. M.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, v. 8, n. 5, p. 607-626 (2011).

ZOHURIAAN-MEHR, M. J. *et al.* Advances in non-hygienic applications of superabsorbent hydrogel materials. *Journal of Materials Science*, v. 45, n. 21, p. 5711-5735 (2010).

1.5. OBJETIVOS DO TRABALHO

1.5.1. Objetivos gerais

- Investigar o potencial da quitosana (QT) e do sulfato de condroitina (SC) na preparação de diferentes tipos de biomateriais, conjuntamente ou em associação com outros polímeros/compostos;
- Desenvolver metodologias para preparação de biomateriais à base de QT e/ou SC;
- Desenvolver metodologias para preparação de biomateriais à base de copolímeros em bloco de SC e de poli(ácido láctico) (PLA);
- Caracterizar físico-química e biologicamente os biomateriais preparados;
- Avaliar a aplicabilidade destes biomateriais.

1.5.2. Objetivos específicos

- Preparar hidrogéis que combinem redes química e fisicamente reticuladas utilizando técnicas de modificação química e a capacidade de complexação polieletrólítica dos polissacarídeos QT e SC;
- Preparar um substrato a partir da QT/SC para ser utilizado como suporte para crescimento celular e de tecidos;
- Preparar filmes a partir da QT/SC para atuarem como revestimento de ferimentos decorrentes de queimaduras e também como carreador do fármaco sulfadiazina de prata (AgSD);
- Sintetizar um copolímero em bloco de SC e poli(ácido láctico) (PLA) capaz de se automontar em água, formando assim nanopartículas para atuarem como possíveis carreadores em sistemas de liberação controlada de fármacos;
- Caracterizar todas as modificações químicas realizadas bem como as mudanças estruturais e morfológicas decorrentes dos processos de preparação utilizados para cada material;

- Executar ensaios *in vitro* de liberação controlada de fármaco e de atividade bactericida da AgSD, citotoxicidade e adesão e proliferação celular dos substratos de QT/SC a fim de avaliar a aplicabilidade dos materiais formados como potenciais biomateriais.

CAPÍTULO 2

HIDROGÉIS DE QUITOSANA/SULFATO DE CONDROITINA FORMADOS A PARTIR DE REDES QUÍMICA E FÍSICAMENTE RETICULADAS: DESENVOLVIMENTO, SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO

2.1. INTRODUÇÃO

Por possuírem interessantes propriedades físico-químicas os hidrogéis têm sido aplicados em diversas áreas (ZOHURIAAN-MEHR e KABIRI, 2008; SCHEXNAILDER e SCHMIDT, 2009). A rede tridimensional que forma a matriz do hidrogel pode absorver e reter grandes quantidades de líquido sem se dissolver ou perder sua integridade estrutural, sendo esta sua principal característica (OMIDIAN *et al.*, 2005). Nas últimas décadas, o principal objetivo das pesquisas envolvendo hidrogéis tem focado na sua preparação e aplicação. Geralmente, a preparação do hidrogel é modulada para atender as expectativas da sua futura aplicação. Um dos aspectos importantes na preparação do hidrogéis se refere ao tipo de metodologia de reticulação aplicada na formação da rede tridimensional. Redes quimicamente reticuladas, ou hidrogéis químicos, são formadas geralmente por macromoléculas covalentemente ligadas umas a outras enquanto que as redes fisicamente reticuladas, ou hidrogéis físicos, são formadas a partir da atração eletrostática entre as macromoléculas carregadas de maneira oposta. Hidrogéis químicos são frequentemente formados por polímeros sintéticos ou naturais, os quais são previamente modificados para introduzir um grupo funcional reticulável ou então são utilizados agentes químicos específicos para reticulação (BURDICK *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2013). Por outro lado, hidrogéis físicos são formados usualmente pela simples mistura de soluções aquosas dos polímeros com cargas opostas, os quais possuem grupos funcionais carregados ou eletricamente carregáveis (FAJARDO *et al.*, 2012).

Neste Capítulo é apresentado um novo tipo de hidrogel onde sua matriz tridimensional é formada por ambas as possibilidades de reticulação - química e física. Esse novo tipo de hidrogel que combina dois tipos de técnicas de reticulação é denominado na língua inglesa como hidrogel “*dual-network*”, o qual pode formar materiais com propriedades superiores aos tradicionais, além de sobrepor algumas das limitações inerentes a cada tipo de hidrogel (químico e físico). A ideia principal apresentada aqui é preparar primeiramente um hidrogel químico a partir de quitosana (QT) modificada e, então, realizar a reticulação física desta primeira rede com sulfato de condroitina (SC). Para isto, grupos metacrilatos provenientes do metacrilato de glicidila (GMA) foram quimicamente inseridos na estrutura da QT possibilitando, assim, sua reticulação química com *N',N'*-metilenobisacrilamida (MBA), um agente de reticulação. Em sequência, a reticulação física foi feita imergindo o hidrogel químico de QT em uma solução ácida de SC. Diversos trabalhos descritos na literatura têm explorado essa possibilidade de combinar SC com polieletrólitos catiônicos, como é o caso da QT (FAJARDO *et al.*, 2010; MUZZARELLI *et al.*, 2012). Para testar a viabilidade e reprodutibilidade dessa metodologia, outro hidrogel foi também formado. Porém, nesse caso, o SC foi quimicamente modificado com GMA para formar então um hidrogel químico, o qual foi posteriormente imerso em uma solução de QT para formar a rede fisicamente reticulada.

A caracterização completa desse novo tipo de hidrogel bem como os resultados obtidos são apresentados no decorrer deste Capítulo. Na verdade, a partir dos dados obtidos é possível constatar a formação de uma nova classe de hidrogéis. Além disso, o uso de polímeros de origem natural é uma ideia original no que diz respeito a esse tipo de material. Como consequência direta do uso dessa metodologia para a obtenção deste tipo de material, há a possibilidade de ampliação da faixa de aplicabilidade do hidrogel devido sua baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade. Todas essas características são desejáveis para potenciais aplicações biológicas e farmacológicas, por exemplo.

2.2. EXPERIMENTAL

2.2.1. Materiais

Quitosana (QT, CAS 90-77-7, Golden-Shell Biochemical, China) 85 % desacetilada e massa molar viscosimétrica (M_v) igual a 87.000 g/mol; sulfato de condroitina (SC, CAS 9007-28-7, gentilmente cedida por Solabia - Brasil) com M_v igual a 22.000 g/mol. Ambas as massas molares viscosimétricas (M_v) foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita por Fajardo *et al.* (2010). Metacrilato de glicidila (GMA, 97 %, CAS 106-91-2, Sigma-Aldrich, EUA); *N,N'*-metilenobisacrilamida (MBA, CAS 110-26-9, Sigma, EUA); Ácido acético (100 %, CAS 64-19-7, Nuclear, Brasil) e persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$, 98 %, CAS 7775-27-1, Sigma-Aldrich, EUA).

2.2.2. Métodos

2.2.2.1. Técnicas de caracterização

Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foi realizada em um espectrômetro Shimadzu (modelo 8300, Japão) operando na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (NMR) de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) no estado sólido foram realizadas em um espectrômetro Varian (modelo Oxford 300, Austrália). Medidas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram executadas a 25 °C usando uma estação de trabalho Surveyor Plus (Thermo Fisher Scientific, EUA) equipada com uma coluna cromatográfica PolySep-GFC-O 6000 (300 x 7,8 mm, Phenomenex) e um detector de arranjos de diodos (Surveyour Plus PDS Detector), ambos controlados pelo software ChromChest[®]. Solução aquosa de ácido acético (1,5 % v/v) foi usada como fase móvel em um fluxo de 0,5 ml/min. Os eluentes contendo as amostras foram monitorados em um comprimento de onda (λ) igual a 212 nm. Termogravimetria (TG) foi realizada em um sistema de análise térmica simultânea Netzsch (modelo STA 409/PG/4/G Luxx, EUA) com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob atmosfera de $\text{N}_{2(g)}$ (fluxo de 20 ml/min) e em uma faixa de temperatura de 22 a 400 °C. Medidas de difração de raios-X (XRD) foram feitas em um difratômetro DMAXB (modelo Rigaku, Japão) equipado com uma

fonte da radiação de Cu-K α ($\lambda = 1,54 \text{ \AA}$). As medidas foram feitas em um ângulo de varredura (2θ) de 5 a 70 °, com resolução de 0,02 ° e velocidade de varredura de 2 °/min. Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram obtidas em um microscópio Shimadzu (modelo SS550 Superscan, Japão). Para obtenção das imagens, as amostras foram, primeiramente, imersas em água destilada a temperatura ambiente até que atingissem o equilíbrio de intumescimento (aproximadamente 24 h após a imersão). Feito isso, as amostras foram congeladas em N_{2(l)} e liofilizadas (Christ, modelo Alpha 1-2 LD Plus, Alemanha) a -55 °C por 24 h. Após serem fraturadas, as amostras foram cobertas por uma fina camada condutora de ouro e, então, as imagens foram obtidas por SEM.

2.2.2.2. Modificação química da QT e do SC com GMA

A estratégia utilizada para preparar ambos os polímeros modificados com GMA foi adaptada da literatura (LI *et al.*, 2003; REIS *et al.*, 2006). QT modificada com GMA (denominada aqui como QT-mod) foi sintetizada a partir da solubilização da QT (2 g - 1 eq) em solução aquosa de ácido acético (1,5 % v/v, 200 ml) a temperatura ambiente por 4 h. Após, GMA (2,1 ml - 10 eq) foi adicionado ao sistema reacional, o qual foi posteriormente aquecido até 60 °C. A reação foi mantida sob agitação magnética por 12 h. O sistema reacional foi resfriado e o material de interesse precipitado com a adição de etanol (200 ml) e, então, recolhido por processo de filtração a vácuo. O filtrado foi lavado várias vezes com porções de etanol para remover qualquer material não reagido. A QT-mod foi liofilizada a -55 °C por 24 h e como resultado foi obtido um pó amarelado. **Rendimento:** 1,75 g (74,5 %). FTIR (cm⁻¹): 3431 (O-H e N-H); 2928 e 2876 (C-H); 1728 (C=O_{ester}); 1657 (C=C); 1554 (N-H, flexão); 1418 e 1384 (C-H, flexão); 1316 (C-N); e 1162, 1054, e 1034 (C-O). NMR ¹H (300 MHz, D₂O, 298 K, δ , ppm): 6,02 (d, C=CH₂); 5,62 (d, C=CH₂); 4,79 (m, H-1^{GlcNAc} e H-1^{GlcN}); 4,52 (d, O-CH₂); 3,90 – 3,30 (m, CH, 5xCH₂, NH e OH); 3,77 (m, H-3,4,6^{GlcNAc} e H-3,4,6^{GlcN}); 3,57 (m, H-5,6^{GlcNAc} e H-5,6^{GlcN}); 3,40 (m, O-CH); 3,03 (m, H-2^{GlcN} e H-2^{GlcN}); 1,93 (s, CH₃); e 1,73 (s, CH₃). (Nota: GlcN = unidade D-glucosamina e GlcNAc = unidade N-acetil-D-glucosamina).

SC modificado com GMA (denominado SC-mod) foi sintetizado utilizando uma metodologia similar à descrita acima. O SC (10 g - 1 eq) foi solubilizado em água destilada (100 ml) a temperatura ambiente por 4 h. O pH do meio reacional foi ajustado para 3,5 com a adição de solução ácido acético (1,0 M). Feito isso, GMA (2,1 ml - 0,7 eq) foi adicionado ao sistema reacional que, posteriormente, foi aquecido até 60 °C e mantido sob agitação magnética por 12 h. Após, o sistema reacional foi resfriado e o SC-mod precipitado pela adição de etanol (100 ml) e, então, recolhido por filtração a vácuo. O filtrado foi lavado diversas vezes com porções de etanol para remover todos os materiais que não reagiram. O SC-mod foi liofilizado a -55 °C por 24 h e o resultado foi um pó fino branco. **Rendimento** 9,23 g (91,3 %). FTIR (cm⁻¹): 3417 (O-H e N-H); 2972 e 2915 (C-H); 1719 (C=O_{éster}); 1633 (C=O_{amida} e C=C); 1574 (N-H, flexão); 1421 e 1378 (C-H, flexão); 1315 (C-N); 1250 (SO₂); e 1131 e 1035 (C-O). ¹H NMR (300 MHz, D₂O, 298 K, δ, ppm): 6,11 (d, C=CH₂); 5,70 (d, C=CH₂); 4,69 (d, O-CH₂); 4,48 (m, H-1^{GlcUa} e H-1^{GalNAc}); 4,30 – 3,20 (m, H-2,3,4,5,6^{GlcUA} e H-2,3,4,5,6^{GalNAc}, O-CH, CH, 5xCH₂, NH, e OH); 1,94 (s, CH₃); e 1,89 (s, CH₃). (Nota: GlcUa = unidade ácido glicurônico e GalNAc = unidade *N*-acetil-*D*-galactosamina).

2.2.2.3. Preparação dos hidrogéis “*dual-network*”

A primeira etapa da preparação dos hidrogéis “*dual-network*” foi a reticulação química do polímero modificado com GMA. Para isso, QT-mod (1,50g) foi solubilizada em solução aquosa de ácido acético (1,5 % v/v, 50 ml) a temperatura ambiente por 4 h. MBA (45 mg) e Na₂S₂O₈ (30 mg) foram adicionados ao sistema reacional e a temperatura foi aumentada até 70 °C. O sistema foi mantido a 70 °C por 1 h para completar a reticulação do hidrogel. O hidrogel químico formado a partir da QT-mod (QT-gel) foi lavado em água destilada para remover algum material não reagido. Por fim, QT-gel foi cortado em porções cúbicas (dimensões: 1 x 1 x 1 cm), as quais foram secas em estufa (50 °C) por 24 h. **Rendimento:** 1,32 g (peso seco).

A reticulação física dos hidrogéis químicos de quitosana (QT-gel) foi feita pela imersão desses em soluções aquosas ácidas de SC. A solução aquosa de SC foi preparada pela

adição de SC (2,5 g) em solução aquosa de ácido acético (1,5 % v/v, 50 ml). Amostras do QT-gel foram imersas em diferentes frascos contendo a solução de SC, por intervalos de tempo distintos (6, 12 e 24 h). Após cada intervalo de tempo, previamente determinado, as amostras de QT-gel, agora fisicamente reticuladas com SC (denominadas de QT-gel/SC) foram removidas dos seus respectivos frascos e, então, lavadas diversas vezes com água destilada e, por fim, secas em estufa (50 °C) por 24 h. Alíquotas das soluções de SC de cada frasco foram recolhidas após a preparação dos hidrogéis QT-gel/SC para quantificar o SC complexado em cada amostra nos diferentes tempos de imersão.

Utilizando uma metodologia similar, foram formados hidrogéis “*dual-network*” de SC (SC-gel/QT). Primeiramente, SC-mod (7,50 g) foi solubilizado em água destilada (50 ml) a temperatura ambiente por 4 h. MBA (225 mg) e Na₂S₂O₈ (225 mg) foram adicionados ao sistema reacional, o qual foi aquecido até 70 °C e mantido nessa temperatura por 1 h para completar a reticulação química do SC-mod. O hidrogel quimicamente reticulado de SC (SC-gel) foi lavado em água destilada por 24 h e cortado em porções cúbicas (dimensões: 1 x 1 x 1 cm), as quais foram secas em estufa (50 °C) por 24 h. **Rendimento:** 5,89 g (peso seco).

Os hidrogéis SC-gel, por sua vez, foram imersos em solução aquosa ácida de QT para preparação da rede fisicamente reticulada. A solução aquosa ácida de QT foi formada pela solubilização de QT (0,75 g) em solução de ácido acético (1,5 % v/v, 50 ml). As amostras de SC-gel foram imersas em diferentes frascos, os quais continham a solução de QT, por diferentes intervalos de tempo (6, 12 e 24 h). Após, as amostras foram coletadas, lavadas em água destilada e, por fim, secas em estufa (50 °C, 24 h). Após a preparação dos hidrogéis SC-gel/QT, alíquotas das soluções de QT de cada frasco foram recolhidas e estocadas para determinar a quantidade de QT complexada em cada tempo de imersão.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1. Modificação química da QT e do SC com GMA

A funcionalização da QT e do SC com grupos metacrilato provenientes do GMA é uma estratégia bastante atraente, pois permite a polimerização radicalar dos polímeros modificados, formando, assim, redes tridimensionais quimicamente reticuladas (TIWARI *et al.*, 2009; MORELLI *et al.*, 2010). A modificação química de polissacarídeos com GMA tem sido explorada e reportada com sucesso por vários estudos. De acordo com Reis *et al.* (2009), a reação de modificação química dos polissacarídeos com GMA pode ocorrer por duas rotas. A primeira é uma reação de transesterificação responsável por formar produtos metacrilatados e, como subproduto, o glicidol. A segunda é uma reação de abertura do anel epóxido do GMA, a qual pode produzir dois produtos de acordo com o sítio de abertura do anel epóxido. Comparando as duas rotas, a primeira, a transesterificação, é uma reação rápida e reversível que predomina quando o solvente utilizado tem caráter aprótico (como, por exemplo, o dimetilsulfóxido) (REIS *et al.*, 2009). Já a segunda rota, a abertura do anel epóxido, é uma reação lenta e irreversível, prevalecendo quando o solvente utilizado tem caráter prótico (como, no caso, a água) (REIS *et al.*, 2009). Levando em conta essas considerações e o fato de que as reações químicas entre os polissacarídeos (QT e SC) com GMA são conduzidas em meio aquoso, pode-se sugerir que a rota por abertura do anel epóxido predomina sobre a transesterificação. A Figura 2.1 mostra um esquema geral das reações entre os polissacarídeos (QT e SC) e o GMA, das quais resultam os produtos: QT-mod e SC-mod.

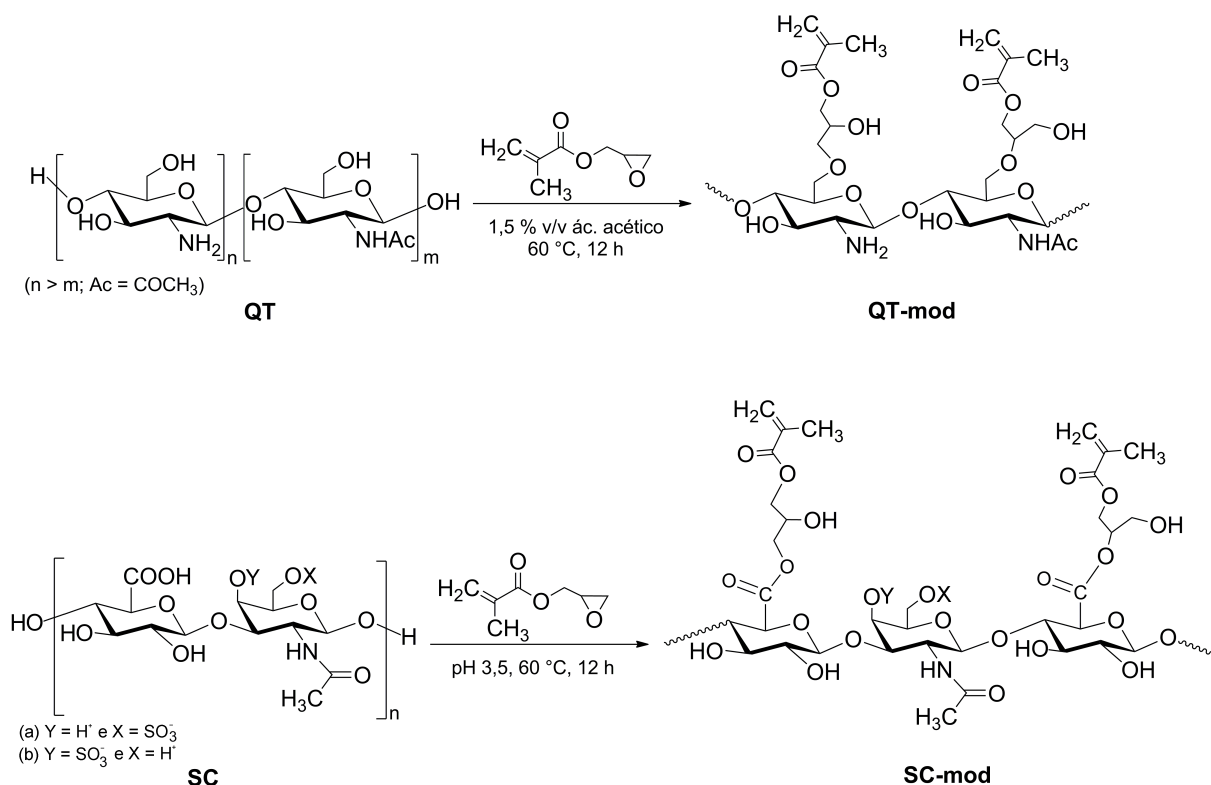


Figura 2.1. Esquema ilustrativo da reação de abertura do anel epóxido do GMA com os polissacarídeos QT e SC.

Os polissacarídeos modificados (QT-mod e SC-mod) foram sintetizados a partir da reação entre os polissacarídeos (QT e SC) com GMA em meio aquoso e meio ácido (pH = 3,5). Nestas condições, conforme descrito na literatura, o GMA pode reagir com os grupos hidroxílicos e carboxílicos presentes nas estruturas dos polissacarídeos por meio de uma reação de abertura do anel epóxido (GUILHERME *et al.*, 2007; REIS *et al.*, 2009). De acordo com estudos prévios realizados em nosso laboratório, observou-se que esse tipo de reação é capaz de inserir dois compostos metacrilatados diferentes na estrutura dos polissacarídeos, o 3-metacrilato-1-glicerila éster e o 3-metacrilato-2-glicerila éster (ver Figura 2.1) (REIS *et al.*, 2009). Isto se deve à habilidade dos grupos hidroxila e carboxila dos polissacarídeos se ligarem ao GMA em diferentes posições do seu anel epóxido.

A caracterização estrutural da QT-mod e do SC-mod foi feita a partir de medidas espectroscópicas de FTIR e NMR ¹H.

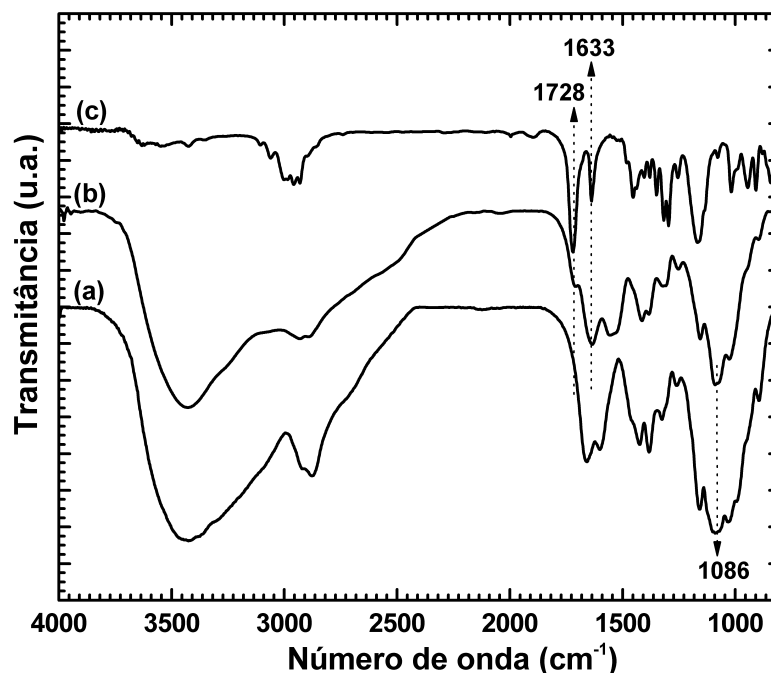


Figura 2.2. Espectros de FTIR da (a) QT, (b) QT-mod e (c) GMA.

Na Figura 2.2 podem ser visualizados os espectros de FTIR da QT, da QT-mod e do GMA, respectivamente. Comparando os espectros de FTIR da QT e da QT-mod é possível observar que as bandas características dos grupos funcionais da QT estão presentes no espectro da QT-mod. Além disso, nota-se o aparecimento de novas bandas sinalizando a modificação da QT com o GMA. Analisando o espectro de FTIR obtido a partir da QT-mod é possível visualizar o aparecimento de bandas em 1728 e 1633 cm^{-1} , as quais podem ser atribuídas ao estiramento das ligações duplas carbono-oxigênio ($\text{C}=\text{O}$) dos grupos carbonila da função éster e às ligações duplas carbono-carbono ($\text{C}=\text{C}$) de sistemas conjugados (GUILHERME *et al.*, 2010). A presença destas bandas evidencia a funcionalização da estrutura da QT com os compostos metacrilatos provenientes do GMA. Além disso, no espectro da QT-mod há uma ligeira redução na banda alargada próxima a 3450 cm^{-1} em comparação à mesma banda observada no espectro da QT. Essa banda está relacionada ao estiramento da ligação oxigênio-hidrogênio ($\text{H}-\text{O}$) dos grupos hidroxila da QT. A redução na intensidade desta banda no espectro da QT-mod se deve à reação entre os grupos hidroxila da QT e o GMA indicando, assim, a ocorrência da reação de abertura do anel epóxido. Por fim,

verificou-se ainda um aumento na intensidade da banda atribuída ao estiramento da ligação carbono-oxigênio (C-O) (próxima a 1086 cm^{-1}) no espectro da QT-mod. Tal fato ocorreu por conta da inserção dos compostos metacrilatados, provenientes do GMA, na estrutura da QT. Resultados similares foram observados a partir da análise do espectro de FTIR do SC-mod, o qual é apresentado na Figura 2.3.

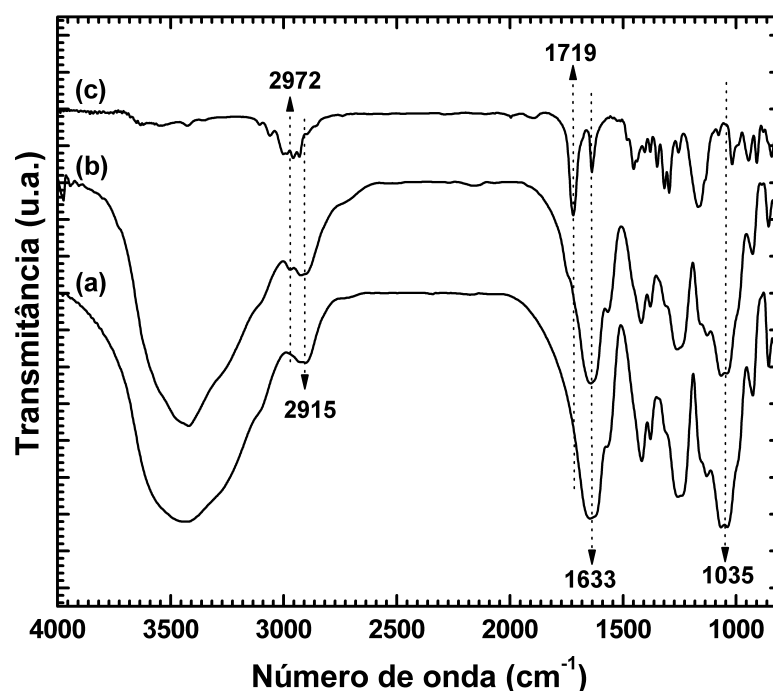


Figura 2.3. Espectros de FTIR (a) SC, (b) SC-mod e (c) GMA.

O espectro de FTIR obtido para o SC-mod (Figura 2.3b) mostra as bandas características do SC (Figura 2.3a) e as bandas provenientes dos compostos metacrilatados oriundos do GMA. No espectro do SC-mod é possível visualizar uma banda atribuída ao estiramento vibracional da ligação C=O dos grupos carbonila da função éster em 1719 cm^{-1} e outra banda em 1633 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações C=C de sistemas conjugados. A presença destas bandas confirma a modificação química do SC com GMA (REIS *et al.*, 2009).

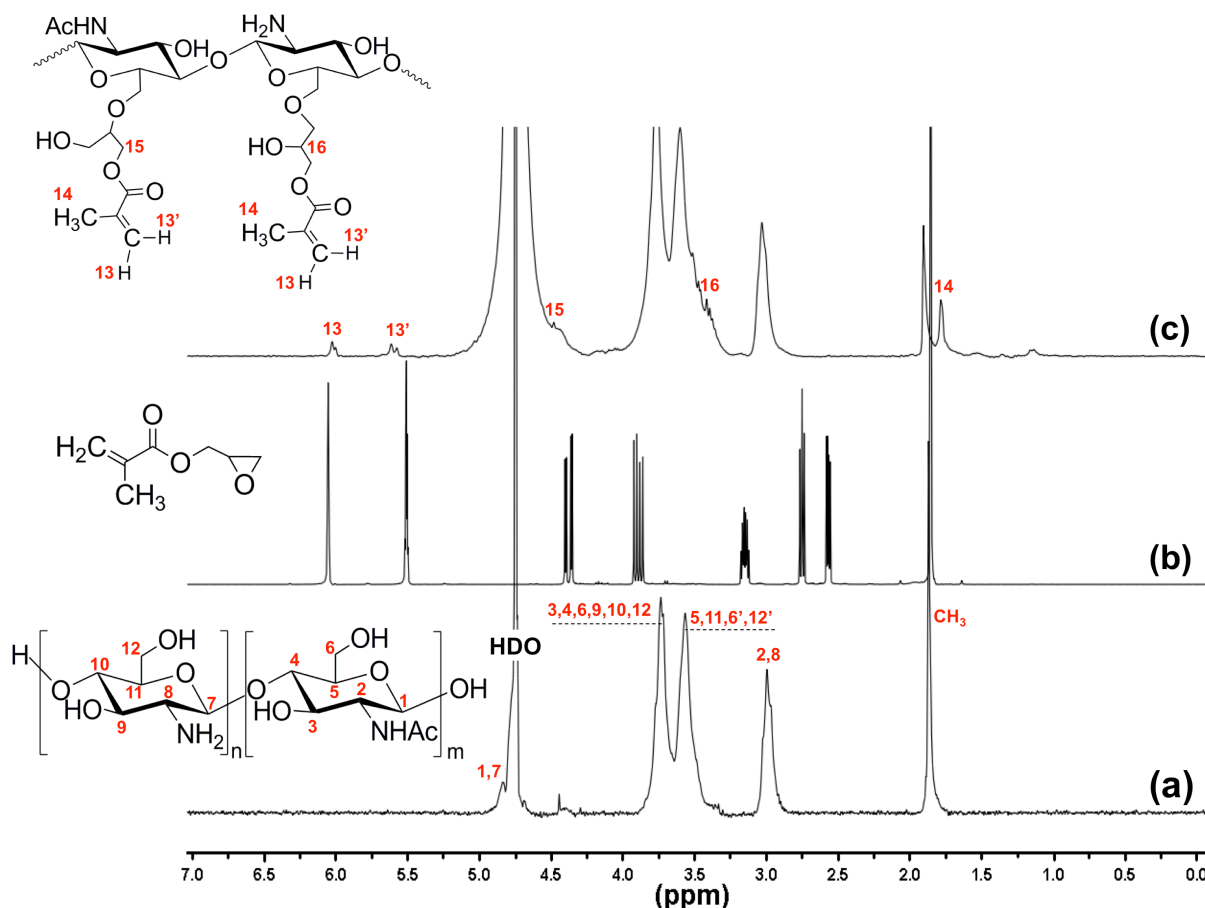


Figura 2.4. Espectro de NMR ^1H (a) QT, (b) GMA e (c) QT-mod (300 MHz, solventes D_2O para QT e QT-mod e CDCl_3 para GMA, 298 K).

Os espectros de NMR ^1H obtidos para QT, GMA e QT-mod são mostrados na Figura 2.4. A partir destes é possível visualizar que, após a inserção dos compostos metacrilatados provenientes do GMA, ocorre o aparecimento de dois sinais de ressonância em δ 6,02 e 5,62 ppm (sinalizados na Figura 2.4c como 13 e 13') no espectro de NMR da QT-mod. Estes sinais de ressonância podem ser atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos vinílicos dos compostos metacrilatados. O sinal de ressonância atribuído aos átomos de hidrogênio ligados aos grupos metila provenientes do GMA foi observado em δ 1,73 ppm (sinalizado na Figura 2.4c como 14).

Outros estudos que tratam da modificação química de polissacarídeos com GMA atribuem os sinais de ressonância que aparecem no espectro da QT-mod em δ 4,69 e 3,40 ppm (sinalizados na Figura 2.4c como 15 e 16) aos átomos de hidrogênio do espaçador glicerila

dos compostos metacrilatados provenientes do GMA (REIS *et al.*, 2009; GUILHERME *et al.*, 2010). O aparecimento destes sinais confirma a reação de modificação da QT com o GMA por meio da reação de abertura do anel epóxido. Como discutido anteriormente, a predominância dessa rota de reação se deve ao uso de um solvente prótico e ao baixo pH do meio reacional. Portanto, nessas condições experimentais o GMA reage com os grupos hidroxila da QT por meio de uma reação de abertura do anel epóxido, de modo irreversível.

A partir do espectro de NMR ^1H da QT-mod, é possível determinar o grau de metacrilção (DM) utilizando a Equação (2.1) (HEDIN *et al.*, 2010):

$$DM = \left[\frac{(A_{\delta 6.02} + A_{\delta 5.62})/2}{A_{\delta 3.03}/2} \right] \quad (2.1)$$

Esta equação relaciona as áreas totais dos dois sinais de ressonância atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos vinílicos (δ 6,02 e 5,62 ppm) observados no espectro da QT-mod (Figura 2.4c) com a área do sinal de ressonância em δ 3,03 ppm verificado no espectro da QT (Figura 2.4a), o qual é atribuído aos átomos de hidrogênio H-2 das unidades GlcNAc e GlcN. O sinal de ressonância atribuído aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos α das unidades GlcN (o qual se encontra em δ 4,79 ppm) não foi utilizado como referência pois este sinal sobrepõe ao sinal de ressonância do D_2O utilizado como solvente. Assim, a determinação do valor de DM utilizando a área deste sinal de ressonância como referência poderia não ser coerente. Na Equação (2.1), o termo A é o valor da área do sinal de ressonância obtido por integração. As respectivas áreas dos sinais de ressonância foram medidas após um cuidadoso tratamento da linha base dos espectros e os valores encontrados foram $A_{\delta 6.02} \approx 0,12$; $A_{\delta 5.62} \approx 0,14$ e $A_{\delta 3.03} \approx 1,35$. Entretanto, ao substituir estes valores na Equação (2.1) vemos que o valor de DM para QT-mod é igual a 0,192 (cerca de 20 %). Poon *et al.* (2007) obtiveram um DM próximo a 13 % para *O*-carboximetilquitosana, a qual foi capaz de formar, posteriormente, um interessante hidrogel foto-reticulável e citocompatível. Este baixo valor de DM é desejável, pois permite reduzir o

número de pontos de reticulação formando assim, um hidrogel mais manipulável e com uma capacidade de intumescimento maior, devido à flexibilidade na rede polimérica.

O espectro de NMR ^1H do SC-mod apresentou sinais de ressonância semelhantes àqueles observados para a QT-mod, como pode ser visto na Figura 2.5.

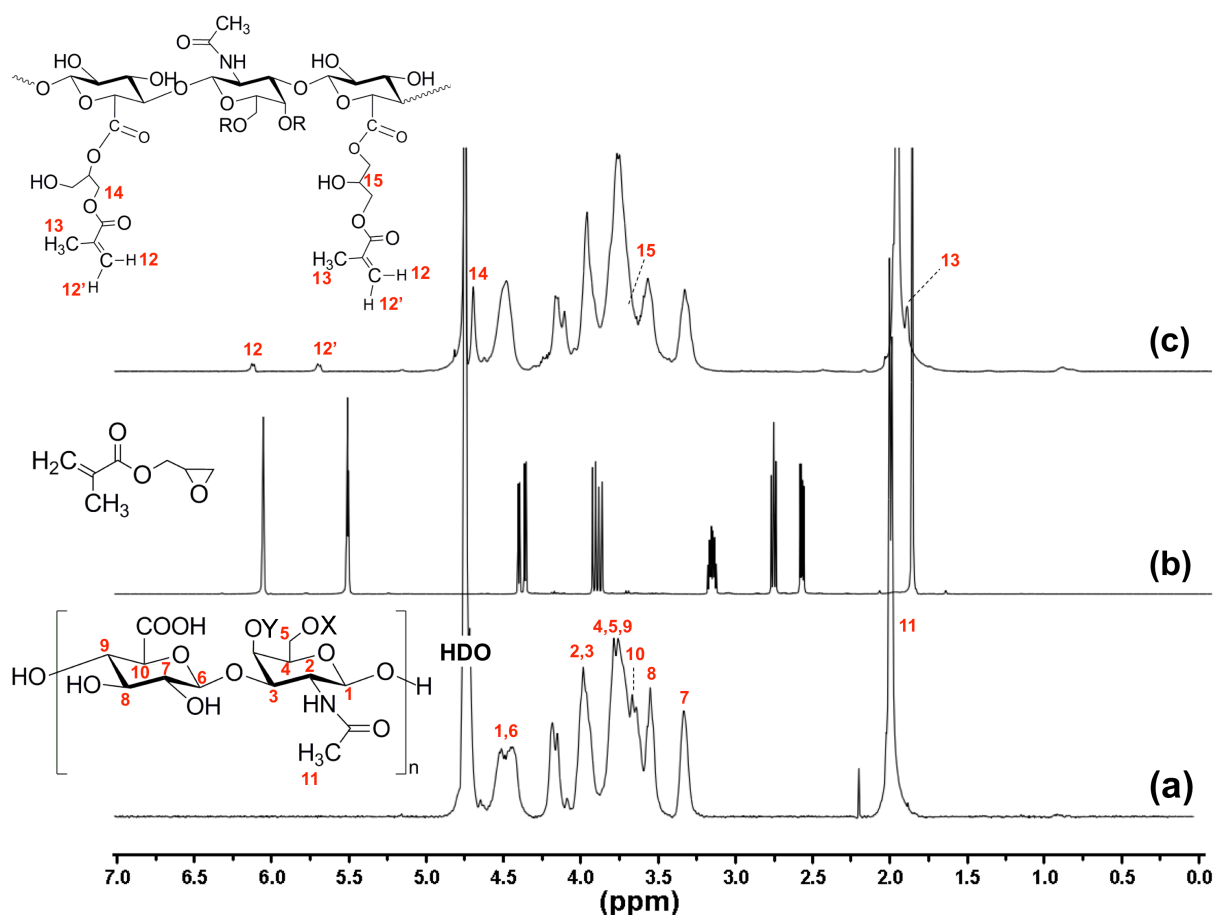


Figura 2.5. Espectro de NMR ^1H (a) SC, (b) GMA e (c) SC-mod (300 MHz, solventes D_2O para SC e SC-mod e CDCl_3 para GMA, 298 K).

Analisando o espectro de NMR ^1H do SC-mod é possível visualizar o aparecimento de dois sinais de ressonância em δ 6,11 e 5,70 ppm (sinalizados na Figura 2.5c como 12 e 12') atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos vinílicos dos compostos metacrilatados inseridos na estrutura do SC. O sinal de ressonância atribuído aos átomos de hidrogênio ligados aos grupos metila, provenientes do GMA, foram observados em δ 1,89 ppm (sinalizado na Figura 2.5c como 13). Já os sinais de ressonância atribuídos aos átomos de

hidrogênio do espaçador glicerila foram observados em δ 4,69 ppm e próximo a δ 3,45 ppm (sinalizados na Figura 2.5 como 14 e 15) confirmando, assim, a inserção de compostos metacrilatados provenientes do GMA na estrutura do SC (REIS *et al.*, 2006; GUILHERME *et al.*, 2010). A determinação do grau de metacrilção (DM) foi feita utilizando a Equação (2.1). A equação faz a relação entre as áreas dos sinais de ressonância atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos vinílicos (δ 6,11 e 5,70 ppm) observados no espectro do SC-mod e o sinal de ressonância atribuído aos átomos de hidrogênio ligados aos carbonos α das unidades GalNAc (δ 4,48 ppm) do SC. Novamente, as respectivas áreas dos sinais de ressonância foram calculadas após um cuidadoso tratamento da linha base dos espectros e os valores obtidos foram $A_{\delta 6.11} \approx 0,67$; $A_{\delta 5.70} \approx 0,65$; e $A_{\delta 4.48} \approx 7,53$. Substituindo esses valores na Equação (2.1), o valor de DM calculado para SC-mod foi igual a 0,08 (cerca de 8 %). Neste caso, o DM obtido para o SC foi menor do que aquele observado para a QT, o que demonstra que, apesar das mesmas condições experimentais utilizadas na modificação dos dois polissacarídeos, a reatividade da QT frente ao GMA é maior.

2.3.2. Caracterização dos hidrogéis

Para produzir hidrogéis “*dual-network*”, o primeiro passo foi formar redes quimicamente reticuladas a partir dos polissacarídeos modificados com GMA. Para isso, cada um dos polissacarídeos previamente modificados foram reticulados com MBA (agente de reticulação) usando persulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$) como iniciador térmico. A etapa seguinte foi formar a rede fisicamente reticulada. Dessa forma, os hidrogéis químicos (QT-gel e SC-gel) foram imersos, respectivamente, em soluções aquosas ácidas de SC e de QT para que ocorresse a complexação polieletrólítica entre os grupos funcionais opostamente carregados. Geralmente, em condições ácidas os grupos amino presentes na QT estão na forma protonada ($-\text{NH}_3^+$) e podem, então, interagir fortemente por atração eletrostática com os grupos carboxilato e sulfato ($-\text{COO}^-$ e $-\text{OSO}_3^-$) presentes no SC (DENUZIERE *et al.*, 1996; BERGER *et al.*, 2004). Tal capacidade de “complexação” foi explorada nesse Capítulo para formar os hidrogéis “*dual-network*”. Além disso, para verificar a capacidade de interação

entre os polissacarídeos carregados, diferentes tempos de imersão foram testados.

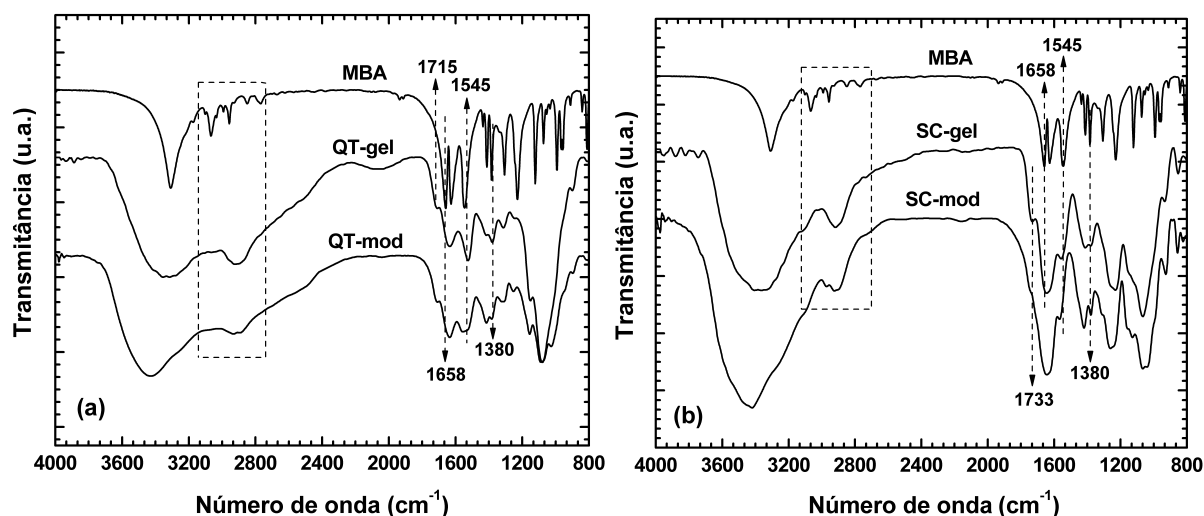


Figura 2.6. Espectros de FTIR (a) QT-mod, QT-gel e MBA e (b) SC-mod, SC-gel e MBA.

Ao analisar o espectro de FTIR do MBA (Figura 2.6a,b) pode ser visualizada uma banda intensa em 3308 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação nitrogênio-hidrogênio (N-H); bandas em 1658 e 1652 cm^{-1} atribuídas às vibrações das ligações conjugadas C=O e C=C; uma banda em 1545 cm^{-1} atribuída à flexão N-H e uma banda em 1380 cm^{-1} atribuída ao estiramento das ligações carbono-nitrogênio (C-N). Para ambos os hidrogéis, QT-gel e SC-gel, foi observado em seus espectros de FTIR bandas intensas próximo a 3000 cm^{-1} que foram atribuídas ao estiramento carbono-hidrogênio (C-H) de grupos alquil ($-\text{CH}_2-$) provenientes do MBA. Ainda, a banda atribuída ao estiramento C=O é ligeiramente deslocada para um menor número de onda devido à perda da conjugação com os grupos carboxílicos após a reação de reticulação. Duas bandas, uma em 1545 e outra em 1380 cm^{-1} , atribuídas, respectivamente, à flexão da ligação N-H e ao estiramento da ligação C-N dos grupos amino provenientes do MBA e da QT, também são observadas no espectro de FTIR dos hidrogéis QT-gel e SC-gel.

A preparação dos hidrogéis QT-gel e SC-gel foi investigada por espectroscopia de NMR ^{13}C no estado sólido (CP/MAS) e os resultados são apresentados na Figura 2.7. Analisando os espectros é possível visualizar, em ambos, os sinais de ressonância atribuídos aos grupos alquil saturados ($-\text{CH}_2-\text{C}-$) na faixa de $\delta\ 42 - 24\text{ ppm}$, o que indica o consumo dos

grupos vinílicos ($C=C$) presentes nos compostos metacrilatos, inseridos nas estruturas dos polisacarrídeos modificados devido à reação radicalar com o MBA. Além disso, a reação radicalar liga as cadeias de polímero à estrutura do MBA e, por essa razão, os sinais de ressonância atribuídos aos grupos alquil provenientes do MBA são observados no espectro dos hidrogéis (QT-gel e SC-gel). Outro ponto importante é a ausência de sinais de ressonância na faixa de δ 140 - 125 ppm, os quais seriam atribuídos aos grupos vinílicos ($C=C$) confirmando assim o consumo desses grupos na reação de reticulação com o MBA. Os sinais de ressonância com baixa intensidade observados na faixa espectral de δ 171 - 168 ppm são atribuídos aos grupos carbonílicos ($>C=O$) do sistema não conjugado, devido à reação de reticulação. Os sinais na faixa de δ 179 - 195 ppm são atribuídos aos grupos amida ($N-C=O$) provenientes do MBA. Porém, estes sinais não são observados no espectro obtido para o SC-gel (Figura 2.6b), devido à sobreposição dos mesmos pelos sinais de ressonância atribuídos à ligação $C=O$ dos grupos carbonílicos presentes na estrutura do SC.

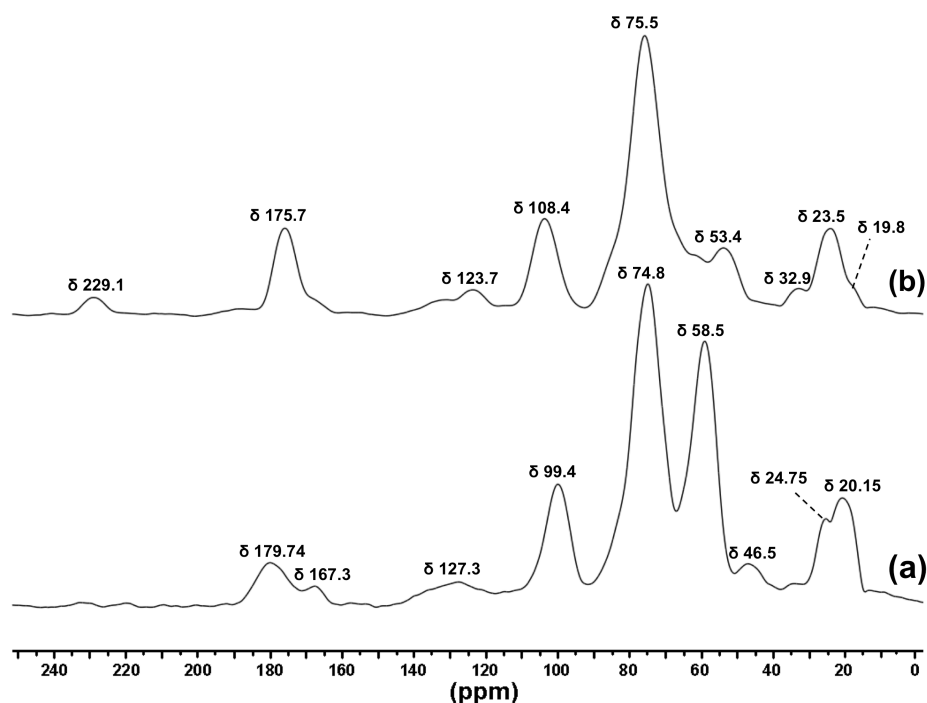


Figura 2.7. Espectros de NMR ^{13}C no estado sólido (CP/MAS) dos hidrogéis químicos (a) QT-gel e (b) SC-gel na faixa espectral de 250 – 0 ppm (75 MHz, 298 K).

Os hidrogéis químicos então formados foram imersos em soluções de QT ou SC para proceder a reticulação física por meio de complexação polieletrólítica. Na Figura 2.8 é mostrado um esquema ilustrativo que representa a preparação da rede polimérica do hidrogel “*dual-network*”.

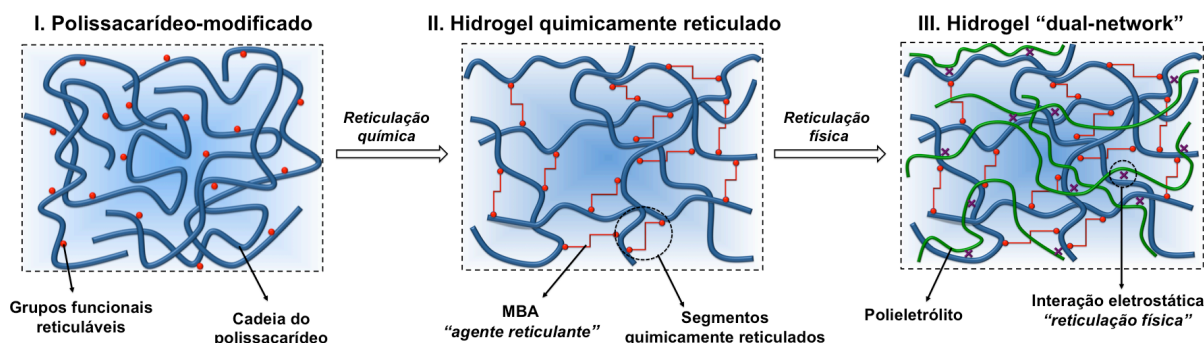


Figura 2.8. Ilustração esquemática da rede polimérica do hidrogel “*dual-network*”.

Para preparação das redes fisicamente reticuladas os hidrogéis químicos (QT-gel e SC-gel) foram imersos em soluções aquosas ácidas de SC ou QT por diferentes tempos de imersão (6, 12 e 24 h). Após estes tempos de imersão, os hidrogéis foram removidos e alíquotas das soluções ácidas de QT ou de SC foram recolhidas e analisadas por HPLC para determinar os percentuais de QT ou SC complexadas aos hidrogéis químicos. A Figura 2.9 mostra os percentuais de polissacarídeo complexado à rede polimérica dos hidrogéis químicos em função do tempo de imersão nas soluções de estocagem. Os percentuais de QT e SC complexados às matrizes dos hidrogéis químicos foram calculados utilizando a Equação (2.2):

$$\% \text{ complexado} = \left[\frac{(C_0 - C_F)}{C_0} \right] \times 100 \quad (2.2)$$

sendo C_0 a concentração inicial das soluções de estocagem (solução de QT ou de SC) onde os hidrogéis químicos foram imersos e C_F a concentração final das soluções de estocagem após, os diferentes intervalos de tempo de imersão.

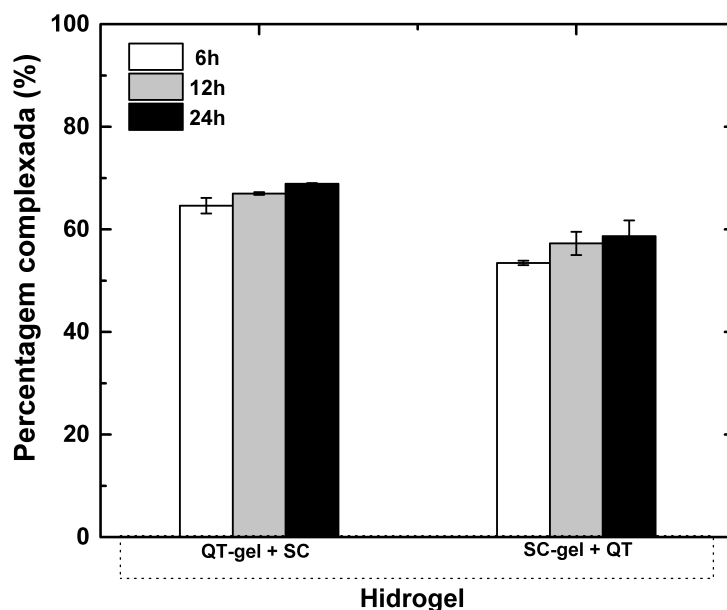


Figura 2.9. Percentual de polissacarídeo complexado aos hidrogéis quimicamente reticulados em função do tempo de imersão (em horas).

A partir dos dados de HPLC e do cálculo do percentual de polissacarídeo complexado foi possível verificar que para ambos os casos o fator tempo de imersão demonstrou pouca influência para os tempos de imersão estudados. Para o QT-gel foi verificado que o percentual de SC complexado varia entre 65 - 69 % em um tempo de imersão que varia de 6 a 24 h. Esses dados significam, que entre 1,61 - 1,72 g de SC foi complexado ao hidrogel químico QT-gel. Em condições ácidas (similares àquelas utilizadas nessa metodologia) os grupos aminos da quitosana estão em seu estado protonado ($-\text{NH}_3^+$) permitindo, assim, a complexação polieletrólítica desses grupos carregados com os grupos carboxilato e sulfato ($-\text{COO}^-$ e $-\text{OSO}_3^-$) do SC.

Como discutido anteriormente, essa complexação ocorre principalmente por fortes interações eletrostáticas (DENUZIERE *et al.*, 1996). A formação de complexos polieletrólíticos entre QT e SC é uma estratégia bem conhecida para formar redes poliméricas fisicamente reticuladas (DENUZIERE *et al.*, 1996; BERGER *et al.*, 2004). Na metodologia aqui desenvolvida, é possível modificar quimicamente a QT com GMA sem prejudicar a capacidade de seus grupos amino de complexarem com outras macromoléculas carregadas.

Dessa forma, de acordo com estudos prévios desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, a estequiometria de complexação entre a QT e o SC está intimamente ligada ao pH do meio. Além disso, esses estudos mostraram que, uma vez atingida essa estequiometria de complexação, o tempo de contato entre as soluções de QT e SC não mais afeta a estequiometria SC/QT (FAJARDO *et al.*, 2011). Por essa razão, ocorreu pouca variação no percentual de SC complexado à rede polimérica do hidrogel QT-gel para um tempo de imersão de até 24 h.

Entretanto, analisando os dados obtidos por HPLC para o outro hidrogel (SC-gel) foi verificado que a percentagem de QT complexada foi ligeiramente menor em comparação àquela verificada para o SC. A percentagem de QT complexada variou de 53 - 59 % (cerca de 0,40 - 0,42 g) para um período de imersão entre 6 - 24 h. Essa menor massa complexada se deve ao fato de que na funcionalização do SC com o GMA (DM $\approx$ 8 %) parte de seus grupos carboxílicos reagirem e, por esta razão, a capacidade de complexação desses grupos com os grupos ($-\text{NH}_3^+$) é reduzida. O controle do grau de metacrilção (DM) do SC é muito importante, já que permite controlar a quantidade de grupos carboxilato consumidos na reação com o GMA. A metodologia de síntese apresentada, nesse Capítulo, permitiu obter um material modificado com um valor de DM relativamente baixo, o que resultou em uma baixa perda na capacidade de complexação dos grupos carboxílicos do SC.

A partir da preparação dos hidrogéis “*dual-network*”, os mesmos passaram a ser denominados como QT-gel/SC(6h), QT-gel/SC(12h) ou QT-gel/SC(24h) para um tipo de hidrogel “*dual-network*”; e SC-gel/QT(6h), SC-gel/QT(12h) ou SC-gel/QT(24h) para o outro tipo de hidrogel “*dual-network*”, onde o valor entre parênteses representa o tempo de imersão de cada hidrogel químico na soluções de SC ou de QT para proceder a reticulação física. A investigação estrutural/morfológica dos hidrogéis “*dual-network*” foi feita por espectroscopia FTIR, análises térmicas (TG), XRD e imagens de SEM.

Os espectros de FTIR obtidos para os hidrogéis “*dual-network*” são apresentados na Figura 2.10. Notou-se que não ocorreram grandes diferenças entre os espectros dos hidrogéis QT-gel e SC-gel com os respectivos espectros dos hidrogéis “*dual-network*” [QT-gel/SC(6-

24h) e SC-gel/QT(6-24h)]. Graças ao aumento na taxa de complexação polieletrólítica entre os grupos funcionais carregados da QT e do SC, a banda próxima a 1560 cm^{-1} , a qual é atribuída aos grupos amino da QT, é deslocada para um menor número de onda (PEREZ *et al.*, 2013). Isso se deve à interação eletrostática desses grupos da QT com os grupos negativamente carregados do SC (PIAI *et al.*, 2009; PIAI *et al.*, 2010).

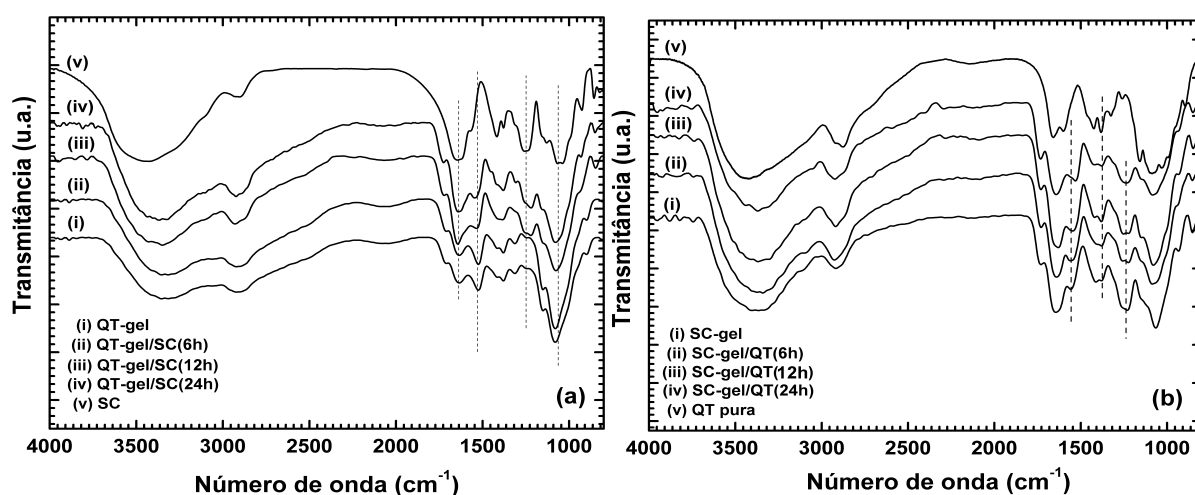


Figura 2.10. Espectros FTIR dos hidrogéis (a) QT-gel, QT-gel/SC(6-24h) e SC e (b) SC-gel, SC-gel/QT(6-24h) e QT.

Ainda, é possível visualizar nos espectros dos hidrogéis QT-gel/SC(6-24h), o aparecimento de uma banda em 1238 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação S=O presente nos grupos sulfatos; e também o aumento da intensidade da banda em 1733 cm^{-1} , a qual é atribuída ao estiramento da ligação C=O dos grupos carboxílicos. A presença de ambos os grupos, sulfato e carboxílico, é devida à presença do SC complexado à rede do hidrogel QT-gel. Além disso, observa-se no espectro dos hidrogéis QT-gel/SC(6-24h) o aumento de intensidade da banda próxima a 1030 cm^{-1} que é atribuída ao estiramento da ligação S-O em comparação ao espectro obtido para o SC. Isso se deve à complexação destes grupos com os grupos amino protonados da QT.

No entanto, os espectros FTIR obtidos para os hidrogéis SC-gel/QT(6-24h) mostram diminuição na intensidade da banda atribuída ao estiramento das ligações S=O (banda em

1238 cm^{-1}) devido a interações eletrostáticas entre os grupos sulfato presentes na rede dos hidrogéis SC-gel e os grupos amino protonados da QT (FAJARDO *et al.*, 2011). Por outro lado, verifica-se ainda o aumento de intensidade nas bandas atribuídas ao estiramento das ligações C-N e S-O (bandas em 1345 e 1040 cm^{-1}), devido à formação da rede fisicamente reticulada entre QT e SC-gel. Logo, os dados obtidos a partir dos espectros FTIR confirmam a imobilização dos polissacarídeos (SC e QT) por meio de complexação polieletrólítica aos hidrogéis QT-gel e SC-gel (que possuem redes quimicamente reticuladas) ficando, assim, caracterizada a formação dos hidrogéis “*dual-network*”.

Difratogramas dos hidrogéis “*dual-network*”, bem como dos hidrogéis químicos (QT-gel e SC-gel) e dos polissacarídeos de partida (QT e SC), foram obtidos para caracterizar estruturalmente os novos hidrogéis “*dual-network*”. O difratograma da QT (Figura 2.11a), demonstra que a mesma possui alguma cristalinidade (halos de difração em 2θ igual a 10,7 ° e 19,9 °) devido à presença de regiões organizadas em sua estrutura. Isso resulta de interações intra-macromoleculares das cadeias da QT, principalmente, pela formação de ligações de hidrogênio entre os seus grupos amino (PILLAI *et al.*, 2009). Após a metacilação da QT com GMA e a reticulação química da QT-mod, tal cristalinidade deixa de existir como foi observado pelo difratograma obtido para o QT-gel (ver Figura 2.11a).

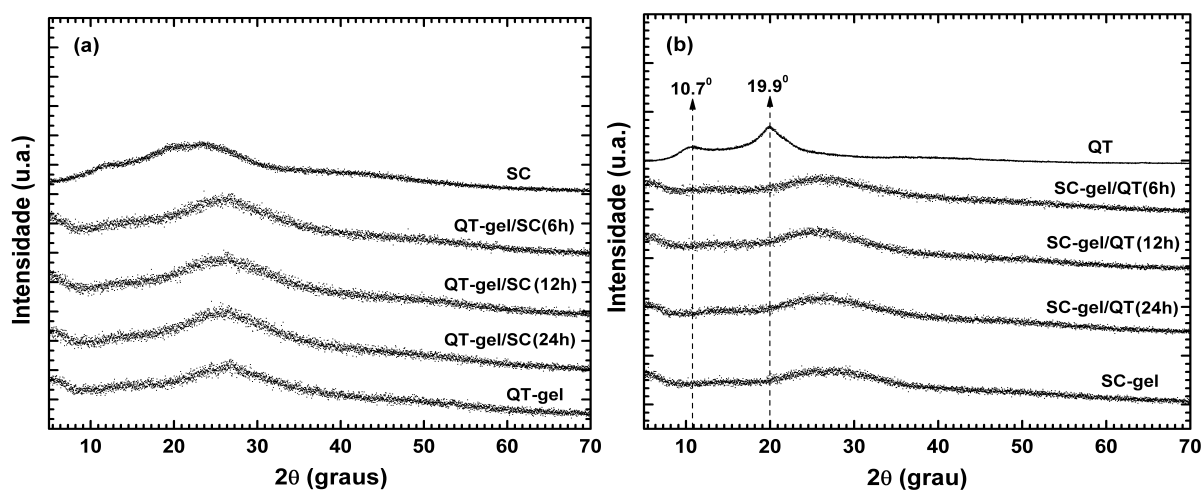
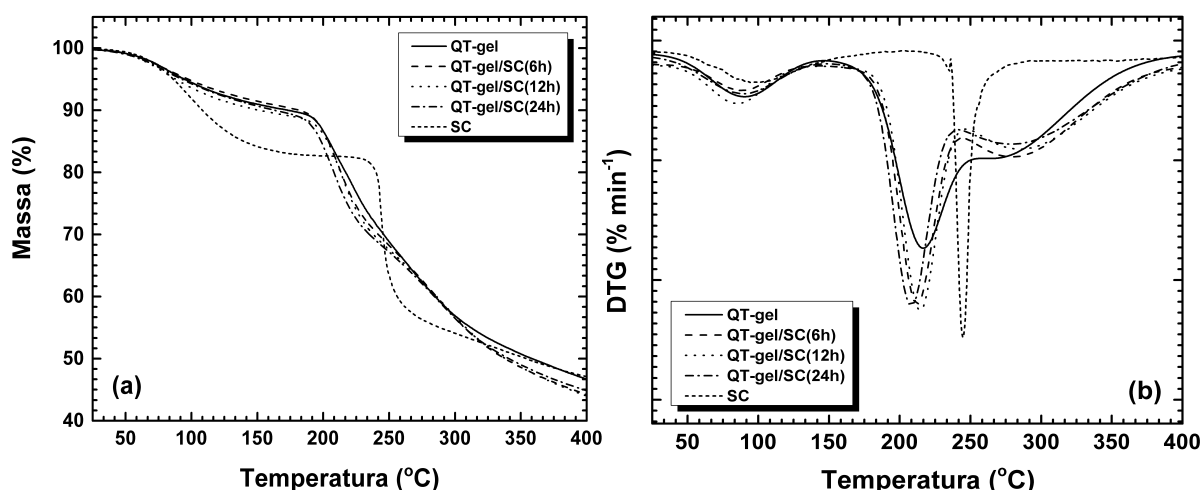


Figura 2.11. Difratogramas obtidos por XRD para os hidrogéis (a) QT-gel, QT-gel/SC(6-24h) e SC e (b) SC-gel, SC-gel/QT(6-24h) e QT.

Analisando os difratogramas obtidos para os hidrogéis QT-gel/SC(6-24h) é possível inferir que a reticulação física do hidrogel químico QT-gel com o SC não afeta/altera a estrutura organizacional dos mesmos, a qual permanece amorfa. Dessa forma, essa mesma análise pode ser feita para os difratogramas obtidos para os hidrogéis SC-gel/QT(6-24h). Na verdade, os difratogramas desses hidrogéis não indicaram a presença de nenhuma região cristalina em suas estruturas. Mesmo a QT de partida que apresenta alguma cristalinidade, após a sua reticulação física com a rede o hidrogel SC-gel, essa cristalinidade desaparece como pode ser visto na Figura 2.11b. A forte interação eletrostática entre os grupos opostamente carregados da QT e do SC rompe as interações intra-macromoleculares presentes na QT.

Termogravimetria (TG) foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica dos hidrogéis formados em função da temperatura. Além disso, a partir das curvas TG foram obtidas curvas de termogravimetria derivada (DTG) para melhor interpretação dos resultados. As curvas de TG e DTG para os hidrogéis “*dual-network*”, hidrogéis químicos (QT-gel e SC-gel) e dos polissacarídeos (QT e SC) são apresentadas na Figura 2.12.



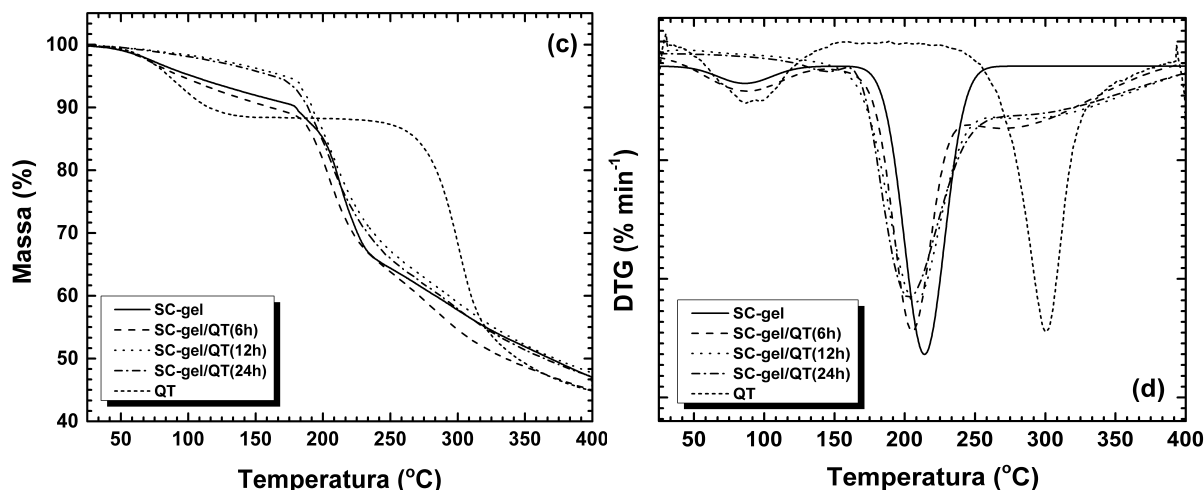


Figura 2.12. Curvas de TG (a,b) e DTG (c,d) obtidas para os hidrogéis QT-gel, QT-gel/SC(6-24h), SC-gel, SC-gel/QT(6-24h) e polissacarídeos QT e SC.

As partir das curvas TG obtidas é possível observar diferentes eventos de perda de massa. O primeiro, entre 50 - 150 °C, pode ser atribuído à perda de água ou de compostos voláteis presentes na estrutura dos hidrogéis e polissacarídeos. Neste evento, a perda de massa é em torno de 10 - 15% em relação à massa inicial da amostra de hidrogel ou polissacarídeo. O segundo evento ocorre entre a faixa de temperatura de 180 - 400 °C e pode ser associado à degradação térmica dos materiais. A degradação térmica ocorre em duas etapas diferentes. A primeira (entre 180 - 250 °C) está associada à degradação térmica das duas redes, a quimicamente reticulada e a fisicamente reticulada. De acordo com os dados de NMR ^1H , o DM, calculado para cada polissacarídeo modificado com GMA foi cerca de 8 % (para SC-mod) e cerca de 20 % (para QT-mod), o que limita o número de pontos de reticulação nas matrizes dos hidrogéis QT-gel e SC-gel. Por essa razão, as energias necessárias para degradar essas matrizes não são diferentes, em relação ao material não modificado. A segunda etapa (entre 250 - 400 °C) é referente à degradação térmica da QT. Esta inferência é feita avaliando os dados de DTG (Figura 2.12b,d). A partir dos dados de DTG é possível observar que o QT-gel possui duas etapas diferentes durante sua degradação térmica. Por outro lado, o hidrogel SC-gel é degradado termicamente em uma única etapa. Após a complexação polieletrólítica da rede do hidrogel químico SC-gel com o polissacarídeo QT é verificado o aparecimento de

uma etapa adicional no processo de degradação térmica. Isso pode ser explicado pelo fato de que a QT é degradada em uma temperatura próxima a 300 °C, conforme observado por Fajardo *et al.* (2010). Os dados obtidos a partir da termogravimetria mostraram, ainda, que a estabilidade térmica da matriz tridimensional onde ambas as reticulações, química e física, estão presentes não difere consideravelmente da estabilidade térmica dos hidrogéis químicos, QT-gel e SC-gel. Nenhuma mudança significativa foi observada na estabilidade térmica mesmo com o aumento no tempo de imersão desses hidrogéis químicos na solução contendo o polissacarídeo (QT ou SC), usada na preparação das redes fisicamente reticuladas.

Na última etapa de caracterização dos hidrogéis formados, como descrito nesse Capítulo, foram verificadas possíveis diferenças morfológicas entre os hidrogéis químicos (QT-gel e SC-gel) e os hidrogéis “*dual-network*” [QT-gel/SC(24h) e SC-gel/QT(24h)] por meio de imagens de SEM. Na Figura 2.13 são mostradas imagens de SEM das superfícies dos hidrogéis fraturados.

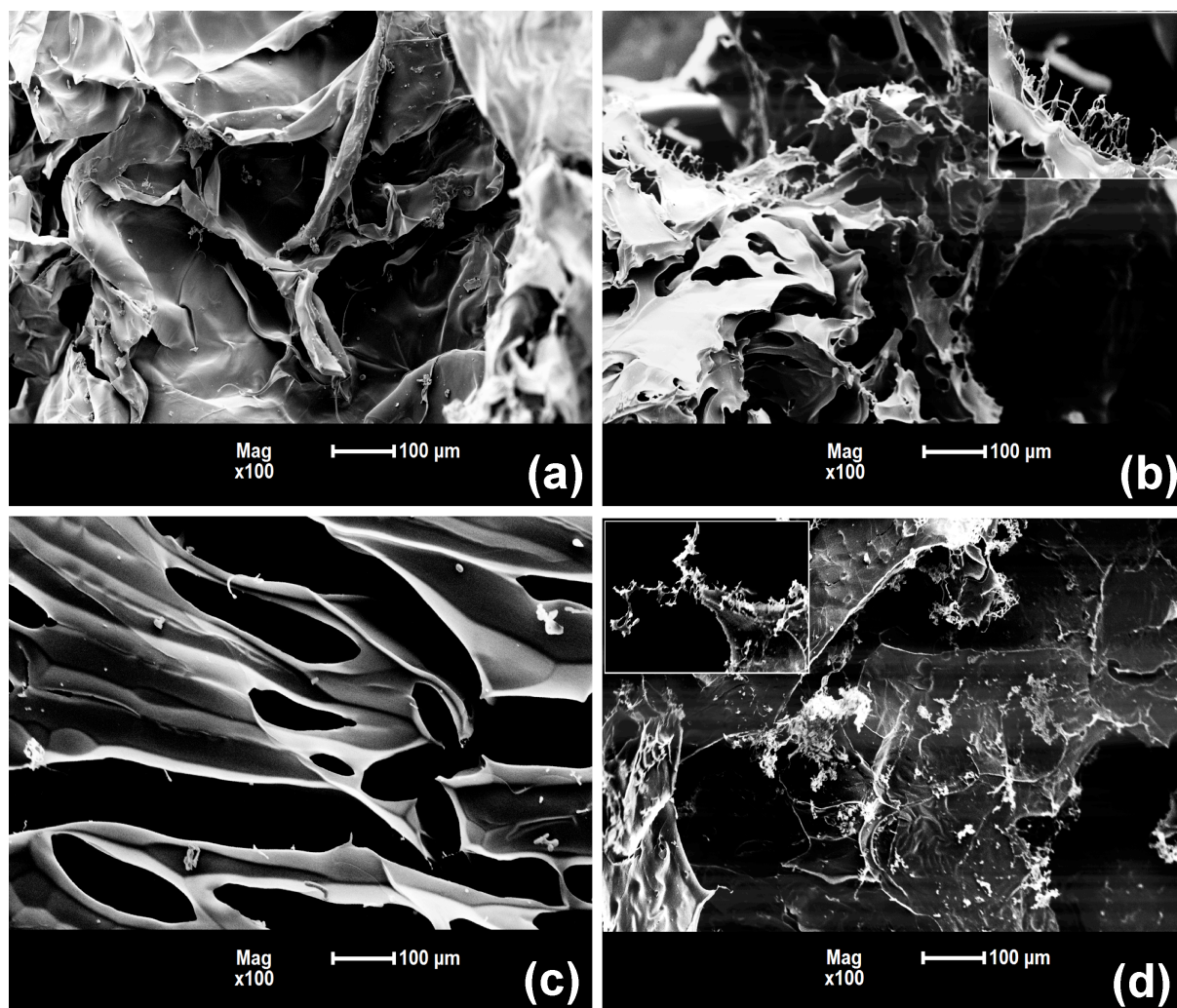


Figura 2.13. Imagens de SEM dos hidrogéis (a) QT-gel, (b) QT-gel/SC(24h), (c) SC-gel e (d) SC-gel/QT(24h) (imagens de superfícies fraturadas; Mag x100, barra de escala 100 μm).

Ao analisar as imagens de SEM dos hidrogéis (QT-gel e SC-gel) observou-se que os mesmos possuem morfologia porosa e irregular, a qual corresponde à morfologia característica de hidrogéis. Após a complexação polieletrólítica da rede quimicamente reticulada pela sua imersão na solução com os polissacarídeos SC ou QT, resultando nos hidrogéis “*dual-network*”, verificou-se que a morfologia porosa e irregular ainda prevalece. Contudo, é possível visualizar nas imagens de SEM obtidas para os hidrogéis QT-gel/SC(24h) e SC-gel/QT(24h) o aparecimento de algumas estruturas peculiares. A presença de aglomerados não-ordenados, por exemplo, foi observada na superfície das fraturas dos hidrogéis. Estes aglomerados podem ser associados aos polissacarídeos (SC e QT)

fisicamente reticulados à rede dos hidrogéis QT-gel e SC-gel. Como pode ser visto na porção ampliada, inserida nas imagens de SEM apresentadas na Figura 2.13b,d, em certas regiões os polissacarídeos complexados são projetados para a superfície dos hidrogéis. Estas observações permitem inferir que a complexação dos polissacarídeos SC e QT com a rede quimicamente reticulada dos hidrogéis QT-gel e SC-gel é restrita à superfície externa e paredes internas dos poros.

2.4. CONCLUSÃO

Neste Capítulo é descrita uma metodologia original capaz de formar hidrogel com um novo tipo de rede polimérica, na qual ambos os tipos de reticulação (química e física) estão presentes. Soma-se a isso, o fato de que todas as sínteses necessárias foram realizadas em condições brandas, sempre em meio aquoso. O hidrogel formado por redes química e fisicamente reticuladas foi denominado hidrogel “*dual-network*”. A viabilidade da metodologia empregada foi testada alterando os polissacarídeos utilizados nas etapas de reticulação química e física. Quitosana (QT) e sulfato de condroitina (SC) foram quimicamente modificados com GMA para possibilitar sua reticulação química. Os polissacarídeos metacrilatados (QT-mod e SC-mod) foram caracterizados por técnicas espectroscópicas de FTIR e NMR ^1H , essa última permitiu calcular o grau de metacrilatação (DM) da QT-mod (20 %) e do SC-mod (8 %). A partir dos polissacarídeos modificados foram formados hidrogéis pela reticulação química por meio da reação com MBA. Análises de FTIR e NMR ^{13}C no estado sólido confirmaram a formação dos hidrogéis químicos, denominados QT-gel e SC-gel. Os hidrogéis “*dual-network*” foram formados pela subsequente complexação polieletrólítica com os polissacarídeos QT e SC. Para isso, os hidrogéis QT-mod e SC-mod foram imersos nas soluções ácidas de QT e SC por diferentes intervalos de tempo (6, 12 e 24 h). A percentagem de polissacarídeo complexado em cada hidrogel químico foi determinada por análises de HPLC, as quais mostraram que o hidrogel QT-gel complexa com

maior quantidade (em massa) de SC do que o hidrogel SC-gel complexa com QT. Isso ocorre devido à diminuição de grupos funcionais no SC-mod passíveis de complexação. Os diferentes hidrogéis “*dual-network*” [denominados aqui como QT-gel/SC(6-24h) e SC-gel/QT(6-24h)] foram caracterizados por espectroscopia FTIR, análises térmicas e por XRD. Os dados obtidos a partir dessas técnicas confirmam a complexação entre os polissacarídeos e as redes quimicamente reticuladas. Contudo, a formação dessa nova rede não afeta de forma considerável a estabilidade térmica e estrutura dos hidrogéis químicos. Quanto à morfologia, imagens de SEM mostraram que ambos os tipos de hidrogel (químico e “*dual-network*”) apresentam morfologia típica dos hidrogéis. Entretanto, as imagens de SEM dos hidrogéis “*dual-network*” indicaram a formação de aglomerados não-ordenados.

Levando em consideração os dados obtidos a partir das técnicas de caracterização descritas nessa seção, verifica-se que é possível obter hidrogel quimicamente reticulado capaz de manter sua característica polieletrólítica. A metodologia empregada permite que, posteriormente, seja feita a reticulação física do hidrogel químico com alguma outra espécie carregada (por exemplo, polieletrólitos, fármacos, marcadores de células cancerígenas, etc.). É importante ressaltar que a reticulação física pode ser desfeita com a mudança de algum parâmetro do meio externo (pH, força iônica, temperatura, etc.) (BAJPAI *et al.*, 2006; REINICKE *et al.*, 2009). Essa propriedade é interessante do ponto de vista técnico-operacional, pois algumas substâncias ativas podem ser complexadas fisicamente com a rede quimicamente reticulada do hidrogel e serem liberadas posteriormente com maior especificidade de acordo com mudanças no meio (MASTROPIETRO *et al.*, 2012; VULIC *et al.*, 2012). Além disso, a rede quimicamente reticulada pode atuar como uma barreira de proteção dessas substâncias, por exemplo, evitando a degradação das mesmas em condições extremamente ácidas como à encontrada na região estomacal. Por fim, essa nova metodologia de obtenção de hidrogéis pode ser também utilizada para melhorar alguma propriedade do hidrogel quimicamente reticulado (no caso, propriedade mecânica, biodegradabilidade,

biocompatibilidade) ou ainda, modelá-lo para ser utilizado em alguma aplicação específica (por exemplo, viabilizar seu uso como substrato para cultivo celular e na regeneração de tecido celular e ósseo).

2.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAJPAI, S. K.; SAXENA, S. K.; SHARMA, S. Swelling behavior of barium ions-crosslinked bipolymeric sodium alginate-carboxymethyl guar gum blend beads. *Reactive & Functional Polymers*, v. 66, n. 6, p. 659-666 (2006).
- BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 35-52 (2004).
- BURDICK, J. A.; PRESTWICH, G. D. Hyaluronic acid hydrogels for biomedical applications. *Advanced Materials*, v. 23, n. 12, p. H41-H56 (2011).
- DENUZIERE, A.; FERRIER, D.; DOMARD, A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydrate Polymers*, v. 29, n. 4, p. 317-323 (1996).
- FAJARDO, A. R. *et al.* Effect of stoichiometry and pH on the structure and properties of Chitosan/Chondroitin sulfate complexes. *Colloid and Polymer Science*, v. 289, n. 15-16, p. 1739-1748 (2011).
- FAJARDO, A. R. *et al.* Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 934-943 (2010).
- FAJARDO, A. R. *et al.* Hydrogel based on an alginate- Ca^{2+} /chondroitin sulfate matrix as a potential colon-specific drug delivery system. *RSC Advances*, v. 2, n. 29, p. 11095-11103 (2012)
- GUILHERME, M. R. *et al.* Smart hollow microspheres of chondroitin sulfate conjugates and magnetite nanoparticles for magnetic vector. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 352, n. 1, p. 107-113 (2010).
- GUILHERME, M. R. *et al.* Superabsorbent hydrogel based on modified polysaccharide for removal of Pb^{2+} and Cu^{2+} from water with excellent performance. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 105, n. 5, p. 2903-2909 (2007).
- HEDIN, J.; OSTLUND, A.; NYDEN, M. UV induced cross-linking of starch modified with glycidyl methacrylate. *Carbohydrate Polymers*, v. 79, n. 3, p. 606-613 (2010).

LI, Q.; WANG, D. A.; ELISSEEFF, J. H. Heterogeneous-phase reaction of glycidyl methacrylate and chondroitin sulfate: Mechanism of ring-opening-transesterification competition. *Macromolecules*, v. 36, n. 7, p. 2556-2562 (2003).

MASTROPIETRO, D. J.; OMIDIAN, H.; PARK, K. Drug delivery applications for superporous hydrogels. *Expert Opinion on Drug Delivery*, v. 9, n. 1, p. 71-89 (2012).

MORELLI, A.; CHIELLINI, F. Ulvan as a new type of biomaterial from renewable resources: functionalization and hydrogel preparation. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 211, n. 7, p. 821-832 (2010).

MUZZARELLI, R. A. A. *et al.* Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review. *Carbohydrate Polymers*, v. 89, n. 3, p. 723-739 (2012).

OMIDIAN, H.; ROCCA, J. G.; PARK, K. Advances in superporous hydrogels. *Journal of Controlled Release*, v. 102, n. 1, p. 3-12 (2005).

PEREZ QUINONES, J. *et al.* Self-assembled nanoparticles of modified-chitosan conjugates for the sustained release of DL-alpha-tocopherol. *Carbohydrate Polymers*, v. 92, n. 1, p. 856-864 (2013).

PIAI, J. F. *et al.* Kinetic study of chondroitin sulphate release from chondroitin sulphate/chitosan complex hydrogel. *Journal of Molecular Liquids*, v. 156, n. 1, p. 28-32 (2010).

PIAI, J. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 7, p. 2601-2609 (2009).

PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, n. 7, p. 641-678 (2009).

POON, Y. F. *et al.* Cytocompatible hydrogels based on photocrosslinkable methacrylated O-carboxymethylchitosan with tunable charge: Synthesis and characterization. *Advanced Functional Materials*, v. 17, n. 13, p. 2139-2150 (2007).

REINICKE, S. *et al.* Smart hydrogels based on double responsive triblock terpolymers. *Soft Matter*, v. 5, n. 13, p. 2648-2657 (2009).

REIS, A. V. *et al.* Reaction of glycidyl methacrylate at the hydroxyl and carboxylic groups of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid): Is this reaction mechanism still unclear? *Journal of Organic Chemistry*, v. 74, n. 10, p. 3750-3757 (2009).

REIS, A. V. *et al.* Synthesis and characterization of pH-responsive hydrogels based on chemically modified Arabic gum polysaccharide. *Polymer*, v. 47, n. 6, p. 2023-2029 (2006).

REIS, A. V. *et al.* Nanometer- and submicrometer-sized hollow spheres of chondroitin sulfate as a potential formulation strategy for anti-inflammatory encapsulation. *Pharmaceutical Research*, v. 26, n. 2, p. 438-444 (2009).

REIS, A. V. *et al.* Synthesis of hollow-structured nano- and microspheres from pectin in a nanodroplet emulsion. *Langmuir*, v. 25, n. 4, p. 2473-2478 (2009).

SCHENKEL, P.; SCHMIDT, G. Nanocomposite polymer hydrogels. *Colloid and Polymer Science*, v. 287, n. 1, p. 1-11 (2009).

TIWARI, A. *et al.* Biodegradable hydrogels based on novel photopolymerizable guar gum-methacrylate macromonomers for in situ fabrication of tissue engineering scaffolds. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 9, p. 3441-3452 (2009).

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *European Polymer Journal*, v. 41, n. 5, p. 923-932 (2005).

VULIC, K.; SHOICHET, M. S. Tunable growth factor delivery from injectable hydrogels for tissue engineering. *Journal of the American Chemical Society*, v. 134, n. 2, p. 882-885 (2012).

YAN, S. *et al.* Fabrication of poly(L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, n. 11, p. 1541-1551 (2013).

ZOHURIAAN-MEHR, M. J.; KABIRI, K. Superabsorbent polymer materials: A review. *Iranian Polymer Journal*, v. 17, n. 6, p. 451-477 (2008).

CAPÍTULO 3

SUBSTRATOS PARA CULTIVO CELULAR FORMADOS POR COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS DE QUITOSANA E SULFATO DE CONDROITINA

3.1. INTRODUÇÃO

Como já mencionado nos capítulos anteriores desta Tese, nos últimos anos um número considerável de publicações têm dado ênfase ao estudo e a aplicação dos chamados biomateriais, especialmente, no campo da biotecnologia, devido às diversas vantagens que esses apresentam sobre os materiais convencionais (ZAVAN *et al.*, 2005; VASITA *et al.*, 2006; BALDWIN *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Dentre os polímeros naturais com grande frequência neste tipo de aplicação, encontra-se a quitosana (QT), a qual apresenta excelentes propriedades físicas e biológicas (PETER, 1995; DENUZIERE *et al.*, 1996; PARK *et al.*, 1996; KUMAR *et al.*, 2004). A QT possui uma natureza catiônica e uma alta densidade de cargas quando em contato com soluções aquosas ácidas podendo, assim, formar redes poliméricas de complexos polieletrolíticos (PEC) na presença de espécies polianiônicas solúveis neste meio (PARK *et al.*, 1996). A interação eletrostática é a principal força interativa responsável pela formação dos PECs, sendo que a mesma se sobrepõe às interações secundárias, como as ligações de hidrogênio e as ligações do tipo dipolo-dipolo (RICHY *et al.*, 2003; VASILIU *et al.*, 2005). A Tabela 3.1 apresenta as energias envolvidas em diferentes tipos de ligações descritos em MORRISON *et al.* (1987).

Tabela 3.1. Energias envolvidas em diferentes tipos de ligação [MORRISON *et al.*, (1987)].

Tipo de ligação	Energia envolvida (kJ/mol)
Ligações covalentes	> 210
Ligações não-covalentes	
Interações eletrostáticas (ligações iônicas)	4 – 80
Ligações de hidrogênio	12 – 30
Dipolo permanente	5 – 25
Interações hidrofóbicas	3 – 12
Dipolo-Dipolo ^a	2 – 10
Dispersão de London ^a	0,3 – 10

^aForças de Van der Waals

Neste Capítulo, a espécie polianiônica usada para formar os complexos polieletrólitos com a QT foi o sulfato de condroitina (SC), um biopolímero da classe dos glicosaminoglicanos (GAGs) presente na matriz cartilaginosa (GANDHI *et al.*, 2008). Os PECs formados pela complexação polieletrólítica da QT e do SC têm sido alvo dos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa (PIAI *et al.*, 2009; FAJARDO *et al.*, 2010; FAJARDO *et al.*, 2011). Fazendo uso do conhecimento prévio adquirido na formação desse tipo de material, neste Capítulo é descrita a preparação de um complexo de QT/SC com a finalidade de sustentar a cultura e o crescimento de células e tecidos. Esta aplicação é encorajada pelas interessantes propriedades físico-químicas e biológicas apresentadas por ambos biopolímeros, QT e SC (por exemplo, balanço adequado entre hidrofiliabilidade/hidrofobicidade, disposição de cargas elétricas, dureza, elasticidade e resistência mais próximas possível às dos tecidos humanos, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, etc.) propriedades essas requeridas na preparação de biomateriais aplicados nesta finalidade (SANTOS JUNIOR *et al.*, 1997). Logo após a formação do complexo, vários ensaios biológicos foram realizados fim de avaliar o potencial do mesmo para atuar eficientemente como substrato para cultura de células e tecidos.

3.2. EXPERIMENTAL

3.2.1. Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho possuem grau analítico e foram usados sem purificação prévia. Quitosana (QT, CAS 90-77-7, Golden-Shell Biochemical - China) 85 % desacetilada e massa molar viscosimétrica (M_v) igual a 87.000 g/mol; sulfato de condroitina (SC, CAS 9007-28-7) com M_v igual a 22.000 g/mol, o qual foi gentilmente fornecido pela empresa Solabia (Brasil). As M_v foram determinadas de acordo com a metodologia previamente descrita por Fajardo *et al.* (2010). Ácido clorídrico (HCl, 36,5 - 38,0 %, CAS 7647-01-0, Nuclear - Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH, 95 %, CAS 1310-73-2, Nuclear - Brasil).

3.2.2. Métodos

3.2.2.1. Técnicas de caracterização

Medidas de ângulo de contato foram realizadas pelo método da gota séssil em um sistema de ângulo de contato utilizando água bidestilada como líquido de prova. O sistema estava equipado com um equipamento de vídeo (OCA20 Dataphysics, Itália). O ângulo de contato medido foi obtido a partir da média simples de 10 repetições ($n = 10$). Todas as medidas foram realizadas em tempo zero para evitar a perfusão da água através da membrana. Além disso, a tensão de adesão da água (T_a) foi calculada pela relação matemática $T_a = \gamma \cos \theta$, onde θ é a medida do ângulo de contato e $\gamma = 72,8$ dina/cm para água bidestilada (XU *et al.* 2007).

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM) equipado com uma fonte de elétrons por emissão de campo (SEM-FEG) (QuantaFEG 200, FEI, Holanda), operando a uma aceleração de voltagem de 20 kV. Para obtenção das imagens, as amostras foram primeiramente desidratadas em etanol, seccionadas e, então, recobertas com uma monocamada de Pd-Au, utilizando um equipamento de “sputter coater” (Emitech K550, Itália) (SALERNO *et al.*, 2007; SALERNO *et al.*, 2008).

3.2.2.2. *Preparação do PEC QT/SC*

O PEC QT/SC foi formado a partir de uma solução aquosa, resultante da mistura de duas outras soluções aquosas individuais de QT e SC. A solução de QT foi obtida por meio da solubilização de QT (6,4 g) em solução aquosa de HCl (400 ml, 0,57 mol/l), produzindo uma solução com concentração de 1,6 % massa por volume (m/v). Essa solução foi aquecida até a temperatura de 65 °C e agitada magneticamente por 4 h até a completa solubilização da QT. A solução de SC foi preparada a partir da solubilização de SC (25,0 g) em água destilada (100 ml) resultando em uma solução com concentração igual a 25,0 % m/v. Feito isso, as duas soluções produzidas foram misturadas lentamente, sob agitação vigorosa e a temperatura ambiente. A suspensão resultante do início da complexação polieletrólítica entre a QT e o SC foi então estocada por 24 h para a sedimentação do material (ou seja, compactação do PEC QT/SC). Decorrido esse período, o material formado foi separado do sobrenadante e purificado em água destilada por mais 24 h. Durante o processo de purificação, o pH do meio foi ajustado à neutralidade (pH 7,0) com o gotejamento de uma solução aquosa de NaOH 0,2 mol/l. Por fim, o material purificado foi seco a temperatura ambiente por 48 h.

3.2.2.3. *Avaliação das propriedades reológicas*

O comportamento reológico dos complexos foi investigado por ensaios de cisalhamento oscilatório de pequenas amplitudes em um reômetro do tipo rotacional (Gemini, Bohlin Reologi, Itália). Para os ensaios, amostras do complexo foram primeiramente intumescidas até o equilíbrio em solução tampão pH 6,0, 7,4 ou 8,0 e em meio de cultura celular (DMEM, Gibco, USA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (Gebo, USA) e 50 µg/ml gentamicina). Os ensaios foram realizados a uma temperatura controlada de 37 °C e as frequências de oscilação aplicadas foram de 0,01 a 10 Hz. Em um experimento dinâmico, o material é sujeito a uma tensão de cisalhamento senoidal, dada pela Equação (3.1):

$$\gamma = \gamma_0 \sin(\omega t) \quad (3.1)$$

onde γ_0 refere-se à amplitude da tensão de cisalhamento, ω é a frequência de oscilação (a qual pode ser expressa como $2\pi f$ onde f é a frequência em Hz) e t é o tempo. A resposta mecânica, expressa como tensão de cisalhamento (τ) de materiais viscoelásticos, é intermediária entre um sólido ideal puro (lei de Hooke) e um fluido viscoso puro (lei de Newton), e pode ser expressa pela Equação (3.2):

$$\tau = G'(\omega)\gamma_0 \sin(\omega t) + G''(\omega)\gamma_0 \cos(\omega t) \quad (3.2)$$

onde $G'(\omega)$ é o módulo de cisalhamento de estocagem e $G''(\omega)$ é o modo de cisalhamento de perda. G' fornece informação sobre a elasticidade ou a energia estocada em um material durante o processo de deformação, enquanto que G'' descreve o caráter viscoso de um material ou a energia dissipada.

3.2.2.4. *Análise morfológica e determinação do tamanho de poro dos complexos polieletrólíticos após intumescimento em diferentes pHs*

As modificações na morfologia do complexo polieletrólítico QT/SC causadas pelo intumescimento prévio em diferentes condições de pH foram verificadas por imagens de microscopia eletrônica de varredura (SEM). Amostras do complexo foram intumescidas até o equilíbrio em soluções tampão pH 2,0 6,0 7,4 e 8,0 e no meio de cultura (pH 7,0 - 7,4). Após isso, foram congeladas em $N_2(l)$ e fraturadas. As amostras foram, então, recobertas com uma fina camada de ouro e examinadas em um microscópio Leica, modelo s420. Para a obtenção das imagens foi aplicada uma aceleração de voltagem de 20 kV. A análise das imagens foi feita utilizando o software computacional NIH Image[®] versão 1.60, o que permitiu a avaliação do tamanho dos poros, sua média e sua distribuição. Essas análises foram feitas por meio de uma operação algorítmica, a qual faz uso da segmentação de imagens conhecida como “*thresholding*”. As análises, em cada imagem, foram feitas em uma área de 5 mm² para determinar as características geométricas de cada poro. As áreas dos poros (expressas em μm^2), o perímetro (μm) e o maior e menor diâmetro da elipse com o mesmo centro de

gravidade foram calculados e usados para estimar o índice de circularidade (*I.C.*) e o fator de polaridade. O *I.C.* foi calculado utilizando a equação $I.C. = 4\pi A/P^2$, onde *A* é a área do poro e *P* é o perímetro do poro (BORZACCHIELLO *et al.*, 2007).

3.2.2.5. Ensaios biológicos

3.2.2.5.1. Cultura celular

Células originárias de fibroblastos de camundongos (denominadas NIH3T3) foram cultivadas em meio de cultura celular (DMEM, Gibco, USA) contendo 10 % de soro fetal bovino (suplementador nutricional), 100 mg/ml de penicilina e 100 mg/ml de estreptomicina (agentes bactericida). As células foram mantidas em um incubador umidificado com temperatura controlada em 37 °C e atmosfera com 5 % de CO₂. As células foram lavadas com solução de tripsina (0,25 % m/v) em solução tampão salina Hanks (essa solução tampão impede que as células se tornem muito ácidas ou básicas e fornece sais essenciais às mesmas) durante 2 min e, então, ressuspensas em meio de cultura celular. Amostras do complexo QT/SC no formato de discos (raio = 10 mm e espessura = 5 mm) foram lavadas em etanol (70 % v/v) por 1 h e, posteriormente, em tampão salino pH 7,4 contendo 1 % (m/v) de agentes antibióticos e antimicóticos por 24 h. As amostras lavadas foram depositadas em placas de cultura celular com 24-poços, lavados com meio de cultura e então, uma quantidade igual a $1,7 \times 10^4$ células foi semeada sobre a amostra em cada poço.

3.2.2.5.2. Ensaios de interação celular

A morfologia e a colonização celular nas amostras do complexo QT/SC foram observadas por SEM 21 dias após a semeadura das células. Feita a remoção do meio de cultura (pH 7,0 - 7,4) as amostras, juntamente com as células, foram fixadas utilizando glutaraldeído (2,5 % v/v) solubilizado em solução tampão de cacodilato de sódio [NaOAsO(CH₃)₂] 0,1 M por 1 h a temperatura ambiente. Logo, as amostras foram desidratadas utilizando etanol e, em seguida, cobertas com uma fina camada de ouro-paládio

para análise em SEM. As imagens de SEM foram obtidas usando uma aceleração de elétrons de 20 kV.

Após 21 dias de cultura, as células foram fixadas em uma solução tampão salina (PBS) contendo *p*-formaldeído (4 % v/v) a 37 °C por 15 min. As amostras foram, portanto, lavadas com PBS e permeabilizadas com uma solução de Triton X-100 (surfactante não iônico) (0,1 % m/v) em solução tampão contendo albumina do soro bovino (BSA) (1 % m/v). Anticorpos primários e secundários foram adicionados às amostras para permitir a análise por imagens (coramento). Estas foram então incubadas com anticorpos primários Qdot (1:100 em 1 % BSA/PBS) durante 30 min e lavadas abundantemente com PBS. Esta etapa foi seguida da adição dos anticorpos secundários. A detecção da tubulina (proteína não globular) foi realizada com o anticorpo secundário CY5 (1:200 em 1 % BSA/PBS). Já o coramento do núcleo celular e dos microfilamentos de actina foi realizado com Sytox Green® (5 µM, Invitrogen, EUA) durante 15 min. Feita a introdução dos anticorpos, as amostras foram lavadas com PBS e imunomarcadores foram observados utilizando um microscópio confocal de varredura a laser (Carl Zeiss, modelo LSM510, Alemanha).

3.2.2.5.3. Ensaio de viabilidade celular

As amostras semeadas com as células NIH3T3 foram removidas dos poços de cultura em diferentes intervalos de tempo (1, 4, 7, 14 e 21 dias), lavadas com PBS e, por fim, depositadas em uma placa de cultura celular 24-poços. Para cada amostra foram adicionados 1 ml de DMEM não corado (HyClone, Reino Unido) juntamente com o corante Alamar Blue (10 % v/v, Serotec, Reino Unido). As amostras foram então encubadas por 4 h a 37 °C em uma atmosfera com 5 % de CO₂. Decorrido esse período, uma alíquota de 200 µl de cada poço foi coletada e transferida para uma placa com 96-poços. A densidade óptica foi imediatamente medida utilizando um espectrofotômetro (Sunrise, modelo TECAN, Suíça) nos comprimentos de onda de 540 e 600 nm. O número de células viáveis é correlacionado com a magnitude da redução do corante e é expressa como porcentagem de redução do Alamar Blue, de acordo com o protocolo do fabricante. Foram investigados os poços semeados com as

células, porém, sem as amostras do complexo, usados como controle. Cada ensaio foi realizado em triplicata ($n = 3$).

3.2.2.5.4. *Quantificação de DNA*

DNA foi quantificado utilizando o kit PicoGreen[®] dsDNA (Molecular Probes, EUA) segundo protocolos de quantificação de DNA. Brevemente, 100 µl do reagente Picogreen[®] dsDNA [diluído previamente, 200 vezes] foi adicionado a 100 µl de um agente de lise celular (produz o rompimento da célula) e incubado em ambiente protegido de luz, a temperatura ambiente por 5 min. A absorbância foi medida em um comprimento de onda de excitação/emissão de 585 - 520 nm utilizando um leitor de placa (Perkin-Elmer, modelo multi label conter 1420 Victor, Itália). dsDNA (DNA com fita dupla) foi quantificado a partir de uma curva de calibração padrão de 1-dsDNA em 10 mM de solução tampão Tris-HCl (pH 7,5) e 1 mM de etilenodiaminotetracético (EDTA). O número de células viáveis (ou viabilidade celular) é determinado pela comparação entre os valores da absorbância medidos para os diferentes tempos de cultura e os valores da curva de calibração, obtidos a partir da correlação entre o número conhecido de células nos 24-poços da placa de cultura celular, com os correspondentes valores de absorbância. Cada experimento foi realizado em triplicata ($n = 3$).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Caracterização do complexo QT/SC

Uma das principais e desejadas características de um substrato para uso em cultivo de células e tecidos é possuir propriedades de superfície que permitam a adesão de células e tecidos. A adesão é definida como um conjunto de forças que fazem com que duas ou mais superfícies, de compostos ou composição diferentes, se unam quando colocadas em íntimo contato (KASEMO, 1998; MORRA *et al.*, 2006). No caso dos biomateriais, a adesão com os sistemas biológicos ocorre completamente quando há molhabilidade da superfície sólida do

biomaterial por um líquido apropriado para o desenvolvimento celular, no caso, os líquidos aquosos biológicos ou que simulem ambientes biológicos (KASEMO, 1998; MORRA *et al.*, 2006). A molhabilidade é a medida do ângulo de contato crítico formado pelo espalhamento de uma gota de líquido em uma superfície sólida. Em se tratando dos biomateriais, esse líquido, na maioria das vezes, é a água. A capacidade de molhamento da superfície do biomaterial tem o potencial de restringir certas populações celulares e de até mesmo alterar suas funções biológicas (KASEMO, 1998; MORRA *et al.*, 2006). Se a molhabilidade da superfície do substrato não for compatível com as células, estas irão preferir aderir umas às outras ou à matriz extracelular ao invés de aderirem à superfície do biomaterial (MORRA *et al.*, 2006). Um parâmetro importante na avaliação da molhabilidade entre duas superfícies é o ângulo de contato, o qual é definido como o ângulo formado entre a superfície s/l e a tangente à superfície do líquido no ponto inicial de contato s/l. Esse ângulo pode variar de 0° à 180° . Na Figura 3.1 é mostrada uma imagem fotográfica tomada em um dos ensaios de medida de ângulo de contato realizado com o complexo polieletrólítico de QT/SC. A média das medidas de ângulo de contato, as quais foram realizadas com água bidestilada, apresentou valor de $\theta = 64,0 \pm 3,8^\circ$. Esse resultado se assemelha a outros já descritos na literatura para sistemas similares. Por exemplo, Yan *et col.* (2013) determinaram para substratos baseados em poli(ácido L-glutâmico) e QT um ângulo de contato menor que $75,0^\circ$. Já Liu *et al.* (2005) observaram que o recobrimento da superfície de poli(etileno tereftalato) com camadas automontadas de QT/SC possui $\theta = 67,1 \pm 2,0^\circ$. O valor obtido indica que a superfície do complexo polieletrólítico QT/SC formado apresenta alta molhabilidade, fato atribuído principalmente ao caráter hidrofílico da QT e do SC, o qual gera grande afinidade entre a água e complexo. Esse resultado permite inferir que o material formado pode apresentar potencial para uma boa adesão célula-material para células com caráter hidrofílico. O valor de tensão de adesão (τ) calculado a partir do valor do ângulo de contato verificado para o complexo QT/SC é igual a $31,9 \pm 3,4$ dina/cm. O dado encontrado sugere que o material formado possui uma boa força de adesão, a qual pode ser uma vantagem interessante para aplicações biológicas.

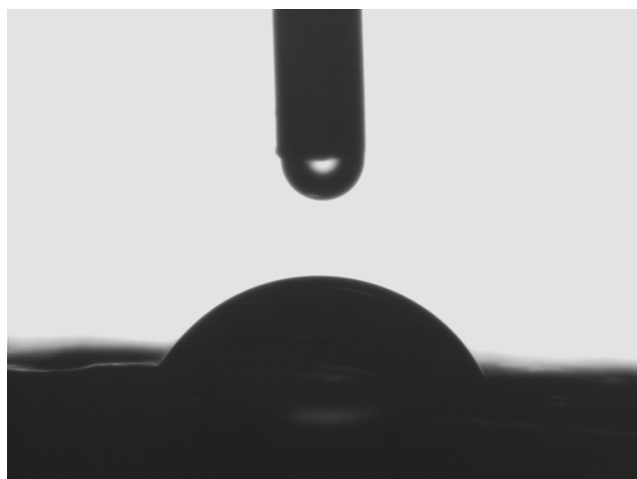


Figura 3.1. Imagem fotográfica tomada em um dos ensaios realizados para determinação do ângulo de contato.

Outro parâmetro fundamental que deve ser avaliado, após a preparação de um material para aplicações biomédicas, é o comportamento reológico. O estudo reológico desse tipo de material tem auxiliado tanto na compreensão da estrutura tridimensional que o forma, mas também entender como a conformação estrutural afeta o comportamento reológico. Além disso, é possível investigar como os fatores externos (temperatura, pressão, umidade, pH, etc.) afetam as propriedades reológicas. Dependendo do comportamento reológico do substrato frente a essas variações, podem ocorrer (ou não) benefícios à cultura celular. Levando isso em consideração, o módulo de cisalhamento mecânico, ou seja, o módulo elástico viscoso de amostras de complexo de QT/SC, os quais foram previamente intumescidos em soluções tampão com diferentes pHs e em meio de cultura, foram determinados a fim de avaliar a influência do pH do meio de intumescimento sob as propriedades reológicas dos complexos. O módulo de cisalhamento foi determinado em função da frequência de oscilação registrada no equipamento. Aliás, as medidas reológicas foram feitas a temperatura constante de 37 °C que é equivalente à temperatura corporal humana em condições normais. Após análise dos resultados, foi possível inferir que o comportamento mecânico de todas as amostras avaliadas é característico de materiais tipo gel, com G'' sendo menor que G' em todas as faixas de frequência investigadas. No entanto, o módulo viscoelástico (G'') demonstrou ser

independente da frequência. Na Tabela 3.2, abaixo, são apresentados os valores obtidos de G' e G'' para as amostras de complexo intumescidas em diferentes condições:

Tabela 3.2. Valores de G' e G'' , a 1 Hz, para as amostras de complexos intumescidos até o equilíbrio em soluções tampão com diferentes pHs e no meio de cultura (MC) a 37 °C.

	Meio de intumescimento				
	pH 2,0	pH 6,0	pH 7,4	MC	pH 8,0
G' (Pa)	$5,0 \times 10^3$	$3,8 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
G'' (Pa)	$3,4 \times 10^3$	$2,6 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3$	$1,7 \times 10^3$

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3.2 é possível observar um decaimento tanto no valor de G' quanto no de G'' quando as amostras são previamente intumescidas em soluções tampão com maiores valores de pH. Isso se deve ao fato de que o aumento no valor do pH do meio externo ao gel proporciona um aumento no índice de intumescimento do complexo. Dessa forma, o complexo perde rigidez e o seu módulo de elasticidade diminui. Soma-se a isso o fato de que com o aumento na taxa de intumescimento, parte das cadeias do SC é liberada (PIAI *et al.*, 2009; PIAI *et al.*, 2010; FAJARDO *et al.*, 2011). Assim, a quantidade de pontos de interação dentro da matriz polimérica diminui e resulta em diminuição das propriedades viscoelásticas do material, como foi de fato observado. Entretanto, vale ressaltar que a amostra previamente intumescida em meio de cultura (MC) apresentou os menores valores de G' e G'' . O líquido utilizado como meio de cultura é uma mistura de sais enriquecidos com aminoácido e outros componentes essenciais para o crescimento celular e apresenta pH entre 7,0 - 7,4. A grande quantidade de sais presentes no MC pode ter afetado a capacidade de complexação entre a QT e o SC reduzindo, desse modo, o módulo de elasticidade da amostra.

A possível influência do pH sobre as características morfológicas do complexo também foi avaliada. A variação na densidade de cargas no interior da matriz polimérica afeta significativamente a capacidade de complexação das espécies polieletrólíticas. Como resultado, tem-se a variação na distribuição e no tamanho médio dos poros presentes na

estrutura do material (FAJARDO *et al.*, 2010). A Figura 3.2 apresenta imagens obtidas por SEM do complexo polieletrólítico QT/SC seco, após ter sido intumescido previamente em solução tampão pH 2,0, 6,0, 7,4 e no meio de cultura celular (pH 7,0 - 7,4). De acordo com o meio de intumescimento, verifica-se que a matriz polimérica do PEC apresenta diferentes morfologias. Tais mudanças são resultantes do maior ou menor grau intumescimento, conforme relatado por Fajardo *et al.* (2010, 2011). O pH do meio de intumescimento afeta a eficiência de complexação entre a QT e o SC (FAJARDO *et al.*, 2011). No entanto, em meios ácidos tem-se elevada taxa de complexação entre os dois polissacarídeos, pois os grupos amino da QT estão totalmente protonados nesta condição, o que permite que os mesmos interajam fortemente com os grupos negativamente carregados do SC. Essa interação faz com que a matriz polimérica restrinja o influxo e efluxo de líquido, o que consequentemente diminui o tamanho dos poros (Figura 3.2a). Já, quando a matriz polimérica é intumescida em uma condição de pH maior que o pKa dos grupos amino da QT, a ionização dos grupos amino não mais ocorre. Vale ressaltar, que os grupos amino da QT apresentam $pK_a \approx 6,20$. Por outro lado, nestas condições de pH os grupos sulfônicos ($pK_a \approx 2,60$) e carboxílicos ($pK_a \approx 4,57$) (LARSSON *et al.*, 1981) do SC são convertidos nas suas respectivas formas ionizadas. Com isso, há um aumento na densidade de cargas negativas no interior da rede polimérica e as cargas negativas promovem a repulsão eletrostática do tipo ânion-ânion entre as cadeias de SC. Tal repulsão, somada à diminuição das interações eletrostáticas entre as cadeias de ambos os polieletrólitos, desestabiliza a rede possibilitando que as cadeias de SC anteriormente aprisionadas, adquiram maior mobilidade. A desestabilização da rede promove a sua expansão, ocasionando o aumento na difusão de líquidos para o interior da matriz. Durante a difusão de líquidos as cadeias menores de SC são capturadas e arrastadas, sendo, portanto, liberadas por difusão durante o efluxo de líquido (HOLLISTER, 2005; CANCEDDA *et al.*, 2007). Por isso, é verificado um aumento no tamanho e na distribuição dos poros para as amostras de PEC intumescidas em soluções tampão pH 6,0 7,4 e 8,0 e no meio de cultura celular, o qual pode apresentar pH 7,0 - 7,4 (ver Figura 3.2b-e).

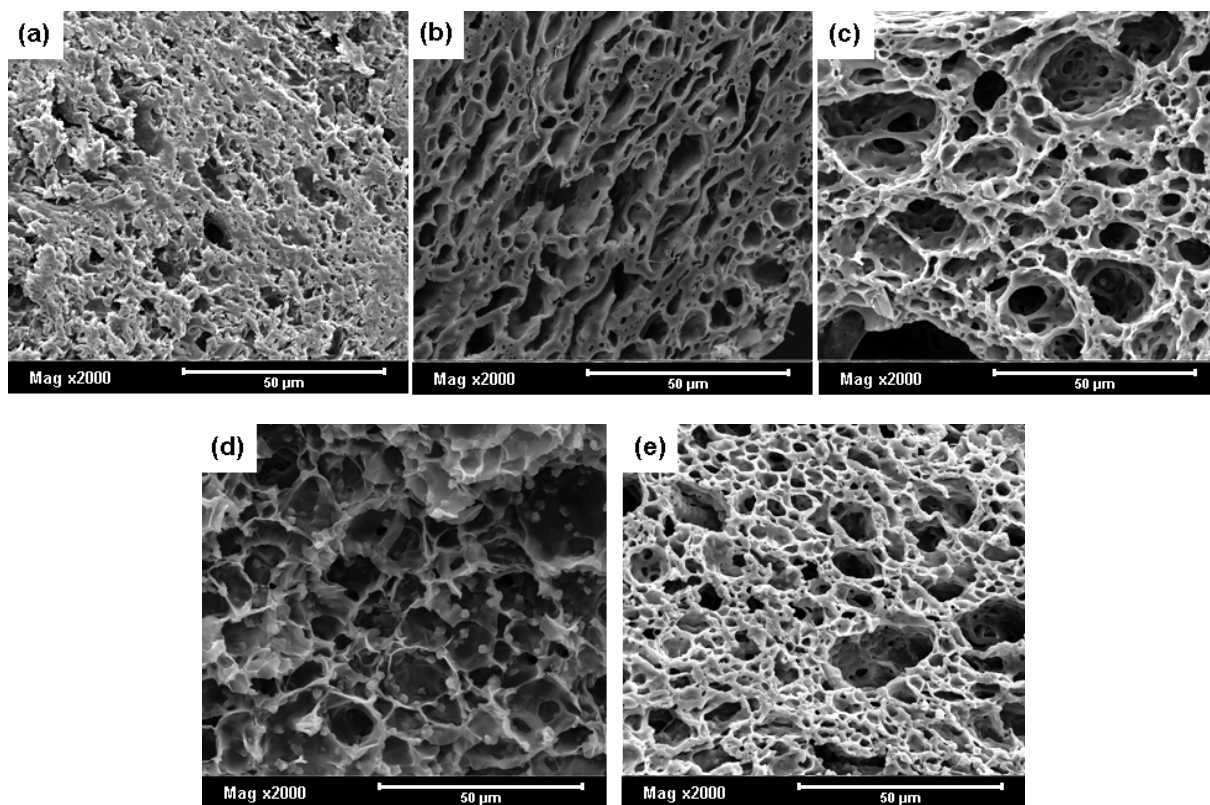


Figura 3.2. Imagens de SEM do complexo polieletrólítico QT/SC seco, após ter sido intumescido previamente em (a) solução tampão pH 2,0; (b) pH 6,0; (c) pH 7,4; (d) MC e (e) solução tampão pH 8,0 (imagens das superfícies fraturadas; Mag x2000, barra de escala 50 μm).

A partir das imagens obtidas por SEM dos complexos previamente intumescidos em diferentes condições de pH foram estimadas a distribuição dos poros em função do tamanho e a porcentagem de poros em cada amostra. Essa análise foi feita utilizando o software computacional NIH Image[®]. Os resultados são apresentados na Figura 3.3.

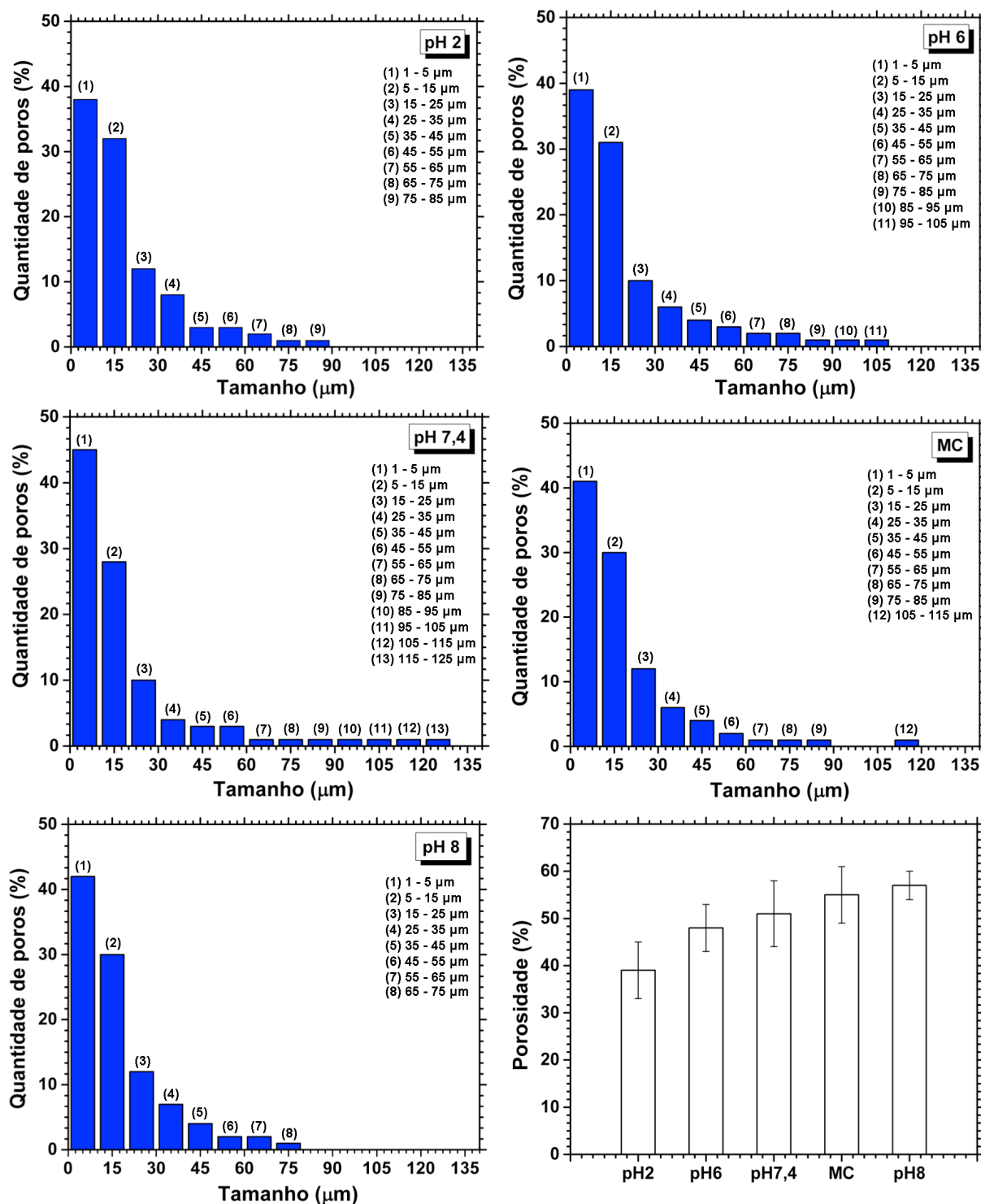


Figura 3.3. Distribuição do tamanho de poros e porosidade do complexo polieletrólítico QT/SC seco, após ter sido intumescido previamente nas soluções tampão pH 2,0, 6,0, 7,4 e 8,0 e em meio de cultura celular (MC).

Foi verificado para todas as amostras que a maioria dos poros apresenta tamanho entre 0 - 15 μm . Além disso, nota-se que para as amostras intumescidas em um meio com $\text{pH} \geq 6$ o percentual de poros com tamanhos entre 15 - 30 μm apresenta uma ligeira diminuição enquanto que o percentual dos poros com tamanhos maiores que 30 μm aumentou. Outro dado relevante se relaciona à questão do percentual de poros, o qual aumenta de acordo com o pH do meio de intumescimento. Em condições fisiológicas ($\text{pH} \approx 7,4$) a porosidade aumenta, o que torna o material um interessante substrato para cultura e crescimento de células e tecidos. Alguns trabalhos difundem o consenso de que materiais porosos quando implantados *in vivo* apresentam melhor integração com o tecido receptor. A estrutura e o tamanho dos poros dos substratos utilizados para cultura e crescimento de células têm papéis críticos na engenharia de tecidos, uma vez que fornecem uma estrutura tridimensional vital para as células neles depositadas (YARLAGADDA *et al.*, 2005).

3.3.2. Ensaios biológicos

A interação entre as células NIH3T3 e o complexo QT/SC foi investigada por meio de imagens de SEM (Figuras 3.4 e 3.5), obtidas após a realização dos ensaios biológicos. Nas imagens de SEM, é possível visualizar claramente que a superfície porosa das amostras previamente intumescidas em meio de cultura celular promovem a adesão e o espalhamento celular. Após 21 dias do início do cultivo celular foi verificado que as células NIH3T3 apresentam boa espalhabilidade sobre a superfície do complexo QT/SC. Além disso, ocorreu o espalhamento das células nas regiões periféricas dos poros assim como nas paredes internas dos mesmos. As células aderidas ao substrato apresentaram uma morfologia condizente com um relevo achatado e liso. Os materiais aglomerados possuem formato poligonal e alongado conforme pode ser observado nas imagens de SEM. As imagens de SEM apresentadas na Figura 3.4 permitem visualizar as células NIH3T3 espalhadas sob a superfície do complexo e no interior dos poros do complexo QT/SC.

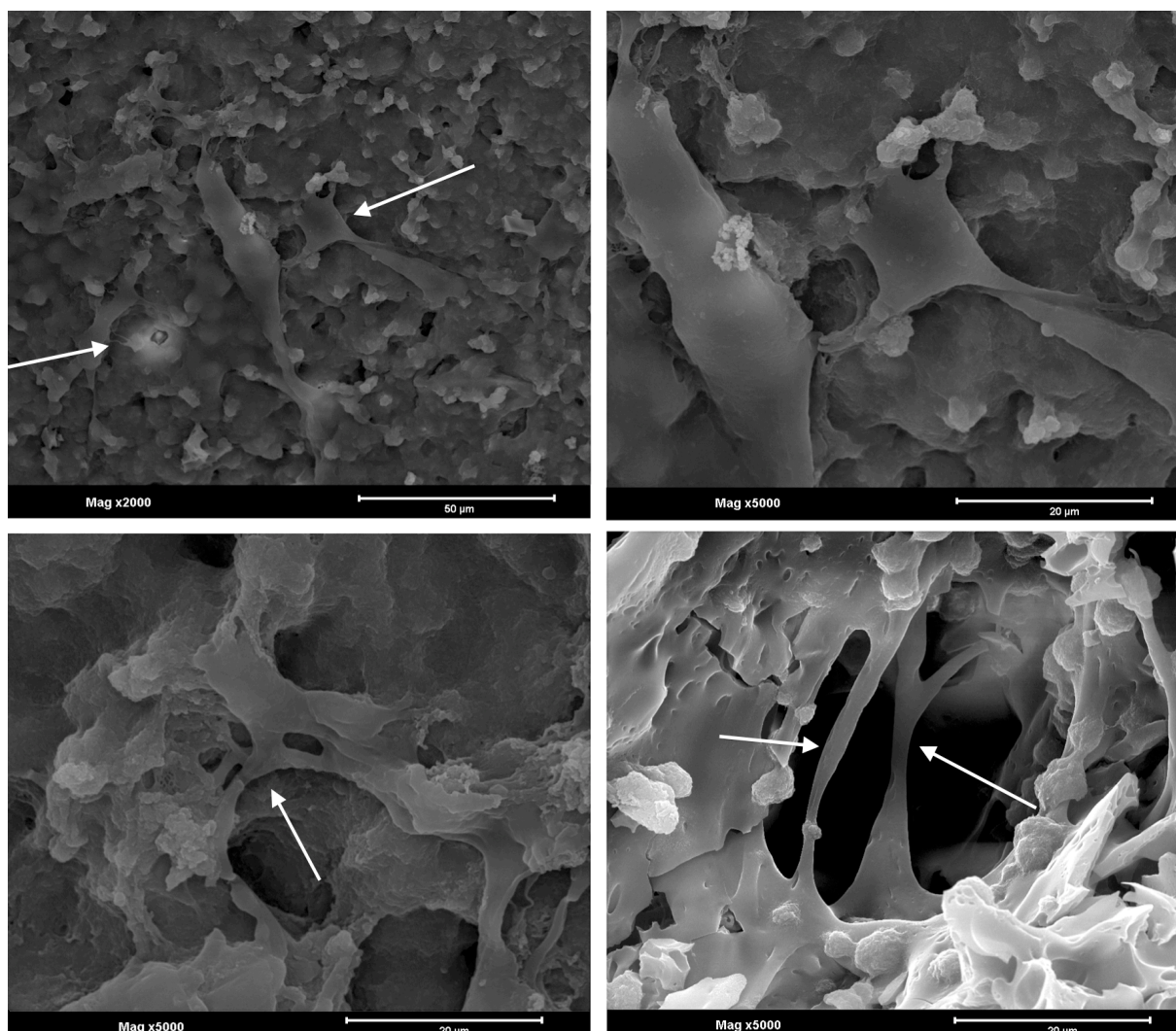


Figura 3.4. Imagens de SEM do complexo polieletrólítico de QT/SC semeado com células NIH3T3 após 21 dias de cultura (Mag x2000 e x5000, barras de escala 50 e 20 µm).

A adesão das células à superfície e aos poros do complexo ocorre via filopódia, prolongamentos citoplásmaticos longos e delgados que permitem a movimentação e adesão das células ao substrato. O aparecimento desses prolongamentos indicam que as células semeadas sobre o complexo, além de aderirem ao PEC, foram capazes de estenderem sua morfologia e proliferar. Pelas imagens de SEM, é possível visualizar, ainda, que as células localizadas ao redor das região periférica dos poros permaneçam conectadas às células vizinhas por micro zonas de contato tipo ponte. Essa ponte entre duas células vizinhas é formada por filamentos intermediários que possuem grande força tensora e que são compostos

por várias proteínas intra e extracelulares. Na Figura 3.5 são apresentadas imagens de SEM com maiores ampliações onde é possível visualizar o aparecimento de estrutura tubulares entre as células, o que evidência a formação de uma nova matriz extracelular (ECM).

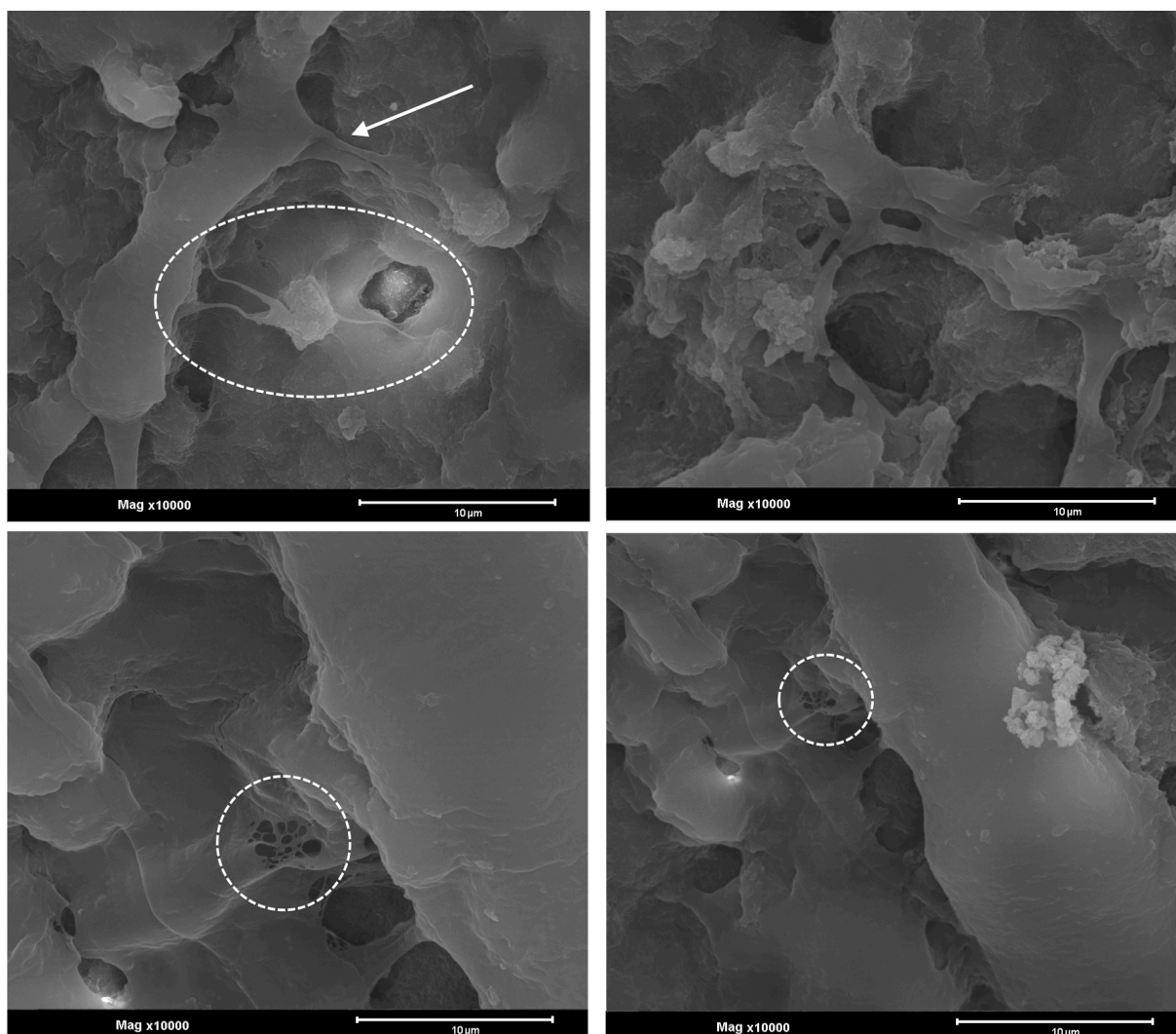


Figura 3.5. Imagens de SEM do complexo polieletrólítico de QT/SC semeado com células NIH3T3 após 21 dias de cultura (Mag x10000; barra de escala de 10 μm).

A ECM corresponde aos complexos macromoleculares relativamente estáveis, formados por moléculas de diferentes naturezas que são produzidas, exportadas e complexadas pelas células, modulando a estrutura, fisiologia e biomecânica dos tecidos. Nas imagens de SEM apresentadas na Figura 3.5 a ECM pode ser observada nos espaços entre os

aglomerados celulares. Os resultados obtidos durante o ensaio sugerem que o complexo polieletrólítico de QT/SC apresenta boa biocompatibilidade em termos da cultura celular de fibroblastos (os quais são formados pelas células NIH3T3). Esses resultados podem ser associados à presença do SC na composição do complexo. Por ser um componente ativo da ECM, o SC permite que as células tenham maior poder de adesão com o complexo e estimula a proliferação celular. Alguns trabalhos relatam que o SC auxilia no crescimento celular e na formação de tecidos (THISSEN *et al.*, 2006; CHUNG *et al.*, 2008). Soma-se a essas vantagens, o fato da QT também apresentar bom potencial para essa aplicação. Zhu *et al.* (2011) mostraram que a ligação das células de fibroblastos aumenta significativamente em substratos formados por quitosana e quitosana/heparina. Assim, pode se inferir que o material formado pela complexação polieletrólítica da QT e do SC apresenta potencial para ser utilizado como biomaterial no revestimento de ferimentos e/ou como suporte para crescimento e regeneração de tecidos.

Imagens obtidas por microscopia confocal de varredura a laser (CLSM) (ver Figura 3.6) corroboram com as imagens de SEM. As imagens de CLSM permitem visualizar a distribuição das células NIH3T3 na estrutura tridimensional do complexo de QT/SC, após o 21º dia de incubação. De acordo com a técnica de coloração empregada, tem-se a partir das fluorescência dos corantes que a região verde corresponde ao núcleo celular, a região vermelha corresponde aos filamentos de actina (citoplasma) e a região azul é correspondente à tubulina (citoesqueleto) (ver Figura 3.6a).

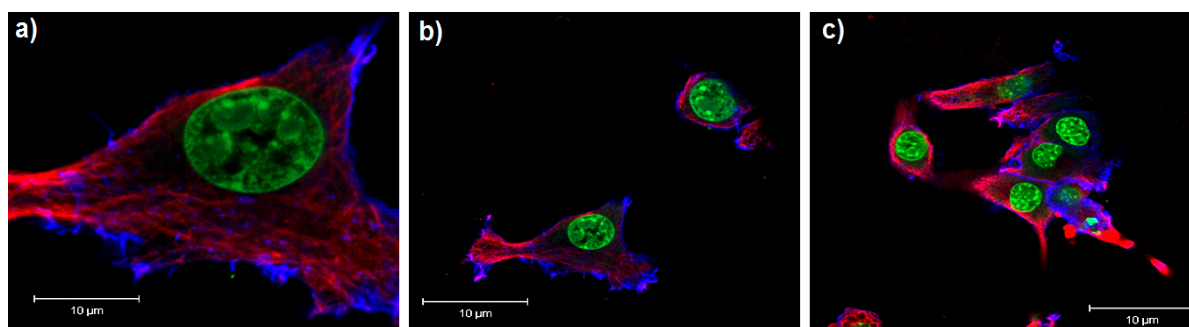


Figura 3.6. Imagens de CLSM (a) de uma célula NIH3T3 e do (b-c) complexo polieletrólítico QT/SC semeado com células NIH3T3 (barra de escala 10 µm).

Analisando as imagens obtidas por CLSM, é possível verificar que as células são induzidas a aderir ao longo da região porosa do substrato e estão arranjadas em aglomerados de células como demonstrado na Figura 3.6(b,c). Avaliando a arquitetura do citoesqueleto das células, nota-se que o corpo celular é caracterizado por longos feixes estirados de actina e por finos filamentos de tubulina, que são projetados na direção exterior do corpo celular. A região periférica do lamelipódio (uma extensão da membrana celular que é sustentada por uma rede ramificada e densa de F-actina com crescimento rápido que atua na protusão e migração da célula) é representada por uma base constituída por microtúbulos e filópodes, fundamentais para a mobilidade celular. Entre os filamentos ramificados de actina, a maior parte se estende em direção aos pontos de contato com outras células, enquanto que os filamentos restantes estão orientados em direção à membrana plasmática. O núcleo exibe características típicas para tal estrutura, onde a aglomeração da cromatina pode ser observada. As técnicas de images utilizadas para carterizar o potencial biológico do complexo QT/SC permite inferir que o mesmo atua eficientemente no suporte celular garantindo, assim, a adesão, a migração e a proliferação de células NIH3T3. Isso se deve, principalmente, à estrutura porosa do material formado a partir das interessantes características fornecidas pela QT e pelo SC.

Ensaio de viabilidade celular foram realizados utilizando o teste com o corante Alamar Blue, o qual consiste em um método utilizado para avaliar a proliferação celular. Esse método tem na simplicidade de uso sua principal vantagem, pois o corante é adicionado diretamente no meio de cultivo de células e não há a necessidade de reagentes específicos ou manipulações adicionais. Além disso, o corante utilizado não é citotóxico sendo, portanto, desnecessária a morte das células para se obter o resultado pretendido. Esse teste consiste na adição de um indicador redox fluorogênico no meio de crescimento celular, no caso, o Alamar Blue. Na forma oxidada, o corante Alamar Blue possui coloração na tonalidade azul escura e apresenta pouca fluorescência intrínseca. Quando entra nas células, o Alamar Blue reduz e muda sua cor para a tonalidade vermelha, a qual passa a exibir grande fluorescência. O grau de conversão da forma oxidada para a forma reduzida está, portanto, intimamente ligado com o aumento no número de células no meio de cultura, ou seja, com a viabilidade celular. A

porcentagem de redução do corante, quantificada por densidade óptica, permite avaliar a extensão da proliferação celular. Neste Capítulo, o ensaio com Alamar Blue foi realizado, afim de verificar a viabilidade das células NIH3T3 semeadas sob o complexo de QT/SC. A viabilidade celular foi avaliada, após diferentes intervalos de incubação (1, 4, 7, 14 e 21 dias). Os resultados são apresentados na Figura 3.7.

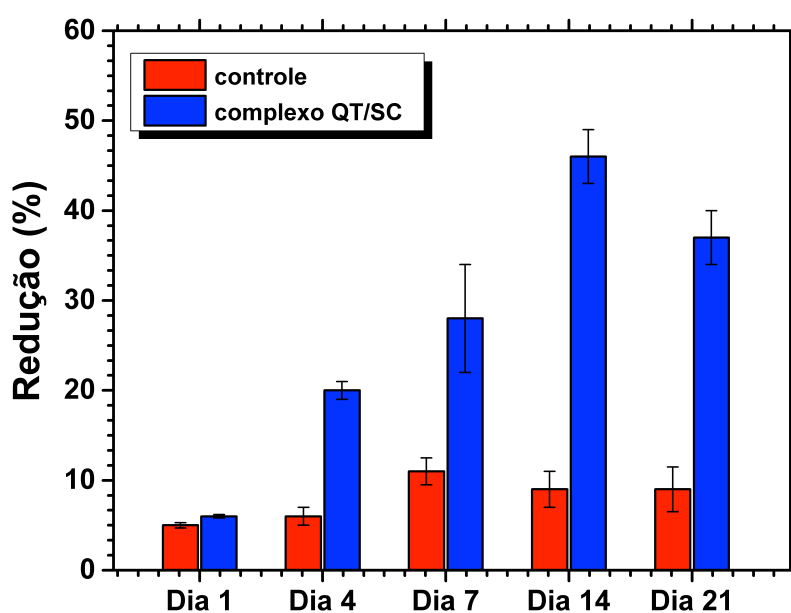


Figura 3.7. Ensaios de viabilidade das células NIH3T3 semeadas sob o complexo de QT/SC e incubadas por diferentes períodos.

Os dados apresentados na Figura 3.7 permitem ressaltar que as células NIH3T3 são viáveis e aderiram à superfície do substrato mantendo sua atividade metabólica. De acordo com os dados obtidos, é possível verificar que a porcentagem de redução do corante demonstrou um aumento no intervalo de 1 a 14 dias de incubação. Após 14 dias de incubação, observou-se um máximo no percentual de redução (cerca de 48 %) e, após esse período ocorreu uma ligeira diminuição desse valor. Ou seja, a viabilidade celular apresentou um aumento considerável até o 14º dia de incubação e a seguir apresentou uma certa diminuição conforme observado no dado registrado para o 21º dia de incubação. Ainda, os resultados obtidos por esse teste mostraram que, além de propiciarem a proliferação das células NIH3T3,

o material utilizado como substrato não apresenta efeito negativo sobre a proliferação celular, uma vez que os resultados alcançados para o mesmo foram superiores aqueles do controle. Esses resultados se devem, principalmente, a habilidade da estrutura tridimensional formada pela complexação da QT e do SC em promover a migração e adesão celular possibilitando, assim, a sua proliferação além de corroborar com os resultados obtidos a partir da quantificação do DNA das células semeadas sobre o complexo QT/SC. A quantificação do DNA das células permite avaliar com maior precisão a dimensão da proliferação celular. Os dados alcançados por essa técnica mostraram que durante a cultura celular *in vitro* a densidade de células viáveis aumentou de $1,7 \times 10^4$ para $8,8 \times 10^5$ células/poço comparando o 1º e o 14º dia de incubação. O grande aumento na densidade de células possibilita, consequentemente, o aumento na atividade de proliferação celular, devido à colonização celular do substrato, confirmando assim, a potencialidade do complexo de QT/SC para atuar como substrato para cultivo de células e tecidos.

3.4 CONCLUSÕES

Complexos polieletrólíticos baseados em QT e SC foram formados e avaliados para atuar como substrato para cultura e crescimento de células e tecidos. Medidas de ângulo de contato, utilizando água bidestilada, mostraram que o complexo formado tem alta molhabilidade, o que se deve à presença de polissacarídeos hidrofílicos em sua preparação. O módulo de cisalhamento mecânico calculado para as amostras de complexo intumescidos em soluções tampão com diferentes pHs mostrou que o material formado apresenta características tipo gel. Foi possível observar, ainda, que os valores de G' e G'' diminuem quando as amostras são intumescidas previamente em soluções tampão com maiores valores de pH. Isso é devido às variações no grau de intumescimento e à perda de parte do SC quando as amostras são intumescidas em um meio com $\text{pH} \geq 6$. Imagens de SEM mostraram que as amostras intumescidas previamente em soluções tampão pH 6,0, 7,4 e 8,0 e em meio de cultura (MC) apresentaram alta porosidade, os quais são distribuídos de modo mais heterogêneo na matriz

polimérica. Além disso, pela avaliação das imagens foi possível verificar que o aumento do pH do meio de intumescimento a valores próximos ou maiores que o pKa dos grupos amino da QT e dos grupos carboxílico e sulfato do SC, proporciona o aumento do tamanho médio dos poros. Desta forma, a estrutura porosa apresentada pelo complexo mostrou-se um ambiente interessante para o cultura e crescimento de células e tecidos. Ensaio de interação entre células NIH3T3 e o complexo QT/SC revelaram, por meio de imagens de SEM, que as células apresentaram boa adesão e dispersão. Aliás, as células proliferaram significativamente como observado pelas imagens de SEM e CLSM. Ensaio de citotoxicidade revelaram que o complexo de QT/SC possui baixo grau de toxicidade para as células testadas e a quantificação do DNA das células, após 14 dias de incubação confirmou a proliferação celular e, cerca de 20 vezes. Os resultados apresentados e discutidos nesse Capítulo permitem, portanto, inferir que o complexo polieletrólítico QT/SC apresenta boa biocompatibilidade em termos da cultura celular de fibroblastos. A utilização do SC e da QT na preparação desse material faz com que o mesmo apresente vantagens únicas e potencial para ser utilizado como biomaterial no revestimento de ferimentos ou como suporte para crescimento e regeneração de tecidos.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BALDWIN, A. D.; KIICK, K. L. Polysaccharide-modified synthetic polymeric biomaterials. *Biopolymers*, v. 94, n. 1, p. 128-140 (2010).
- BORZACCHIELLO, A. *et al.* Structural and rheological characterization of hyaluronic acid-based scaffolds for adipose tissue engineering. *Biomaterials*, v. 28, n. 30, p. 4399-4408 (2007).
- CANCEDDA, R.; GIANNONI, P.; MASTROGIACOMO, M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*, v. 28, n. 29, p. 4240-4250 (2007).
- CHUNG, C.; BURDICK, J. A. Engineering cartilage tissue. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 2, p. 243-262 (2008).
- DENUZIERE, A.; FERRIER, D.; DOMARD, A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical aspects. *Carbohydrate Polymers*, v. 29, n. 4, p. 317-323 (1996).
- FAJARDO, A. R. *et al.* Effect of stoichiometry and pH on the structure and properties of chitosan/chondroitin sulfate complexes. *Colloid and Polymer Science*, v. 289, n. 15-16, p. 1739-1748 (2011).
- FAJARDO, A. R. *et al.* Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 934-943 (2010).
- GANDHI, N. S.; MANCERA, R.L. The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 72, n. 6, p. 455-482 (2008).
- HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nature Materials*, v. 4, n. 7, p. 518-524 (2005).
- KASEMO, B. Biological surface science. *Current Opinion in Solid State & Materials Science*, v. 3, n. 5, p. 451-459 (1998).
- KUMAR, M. *et al.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 12, p. 6017-6084 (2004).

LARSSON, B.; NILSSON, M.; TJALVE, H. The binding of inorganic and organic cations and H^+ to cartilage invitro. *Biochemical Pharmacology*, v. 30, n. 21, p. 2963-2970 (1981).

LIU, Y. X.; HE, T.; GAO, C. Y. Surface modification of poly(ethylene terephthalate) via hydrolysis and layer-by-layer assembly of chitosan and chondroitin sulfate to construct cytocompatible layer for human endothelial cells. *Colloids and Surfaces B-Biointerfaces*, v. 46, n. 2, p. 117-126 (2005).

MORRA, M.; CASSINELLI, C. Biomaterials surface characterization and modification. *International Journal of Artificial Organs*, v. 29, n. 9, p. 824-833 (2006).

OLIVEIRA, J. T.; REIS, R. L. Polysaccharide-based materials for cartilage tissue engineering applications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 5, n. 6, p. 421-436 (2011).

PARK, W. H.; LEE, K. Y.; HA, W. S. Insoluble polyelectrolyte complex formed from chitosan and alpha-keratose: Conformational change of alpha-keratose. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 197, n. 7, p. 2175-2183 (1996).

PETER, M. G. Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, v. A32, n. 4, p. 629-640 (1995).

PIAI, J. F. *et al.* Kinetic study of chondroitin sulphate release from chondroitin sulphate/chitosan complex hydrogel. *Journal of Molecular Liquids*, v. 156, n. 1, p. 28-32 (2010).

PIAI, J. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 7, p. 2601-2609 (2009).

RICHY, F. *et al.* Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis - A comprehensive meta-analysis. *Archives of Internal Medicine*, v. 163, n. 13, p. 1514-1522 (2003).

MORRISON, R. T.; BOYD, R. N. *Organic Chemistry*. 4^a ed. Allyn and Bacon (1987).

SALERNO, A.; IANNACE, S.; NETTI, P. A. Open-pore biodegradable foams prepared via gas foaming and microparticulate templating. *Macromolecular Bioscience*, v. 8, n. 7, p. 655-664 (2008).

SALERNO, A. *et al.* Design and preparation of mu-bimodal porous scaffold for tissue engineering. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, n. 5, p. 3335-3342(2007).

SANTOS JUNIOR, A.; WADA, L. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, p. 9 (1997).

THISSEN, H. *et al.* Synthetic biodegradable microparticles for articular cartilage tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 77A, n. 3, p. 590-598 (2006).

VASILIU, S.; POPA, M.; RINAUDO, M. Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. *European Polymer Journal*, v. 41, n. 5, p. 923-932 (2005)

VASITA, R.; KATTI, D. S. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Review of Medical Devices*, v. 3, n. 1, p. 29-47 (2006).

XU, L.-C.; SIEDLECKI, C. A. Effects of surface wettability and contact time on protein adhesion to biomaterial surfaces. *Biomaterials*, v. 28, n. 22, p. 3273-3283 (2007).

YAN, S. *et al.* Fabrication of poly(L-glutamic acid)/chitosan polyelectrolyte complex porous scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 1, n. 11, p. 1541-1551 (2013).

YARLAGADDA, P.; CHANDRASEKHARAN, M.; SHYAN, J. Y. M. Recent advances and current developments in tissue scaffolding. *Bio-Medical Materials and Engineering*, v. 15, n. 3, p. 159-177 (2005).

ZAVAN, B. *et al.* Extracellular matrix-enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. *Biomaterials*, v. 26, n. 34, p. 7038-7045 (2005).

ZHU, J. M.; MARCHANT, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Review of Medical Devices*, v. 8, n. 5, p. 607-626 (2011).

CAPÍTULO 4

PREPARAÇÃO DE FILMES A PARTIR DE COMPLEXOS POLIELETROLÍTICOS DE QUITOSANA E SULFATO DE CONDROITINA COM POTENCIAL APLICAÇÃO NO REVESTIMENTO DE FERIMENTOS

4.1. INTRODUÇÃO

A pele humana é a primeira e a principal barreira contra a invasão de agentes externos nocivos ao nosso corpo. Porém, as vítimas de queimaduras podem ter sua pele danificada ou mesmo destruída, dependendo da severidade do ferimento. Quando a pele é acometida por essa injúria, as proteínas que a constituem são degradadas reduzindo, assim, a quantidade de oxigênio no local lesionado. Esse local passa, então, a ser um excelente meio para o desenvolvimento e proliferação de microrganismos patogênicos (KEEN *et al.*, 2010; MATT *et al.*, 2010; DAI *et al.*, 2010; RAFLA *et al.*, 2011). Além disso, a obstrução vascular resultante da queimadura impede o transporte de antibióticos e fluídos do sistema imunológico para a região afetada. Um dos tratamentos para ferimentos decorrentes de queimaduras é remover uma fina camada de pele saudável do corpo do paciente e enxertá-la na região danificada. Para proteger essa região de possíveis infecções e desidratação, um revestimento temporário é utilizado para cobri-la durante o período entre a internação hospitalar e o procedimento de enxertia. Esse tipo de procedimento tem sido utilizado há pelo menos duas décadas (MINUTH *et al.*, 1998; JONES *et al.*, 2002; MI *et al.*, 2002; ANDREADIS, 2007) e, para esse propósito, muitos filmes poliméricos têm sido desenvolvidos a partir de outros de origem sintética e/ou natural (PHAN *et al.*, 2005; FU *et al.*, 2009; ADLY *et al.*, 2010). Dentre as várias metodologias e técnicas aplicadas na preparação de filmes poliméricos, a complexação polieletrólítica tem tido destaque por produzir filmes com boas propriedades mecânicas e desempenhos satisfatórios (WANG *et al.*,

2002; YU *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2009). Como discutido nos Capítulos anteriores desta Tese, a interação eletrostática entre macromoléculas com cargas elétricas opostas ocorre, geralmente, em condições brandas e é capaz de formar materiais com caráter hidrofílico e sensíveis a mudanças do meio (como por exemplo, mudança de pH, força iônica, etc.) (FUJII *et al.*, 2009; BHATTARAI *et al.*, 2010).

Por possuir interessantes propriedades físico-químicas e biológicas (biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, potencial hemostático, atividade anti-infecciosa) a quitosana (QT) é uma excelente candidata para preparação dos filmes com potencial aplicação no revestimento de ferimentos decorrentes de queimaduras (RINAUDO, 2006; RAAFAT *et al.*, 2009; JAYAKUMAR *et al.*, 2010). Além disso, QT possui interessantes propriedades, particularmente atraentes, para essa aplicação. Alguns trabalhos descritos na literatura mostram que a QT possui ação contra tumores e ação anticoagulante (MENG *et al.*, 2010; MUZZARELLI, 2010). A associação da QT com o sulfato de condroitina (SC) permite a preparação de filmes devido à complexação eletrostática desses dois polissacarídeos quando em meio ácido (FAJARDO *et al.*, 2010). Por ser um dos componentes da matriz extracelular (ECM), o SC tem sido aplicado na preparação desse tipo de biomaterial e alguns estudos reportam resultados promissores. Tendo em vista essas considerações, neste Capítulo é reportada a preparação de filmes por meio de reação de complexação polieletrólítica entre a QT e o SC, utilizando a metodologia “*casting*”. As razões de massa entre a QT e o SC foram variadas afim de verificar mudanças nas propriedades finais dos filmes. Além disso, para aumentar a aplicabilidade dos mesmos como dispositivo para o revestimento de ferimentos, a droga sulfadiazina de prata (AgSD), estrutura mostrada na Figura 4.1, foi incorporada nas formulações dos filmes.

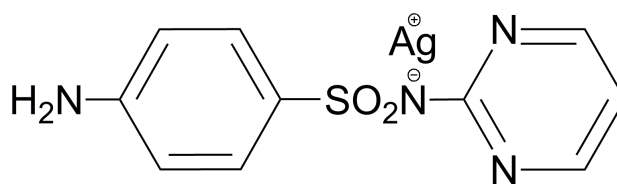


Figura 4.1. Estrutura química da sulfadiazina de prata (AgSD).

AgSD é um antibiótico amplamente utilizado no tratamento de ferimentos decorrentes de queimaduras. Contudo, o uso tópico do AgSD não oferece proteção durante longos períodos, o que limita sua aplicação (JAIN *et al.*, 2009; SHANMUGASUNDARAM *et al.*, 2009). Dessa forma, este estudo tem por finalidade formar filmes de QT/SC tendo AgSD incorporada, investigar a ação bactericida do material QT/SC-AgSD e, também, estudar a liberação sustentada do fármaco.

4.2. EXPERIMENTAL

4.2.1. Materiais

Os reagentes utilizados nesse Capítulo possuem grau analítico e foram usados sem purificação prévia. Quitosana (QT, CAS 90-77-7, Golden-Shell Biochemical, China) 85 % desacetilada e massa molar viscosimétrica (M_v) igual a 87.000 g/mol; Sulfato de condroitina (SC, CAS 9007-28-7, gentilmente cedida por Solabia - Brasil) com M_v igual a 22.000 g/mol. Ambas as M_v foram obtidas de acordo com a metodologia previamente descrita por Fajardo *et al.* (2010). Sulfadiazina de prata (AgSD, CAS 22199-08-2, Siddharth International, Índia). Ácido acético (100 %, CAS 64-19-7, Nuclear, Brasil) e hidróxido de sódio (NaOH, 95 %, CAS 1310-73-2, Nuclear, Brasil).

4.2.2. Métodos

4.2.2.1 Técnicas de caracterização

Espectros da região do infravermelho (FTIR) foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer (modelo RXI, Japão) operando na faixa de 500 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas utilizando-se a metodologia ASTM D882, em um equipamento Texturômetro (Stable Microsystems, modelo TA.XT2, Inglaterra). A partir dos filmes foram produzidos corpos de prova com formato retangular (50 mm x 15 mm), os quais foram submetidos, posteriormente, aos ensaios de tração. Os

parâmetros avaliados por meio dos ensaios de tração foram: tensão de ruptura (T_r), percentual de elongação máxima no momento da ruptura (E) e módulo de Young ($E = \text{tensão/deformação}$). Para cada filme foram realizados 10 ensaios de tração ($n = 10$), logo os dados obtidos são referentes à média desses ensaios.

4.2.2.2. *Preparação dos filmes de QT/SC*

Os filmes de QT/SC foram formados por meio da metodologia “*casting*”. Primeiramente, foram preparadas duas soluções; uma de QT (2 % m/v) em solução de ácido de ácido acético (1 % m/v) e outra de SC (8 % m/v) em água destilada. Posteriormente, quantidades necessárias das soluções de QT e de SC foram misturadas para formar filmes com diferentes razões de massa entre a QT e o SC. Para cada amostra, as soluções resultantes da mistura das soluções de QT e SC foram homogeneizadas por meio de agitação magnética e, então, transferidas para placas de Petri (placas de poliestireno, diâmetro 85 mm e altura 10 mm). Em sequência, os filmes foram estocados em estufa a 40 °C durante 24 h para evaporação do solvente. Assim que formados, os filmes foram removidos das placas de Petri e, imediatamente, lavados em solução de NaOH 0,2 M; purificados por imersão em água destilada durante 12 h e então secos a temperatura ambiente. Os procedimentos experimentais para formar os filmes carregados com AgSD foram semelhantes aos aqui descritos. Contudo, durante a etapa de preparo da solução de QT em ácido acético (1 % m/v) uma certa quantidade previamente estabelecida de AgSD foi adicionada. Na Tabela 4.1 são mostradas as quantidades de QT, SC e AgSD utilizadas e a composição de cada filme formado.

Tabela 4.1. Composição dos filmes de QT/SC (carregados e não carregados com AgSD).

Filme	Solução QT ^a		Solução SC ^b		Razão QT/SC (% m/m)	Massa QT+SC (mg)	AgSD		Massa total (mg)
	Volume (ml)	Massa (mg)	Volume (ml)	Massa (mg)			Massa (mg)	% ^c	
MCS1	44	880	16	1.280	40/60	2.160	-	-	2.160
MCS2	48	960	12	960	50/50	1.920	-	-	1.920
MCS3	51	1.020	9	720	60/40	1.740	-	-	1.740
MCS1-1	44	880	16	1.280	40/60	2.160	15	0,70	2.175
MCS2-2	48	960	12	960	50/50	1.920	15	0,77	1.935
MCS3-3	51	1.020	9	720	60/40	1.740	15	0,85	1.755

^a Concentração igual à 2 % m/v; ^b Concentração igual à 8 % m/v; ^c % em relação à massa total dos filmes.

4.2.2.3. Ensaios de intumescimento

A capacidade de absorção de líquidos aquosos de cada filme foi verificada por meio da determinação do grau de intumescimento (S) dos mesmos em diferentes condições de pH a temperatura ambiente. O cálculo de S foi realizado utilizando a Equação (4.1):

$$S = \frac{W_{it} - W_0}{W_0} \quad (4.1)$$

onde W_{it} é a massa dos filmes intumescidos em um determinado tempo t e W_0 é a massa dos filmes secos. Para determinação de S , uma amostra de cada filme, previamente pesada, foi recolhida (amostra retangular 40 mm x 20 mm) e imersa em soluções tampão com pH 2,0, 7,0 ou 10. As soluções tampão, com força iônica constante ($I = 0,1$ mol/l), foram produzidas de acordo com a metodologia descrita na “*National Book of Formulas - United States Pharmacopoeia*” (USP 30-NF25) (2007). Após a imersão das amostras dos filmes nas soluções tampão, cada uma foi removida e pesada, em determinados intervalos de tempo, a fim de se determinar o valor de S . Para cada condição de pH, três amostras de cada filme foram utilizadas e, assim, o valor de S determinado é referente a uma média de triplicatas ($n = 3$).

4.2.2.4. Ensaios de liberação de AgSD *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* de AgSD a partir dos filmes de QT/SC carregados foram realizadas com amostras (0,1 g) dos filmes MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3. Cada amostra foi depositada em um recipiente contendo 50 ml de solução tampão fosfato (pH 7,4) e a temperatura do sistema foi fixada em 37 °C. Após determinados intervalos de tempo, alíquotas da solução foram coletadas para se determinar a quantidade de AgSD liberada no meio de imersão. As alíquotas foram analisadas pela técnica de espectroscopia na região do ultravioleta - visível (UV-Vis) (equipamento marca Femto, modelo 800Xi, Brasil). A absorbância para cada alíquota foi medida em um comprimento de onda de 430 nm (KONG *et al.*, 2008). Feito isso, as medidas de absorbância e as alíquotas retiradas de cada solução foram devolvidas aos respectivos recipientes com o intuito de manter o volume constante durante o ensaio de liberação. A quantidade de AgSD liberada em diferentes intervalos de tempo foi obtida utilizando uma curva analítica previamente construída. A curva analítica foi feita utilizando uma solução padrão de AgSD variando a concentração de $5,00 \times 10^{-5}$ a $3,12 \times 10^{-6}$ mg/l e usando uma solução tampão pH 7,4 como solvente. O valor do coeficiente de determinação para o modelo linear (R^2), determinado para a curva analítica foi maior que 0,999. Todos os experimentos foram feitos em triplicatas ($n = 3$).

4.2.2.5. Estudo da atividade bactericida

A atividade bactericida dos filmes carregados com AgSD foi testada por meio da determinação do halo de inibição das mesmas em placas inoculadas com cepas de bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) e *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). Para esses testes, discos com diâmetro de 5 mm dos filmes não carregados (controle) e carregados com AgSD foram depositados no meio de inoculação, a fim de avaliar a inibição ao crescimento de uma determinada cepa bacteriana. As placas contendo as cepas com os discos extraídos a partir dos filmes (carregados e não carregados) foram mantidos em temperatura controlada (37 °C) por 24 h. Depois desse período, os halos de inibição, os quais são o diâmetro dos

círculos inibitórios ao redor dos filmes carregados, foram comparados com os dos filmes controle.

4.2.2.6. Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular para os filmes de QT/SC (carregados ou não carregados) foi realizado por meio de teste de citotoxicidade indireta, utilizando sulforodamina B (SRB) (Sigma, EUA). O efeito de citotoxicidade dos filmes foi avaliado utilizando células do tipo Vero, que são células de linhagem contínua isoladas do epitélio renal de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Todos os filmes testados foram previamente esterilizados em autoclave (condições: 121 °C por 15 min.). As células Vero foram cultivadas em DMEM (Gibco, EUA) suplementado com soro fetal bovino (10 %, Gibco, EUA) e gentamicina (50 µg/ml), o qual atua como agente bactericida (condições de cultivo: incubação em estufa a 37 °C em atmosfera controlada com 5 % de CO₂). Para os testes de citotoxicidade, as células Vero foram distribuídas em micropratos de cultura (24-poços) em uma densidade de $2,0 \times 10^5$ células/poço (condições: incubação em estufa úmida a 37 °C por 24 h). Triplicatas de cada amostra de filme foram retiradas e esterilizadas e, em seguida, cada uma foi incubada em um meio contendo o soro fetal bovino por 24 h a 37 °C. Aliquotas de 1000 µl de cada meio contendo as amostras dos filmes foram retiradas e transferidas para cada poço. O controle (poço sem filme) foi incluído nesse ensaio. Após a introdução das amostras de filme, o microprato foi estocado por 72 h. Feito isso, as amostras e os meios de cultura foram removidos dos poços, e os mesmos foram lavados com tampão fosfato (pH 7,4) e fixados com ácido tricloroacético (10 % v/v) por 1 h. Por fim, em cada poço foi adicionado solução de SRB (500 µl, 4 % v/v) e o microprato foi estocado por 30 min sob-refrigeração. O microprato foi lavado várias vezes com solução de ácido acético (1 % v/v) para remover o SRB. O SRB ligado às células residentes nos poços foi solubilizado em solução de tris-(hidroximetil)-aminometano (tris-base, 150 µl, 10 mM). A densidade óptica foi medida em 530 nm por meio de um espectrofotômetro (Bio-Tek, modelo PowerWave XS, EUA).

4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. Análises de FTIR

Como discutido anteriormente, quando uma solução de QT em meio ácido é misturada com uma solução de SC é observada a formação de complexos polieletrólíticos por meio de interações entre os grupos funcionais desses polímeros que possuem cargas elétricas opostas. Diferentes formulações foram testadas, a fim de se conhecer as diferentes características apresentadas pelos filmes quando a razão de massa entre a QT e o SC é variada. Além disso, visando a aplicação desses filmes como possíveis revestimentos de ferimentos, sobretudo, daqueles decorrentes de queimaduras, o fármaco AgSD foi incorporado nas formulações testadas. Os filmes formados com base na metodologia “*casting*”, a qual consiste na desidratação de uma solução coloidal denominada solução filmogênica, foram caracterizados por FTIR e os espectros obtidos são apresentados na Figura 4.2. Foram obtidos, também, espectros FTIR da QT, do SC não complexados e da AgSD de partida. Os espectros FTIR da QT e do SC podem ser visualizados na Figura 4.2(a). Uma vez que os espectros FTIR da QT e do SC foram apresentados e discutidos no Capítulo 2 desta Tese, uma explicação detalhada de ambos não será necessária neste Capítulo.

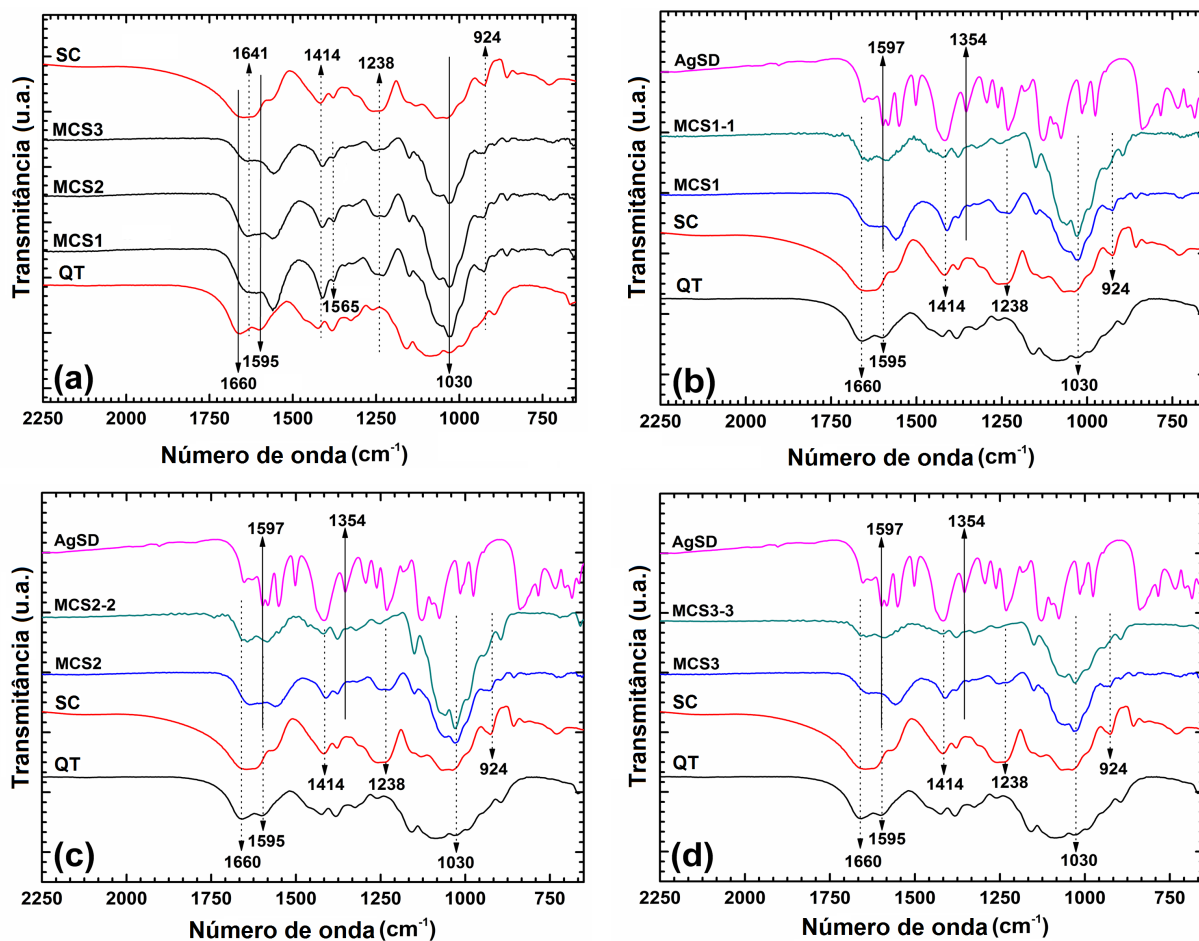


Figura 4.2. Espectros FTIR (a) dos filmes QT/SC não carregados e (b-d) dos filmes QT/SC carregados com AgSD.

O espectro FTIR do filme MCS1 [Figura 4.2(a)], o qual possui o maior percentual de SC (razão QT/SC igual a 40/60), exibe bandas características do SC em 1634 cm^{-1} (estiramento da ligação C=O do grupo amida), 1562 e 1414 cm^{-1} (estiramentos simétricos e assimétricos do grupo COO^-) e 1238 cm^{-1} (ligação S=O do grupo OSO_3^-) (XI *et al.*, 2012). Além destas bandas, é possível observar uma banda de maior intensidade próxima a 1565 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída à flexão (“*bend*”) da ligação N-H dos grupos amino da QT. Comparado com o espectro FTIR da QT, onde essa mesma banda é observada em 1595 cm^{-1} , pode se inferir que esse deslocamento para um menor número de onda se deve a interações dos grupos amino da QT com os grupos sulfato do SC. Nessa formulação, o excesso de SC pode fornecer uma grande quantidade de grupamentos sulfato, os quais complexam com a

maior parte dos grupos amino da QT que em meio ácido estão na sua forma protonada ($-\text{NH}_3^+$) (FAJARDO *et al.*, 2011). Por essa razão, a banda referente aos grupos amino da QT aparece no espectro FTIR do MCS1 deslocada para um menor número de onda e com intensidade diferente da banda observada em 1595 cm^{-1} no espectro da QT, característica dos grupos amino “livres”. Esta mesma banda também é observada em 1565 cm^{-1} nos espectros FTIR dos filmes MCS2 e MCS3 [Figura 4.2(a)]. Ainda, avaliando o espectro FTIR do filme MCS1 é possível verificar um aumento na intensidade da banda em 1030 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída ao estiramento da ligação S-O dos grupos sulfato do SC (FAJARDO *et al.*, 2011). Isto é devido à interação destes grupos com os grupos amino protonados da QT. Comparando os espectros FTIR dos três filmes formados (MCS1, MCS2 e MCS3), é possível notar uma ligeira diferença de intensidade das bandas atribuídas aos grupos amino da QT (banda em 1565 cm^{-1}); das bandas atribuídas aos estiramentos vibracionais da ligação S=O (banda em 1238 cm^{-1}) e da ligação S-O (banda em 1030 cm^{-1}). Estas diferenças se devem à variação na razão molar entre a QT e o SC utilizada na formulação dos filmes (Tabela 4.2). A capacidade de complexação também é afetada pelo excesso de grupos positivamente carregados provenientes da QT ($-\text{NH}_3^+$), o que faz com que a repulsão entre essas cargas aumente consideravelmente desestabilizando, assim, o sistema até então complexado.

Tabela 4.2. Razão molar entre os componentes dos filmes de QT/SC carregados e não carregados com AgSD.

Filme	Razão QT/SC (% m/m)	Razão molar [QT] / [SC]	Razão molar [QT] / [AgSD]	Razão molar [SC] / [AgSD]
MCS1	40/60	2:1	-	-
MCS2	50/50	3:1	-	-
MCS3	60/40	4:1	-	-
MCS1-1	40/60	2:1	129:1	66:1
MCS2-2	50/50	3:1	141:1	48:1
MCS3-3	60/40	4:1	150:1	37:1

*As razões molares foram calculadas após a mistura das soluções de QT e SC com ou sem AgSD. Os cálculos foram feitos considerando a massa molar das respectivas unidades repetitivas (UR) da QT (= 161,156 g/UR), do SC (= 458,89 g/UR) e da massa molar da AgSD (= 357,14 g/mol).

Na Figura 4.2(b-d) são mostrados os espectros de FTIR dos filmes de QT/SC carregados e não carregados. No espectro FTIR da AgSD pode ser visualizada uma banda em 1652 cm^{-1} atribuída às deformações axial e angular da ligação nitrogênio-hidrogênio (N-H) da sulfonamida; uma banda em 1597 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação dupla carbono-carbono (C=C) do anel pirimidínico; e, por fim, uma banda em 1230 cm^{-1} , atribuída ao estiramento assimétrico do grupo SO_2 (PRIETO *et al.*, 2006). Comparando os espectros FTIR dos filmes carregados com os espectros dos filmes não carregados é possível verificar uma ligeira redução na intensidade das bandas atribuídas aos grupos amino da QT (banda em 1565 cm^{-1}). Outra mudança é verificada quando se comparam os espectros FTIR dos filmes carregados com os espectros dos filmes não carregados em relação à diminuição na intensidade das bandas atribuídas aos estiramentos vibracionais (simétrico e assimétrico) dos grupos COO^- e ao estiramento assimétrico da ligação S=O do grupo OSO_3^- (bandas em 1414 e 1238 cm^{-1}). Estas diferenças permitem inferir que a incorporação do fármaco na formulação dos filmes afeta a capacidade de complexação entre a QT e o SC. Por possuir diversos grupos funcionais, entre eles os átomos de nitrogênio que podem apresentar cargas positivas de acordo com o pH do meio de preparação do filme, a AgSD pode interagir com os grupos funcionais de ambos os polímeros formadores do filme por meio de interações eletrostáticas.

Se não carregados, os grupos funcionais da AgSD podem ainda formar ligações de hidrogênio. A presença de átomos fortemente eletronegativos (ex. O, N e S) favorece a formação desse tipo de ligação.

4.3.2. Determinação do grau de intumescimento (*S*)

Assim como os hidrogéis quimicamente reticulados, as redes poliméricas formadas por complexos polieletrólíticos (fisicamente reticulados) possuem como principal característica a capacidade de absorver e reter uma quantidade considerável de líquidos aquosos. Esta habilidade vai além de apenas absorver uma grande quantidade de líquidos; a matriz tridimensional do complexo polieletrólítico se mantém mesmo no estado intumescido. O processo de absorção de líquidos por este tipo de material é conhecido como intumescimento e depende da interação entre a matriz polimérica e o solvente e também do grau de reticulação do polímero. No caso de complexos polieletrólíticos, o intumescimento é dependente do grau de reticulação física (complexação e entrelaçamento de cadeias) entre as macromoléculas com cargas elétricas opostas.

Nesse trabalho, a capacidade de absorção de líquidos pelos filmes em meios com diferentes pHs foi estimada pela determinação do parâmetro grau de intumescimento (*S*) e os resultados são apresentados na Figura 4.3. Em relação ao filme MCS1, destaca-se o fato de que quando o mesmo é imerso em tampão pH 7,0 o grau de intumescimento atinge um valor máximo após 3 h de imersão e, então, o valor diminui até atingir o equilíbrio próximo a 10 h de estudo. Esse comportamento é contrastante com o apresentado por esse mesmo filme quando intumescido em soluções tampão com pHs 2,0 e 10,0. Quando a matriz polimérica QT/SC é imersa em um tampão ácido, a interação eletrostática entre os polieletrólitos é grande o suficiente para evitar que uma grande quantidade de líquido seja absorvida ou que ocorra perda de massa. Isso ocorre, pois em meio ácido os grupos aminos da QT estão completamente protonados enquanto que os grupos sulfato do SC, por apresentarem pK_a próximo a 2,6 (LARSSON *et al.*, 1981), estão também em sua forma ionizada ($-\text{OSO}_3\text{H} \rightarrow -\text{OSO}_3^- + \text{H}^+$). Isto permite maior interação entre esses grupamentos funcionais (FAJARDO *et*

al., 2011). Em tampão pH 7,0, a condição de maior pH faz com que os grupos amino da QT ($pK_a \approx 6,5$) (FAJARDO *et al.*, 2011) permaneçam parcialmente protonados reduzindo assim a interação física destes com os grupos funcionais ionizados do SC. Ainda, em pH 7,0 os grupos funcionais do SC uma vez não protonados ($-\text{OSO}_3^-$ e $-\text{COO}^-$) causam um aumento na repulsão do tipo ânion-ânion entre as cadeias de SC. Isto possibilita que parte das cadeias de SC adquira certa mobilidade o que contribui para a expansão da matriz polimérica. Assim, o influxo de líquido para o interior na matriz polimérica aumenta, como observado, e o grau de intumescimento atinja um valor máximo nas condições estudadas. Parte das cadeias de SC são arrastadas para fora da matriz durante o efluxo de líquido. Estudos realizados em nosso laboratório mostram que sistemas formados por complexos polieletrólíticos de QT/SC liberam parte do SC complexado quando em meio neutro (PIAI *et al.*, 2009; PIAI *et al.*, 2010). Esse fato explica a perda de massa inicial e a consequente diminuição no valor do grau de intumescimento do filme (cerca de 300 %) quando o mesmo é imerso em tampão pH 7,0. O SC é um biopolímero altamente hidrofílico e sua saída acarreta perda da capacidade de absorção e retenção de líquido aquoso. Os grupos amino ($-\text{NH}_2$) passam a interagir com os grupos carboxilato e sulfato das cadeias do SC através de ligações de hidrogênio. Isso reduz a repulsão eletrostática causada pelos grupos negativamente carregados do SC e, então, a matriz polimérica adquire estabilidade novamente. Por essa razão, foi observado que quando imersa em tampão pH 10,0 o filme MCS1 apresenta uma capacidade de absorção de líquido menor do que quando imerso em tampão pH 7,0.

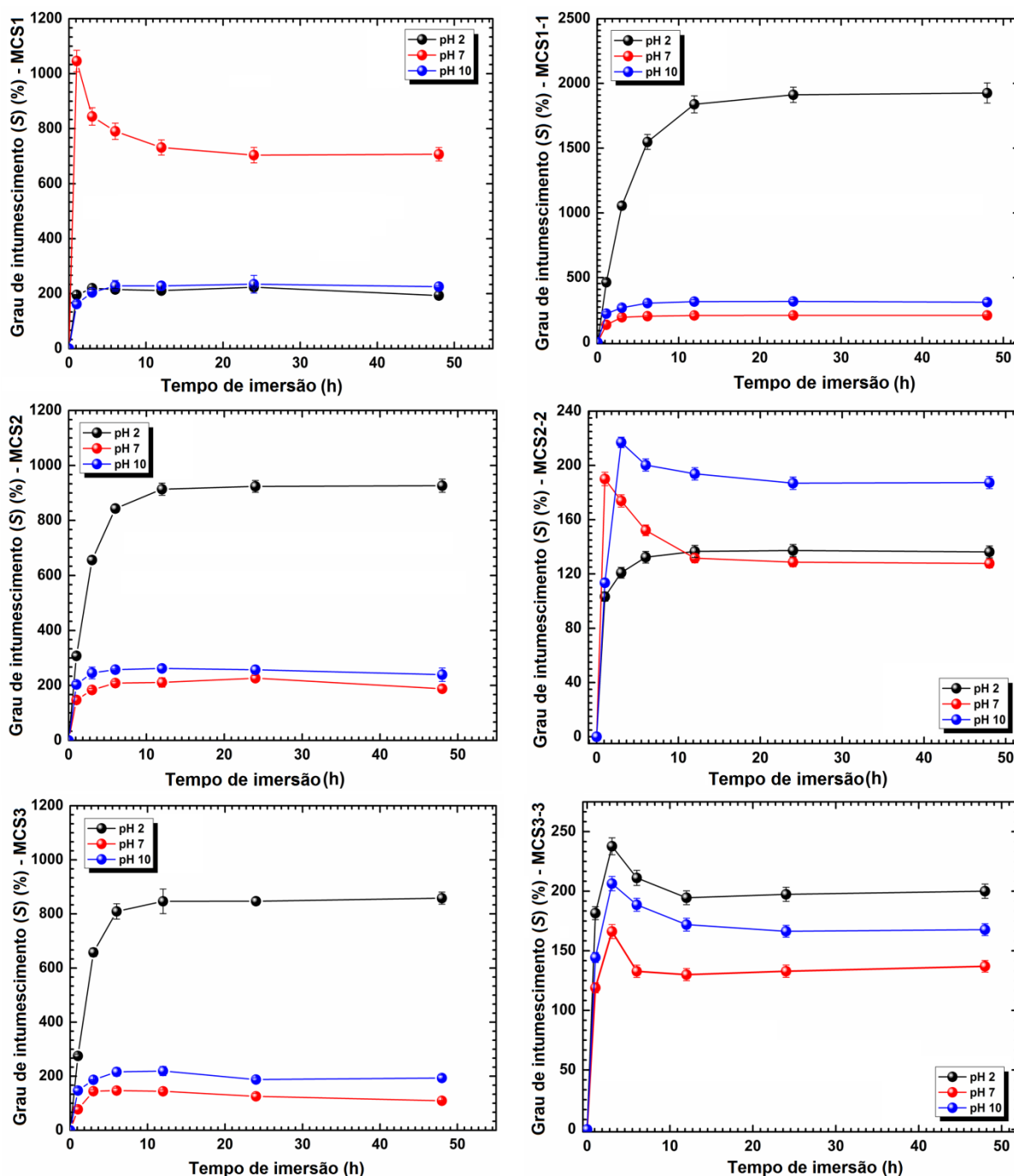


Figura 4.3. Grau de intumescimento (S) dos filmes MCS(1-3), MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3 quando imersos em diferentes pHs em função do tempo de imersão em horas.

Entretanto, os filmes obtidos usando formulação com menor quantidade de SC (filmes MCS2 e MCS3) e, conseqüentemente, com maior razão molar QT/SC, demonstraram perfis de intumescimento diferentes quando comparados com o filme MCS1. Quando MCS2 e MCS3 são imersas em soluções ácidas a protonação dos grupos amino da QT é favorecida

enquanto que a disponibilidade de grupos sulfato provenientes do SC diminui. Isso faz com que as cargas positivas não sejam totalmente estabilizadas, o que cria uma repulsão do tipo cátion-cátion no interior da matriz polimérica. Dessa forma, ocorre a desestabilização do sistema e sua consequente expansão, a qual permite que uma grande quantidade de líquido possa difundir para dentro da mesma. Esse comportamento é verificado quando se analisa o perfil de intumescimento dos filmes MCS2 e MCS3 imersos em tampão pH 2. Nesta condição de pH ambos os filmes apresentaram seus maiores valores para o parâmetro S . Em relação às outras condições de pH testadas, os dois filmes MCS2 e MCS3 apresentaram capacidades similares de absorção do meio aquoso. Verifica-se que, quando intumescidas em tampões pH 7,0 ou 10,0 o grau de intumescimento obtido é bem menor em relação aos obtidos para esses filmes quando imersos em tampão pH 2,0.

Ao se comparar os valores de S obtidos para os filmes carregados com o fármaco AgSD com respectivos valores para os filmes não carregados, verificou-se que a incorporação de AgSD na matriz polimérica exerce clara influência sobre a capacidade de absorção dos filmes. Além disso, notou-se também que a variação do pH do meio de intumescimento exerce igualmente influência nessa propriedade. Em condições ácidas (tampão pH 2) o filme MCS1-1 exibiu o maior valor de S (cerca de 2.000 %) enquanto que os filmes MCS2-2 e MCS3-3 atingiram um valor máximo de S próximo a 250 %. Esses resultados podem ser atribuídos à presença dos íons de prata (Ag^+), provenientes da AgSD, os quais uma vez dentro da matriz polimérica competem com os cátions da QT pela interação com o SC. Uma vez afetada a complexação polieletrólítica entre QT e do SC, a matriz polimérica tem também alteradas sua configuração e sua capacidade de absorção de líquidos. Esses dados corroboram com os resultados obtidos das análises dos espectros FTIR dos filmes carregados ou não com AgSD. Observou-se, também, que quando o filme MCS2-2 é intumescido em condições neutras e básicas ($\text{pH} \geq 7$) o mesmo apresenta diminuição no perfil de intumescimento após atingir um valor máximo de S . Já o filme MCS3-3 apresenta esse tipo de comportamento em todas as condições de pH testadas. Tal diminuição na capacidade de intumescimento pode ser atribuída à liberação de algum dos componentes presentes na formulação do filme. Além

disso, os resultados mostrados na Figura 2.2 permitem inferir que os filmes MCS2-2 e MCS3-3 são mais afetados pela incorporação de AgSD do que o filme MCS1-1. Na formulação usada para obter esses dois filmes, uma maior quantidade de QT foi utilizada para produzir os filmes MCS2-2 e MCS3-3 sugerindo, assim, que a interação do fármaco com as cadeias de QT prevalece sobre a interação entre o fármaco e as cadeias de SC. Sendo assim, o SC passa a competir com o AgSD e parte das cadeias que não interagem para a formação dos complexos polieletrólíticos com a QT são passíveis de liberação.

4.3.3. Propriedades mecânicas

A determinação das propriedades mecânicas dos filmes formados neste Capítulo 4 é um ponto importante, especialmente, pelo fato de que o objetivo é, posteriormente, aplicá-los como revestimento de ferimentos. Dentre as várias propriedades mecânicas passíveis de análise, foram determinadas aqui a tensão de ruptura (T_r), o percentual de elongação máxima no momento da ruptura (E) e o módulo de Young ou módulo elástico. A T_r é a tensão máxima da curva de tensão nominal (ou tensão aplicada, em MPa) em função da deformação. Se ocorrer no corpo de prova um decréscimo na área da secção reta, o posterior aumento da deformação provoca uma diminuição da tensão nominal até ocorrer a fratura, já que a tensão nominal é determinada em relação à área inicial da secção reta do corpo de prova. O módulo de Young é a taxa de variação da tensão aplicada em função da deformação. Ele é obtido a partir da determinação da inclinação da porção linear do gráfico de tensão em função da deformação. A Figura 4.4 apresenta a curva média de tensão em função da deformação obtida para o filme MCS1 e é referente à média dos 10 ensaios de tração realizados com amostras do filme MCS1.

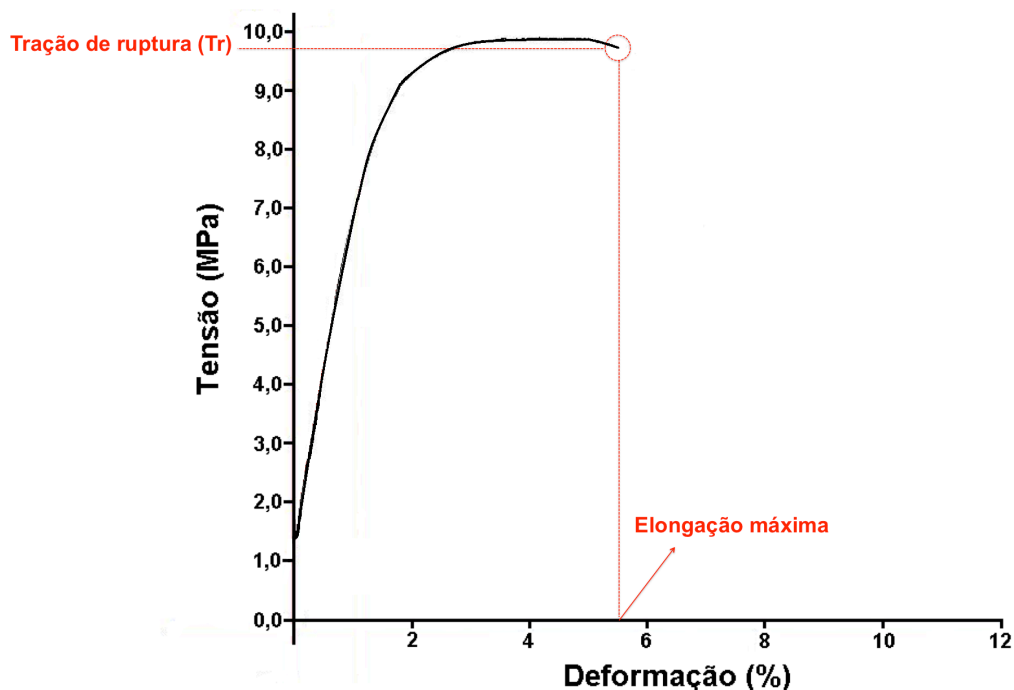


Figura 4.4. Curva média de tensão em função da deformação obtida para o filme MCS1.

As propriedades mecânicas dos filmes QT/SC (carregados e não carregados com AgSD) foram avaliadas por meio de testes de tração e os parâmetros calculados são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3. Propriedades mecânicas dos filmes determinados a partir de ensaios de tração.

Filmes	Área ^a (10 ⁻⁴ m ²)	F _{max} (N)	T _r (MPa)	E (%)	Mod. Young (MPa)
MCS1	7,50	7,3 ± 0,3	9,7 ± 0,4	27,9 ± 1,9	44,4 ± 4,2
MCS2	7,50	6,2 ± 0,2	8,2 ± 0,3	21,9 ± 2,2	45,9 ± 4,8
MCS3	7,50	6,1 ± 0,2	8,2 ± 0,4	35,9 ± 2,6	30,8 ± 3,3
MCS1-1	7,50	4,8 ± 0,3	6,4 ± 0,4	24,2 ± 1,5	32,9 ± 3,0
MCS2-2	7,50	3,9 ± 0,5	5,2 ± 0,6	18,3 ± 1,7	33,7 ± 4,7
MCS3-3	7,50	3,5 ± 0,3	4,6 ± 0,5	32,5 ± 3,1	18,9 ± 2,3

^a Área do corpo de prova

Analisando os dados apresentados na Tabela 4.3, verifica-se que a tensão de ruptura (T_r) apresentada pelos filmes está diretamente relacionada com a quantidade de SC utilizada

na formulação utilizada na preparação dos filmes e com a incorporação ou não do fármaco. Por exemplo, o filme MCS1 exibiu o maior valor de T_r , o que pode ser explicado pelo fato da maior quantidade de SC utilizada em sua formulação aumentar a disponibilidade de grupos funcionais aptos a interagirem com os grupos funcionais da QT. Vale ressaltar que para essa formulação a razão entre a quantidade de grupos amino provenientes da QT e os grupos sulfato do SC é na ordem de 2:1. Sendo assim, a matriz polimérica formada, nesse caso, possui um número maior pontos de interação e a T_r medida para o filme MCS1 é consequentemente maior. Verifica-se que a diminuição na quantidade de SC utilizada na formulação dos filmes também diminui o valor de T_r , ou seja, a matriz polimérica torna-se mais frágil. Essa afirmação fica facilmente visualizada quando são comparadas as $F_{\max}$ necessárias para fraturar os filmes MCS1, MCS2 e MCS3.

Após a incorporação do AgSD, os valores medidos de T_r foram ainda menores quando comparados com os valores médios medidos para os filmes não carregados. Esse comportamento demonstra, novamente, que a incorporação da AgSD afeta a estabilidade da matriz polimérica, uma vez que a complexação dos grupos funcionais provenientes da QT e do SC é prejudicada. A influência do fármaco sobre a capacidade de complexação da QT e do SC corrobora com as medidas de FTIR e os dados de intumescimento já apresentados e discutidos. Os valores calculados para o módulo de Young variaram de acordo com razão de massa QT/SC utilizada na formulação dos filmes e com a incorporação da AgSD. Vale lembrar, ainda, que levando em consideração o desvio padrão das medidas realizadas, os filmes de razões mássicas QT/SC iguais a 40/60 e 50/50 (filmes MCS1 e MCS2) possuem valores similares de módulo de Young. Esta observação também se aplica aos filmes MCS1-1 e MCS2-2. Porém, os filmes que apresentam em sua formulação menor quantidade de SC (filmes MCS3 e MCS3-3) possuem os menores valores para o módulo de Young. Nestes, a razão molar entre a QT e o SC é da ordem de 4:1, o que implica em uma redução considerável na quantidade de pontos de complexação polieletrólítica entre os grupos amino da QT e os grupos sulfato do SC. Sendo assim, o material formado torna-se menos rígido e com menor módulo de Young. Somando-se a isso, a QT possui grande afinidade pela água e no estado

sólido as suas macromoléculas podem apresentar estruturas distorcidas, as quais são facilmente hidratadas, tornando assim, o material menos rígido (RINAUDO *et al.*, 2001).

A incorporação do fármaco nas formulações usadas para obter os filmes MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3 conduziu a materiais com menores valores de módulo de Young quando comparados com os valores obtidos para os filmes MCS1, MCS2 e MCS3. Fica, portanto, evidente que a adição do fármaco afeta drasticamente a interação eletrostática entre os grupos com cargas elétricas opostas. Essa diminuição se traduz na formação de filmes menos rígidos conforme observado pela análise dos dados da Tabela 4.3.

4.3.4 Ensaios de liberação *in vitro* da AgSD

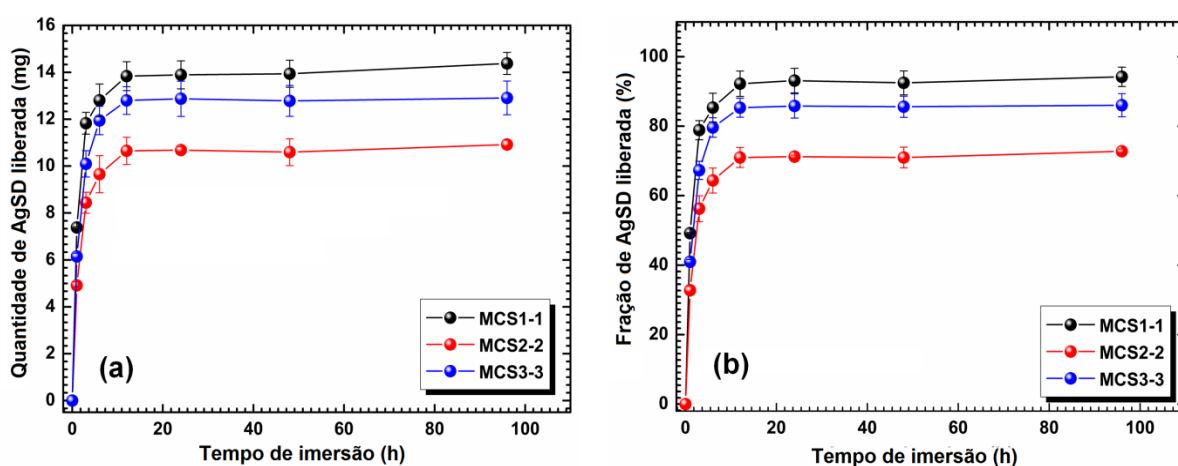


Figure 4.5. (a) Quantidade (em mg) e (b) fração (em %) de AgSD liberada em tampão fosfato (pH 7,4) em função do tempo de imersão (em h).

As quantidades e as frações de AgSD liberadas a partir dos filmes QT/SC-AgSD foram investigadas para avaliar o perfil de liberação do fármaco, bem como para avaliar o potencial de aplicação dos filmes como dispositivos no tratamento de ferimentos. Os ensaios de liberação foram realizados em tampão fosfato (pH 7,4), para simular o plasma sanguíneo, o qual pode apresentar valor de pH na faixa de 7,34 a 7,45, e temperatura controlada (37 °C). Os resultados são apresentados na Figura 4.5. Alguns trabalhos reportam que a AgSD

dissocia-se em íons prata (Ag^+) e sulfadiazina e que sua liberação depende do equilíbrio das interações iônicas entre esses dois componentes e da estrutura do filme. Essa inconsistência entre a liberação do Ag^+ e da sulfadiazina, incorporada na matriz do filme QT/SC, pode ser atribuída ao fato de que, os íons prata interagem com os grupos amino da QT e sua liberação é, portanto, mais lenta. Por outro lado, a sulfadiazina não interage eletrostaticamente com nenhum grupo funcional presente na matriz polimérica e, nessa condição de pH (7,4), ela pode difundir espontaneamente para fora da matriz. Esse comportamento é vantajoso, pois alguns estudos reportam que após a liberação os íons prata permanecem na forma de precipitado (AgCl) ou, então, se ligam à superfície do ferimento enquanto que ao ser liberada a sulfadiazina entra em contato direto com a corrente sanguínea (KUMAR *et al.*, 2010). Os ensaios de liberação de AgSD *in vitro* mostraram que a razão mássica QT/SC durante a preparação dos filmes exerce influência na taxa de liberação do agente antibiótico (AgSD). Os filmes MCS1-1 e MCS3-3, preparados em razões mássicas extremas QT/SC (40/60 ou 60/40), as quantidades de AgSD liberadas foram as maiores (cerca de 13 mg ~ 82 % do total encapsulado), enquanto que o filme MCS2-2 (razão QT/SC 50/50) liberou uma quantidade menor de AgSD (cerca de 10 mg ~ 70 % do total encapsulado). Apesar dessa diferença, pode-se inferir que todos os filmes preparados no decorrer desse trabalho mostraram-se adequados para sustentar a liberação de AgSD por um período de até 20 h. Assim, assegura-se que a droga não perde a sua efetividade, evita a manipulação da sutura (diminui o desconforto e o risco de infecção) e contribui para que um excesso de íons prata não sejam inseridos no ferimento mas liberados de forma gradativa. Para avaliar o perfil de liberação da AgSD é importante verificar e entender o mecanismo pelo qual a mesma é liberada. Nesse estudo, a liberação da AgSD a partir dos filmes de QT/SC foi tratada como um fenômeno de partição e a sua cinética de liberação foi estudada com base em um modelo matemático desenvolvido por Reis *et al.* (2007). O fenômeno de partição pressupõe que o soluto se distribui entre as fases matriz polimérica e solvente e, que a afinidade físico-química entre as espécies soluto/matriz polimérica e soluto/solvente está intimamente relacionada com a velocidade de liberação do soluto. Utilizando o modelo de Reis *et al.* (2007), é possível prever o perfil

completo de liberação de um soluto a partir de uma matriz polimérica. O modelo foi aplicado aos dados coletados e os resultados obtidos da aplicação são apresentados na Figura 4.5(b). De acordo com o modelo citado, o parâmetro que quantifica a atividade de partição (α) pode ser calculado por meio da Equação 4.4:

$$\alpha = \frac{Fr_{max}}{1 - Fr_{max}} \quad (4.4)$$

onde α expressa as afinidades físico-químicas entre fármaco/matriz polimérica e fármaco/solvente. Ou seja, o parâmetro α descreve a existência, ou não, de difusão do soluto entre as fases. A natureza química do solvente no qual a matriz polimérica está inserida pode afetar tanto a taxa de liberação quanto a atividade de partição (α). Quando o valor calculado para α é nulo ($\alpha = 0$), pode-se inferir que não haverá liberação do soluto a partir da matriz polimérica para fase solvente. Assim, não existirá partição do soluto entre as fases matriz polimérica e solvente, isto é, não existirá difusão de soluto de uma fase para outra (REIS *et al.*, 2007; LOPES *et al.*, 2013). Porém, se $\alpha > 0$, ocorrerá tal difusão (LOPES *et al.*, 2013). Com base nas frações máximas (Fr_{max}) de AgSD liberadas dos filmes MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3, em tampão fosfato (pH 7,4), os valores de α foram calculados e são apresentados na Tabela 4.4. Os valores de Fr_{max} e α foram tratados utilizando as equações (4.5) e (4.6), as quais descrevem a liberação da AgSD em termos de uma cinética de 1ª e 2ª ordem, com caráter reversível.

$$Fr_{max} \ln \left(\frac{Fr_{max}}{Fr_{max} - Fr_l} \right) = k_l t \quad (4.5)$$

$$\frac{\alpha}{2} \ln \left[\frac{Fr_l - (2Fr_l Fr_{max}) + Fr_{max}}{Fr_{max} - Fr_l} \right] = k_l t \quad (4.6)$$

onde Fr_l corresponde a fração de AgSD liberada em um tempo t ($t \neq 0$) e k_l é a constante de liberação. k_l é obtida a partir da inclinação da reta do gráfico entre o termo esquerdo da equação (4.5) ou (4.6) em função do tempo (t). Os valores de k_l alcançados para todos os filmes em tampão fosfato (pH 7,4) são apresentados na Tabela 4.4. Fazendo uso de outra estrutura matemática, que relaciona Fr_{max} , α e k_l [equações (4.7a e 4.7b)] é possível calcular o tempo necessário para que a concentração do soluto no solvente atinja 50 % do valor da $Fr_{max}(t_{1/2})$. Os valores de $(t_{1/2})$ calculados para os modelos cinéticos de 1ª e 2ª ordem são apresentados na Tabela 4.4.

$$t_{1/2} = \frac{0,693Fr_{max}}{k_l} \quad (4.7)$$

$$t_{1/2} = \left(\frac{\alpha}{2k_l} \right) \ln(3 - 2Fr_{max}) \quad (4.8)$$

Tabela 4.4. Valores de Fr_{max} , α , k_l e $t_{1/2}$ para AgSD liberado a partir das filmes de QT/SC. Os valores de k_l e $t_{1/2}$ foram obtidos a partir de modelos cinéticos reversíveis de 1ª e 2ª ordem.

Filme	Fr_{max}	α	Cinética 1ª ordem			Cinética 2ª ordem		
			$k_l(10^{-2} \text{ h}^{-1})$	R^2	$t_{1/2}(\text{h})$	$k_l(10^{-2} \text{ h}^{-1})$	R^2	$t_{1/2}(\text{h})$
MCS1-1	0,86	6,14	33,56	0,99	1,78	90,34	0,99	0,84
MCS2-2	0,71	2,67	19,49	0,94	2,52	33,85	0,99	1,72
MCS3-3	0,84	5,15	21,18	0,88	2,75	46,20	0,96	1,57

O modelo cinético reversível de 1ª ordem pressupõe que a liberação da AgSD a partir dos filmes de QT/SC é descrito apenas como um fenômeno de partição entre a matriz polimérica do filme e o meio em que ele se encontra. Esse modelo descreve que a velocidade de liberação do soluto em um dado instante é diretamente proporcional à diferença entre a concentração do soluto liberado e absorvido pela matriz polimérica. Já o modelo cinético reversível de 2ª ordem, pressupõe que a velocidade de liberação do soluto em um dado instante é diretamente proporcional à diferença entre a concentração do soluto liberado e

absorvido elevada ao quadrado. Analisando os dados cinéticos apresentados na Tabela 4.4, é possível perceber que para todos os casos (independente da formulação) o valor de α foi maior que 1, o que indica que o soluto tem mais afinidade pelo solvente que pela matriz polimérica nas condições testadas. Além disso, percebe-se que a liberação da AgSD é mais bem descrita segundo o modelo cinético reversível de 2ª ordem, visto que os valores dos coeficientes de determinação (R^2) para esse modelo são maiores do que aqueles observados para a cinética de 1ª ordem. Os valores de R^2 foram obtidos a partir das análises de regressão linear dos modelos cinéticos reversíveis de 1ª e 2ª ordem. Os valores de k_l alcançados a partir de ambos modelos cinéticos mostram que o filme MCS3-3 possui a maior velocidade de liberação dentre os filmes estudados. Como resultado, tem-se que o tempo de meia vida de liberação ($t_{1/2}$) para esse filme é o menor, cerca de 0,84 h (~ 50 min). Esse resultado demonstra, aparentemente, que o MCS3-3 pode não ser interessante para ser utilizado como dispositivo de liberação controlada de Ag^+ , o qual deve sustentar a liberação por um período de tempo considerável. Porém, deve ser ressaltado que os valores da Fr_l e $t_{1/2}$ dependem dos valores que os termos k_l e α podem assumir, os quais, por sua vez, dependem das condições de temperatura, pressão, pH, força iônica, geometria do dispositivo, solvente, etc. (REIS *et al.*, 2007).

4.3.5. Estudo da atividade bactericida

As atividades bactericidas dos filmes de MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3 foram estimadas por meio da determinação dos halos de inibição das mesmas utilizando as cepas de bactérias *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respectivamente. Os filmes de MCS(1-3), os quais não foram carregados com AgSD, foram utilizados como controle. A bactéria do tipo *P. aeruginosa* é do tipo gram-negativa e é responsável por explorar algumas fraquezas no corpo humano para estabelecer um quadro infeccioso devido a sua resistência contra alguns antibióticos e agentes antissépticos. Geralmente, esta bactéria é responsável pela causa de infecções em ferimentos decorrentes de queimaduras, especialmente, aquelas severas tratadas em ambientes hospitalares. Já a bactéria do tipo *S. aureus* é uma bactéria gram-positiva, sendo

uma das espécies patogênicas mais comuns e responsáveis por infectar regiões da pele que apresentam cortes abertos ou ferimentos que têm traços de sangue.

A Figura 4.6 mostra imagens fotográficas das placas inoculadas com as cepas de *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Os halos de inibição medidos para os filmes carregados e não carregados com AgSD são apresentadas na Tabela 4.5.

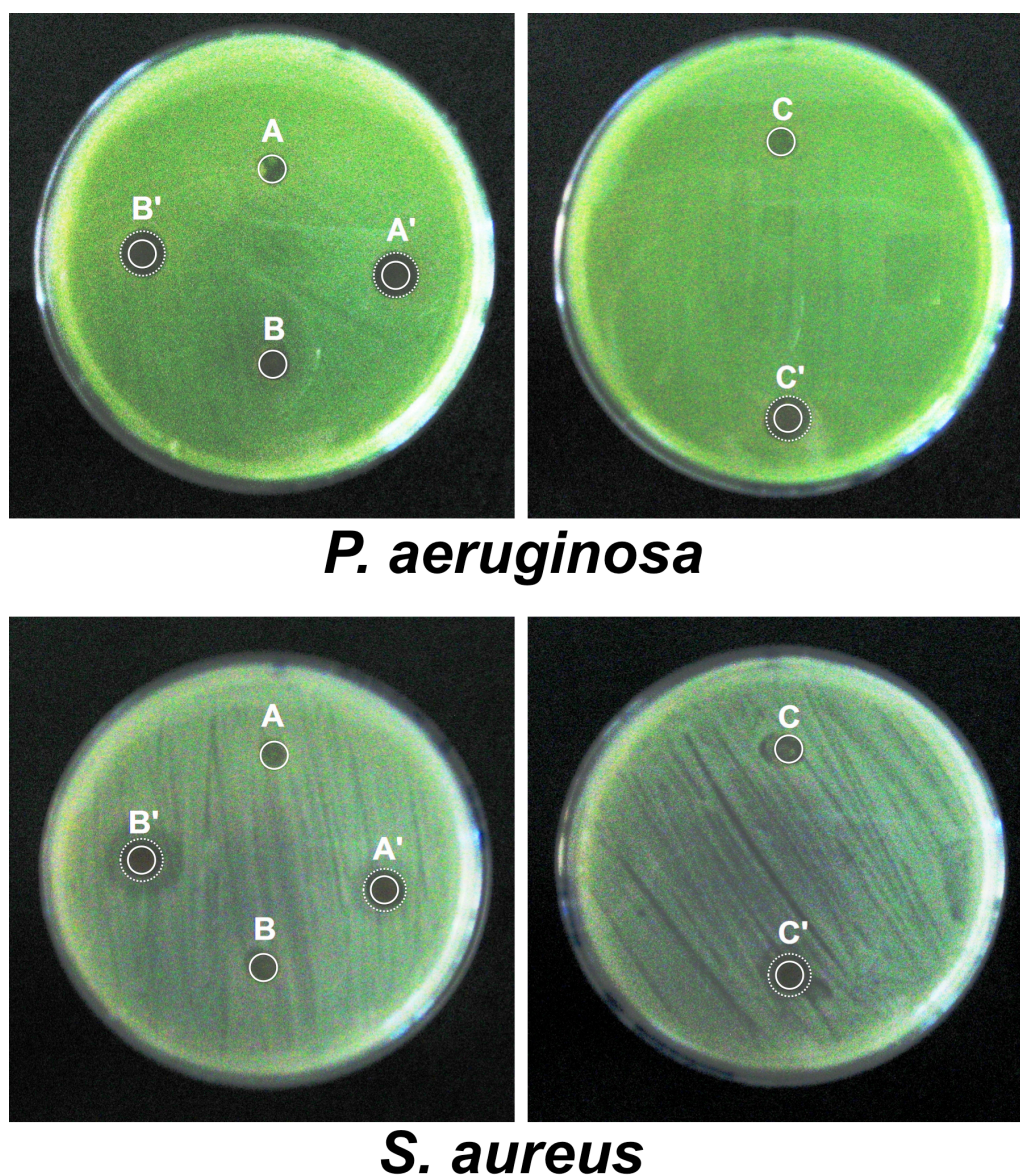


Figura 4.6. Imagens fotográficas das placas inoculadas com as bactérias do tipo *P. aeruginosa* e *S. aureus*. A - MCS1 (controle), A'-MCS1-1; B - MCS2 (controle), B' - MCS2-2; C - MCS3 (controle), C' - MCS3-3 (linha contínua delimita a área do controle e a linha pontilhada delimita a área entre o controle e o halo de inibição).

Tabela 4.5. Determinação da atividade bactericida dos filmes de QT/SC, carregados com AgSD contra as bactérias do tipo *P. aeruginosa* e *S. aureus* por meio da determinação do halo de inibição.

Bactéria testada	Halos de inibição (diâmetro - mm*)					
	MCS1	MCS1-1	MCS2	MCS2-2	MCS3	MCS3-3
<i>P. aeruginosa</i>	0	4	0	4	0	4
<i>S. aureus</i>	0	3	0	3	0	2

*Halo de inibição corrigida (diâmetro do halo inibição-diâmetro dos discos)

Os resultados encontrados mostram que todas os três filmes de QT/SC carregados com AgSD apresentam atividade antibacteriana quando comparados com seus respectivos controles. Foi verificado que a atividade antibacteriana se mostrou mais efetiva contra a proliferação das bactérias do tipo *P. aeruginosa* e, independentemente da composição do filme, os resultados foram os mesmos, o que indica que a ação bactericida é somente devido à presença da AgSD nos filmes. Para as bactérias do tipo *S. aureus*, os halos de inibição observados foram menores e para o filme MCS3-3, o diâmetro do halo de inibição foi de 2 mm. A diferença entre os resultados obtidos para os dois tipos de bactérias testadas pode ser explicada pelo fato de que as bactérias do tipo *P. aeruginosa* apresentam uma fina parede celular com várias camadas, o que permite que os íons Ag^+ penetrem facilmente na sua parede celular e interfiram em sua rota metabólica. Os dados obtidos neste trabalho são coerentes com aqueles apresentados e discutidos em outros trabalhos que também testaram a atividade bacteriana da AgSD (RINAUDO *et al.*, 2001; JAIN *et al.*, 2009).

4.3.6. Ensaio de viabilidade celular

Dispositivos para uso em seres humanos, principalmente, aqueles de aplicação clínica, como, por exemplo, os biomateriais, não devem causar reações adversas e nem lesar o organismo do paciente em tratamento. Por esta razão, é necessário, primeiramente, detectar alguma possível toxicidade do material por meio de ensaios *in vitro* utilizando sistemas biológicos. A Figura 4.7 demonstra os resultados do ensaio de viabilidade celular dos filmes

de QT/SC (carregados e não carregados com AgSD). Testes de citotoxicidade indireta, realizados com células Vero, mostraram que os filmes (carregados ou não com AgSD) não apresentam toxicidade. Além disso, para todos os filmes testados verificou-se que a densidade óptica foi maior que o controle positivo. Isso indica que todos os filmes, além de serem atóxicos, também favorecem a proliferação celular. Estes resultados permitem inferir que ambos os tipos de filmes formados, mesmo com a incorporação da AgSD, são biocompatíveis e não partilham de nenhum nível de toxicidade, o que potencializa a aplicação dos filmes desenvolvidos, nesse Capítulo, no tratamento e recobrimento de ferimentos.

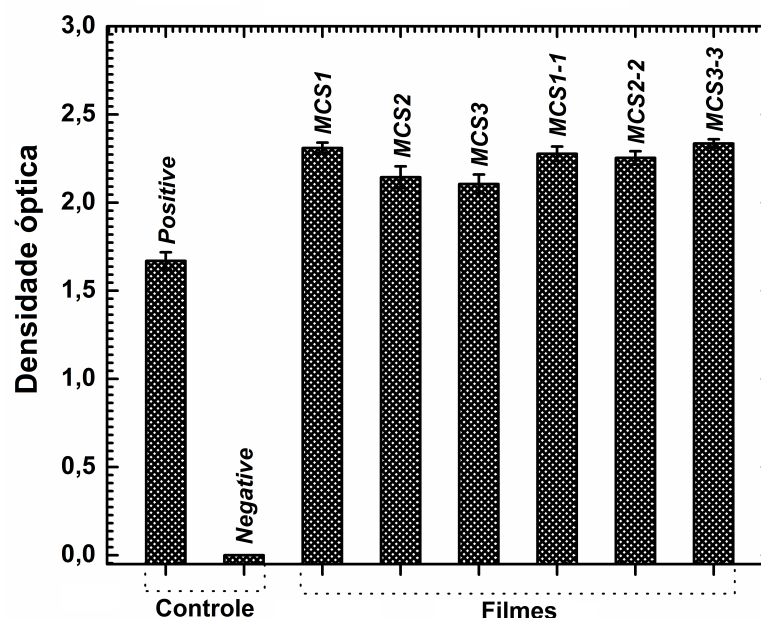


Figura 4.7. Ensaio de viabilidade celular com os filmes MCS(1-3), MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3.

4.4. CONCLUSÕES

Filmes de QT/SC, com diferentes formulações, foram preparados por meio da complexação polieletrólítica da QT com o SC. Para potencializar o uso dos filmes como possíveis revestimentos de ferimentos, os filmes formados foram carregados com AgSD, um fármaco com atividade antibiótica. Todos os filmes (carregados com AgSD ou não) foram

caracterizados por FTIR e as suas capacidades de absorção de líquido em diferentes condições de pH foram estimadas por meio do parâmetro grau de intumescimento (S). Ambos os tipos de filmes (carregados ou não com AgSD), exibiram um perfil de intumescimento dependente do pH. A avaliação das propriedades mecânicas mostrou que a variação de massa entre QT/SC e a incorporação da AgSD afeta diretamente a T_r e o módulo de Young dos filmes. O ensaio de liberação da AgSD *in vitro* revelou novamente que a variação da razão mássica QT/SC influencia a taxa de liberação do fármaco. Verificou-se, também, que todos os filmes MCS1-1, MCS2-2 e MCS3-3 são hábeis para sustentar a liberação da AgSD por um período de 96 h, com uma fração máxima liberada de cerca de 82 % da quantidade total de fármaco incorporada. Os ensaios para avaliar as atividades bactericidas dos filmes frente às bactérias do tipo *P. aeruginosa* e *S. aureus* mostraram que todos os três filmes carregados com AgSD apresentam atividade bactericida e que essa atividade é maior contra bactérias do tipo *P. aeruginosa*. Por fim, o ensaio de viabilidade celular, realizado com células Vero, mostrou que tanto os filmes não carregados como os carregados são atóxicos. Em adição, o ensaio realizado revelou que os filmes também favorecem a proliferação celular. Os resultados apresentados e discutidos nesse Capítulo indicam fortemente que os filmes de QT/SC carregados com AgSD possuem potencial para serem utilizados como materiais para revestimento de ferimentos.

4.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADLY, O. A. *et al.* Assessment of amniotic and polyurethane membrane dressings in the treatment of burns. *Burns*, v. 36, n. 5, p. 703-710 (2010).

ANDREADIS, S. T. Gene-modified tissue-engineered skin: The next generation of skin substitutes. *Tissue Engineering II: Basics of Tissue Engineering and Tissue Applications*, v. 103, p. 241-274 (2007).

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 62, n. 1, p. 83-99 (2010).

DAI, T. *et al.* Topical Antimicrobials for burn wound infections. *Recent Patents Anti-Infective Drug Discovery*, v. 8, (2010).

FAJARDO, A. R. *et al.* Effect of stoichiometry and pH on the structure and properties of chitosan/chondroitin sulfate complexes. *Colloid and Polymer Science*, v. 289, n. 15-16, p. 1739-1748 (2011).

FAJARDO, A. R. *et al.* Time- and pH-dependent self-rearrangement of a swollen polymer network based on polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 934-943 (2010).

(USP30-NF25), National Book of Formulas - United States Pharmacopoeia, *In: The United Pharmacopoeia Convention*, Rockville, MD, U.S.A. (2007).

FU, L. *et al.* Fabrication of novel cellulose/chitosan artificial skin composite. *Materials Research*, Pts 1 and 2, v. 610-613, p. 1034-1038 (2009).

FUJII, A. *et al.* pH-responsive behavior of hydrogel microspheres altered by layer-by-layer assembly of polyelectrolytes. *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 337, n. 1-3, p. 159-163 (2009).

JAIN, J. *et al.* Silver nanoparticles in therapeutics: Development of an antimicrobial gel formulation for topical use. *Molecular Pharmaceutics*, v. 6, n. 5, p. 1388-1401 (2009).

JAYAKUMAR, R. *et al.* Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials- A short review. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 2, p. 227-232 (2010).

JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. *British Journal of Plastic Surgery*, v. 55, n. 3, p. 185-193 (2002).

KEEN, E. F., III *et al.* Incidence and bacteriology of burn infections at a military burn center. *Burns*, v. 36, n. 4, p. 461-468 (2010).

KONG, H.; JANG, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir*, v. 24, n. 5, p. 2051-2056 (2008).

KUMAR, P. T. S. *et al.* Preparation and characterization of novel beta-chitin/nanosilver composite scaffolds for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 761-767 (2010).

LARSSON, B.; NILSSON, M.; TJALVE, H. The binding of inorganic and organic cations and H^+ to cartilage invitro. *Biochemical Pharmacology*, v. 30, n. 21, p. 2963-2970 (1981).

LOPES, L. C. *et al.* Incorporation of theophylline in a chitosan/chondroitin sulfate hydrogel matrix: In vitro release studies and mechanical properties according to pH changes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 128, n. 5, p. 3417-3424 (2013).

MATT, V.; JACQUELINE, W.; IAN, M. Basic physiology of the skin. *Surgery*, v. 28, n. 10, p. 469-472 (2010).

MENG, X. *et al.* Chitosan and alginate polyelectrolyte complex membranes and their properties for wound dressing application. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 21, n. 5, p. 1751-1759 (2010).

MI, F. L. *et al.* Control of wound infections using a bilayer chitosan wound dressing with sustainable antibiotic delivery. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 59, n. 3, p. 438-449 (2002).

MINUTH, W. W.; SITTINGER, M.; KLOTH, S. Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell and Tissue Research*, v. 291, n. 1, p. 1-11 (1998).

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. *Marine Drugs*, v. 8, n. 2, p. 292-312 (2010).

PHAN, T. T. *et al.* Evaluation of cell culture on the polyurethane-based membrane (Tegaderm™): Implication for tissue engineering of skin. *Cell and Tissue Banking*, v. 6, p. 91-97 (2005).

PIAI, J. F. *et al.* Kinetic study of chondroitin sulphate release from chondroitin sulphate/chitosan complex hydrogel. *Journal of Molecular Liquids*, v. 156, n. 1, p. 28-32 (2010).

PIAI, J. F.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C. Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 7, p. 2601-2609 (2009).

PRIETO, M. J. *et al.* Nanomolar cationic dendrimeric sulfadiazine as potential antitoxoplasmic agent. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 326, n. 1-2, p. 160-168, (2006).

RAAFAT, D.; SAHL, H.-G. Chitosan and its antimicrobial potential - a critical literature survey. *Microbial Biotechnology*, v. 2, n. 2, p. 186-201 (2009).

RAFLA, K.; TREDGET, E. E. Infection control in the burn unit. *Burns*, v. 37, n. 1, p. 5-15, (2011).

REIS, A. V. *et al.* Mathematical model for the prediction of the overall profile of in vitro solute release from polymer networks. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 310, n. 1, p. 128-135 (2007).

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, n. 7, p. 603-632 (2006).

RINAUDO, M. *et al.* NMR investigation of chitosan derivatives formed by the reaction of chitosan with levulinic acid. *Carbohydrate Polymers*, v. 46, n. 4, p. 339-348 (2001).

SHANMUGASUNDARAM, N. *et al.* Efficiency of controlled topical delivery of silver sulfadiazine in infected burn wounds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 89A, n. 2, p. 472-482(2009).

WANG, L. H. *et al.* Chitosan-alginate PEC membrane as a wound dressing: Assessment of incisional wound healing. *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 63, n. 5, p. 610-618 (2002).

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

YU, S. H. *et al.* Antibacterial activity of chitosan-alginate sponges incorporating silver sulfadiazine: Effect of ladder-loop transition of interpolyelectrolyte complex and ionic crosslinking on the antibiotic release. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 98, n. 2, p. 538-549 (2005).

ZHANG, G. *et al.* One-step dynamic assembly of polyelectrolyte complex membranes. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 29, n. 6, p. 1877-1884 (2009).

CAPÍTULO 5

COPOLÍMEROS EM BLOCO DE SULFATO DE CONDROITINA-*b*-POLI(ÁCIDO LÁTICO): SÍNTESE VIA “CLICK CHEMISTRY” E PREPARAÇÃO DE MICELAS AUTOMONTADAS

5.1. INTRODUÇÃO

No Capítulo 1 desta Tese foram descritos os vários aspectos positivos apresentados pelo sulfato de condroitina (SC), aspectos esses que tornam o SC um potencial candidato na obtenção de novos biomateriais. Contudo, por possuir uma alta solubilidade em água a aplicação do SC para essa finalidade fica limitada. Uma das maneiras de sobrepor esta limitação é associar o SC a outros polímeros menos solúveis formando, assim, sistemas estáveis para serem manipulados em sistemas aquosos evitando a alta solubilidade do SC (LEE *et al.*, 2006; HUANG *et al.*, 2009). Neste caso, a preparação de um copolímero em bloco entre o SC e algum polímero que apresente característica hidrofóbica é uma ferramenta interessante e promissora. A preparação de um copolímero em bloco, onde um dos blocos é o SC, permite preservar as propriedades químicas, físicas e biológicas deste biopolímero. Além disso, esse tipo de copolímero pode apresentar propriedades físico-químicas únicas de acordo com a maneira que o bloco é formado ou pela adição de novos blocos (NARDIN *et al.*, 2001; ADAMS *et al.*, 2003). Levando em conta estas considerações, neste Capítulo são descritos, pela primeira vez, a síntese e o desenvolvimento de um copolímero em bloco entre o SC (bloco hidrofílico) e o poli(ácido lático) (bloco hidrofóbico), por meio de uma reação do tipo “*click chemistry*” (HVILSTED, 2012). Poli(ácido lático) (PLA) é um polímero sintético que, além de apresentar característica hidrofóbica, apresenta também interessantes características para ser aplicado no desenvolvimento de dispositivos com aplicação biológica (como, por exemplo, biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas) (KLOK, 2005). O uso do PLA

na formulação de sistemas para liberação controlada de fármacos e na obtenção de materiais de reparo cirúrgico tem sido frequentemente reportado na literatura (FRANCO *et al.*, 2011; LASPRILLA *et al.*, 2012). Apesar de apresentar propriedades interessantes, o PLA pode possuir uma alta cristalinidade (PLLA e PDLA) e um caráter hidrofóbico, o que faz com que a difusão de água no interior de sua matriz seja lenta. Como resultado, o tempo de degradação do PLA aumenta e a sua compatibilidade com os tecidos humanos diminui limitando a sua aplicação como biomaterial. A associação do PLA com um polímero hidrofílico, como é o caso do SC, é uma estratégia que deve ser considerada para resolver essa limitação. Assim, por possuir característica anfifílica devido à presença de blocos hidrofílicos e blocos hidrofóbicos o copolímero SC-*b*-PLA pode formar estruturas automontadas (por exemplo, micelas, cilindros, vesículas, etc.) em solventes seletivos. Essas estruturas automontadas podem ser utilizadas em diferentes aplicações de acordo com sua morfologia. As estruturas micelares, no caso, apresentam um grande potencial para serem aplicadas como veículos para liberação controlada de fármacos com características hidrofóbicas e/ou anfifílicas (MENG *et al.*, 2009). A morfologia final obtida nos sistemas automontados é governada por diferentes parâmetros como, por exemplo, temperatura, pH, concentração na solução, razão entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas, etc. (BORSALI *et al.*, 2001; BOUGARD *et al.*, 2008). Foram sintetizados dois copolímeros em bloco de SC-*b*-PLA, os quais possuem diferentes comprimentos do bloco hidrofóbico. Além disso, foram investigadas as características de automontagem desses dois copolímeros em água a partir de diferentes técnicas.

5.2. EXPERIMENTAL

5.2.1 Materiais

Sulfato de condroitina (SC, CAS 9007-28-7, gentilmente cedida por Solabia - Brasil); Poli(ácido láctico) hidroxilado na posição terminal com massas molares diferentes (M_w 1.700 e 6.500 g/mol) (PLA, CAS 33135-50-1, PolymerSource, Canadá). Enzima hialuronidase (tipo

II, ≥ 300 unidades/mg) (CAS 37326-33-3, Sigma-Aldrich, EUA); 4-nitrofenol (CAS 100-02-7, Sigma-Aldrich, EUA); cloreto de 4-toluenossulfonila (TsCl, CAS 98-59-9, Sigma-Aldrich, EUA); 4-(dimetilamino) piridina (DMAP, CAS 1122-58-3, Sigma-Aldrich, EUA); brometo de tetrabutilamônio (CAS 1643-19-2, Sigma-Aldrich, EUA); cloreto de estanho(II) (CAS 10025-69-1, Sigma-Aldrich, EUA); trietilamina (Et₃N, CAS 121-44-8, Sigma-Aldrich, EUA); cianoborohidreto de sódio (NaBH₃CN, CAS 25895-60-7, Sigma-Aldrich, EUA) e azida de sódio (NaN₃, CAS 26628-22-8, Sigma-Aldrich, EUA). Todos os reagentes possuíam grau analítico e foram utilizados sem purificação prévia.

5.2.2 Métodos

5.2.2.1 Técnicas de caracterização

Espectros da região do infravermelho (FTIR) foram obtidos em um espectrômetro Perkin-Elmer (modelo RXI, Japão) operando na faixa de 500 a 4.000 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹. Espectros de ressonância magnética nuclear (NMR) de hidrogênio (¹H), de carbono (¹³C) e de espectroscopia de ressonância magnética nuclear ordenada por difusão (DOSY) foram obtidos em um espectrômetro Bruker (modelo Avance DRX 400, country). Espectros de fluorescência foram obtidos em um espectrofluorímetro Perkin-Elmer (modelo LS-50B, country), equipado com uma célula termostatizada. Medidas de cromatografia de permeação em gel (GPC) foram feitas a 60 °C em um sistema Agilent (modelo 390-MDS, EUA) equipado com uma bomba injetora 290-LC; detector de índice de refração 390-MS; detector UV (Knauer Smartline, modelo 2500) e duas colunas Agilent PolyPore (modelo PL1113-6500; lineares 7,5 x 300 mm; tamanho de partícula 5 µm; limite de exclusão 200 – 2.000.000) utilizando *N,N*-dimetilformamida contendo cloreto de lítio (0,01 M) como fase móvel (fluxo de 1,0 ml/min) e em um outro equipamento de GPC (Water 150C system) equipado com um detector multi-ângulo (Wyatt, modelo DAWN DSP-F) e duas colunas em série (Shodex, modelos OHPack 802 e 803). Neste as medidas foram feitas a 25 °C utilizando água destilada como fase móvel (fluxo de 0,5 ml/min). Medidas de espalhamento dinâmico da luz (DLS) foram feitas em um equipamento ALV-CGS (modelo 8F-S/N 069, Alemanha) em diferentes

ângulos de espalhamento (de 50° a 140°) e em intervalos 10° durante 300 s, a 25 °C. Imagens de microscopia foram obtidas em um microscópio eletrônico de varredura, equipado com uma fonte de emissão de campo (SEM-FEG, Zeiss - modelo Ultra 55 FEG) e em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM, JEOL - modelo 2010 FEF).

5.2.2.2 Síntese do SC funcionalizado com grupos alcinos na posição terminal (SC-alcino)

Anteriormente à funcionalização do SC com grupos alcinos, o SC teve sua massa molar reduzida por despolimerização enzimática (FU *et al.*, 2009). O sulfato de condroitina com menor massa molar (SC-MM) foi obtido a partir da digestão do SC puro com Hialuronidase, uma enzima não-específica. Para isso, SC (1 g) foi solubilizado em solução tampão fosfato (pH 6, 50 mM, 10 ml) juntamente com NaCl (150 mM) e a enzima hialuronidase (24 mg - 300 unidades/mg) a 37 °C por 48 h. Após este período, a solução foi aquecida até o ponto de fervura, o qual foi mantido por 20 min a fim de cessar o processo de despolimerização. A fração de interesse foi recolhida após diferentes etapas de filtração em uma unidade de ultrafiltração (Millipore, modelo Minaton, EUA) utilizando membranas de ultrafiltração com corte de peso molecular (Mwco) de 10.000 e 5.000. O SC-MM seco, um pó branco, foi obtido por liofilização (-55 °C por 48 h). **Rendimento:** 0,595 g (60 %).

Após a obtenção do SC-MM, o mesmo foi funcionalizado com grupos alcino. Para tanto, SC-MM (300 mg - 53 µmol) foi solubilizado em solução tampão de acetato de amônio (NH₄OAc 5 mM, pH 5, 20 ml) a temperatura ambiente e agitação magnética. Uma massa de 30 mg (204 µmol) de 4-propargiloxianilina (GUERRY *et al.*, 2013) foi, primeiramente, solubilizada em uma quantidade necessária de metanol e, então, a solução foi gotejada à solução de SC-MM. Feito isso, NaBH₃CN (10 mg - 159 µmol) foi adicionado à mistura reacional, o qual foi aquecido até 50 °C e mantido sob agitação magnética por 5 dias. Após, o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e água destilada (50 ml) foi adicionada. Para recuperar o material de interesse foi realizada uma extração do tipo líquido-líquido com diclorometano (DCM, 2 x 25 ml). A fase aquosa recolhida deste processo foi então filtrada por ultrafiltração utilizando uma membrana com Mwco igual a 5.000 e, por fim, concentrada até

um volume final de 40 ml. Finalmente, o produto (SC-alcino) foi seco por liofilização (-55 °C por 24 h). **Rendimento:** 290 mg (94 %). FTIR (cm⁻¹): 3422 (O-H e N-H); 2912 (C-H); 2121 (C≡C); 1632 (C=O, amida); 1565 (N-H, flexão); 1514 (C=C, aromático); 1420 e 1382 (C-H, flexão); 1345 (C-N); 1238 (SO₂); 1054 (C-O) e 885 (C-H, flexão fora do plano). NMR ¹H (400 MHz, D₂O, 353 K, δ, ppm): 6,99 e 6,88 (padrão bb' e aa', d, C₆H₄); 4,79 (m, H-4^{GalNAc}, sulfato C⁴); 4,74 (m, H-1^{GalNAc}); 4,61 (m, H-6^{GalNAc}, sulfato C⁶), 4,49 (m, H-1^{GlcUA}), 4,16 - 3,34 (m, H-2,3,4,5,6^{GlcUA} e H-2,3,4,5,6^{GalNAc}, NH e CH₂); 2,98 (s, C≡CH) e 2,03 (s, CH₃). NMR ¹³C (400 MHz, D₂O, 353 K, δ, ppm): 175,4 (O-C=O^{GlcUA}); 174,4 (NH-C=O^{GalNAc}); 117,8 (>CCHCH); 116,9 (CHCHC<); 104,6 (C-1^{GalNAc}); 101,5 (C-1^{GlcUA}); 80,7 - 51,3 (C-2,3,4,5,6^{GlcUA} e GalNAc, CH₂, C≡CH e C≡CH) e 23,2 (CH₃^{GalNAc}). (Nota: GlcUA = unidade ácido glicurônico e GalNAc = unidade *N*-acetil-*D*-galactosamina).

5.2.2.3. Síntese do PLA_n funcionalizado com grupos azida na posição terminal (PLA_n-N₃)

A funcionalização dos PLAs (de diferentes massas molares e denotados como PLA_n) com grupos azida na posição terminal foi feita em duas etapas: na primeira etapa foi sintetizado um composto intermediário pela reação de tosilação dos PLA_n e na segunda foi realizada a azidação desse composto intermediário com NaN₃. A reação de tosilação dos dois tipos de PLA (PLA_n) foi realizada de maneira similar. PLA(1 equivalente ≈ 1 eq) foi solubilizado em DCM (2,5 ml) juntamente com Et₃N (10 eq) e DMAP (0,01 eq) a temperatura ambiente; agitação magnética e atmosfera de argônio (Ar). Posteriormente, TsCl (12 eq), em DCM (500 µl), foi adicionado à mistura reacional por gotejamento (10 µl/min). A reação se processou por 24 h a temperatura ambiente, sob agitação magnética e atmosfera de Ar. Após a reação, o excesso de Et₃N foi neutralizado com ácido acético e o produto, PLA-tosilado, foi precipitado pela adição de metanol frio e, então, recuperado por centrifugação (8.000 rpm, 15 min, 4 °C). Esse processo foi realizado três vezes. O produto centrifugado foi seco a pressão reduzida. **Rendimento:** 64 % (PLA₁₇₀₀-tosilado) e 78 % (PLA₆₅₀₀-tosilado). FTIR (cm⁻¹): 3069, 2991, 2950, 2885 e 2827 (C-H); 1754 (C=O, éster); 1598 (C=C, anel benzênico); 1326 e 1200 (SO₂); 1085 (C-O) e 819 (C-H, aromático, flexão). NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298

K, δ , ppm): 7,82 e 7,34 (padrão aa' e bb', d, C₆H₄); 5,15 (m, CH); 4,26 (m, CH₂); 3,57 (m, CH₂); 3,55 (s, CH₃); 2,43 (s, CH₃) e 1,55 (d, CH₃). NMR ¹³C (75 MHz, CDCl₃, 298 K, δ , ppm): 170,04 e 169,36 (O-C=O); 145,50 (SO₂C<); 133,82 (>CCH₃); 130,22 (>CCHCH); 128,48 (CHCHC<); 73,78 (OCHSO₂); 70,56 (OCH₂CH₂); 69,10 (OOCCHO); 64,77 (CH₂CH₂O); 59,34 (CH₃O); 22,10 (>CCH₃); 18,91 (CH₃CHSO₂) e 17,09 (CH₃CHO).

Após a síntese dos PLA-tosilados, foi realizada a reação de azidação dos mesmos. Para isso, PLA-tosilado (1 eq) foi solubilizado em *N,N*-dimetilformamida (DMF) anidro (1 ml) a temperatura ambiente, sob agitação magnética e a atmosfera de Ar. NaN₃ (10 eq) foi adicionado ao sistema reacional, o qual foi aquecido a 50 °C e mantido sob agitação por 24 h. Após, a mistura reacional foi diluída em DCM (15 ml) e lavada com solução saturada de NaCl (1 x 10 ml) e água destilada (3 x 10 ml). A fase orgânica foi recuperada depois de uma extração do tipo líquido-líquido e seca com Na₂SO₄. Posteriormente, a fase orgânica foi concentrada para poucos mililitros em rotaevaporador. Por fim, o PLA-N₃ foi precipitado pela adição de metanol frio e recuperado por centrifugação (8.000 rpm, 15 min, 4 °C). O material centrifugado foi seco à pressão reduzida. **Rendimento:** 61 % (PLA₁₇₀₀-N₃) e 80 % (PLA₆₅₀₀-N₃). FTIR (cm⁻¹): 2991, 2950 e 2851 (C-H); 2118 (N₃); 1754 (C=O, éster); 1085 (C-O). NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃, 298 K, δ , ppm): 5,15 (m, CH); 4,26 (t, CH₂); 4,01 (m, CH); 3,57 (m, CH₂); 3,55 (s, CH₃) e 1,55 (d, CH₃). NMR ¹³C (75 MHz, CDCl₃, 298 K δ , ppm): 170,04 e 169,36 (O-C=O); 70,56 (OCH₂CH₂); 69,10 (OOCCHO); 64,77 (CH₂CH₂O); 59,34 (CH₃O); 62,13 (CHN₃) e 16,45 (CH₃CHO).

5.2.2.4. Síntese dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA

Os copolímeros em bloco SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ foram sintetizados utilizando uma reação do tipo “*click chemistry*”. Para síntese do copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, PLA₁₇₀₀-N₃ (110 mg -1 eq) e SC-alcino (540 mg -1,5 eq) foram solubilizados, simultaneamente, em uma mistura DMF/água destilada (3:1 v/v, 10 ml). Posteriormente, ascorbato de sódio (2 eq em relação ao PLA₁₇₀₀-N₃) e CuSO₄ (2 eq em relação ao PLA₁₇₀₀-N₃) foram adicionados ao sistema reacional, o qual foi aquecido a 60 °C e permaneceu sob agitação por 48 h.

Similarmente, o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ foi sintetizado a partir da reação do PLA₆₅₀₀-N₃ (130 mg - 1 eq) com SC-alcino (170 mg - 1,5 eq). Essa última reação foi realizada também, em uma mistura DMF/água destilada (3:1 v/v, 10 ml) contendo ascorbato de sódio (2 eq em relação ao PLA₆₅₀₀-N₃) e CuSO₄ (2 eq em relação ao PLA₆₅₀₀-N₃). As condições experimentais foram semelhantes às utilizadas na síntese do copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀. Após 48 horas, separadamente, cada mistura reacional foi diluída em água destilada (50 ml) e centrifugada (8.000 rpm, 15 min, 4 °C) para eliminar o PLA_n-N₃ que não reagiu. Para eliminar o SC-alcino que não reagiu, duas técnicas diferentes foram usadas de acordo com o copolímero bloco. Para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, a fase aquosa foi dialisada contra água destilada por 48 h por meio de uma membrana de diálise (Spectra/Por) com Mwco de 3.500. Para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ a fase aquosa foi filtrada por 24 h em uma unidade de ultrafiltração (Millipore, modelo Minaton, EUA), a partir de uma membrana com Mwco de 5.000. As soluções resultantes dos processos de diálise e de filtração foram secas por liofilização (-55 °C por 24 h) para que os copolímeros sintetizados fossem recuperados.

Rendimento: 168 mg (SC-*b*-PLA₁₇₀₀) e 200 mg (SC-*b*-PLA₆₅₀₀). FTIR (cm⁻¹): 3422 (O-H e N-H); 2991 e 2950 (C-H); 1754 (C=O, éster); 1632 (C=O, amida); 1565 (N-H, flexão); 1514 (C=C, aromático); 1420 e 1382 (C-H, flexão); 1381 (C-N); 1238 (SO₂); 1085 e 1054 (C-O) e 885 (C-H, flexão fora do plano). NMR¹H (400 MHz, DMSO-d₆/D₂O (6:1), 353 K, δ, ppm): 8,20 e 8,10 (2x s, H^{triazóis}); 6,77 e 6,59 (padrão bb' e aa', C₆H₄^{bloco SC}); 5,62 (s, 2H, CH₂^{bloco SC}); 5,13 (m, CH^{bloco PLAn}); 4,89 - 3,14 (m, H-1, 2, 3, 4, 5, 6^{GlcUA e GalNAc do bloco SC}, 2x CH₂, CH, CH₃^{do bloco PLAn}); 1,82 (m, 3H, CH₃^{do bloco PLAn}) e 1,44 (s, CH₃^{GalNAc do bloco SC}).

5.2.2.5. Determinação do valor da concentração micelar crítica (CMC) dos copolímeros em bloco por fluorescência

O valor da CMC para os copolímeros em bloco SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ em água foi determinado a partir da variação do espectro de fluorescência do pireno (MODOLON *et al.*, 2012). Para isso, uma solução de pireno foi preparada a partir da solubilização do mesmo (3 mg) em acetona (30 ml). Essa solução foi agitada por 12 h a temperatura ambiente.

Após, um volume conhecido da solução de pireno foi transferido para diferentes frascos. A acetona foi evaporada e, então, a solução contendo um dos copolímeros (SC-*b*-PLA₁₇₀₀ ou SC-*b*-PLA₆₅₀₀) foi adicionada aos frascos. A concentração final de pireno em cada frasco, após a adição da solução do copolímero, foi de 3×10^{-4} mg/ml. A solução de copolímero foi obtida a partir da adição de uma quantidade conhecida de SC-*b*-PLA₁₇₀₀ ou SC-*b*-PLA₆₅₀₀ em uma mistura DMF/água destilada (4:1 v/v). As soluções dos copolímeros adicionadas aos diferentes frascos foram diluídas com quantidades necessárias de solução tampão fosfato (pH 7,4) para produzir, concentrações de copolímero na faixa de 0,001 a 5 mg/ml. Todos os frascos contendo as soluções de copolímero foram mantidos sob agitação magnética por 24 h a temperatura ambiente. Os espectros de fluorescência foram registrados na faixa de 350 a 500 nm, após excitação em 339 nm, e com as fendas do monocromador ajustadas em 5 nm para ambas excitação e emissão. A partir dos espectros de emissão registrados para as soluções com diferentes concentrações de copolímero, foram calculadas as razões entre as intensidades dos picos observados em 372 nm (denominado I_1) e 383 nm (denominado I_3). Os valores calculados foram plotados em função da concentração do copolímero em bloco na solução. Para ambos os copolímeros sintetizados nesse Capítulo, o valor da CMC foi determinado a partir da intersecção das retas obtidas por regressão linear.

5.2.2.6. Caracterização da automontagem dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA

Medidas do diâmetro e da intensidade de luz espalhada, para as suspensões de nanopartículas formadas a partir da automontagem dos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀, foram realizadas por meio de técnicas de espalhamento dinâmico da luz (DLS). As medidas foram feitas utilizando um Goniômetro ALV, o qual é equipado com um laser 35 mW HeNe, operando no comprimento de onda de 632,8 nm, com correlador digital e um controlador de temperatura. Todas as amostras foram sistematicamente estudadas nos ângulos de 60°, 90° e 120° e outras estudadas em diferentes ângulos de espalhamento (de 50° a 140° em intervalos 10°). Todas as medidas foram realizadas durante 300 s, a 25 °C. Para a automontagem das nanopartículas, água destilada (um não solvente, neste caso) foi

lentamente gotejada sobre as soluções dos copolímeros sintetizados como já descrito neste Capítulo. A metodologia utilizada para preparação das nanopartículas foi a mesma para ambos os copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀. Sendo assim, um copolímero SC-*b*-PLA_n (30 mg) foi solubilizado em uma mistura DMF/água destilada (3:2 v/v, 500 µl) a temperatura ambiente, sob agitação magnética por 24 h. Feito isso, a solução do copolímero foi transferida para um frasco com tampa, o qual foi acoplado a um sistema formado por uma bomba de seringa e uma outra contendo água destilada (4,5 ml) (ver Figura 5.1). A água da seringa foi lentamente gotejada sob a solução contendo o copolímero (1,02 ml/h). A solução resultante (com volume final de 5,0 ml e concentração de copolímero igual a 3,0 mg/ml) foi mantida sob agitação magnética, por 2 h, para estabilização das nanopartículas formadas. Antes das medidas de DLS, as soluções contendo as nanopartículas foram dialisadas contra água por 48 h em uma membrana (Spectra/Por), com Mwco de 3.500 para eliminar o DMF e, então, filtradas em filtros de seringa hidrofílicos, com poros de 0,20 µm (Millipore, modelo Millex PES, EUA).



Figura 5.1. Imagem fotográfica do sistema utilizado na preparação das partículas automontadas.

Após as medidas de DLS, os dados foram coletados usando o software ALV Correlator Control. As distribuições dos tempos de relaxação $A(t)$ foram obtidas a partir da análise CONTIN, das funções de auto-correlação $C(q, t)$ (DAL BO *et al.*, 2012). Os tempos de relaxação, os quais são denotados por t_r e correspondem ao valor máximo das distribuições $A(t)$. Já as frequências de relaxação (Γ) são dadas pela relação $1/t_r$ (DAL BO *et al.*, 2012). O coeficiente de difusão aparente (D_{app}) das nanopartículas, para uma dada concentração do copolímero, é calculado por meio da seguinte equação:

$$\left. \frac{\Gamma}{q^2} \right|_{q \rightarrow 0} = D_{app} \quad (5.1)$$

onde q é o módulo do vetor espalhamento e é definido como

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5.2)$$

onde λ é o comprimento de onda do feixe de laser incidente, n é o índice de refração do solvente puro ($n = 1,33$ para água) e θ ângulo de espalhamento. D_{app} é determinado a partir da inclinação da reta obtida por regressão linear dos pontos do gráfico Γ em função de q^2 . O raio hidrodinâmico (R_H) (sendo, portanto, o diâmetro igual a $2R_H$) foi calculado com base na relação de Stokes-Einstein:

$$R_H = \left. \frac{k_B T q^2}{6\pi\eta\Gamma} \right|_{q \rightarrow 0} \approx \frac{k_B T}{6\pi\eta D_{app}} \quad (5.3)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura da amostra e η é a viscosidade do solvente puro (água, nesse caso) (DAL BO *et al.*, 2012).

A caracterização morfológica dos sistemas automontados foi realizada pela análise de imagens obtidas por SEM-FEG e TEM. Imagens de microscopia eletrônica de varredura

(SEM) foram obtidas em um microscópio equipado com uma fonte de elétrons por emissão de campo (SEM-FEG) (Zeiss, modelo ultra 55 FEG), operando a 3 kV usando um detector “*in-lens*”. Para obtenção das imagens, uma pequena alíquota da solução contendo a amostra (solução aquosa do copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ ou do copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ – concentração 0,1 mg/ml) foi depositada sobre uma lâmina de sílica (1 x 1 cm), a qual foi seca à temperatura ambiente. Posteriormente, a placa de sílica contendo a amostra foi recoberta com uma fina camada de carbono. Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram obtidas em um microscópio JEOL (modelo JEM 2010 FEF), operando a 120 kV. Para as análises por TEM, as amostras foram preparadas pelo gotejamento de 4 µl da solução aquosa contendo as partículas sobre um porta amostras (“*grid*”) de cobre, recobertos com filme *formvar*. A concentração das soluções dos copolímeros foi de 0,1 mg/ml. Antes da secagem completa, 4 µl de uma solução de acetato de uranila (2 % m/v) foram gotejados sobre o porta amostra. O acetato de uranila, um corante negativo, foi utilizado como agente de contraste. O excesso de líquido foi removido utilizando um papel filtro e o porta amostra foi seco à temperatura ambiente por 30 min. Após a obtenção das imagens de SEM e de TEM, o diâmetro médio das nanopartículas foi determinado utilizando o software Size Meter[®]. O limiar (“*threshold*”) do software foi calibrado de acordo com a barra de escala das imagens e o diâmetro médio foi obtido a partir da distribuição dos diâmetros registrados para 150 nanopartículas (n = 150) escolhidas aleatoriamente.

5.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1. Obtenção do SC-MM

A justificativa de se preparar copolímeros bloco SC-*b*-PLA se baseia nas vantagens do SC na preparação dos biomateriais, como já descrito nos Capítulos anteriores desta Tese. Alguns estudos mostram que o SC com baixa massa molar, comparado àqueles com massa molar ≥ 20.000 g/mol, podem apresentar maior taxa de absorção e maior efeito terapêutico no tratamento de certos tipos de osteoartrite (ADEBOWALE *et al.*, 2000; CHO *et al.*, 2004).

Dados os desafios inerentes à despolimerização dos glicosaminoglicanos, neste Capítulo é descrita uma metodologia eficiente que permite realizar a despolimerização do SC em condições suaves e que ainda permite o recolhimento da fração de massa molar de interesse, de uma maneira acessível e rápida. O SC foi despolimerizado por meio de digestão enzimática utilizando uma enzima não específica; a hialuronidase. Essa enzima possui a habilidade de clivar as ligações do tipo β -1,4-glicosídica entre as unidades de ácido glucurônico e *N*-acetil-*D*-galactosamina, as quais formam a estrutura do SC (TAKAGAKI *et al.*, 1994). Após a digestão enzimática, a fração de massa molar desejável da SC-MM foi recolhida por ultrafiltração; liofilizada e caracterizada por GPC. Além disso, alíquotas da solução de digestão foram coletadas no início e no final do processo afim de se conhecer os valores das viscosidades intrínsecas ($[\eta]$) e posterior avaliação das massas molares viscosimétrica (M_v) do SC e do SC-MM. As medidas viscosimétricas foram feitas a 25 °C utilizando um viscosímetro capilar Schott (diâmetro 0,63 mm, modelo 531-10), equipado com uma bomba para diluição automática (Schott, modelo AVS360). A concentração das soluções foi ajustada com base na viscosidade inicial das amostras. A M_v foi calculada pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (WASTESON, 1971) e os valores das constantes K e α foram $3,26 \times 10^{-5}$ (dl/g) e 0,96, respectivamente. A distribuição das massas molares determinadas por GPC e por viscosimetria para o SC e o SC-MM é apresentada na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Distribuição das massas molares do SC e do SC-MM, determinadas por GPC e por viscosimetria.

Amostra	M_w (10^3 g/mol) ^a	M_n (10^3 g/mol) ^a	M_z (10^3 g/mol) ^a	M_v (10^3 g/mol) ^b	M_w/M_n	$[\eta]$ (dl/g) ^c
SC	19,28	14,11	27,65	18,7	1,37	0,44
SC-MM	5,66	3,89	8,23	5,1	1,46	0,12

^a Dados obtidos por GPC; ^b Dados obtidos por viscosimetria; ^c Calculado por dados viscosimétricos.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 5.1 é possível inferir que a despolimerização enzimática foi capaz de reduzir cerca de 3,5 vezes a massa molar do SC-

MM em relação a do SC original o que, conseqüentemente, diminui o grau de polimerização. O SC possui um grau de polimerização igual a 41 enquanto que o respectivo valor para o SC-MM cai para 12. Além disso, o processo de despolimerização enzimática reduziu o valor de $[\eta]$ da solução de SC-MM, porém a polidispersividade aumentou ligeiramente quando comparada com àquela apresentada pelo SC.

5.3.2. Caracterização da síntese e da estrutura do SC-alcino

Nos últimos anos, o uso das reações do tipo “*click chemistry*” têm sido aparentemente a melhor escolha quando se tem por objetivo obter produtos com rendimentos virtualmente quantitativos sem que haja formação de reações paralelas, fazendo com que o seu processo de purificação seja relativamente mais simples (GORUR *et al.*, 2011). Dentre as possíveis reações do tipo “*click chemistry*”, a reação de cicloadição 1,3-dipolar entre grupos alcinos e azidas, primeiramente realizada por Huisgen, se destaca. Essa reação permanece como um dos métodos clássicos mais escolhidos para síntese de 1,2,3-triazóis e, geralmente, tem encontrado grande aplicabilidade na preparação de novos materiais e biomateriais (ARIGELA *et al.*, 2012). Levando em consideração esses argumentos, neste Capítulo é demonstrada uma metodologia eficiente que faz uso de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar entre o SC-alcino e o $\text{PLA}_n\text{-N}_3$ para preparação de um copolímero em bloco SC-*b*-PLA. A estratégia de síntese utilizada no decorrer da pesquisa é demonstrada na Figura 5.2.

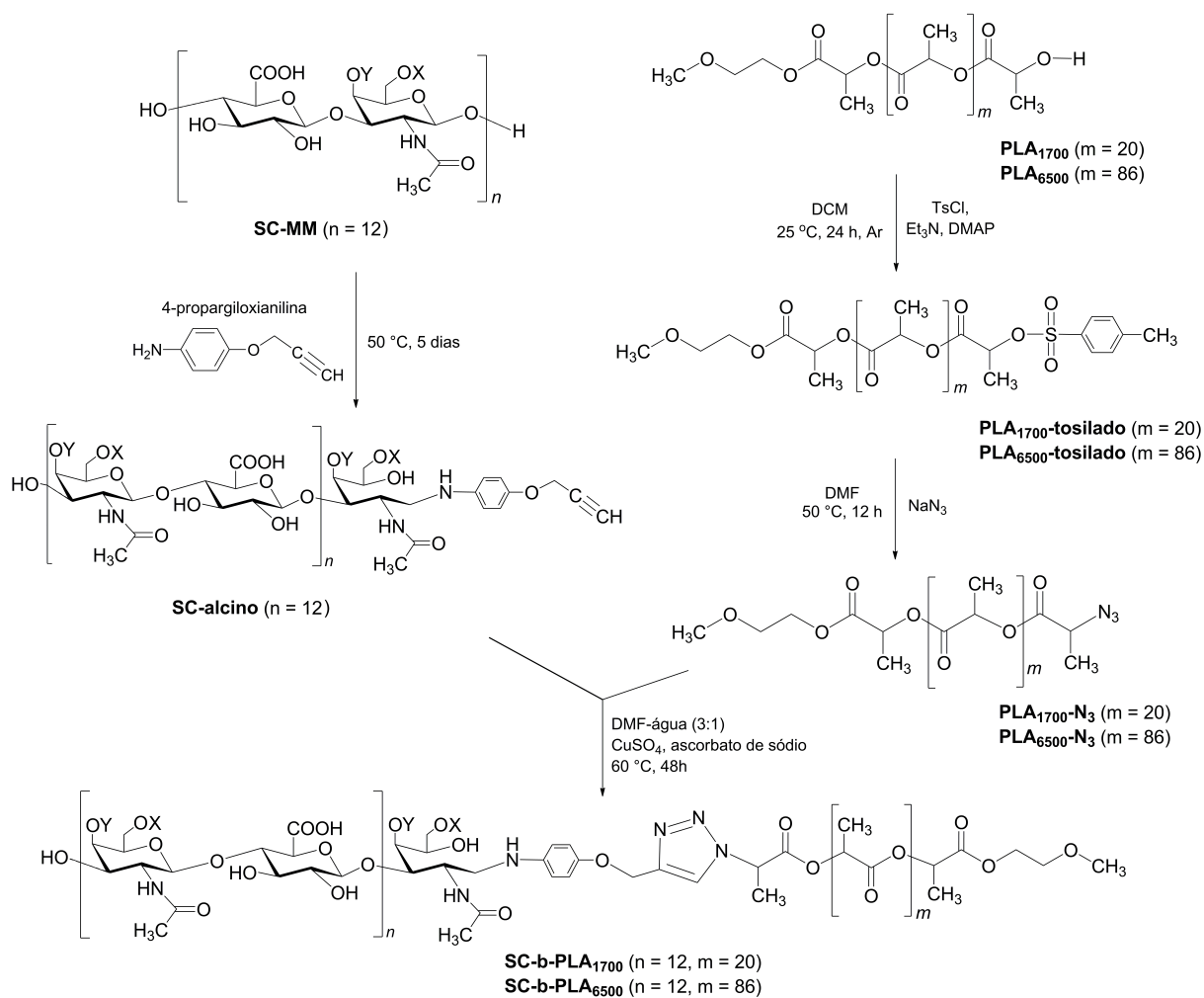


Figura 5.2. Estratégia de síntese dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA ($Y = H^+$ e $X = SO_3^-$ ou $Y = SO_3^-$ e $X = H^+$).

O SC-alcino foi preparado por meio de uma reação de aminação redutiva do SC-MM com 4-propargiloxianilina, um derivado de propargila sintetizado pela equipe “*Chimie et Biotechnologie des Oligosaccharides*”, do “*Centre de Recherches sur les Macromolécules Végétales*” (CERMAV-Grenoble/França) (GUERRY *et al.*, 2013). A caracterização estrutural do SC-alcino foi feita a partir de medidas espectroscópicas FTIR e NMR (1H e ^{13}C).

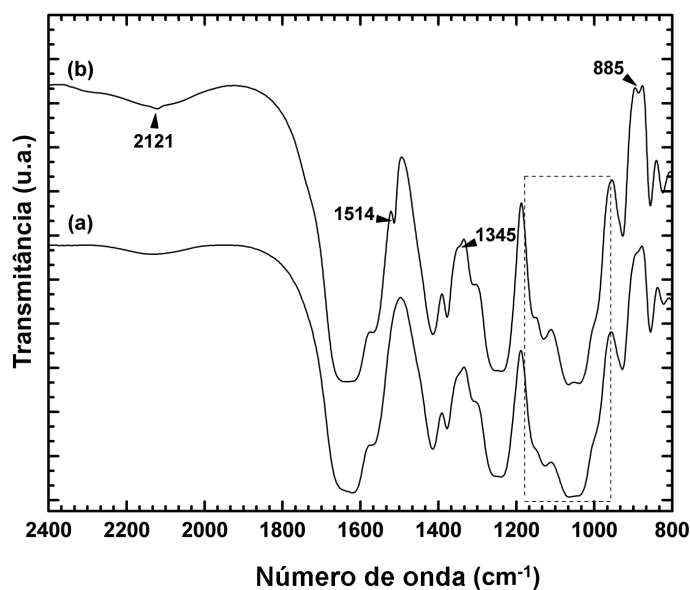


Figura 5.3. Espectros FTIR (a) do SC-MM e (b) do SC-alcino.

Após a reação de aminação reductiva, é possível visualizar no espectro FTIR obtido para o SC-alcino (Figura 5.3b), a presença das bandas características do SC-MM, uma banda alargada em 2121 cm^{-1} atribuída ao estiramento da ligação tripla carbono-carbono ($\text{C}\equiv\text{C}$) dos grupos alcino. Ainda, são visualizadas bandas em 1514 , 1345 e 885 cm^{-1} atribuídas aos estiramentos vibracionais da ligação dupla carbono-carbono ($\text{C}=\text{C}$) do anel benzênico e da ligação C-N e a flexão fora do plano de simetria da ligação C-H presente no anel benzênico. Por fim, pode-se visualizar um ligeiro aumento na intensidade da banda na região entre $1200 - 1000\text{ cm}^{-1}$ devido ao estiramento da ligação carbono-oxigênio (C-O). O aparecimento destas bandas é um indício significativo da funcionalização do SC-MM com o grupo alcino.

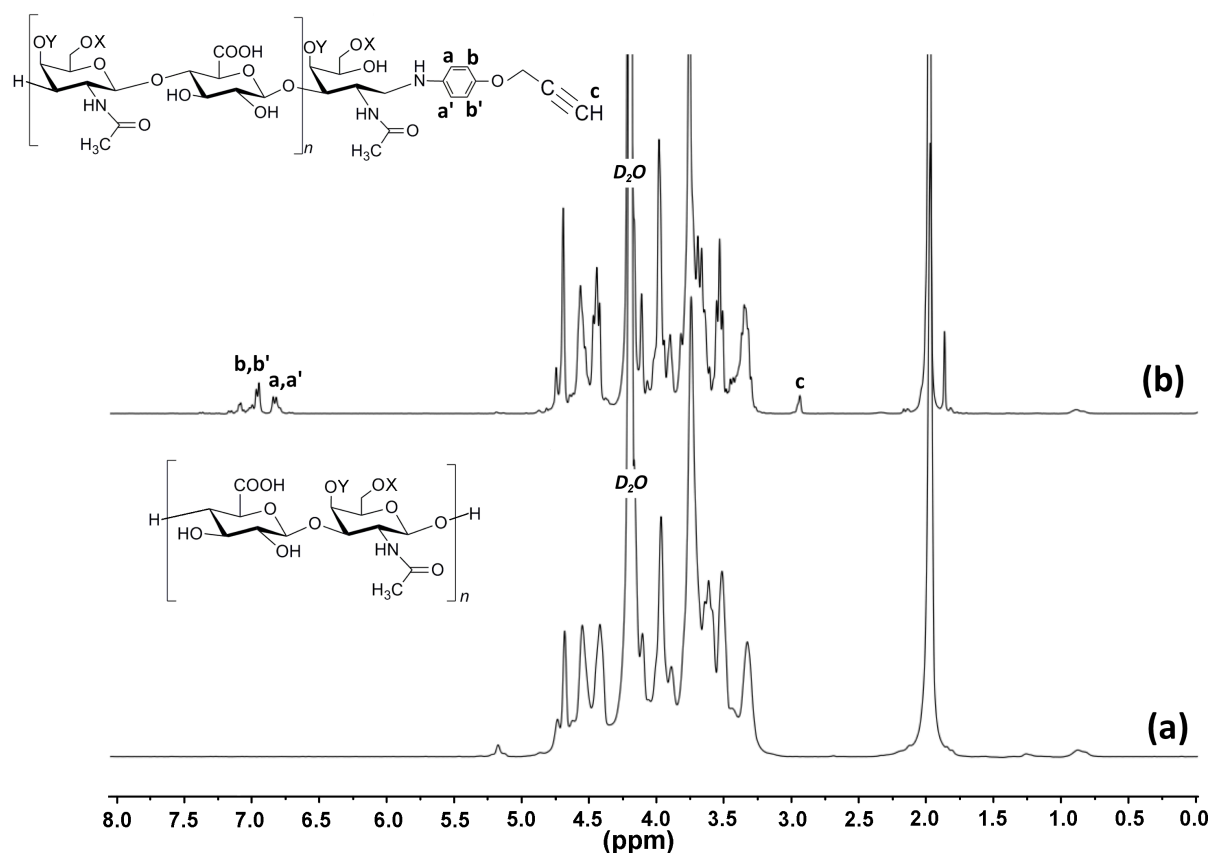


Figura 5.4. Espectros de NMR ^1H (a) do SC-MM e (b) do SC-alcino (400 MHz, D_2O , 353 K).

O espectro de NMR ^1H obtido para o SC-alcino (Figura 5.4b), diferentemente daquele alcançado para o SC-MM, apresentou dois sinais de ressonância em δ 6,99 e 6,88 ppm ($\text{H}_{\text{bb'}}$ e $\text{H}_{\text{aa'}}$), os quais são atribuídos aos hidrogênios ligados ao anel benzênico proveniente do 4-propargiloxianilina. Além disso, ocorreu também o aparecimento de um sinal em δ 3,39 ppm (H_{c}) atribuído aos átomos de hidrogênio ligados aos grupos alcino inseridos na posição terminal do SC-MM. A partir desses dados, é possível inferir que reação de aminação redutiva teve êxito e o SC-alcino foi efetivamente formado. O grau de funcionalização do SC-MM foi calculado a partir da razão entre as áreas dos sinais de ressonância atribuídos aos átomos de hidrogênio do anel benzênico ($\text{H}_{\text{bb'}}$ e $\text{H}_{\text{aa'}}$), aos átomos de hidrogênio da ligação tripla carbono-carbono (H_{c}) e a área do sinal de ressonância atribuído aos átomos de hidrogênio $\text{H-2}^{\text{GlcUA}}$ (δ 3,34 ppm). Essas áreas foram calculadas com base na integração dos referidos sinais após, um cuidadoso tratamento de linha base. Os valores calculados para razões das áreas

foram 0,158 ($H_{bb'}/H-2^{GlcUA}$), 0,151 ($H_{aa'}/H-2^{GlcUA}$) e 0,081 ($H_c/H-2^{GlcUA}$), respectivamente. Comparando esses valores experimentais com os valores teóricos (0,167; 0,167 e 0,083) é possível inferir que o grau de funcionalização obtido utilizando essa estratégia de síntese foi próximo a 94 %. Resultados similares foram observados por NMR ^{13}C (dados não apresentados aqui). Os dados de FTIR e NMR (1H e ^{13}C) confirmam que o SC-MM foi efetivamente funcionalizado com os grupos alcino e que a metodologia empregada produz um alto grau de funcionalização. Vale ressaltar que a síntese de derivados de SC, tendo como princípio a inserção de grupos na posição redutiva do SC, já foi explorada (SAITOH *et al.*, 1995; YAMAGUCHI *et al.*, 2006). Contudo, estes derivados não foram isolados, quantificados e caracterizados como descrito neste Capítulo.

5.3.3. Caracterização da síntese e da estrutura do PLA_n-N_3

Na síntese do copolímero em bloco SC-*b*- PLA_n utilizando uma reação do tipo “*click chemistry*”, na qual um grupo alcino reage com um grupo azida formando um 1,2,3-triazol exige, nesse caso, que o PLA_n seja funcionalizado com um grupo azida, uma vez que o outro bloco foi previamente funcionalizado com o grupo alcino. Com esse propósito, procurou-se desenvolver uma metodologia versátil que permite inserir o grupo azida no lugar do grupo hidroxila que se encontra na posição terminal do PLA_n . Esta metodologia necessita de duas etapas. Na primeira é formado um composto intermediário a partir da reação tosilação entre o PLA e o cloreto de 4-toluenosulfonila (TsCl). A etapa subsequente é a reação de azidação desse composto intermediário com o sal NaN_3 . A caracterização estrutural do PLA após cada etapa da reação foi feita pelas técnicas espectroscópicas FTIR e NMR (1H e ^{13}C).

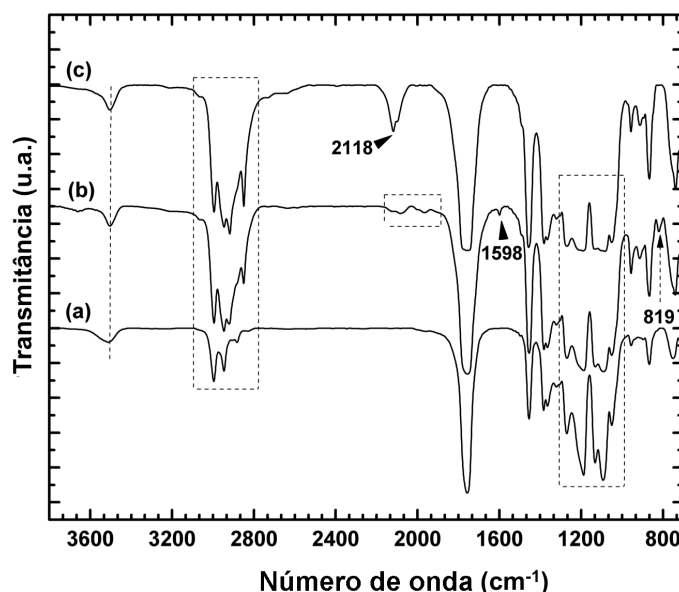


Figura 5.5. Espectros de FTIR do (a) PLA₁₇₀₀, (b) PLA₁₇₀₀-tosilado e (c) PLA₁₇₀₀-N₃.

Comparando os espectros FTIR obtidos para o PLA₁₇₀₀ e para o PLA₁₇₀₀-tosilado é possível visualizar que a banda alargada próximo a 3500 cm⁻¹ torna-se mais estreita no espectro FTIR obtido para o PLA₁₇₀₀-tosilado devido ao consumo dos grupos hidroxila (–OH) do PLA₁₇₀₀ na reação de tosilção (JEONG *et al.*, 2003; PIERRE-ANTOINE *et al.*, 2012). Vale ressaltar, no entanto, que no espectro FTIR do PLA₁₇₀₀-tosilado é observada ainda uma banda estreita próxima a 3500 cm⁻¹ que pode ser atribuída a uma banda de sobretom (“overtone”). Além disso, no espectro FTIR do PLA₁₇₀₀-tosilado é possível verificar que as bandas entre 3100 - 2800 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento da ligação C-H, e bandas entre 1300 - 1100 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento das ligações S=O e C-O, apresentam aumento significativo em suas intensidades devido à inserção dos grupos tosila na estrutura do PLA₁₇₀₀ (JEONG *et al.*, 2003; PIERRE-ANTOINE *et al.*, 2012). Ainda, analisando o espectro FTIR obtido para o PLA₁₇₀₀-tosilado é possível visualizar o aparecimento de duas novas bandas em 1598 e 819 cm⁻¹, as quais são atribuídas às vibrações das ligações C=C do anel benzênico e a flexão fora do plano da ligação C-H também presente no anel benzênico. O aparecimento dessas bandas confirma, portanto, a inserção do grupo tosila e a preparação do composto intermediário (JEONG *et al.*, 2003; PIERRE-ANTOINE *et al.*, 2012). A reação de azidação foi realizada a partir do composto intermediário, PLA₁₇₀₀-tosilado. A Figura 5.5c mostra o

espectro FTIR obtido para o PLA₁₇₀₀-N₃, o qual não mais apresenta as bandas características do grupo tosila indicando sua substituição pelo grupo azida. Isso é confirmado pelo aparecimento de uma banda intensa em 2118 cm⁻¹ atribuída ao estiramento N₃, o que confirma a funcionalização do PLA₁₇₀₀. Apesar de não apresentados aqui, os dados de FTIR obtidos para o PLA₆₅₀₀, PLA₆₅₀₀-tosilado e PLA₆₅₀₀-N₃ foram semelhantes a esses, o que confirma que a metodologia apresentada nesse Capítulo, visando a funcionalização do PLA com grupos azida, tem êxito para PLAs de diferentes massas molares.

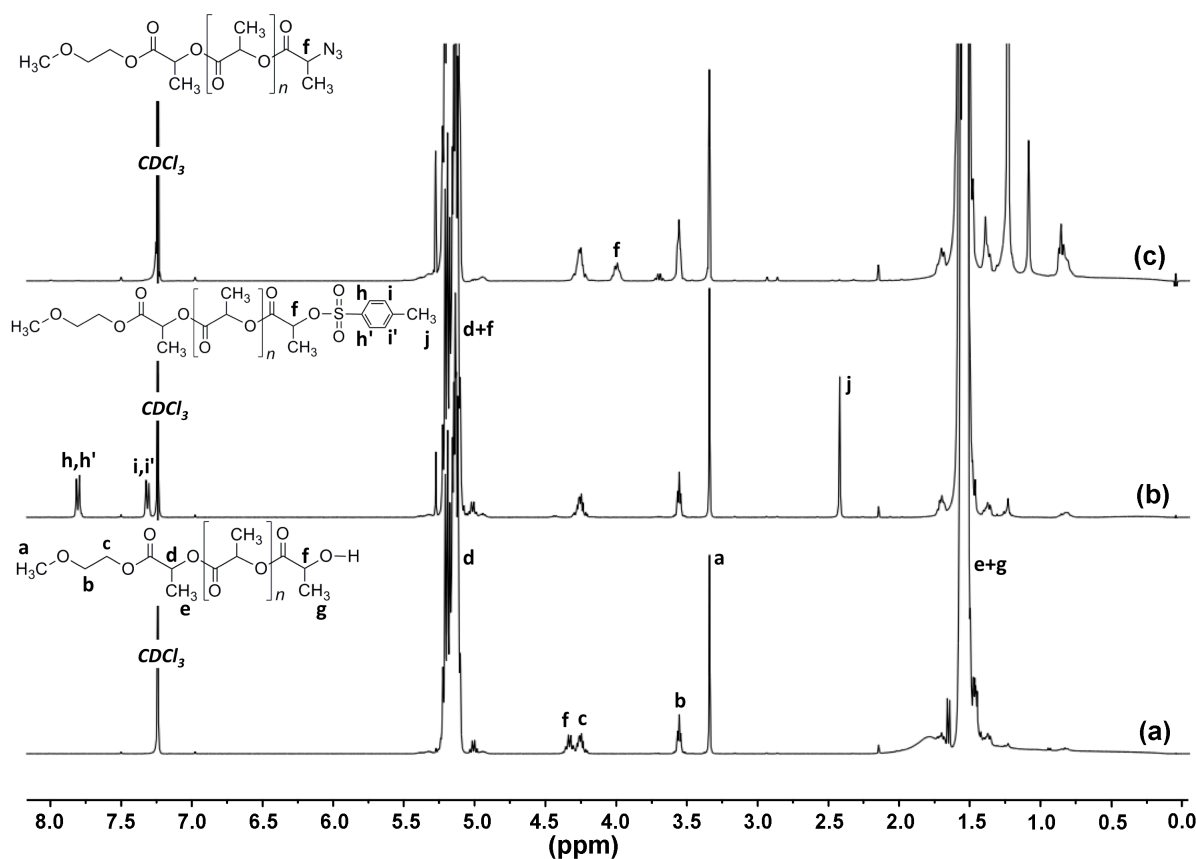


Figura 5.6. Espectros de NMR de ¹H do (a) PLA₁₇₀₀, (b) PLA₁₇₀₀-tosilado e (c) PLA₁₇₀₀-N₃.

O espectro de NMR ¹H obtido para o PLA₁₇₀₀-tosilado apresentou novos sinais de ressonância, os quais são atribuídos aos prótons aromáticos provenientes dos grupos tosila inseridos na estrutura do PLA₁₇₀₀. Esses novos sinais são observados em δ 7,82 e 7,34 ppm (denominados como H_{h,h'} e H_{i,i'} na Figura 5.6b). O sinal conferido aos átomos de hidrogênio

ligados aos grupos metila adjacentes aos anéis benzênicos dos grupos tosila é observado em δ 2,43 ppm (H_j) (GACAL *et al.*, 2009). Além disso, comparando os espectros NMR obtidos para o PLA₁₇₀₀ e para o PLA₁₇₀₀-tosilado é possível verificar o deslocamento do sinal de ressonância dos átomos de hidrogênio adjacentes aos grupos hidroxila ligados na terminação da estrutura do PLA₁₇₀₀. O deslocamento desse sinal de ressonância, de δ 4,28 ppm (H_f na Figura 5.6a) para δ 5,15 ppm (Figura 5.6b), caracteriza a reação de tosilação. Aqui, o grau de funcionalização foi calculado a partir da razão entre as áreas dos sinais atribuídos aos átomos de hidrogênio ligados ao anel benzênico ($H_{h,h'}$ e $H_{i,i'}$), aos átomos de hidrogênio ligados aos grupos metila adjacentes ao anel benzênico (H_j) e a área do sinal atribuído aos hidrogênios ligados ao grupo metila terminal do PLA₁₇₀₀ (δ 3,55 ppm, denotado como H_a). As áreas dos sinais de ressonância foram calculadas a partir das suas integrações após um cuidadoso tratamento de linha base dos espectros obtidos. Os valores encontrados para as razões entre as áreas foram 0,65 ($H_{hh'}/H_a$), 0,67 ($H_{ii'}/H_a$) e 1,00 (H_j/H_a), respectivamente. A comparação desses valores com os valores teóricos (0,65, 0,67 e 1,00) confirma que o grau de funcionalização do PLA₁₇₀₀ com os grupos tosila foi de 100 %.

A reação de azidação é confirmada pela análise do espectro de NMR ¹H obtido para o PLA₁₇₀₀-N₃. O desaparecimento dos sinais de ressonância em δ 7,82, 7,34 e 2,43 ppm confirma a substituição dos grupos tosila pelos grupos azida. Ainda, é possível visualizar o deslocamento dos átomos de hidrogênio anteriormente ligados aos carbonos adjacentes aos grupos tosila, de δ 5,15 ppm (ver Figura 5.6b) para δ 4,01 ppm (ver Figura 5.6c) após a reação de azidação. O grau de funcionalização foi calculado a partir da razão entre a área do sinal de ressonância H_f (δ 4,01 ppm) e a área do sinal H_a (δ 3,55 ppm). O valor encontrado para essa razão foi igual a 0,31, sendo que o valor teórico é 0,33, o que permite inferir que o grau de funcionalização do PLA₁₇₀₀-tosilado com o grupo azida foi de 100 %. Os dados aqui apresentados e discutidos corroboram com os dados obtidos por NMR ¹³C. Os espectros de NMR ¹H e ¹³C obtidos para o PLA₆₅₀₀, PLA₆₅₀₀-tosilado e o PLA₆₅₀₀-N₃ também confirmam a formação dos compostos intermediários e funcionalizados com grupo azida, sendo a análise

deste feita de forma similar à procedida para o PLA de menor massa molar. Vale ainda ressaltar que o mesmo grau de funcionalização foi obtido em cada uma das etapas da síntese.

5.3.4. Caracterização da síntese e da estrutura dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA

Para a preparação dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA_n os precursores SC e PLA previamente funcionalizados com os grupos alcino e azida foram covalentemente ligados por meio de uma reação de cicloadição 1,3-dipolar catalisada por cobre [Cu(I)]; uma reação do tipo “*click chemistry*”. Como mencionado anteriormente, essa reação é atraente, pois a mesma não demanda que grupos funcionais presentes nos precursores sejam protegidos; geralmente apresenta altas taxas de rendimento e evita a ocorrência de reações paralelas. Neste caso, o sistema Cu(I)/ascorbato de sódio foi utilizado como catalisador e a reação se processou a 60 °C em uma mistura de DMF/água destilada. Após a reação de “*click*”, os copolímeros em bloco SC-*b*-PLA foram purificados, utilizando uma metodologia simples a qual se mostrou eficiente e, então, caracterizados por espectroscopias FTIR e NMR ¹H.

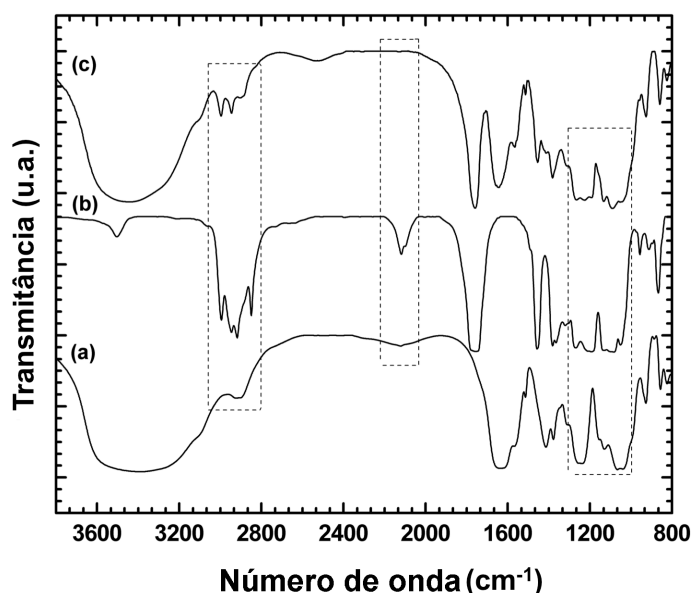


Figura 5.7. Espectros FTIR do (a) SC-alcino, (b) PLA₁₇₀₀-N₃ e (c) copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀.

Analisando o espectro FTIR obtido para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ é possível visualizar a presença de todas as bandas características dos polímeros constituintes de cada

bloco (SC e PLA), o que indica que a estrutura do copolímero é formada por esses dois polímeros. A eficiência da reação “click” é confirmada pelo desaparecimento da banda atribuída ao grupo azida, a qual é observada no espectro de FTIR do PLA₁₇₀₀-N₃ próximo a 2100 cm⁻¹ (GACAL *et al.*, 2009; DAL BO *et al.*, 2012). Na caracterização por NMR¹H dos copolímeros SC-*b*-PLA_n (Figura 5.8), foi utilizada uma mistura de solventes deuterados [dimetil sulfóxido (DMSO-*d*₆) e água (D₂O)] para garantir a boa solubilização de ambos os blocos. Contudo, vale ressaltar que a mistura de solventes deuterados pode alterar os valores dos deslocamentos químicos para átomos de hidrogênio específicos (GOTTLIEB *et al.*, 1997).

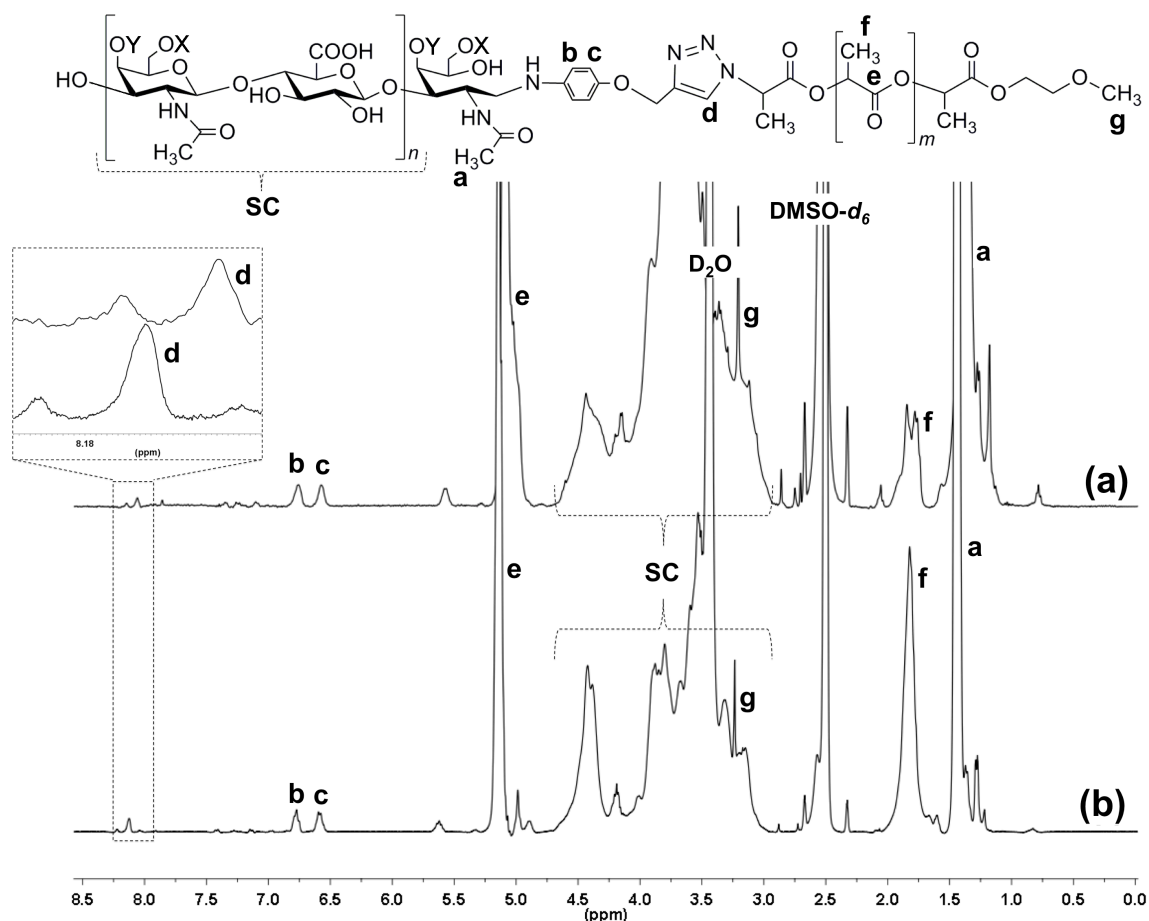


Figure 5.8. Espectros de NMR ¹H do (a) SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e (b) SC-*b*-PLA₆₅₀₀ (400 MHz, DMSO-*d*₆/D₂O, 353 K).

Ambos os espectros de NMR¹H obtidos para os dois copolímeros SC-*b*-PLA sintetizados apresentam os sinais de ressonância característicos dos polímeros formadores de cada bloco. Além disso, é possível visualizar o aparecimento de novos sinais entre δ 8,20 e 8,10 ppm em ambos os espectros. Esses sinais caracterizam a formação do anel triazólico, o qual liga os blocos SC e PLA confirmando, portanto, a preparação dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA por meio de uma reação de “*click chemistry*” (GACAL *et al.*, 2009; DAL BO *et al.*, 2012). A preparação/purificação dos copolímeros SC-*b*-PLA foi caracterizada também por meio da técnica de espectroscopia de ressonância magnética nuclear ordenada por difusão (NMR/DOSY). DOSY é um experimento de NMR que permite separar diferentes compostos em uma mistura pela diferenciação dos coeficientes de translação difusional de cada espécie química em solução (MORRIS *et al.*, 1992). Esse experimento permite, também, separar os sinais de ressonância de cada espécie na mistura.

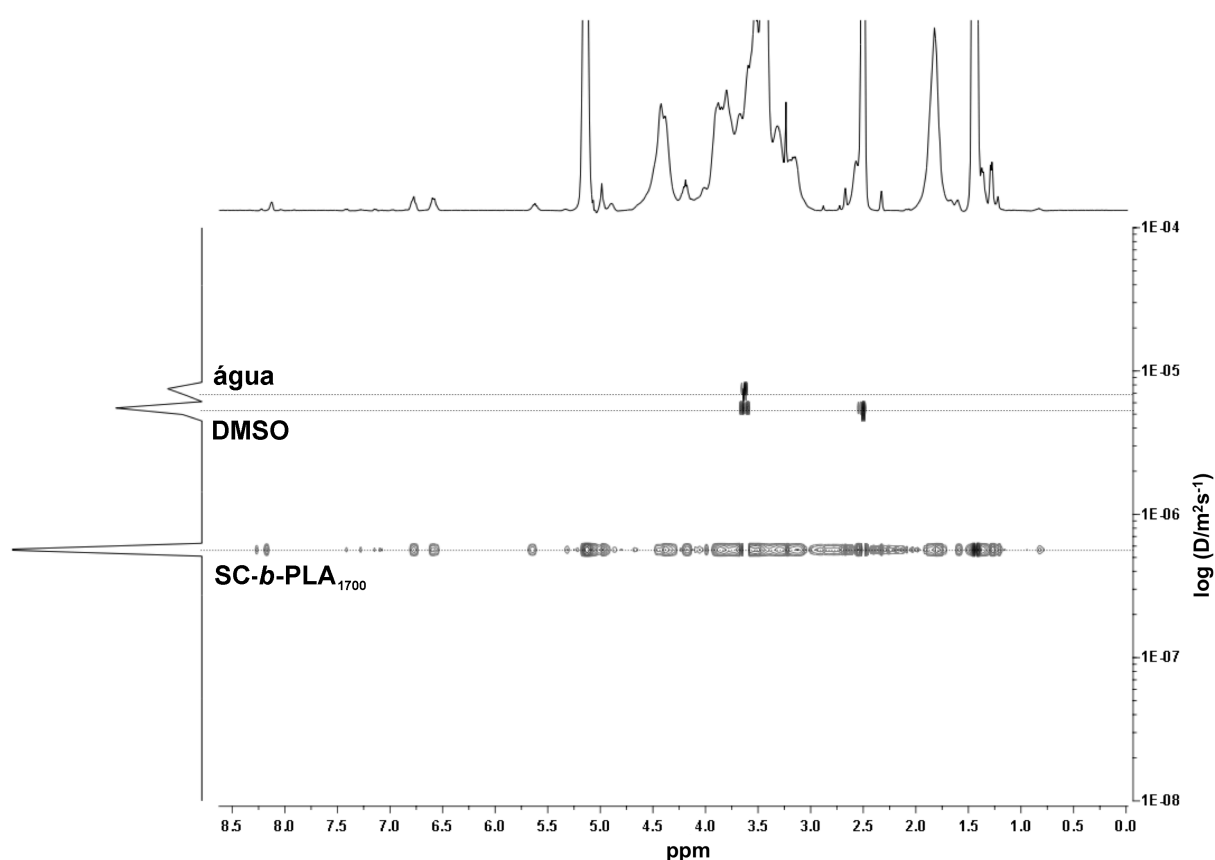


Figura 5.9. Espectro NMR/DOSY para SC-*b*-PLA₁₇₀₀ solubilizado em uma mistura DMSO-*d*₆/D₂O (400 MHz, 353 K).

Os dados obtidos a partir do experimento DOSY são mostrados na Figura 5.9. É mostrado no topo da representação gráfica um espectro de NMR ^1H em uma dimensão (1D) do copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e no eixo lateral são indicados os diferentes coeficientes de difusão. Analisando o gráfico em questão, é possível verificar que a mistura analisada é formada por pelo menos três espécies químicas com coeficientes de difusão diferentes. As duas primeiras espécies, as quais apresentam um maior coeficiente de difusão são os solventes deuterados usados para solubilizar o copolímero, nesse caso DMSO-*d*₆ e D₂O. No espectro atribuído ao DMSO-*d*₆ observa-se o aparecimento de dois sinais de ressonância, ao invés de um único sinal, geralmente, observado em δ 2,50 ppm. Isso ocorre devido à forte interação entre o DMSO-*d*₆/D₂O, a qual faz com que ocorra troca intermolecular dos átomos de hidrogênio (GOTTLIEB *et al.*, 1997). A terceira espécie química verificada é o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, a qual possui o menor coeficiente de difusão. Além disso, nota-se que os sinais de ressonância de ambos os blocos são perfeitamente alinhados no espectro de NMR ^1H do copolímero. Este padrão sugere que todos os sinais de ressonância observados pertencem à mesma macromolécula confirmando assim, a preparação do copolímero na reação de “*click chemistry*”. Os dados do experimento DOSY demonstram também que não ocorreu a formação de subprodutos durante a reação de “*click*” e que a metodologia empregada na purificação do copolímero permite recuperar o material de interesse e eliminar algum possível contaminante. Resultados similares do experimento DOSY foram obtidos para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀.

5.3.5. Automontagem dos copolímeros em bloco SC-*b*-PLA em água

Uma das propriedades mais interessantes observadas em sistemas anfífilicos é a sua capacidade de automontagem em meio aquoso. A força que governa esta automontagem é o chamado efeito hidrofóbico, o qual explica a tendência de moléculas não polares formarem agregados em meio aquoso (CLARKE, 1981). Devido ao efeito hidrofóbico, quando um sistema anfílico entra em contato com o ambiente aquoso, ele apresenta a capacidade de formar uma variedade de estruturas (por exemplo, micelas, vesículas, bicamadas, etc.). Essa

capacidade de formar diferentes estruturas nada mais é do que uma ação realizada pela molécula anfifílica no intuito de minimizar o contato entre a parte hidrofóbica e as moléculas de água (CLARKE, 1981; BORSALI *et al.*, 2001). Soma-se a isso o fato de que as estruturas formadas pelas moléculas anfifílicas aperfeiçoam, por outro lado, a repulsão entre as partes hidrofílicas (CLARKE, 1981; BORSALI *et al.*, 2001). O tipo de estrutura formada pela automontagem irá depender da estrutura da molécula anfifílica, de sua concentração, da temperatura e pressão do sistema (ISRALELACHVILI, 1992). Levando isso em consideração, nesse Capítulo, foram determinados os valores das concentrações micelares críticas (CMC) para os copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀. Conhecer esses valores é importante, pois permite determinar a concentração mínima necessária na qual o processo de automontagem dos copolímeros tem início.

Os espectros de emissão de fluorescência do pireno em função da concentração dos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ são apresentados na Figura 5.10(a,c). Analisando esses espectros é possível verificar que a intensidade de fluorescência do pireno aumentou proporcionalmente com o aumento da concentração dos copolímeros na solução. Estudos mostram que as propriedades de fluorescência do pireno são afetadas quando ele é transferido de um ambiente aquoso, exterior da micela, para um microambiente hidrofóbico, interior da micela (NAKAHARA *et al.*, 2005; GONÇALVES *et al.*, 2007; TOPEL *et al.*, 2013). Quando há essa transferência, ocorre um aumento na intensidade de fluorescência do pireno. As intensidades dos picos de emissão observados em 372 e 383 nm (denominados I_1 e I_3) estão relacionadas à polaridade do microambiente, no qual o pireno está dissolvido e a razão entre as intensidades I_1 e I_3 pode ser utilizada como indicador da solução micelar. A Figura 5.10(b,d) mostra o gráfico para variação da razão I_1/I_3 em função da concentração dos copolímeros. Os valores de CMC foram determinados a partir da intersecção das retas obtidas por regressão linear. Os valores de CMC determinados com base nos experimentos de fluorescência foram 0,158 mg/ml para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e 0,048 mg/ml para SC-*b*-PLA₆₅₀₀. Comparando os valores encontrados aqui com outros valores reportados na literatura para copolímeros com caráter anfifílico, é possível observar certa semelhança. Guo *et al.*

(2012) determinou que o valor de CMC para um copolímero baseado em celulose-g-PLA é igual a 0,130 mg/ml. Já Modolon *et al.* (2012), determinou um valor de CMC igual a 0,100 mg/ml para um copolímero em bloco formado por oligossacarídeos anfifílicos.

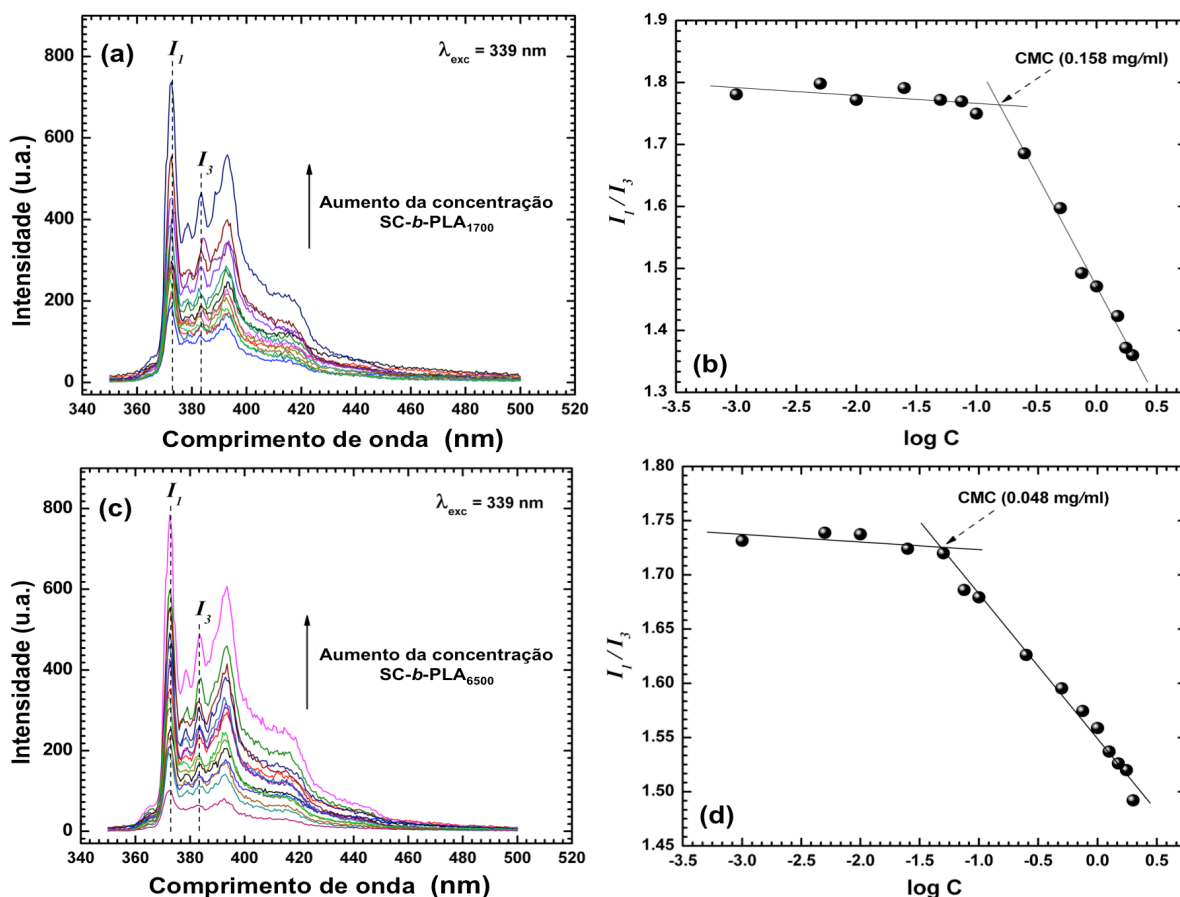


Figura 5.10. Espectros de emissão de fluorescência do pireno e variação da razão I_1/I_3 em função da concentração dos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ (a,b) e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ (c,d) ([pireno] = 3×10^{-4} mg/ml).

Comparando os valores de CMC determinados para os copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ fica evidente que a mudança na estrutura do bloco hidrofóbico (variação da massa molar do PLA), afeta o processo de automontagem do copolímero. O valor da CMC depende da razão entre o número de segmentos hidrofóbicos e segmentos hidrofílicos que formam o copolímero em bloco. Sistemas anfifílicos formam uma razão baixa entre esses segmentos, ou seja, o número de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos é semelhante, pois

possuem um alto valor de CMC. Por outro lado, quando a razão é alta, os números de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos são diferentes e menor é o valor determinado para a CMC (WANG *et al.*, 2008). Para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, a razão entre o número de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos é da ordem de 23/12 enquanto, que para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ essa é da ordem de 90/12. Dessa forma, é coerente que o copolímero formado com um bloco hidrofóbico de menor massa molar possua um valor de CMC maior do que aquele determinado para o copolímero formado por um bloco hidrofóbico de maior massa molar. Essa variação nos valores de CMC em função da razão entre o número de segmentos hidrofóbicos e hidrofílicos é devido às forças atrativas que aumentam ou diminuem em função do tamanho do bloco hidrofóbico (WANG *et al.*, 2008). Quando o número de fragmentos hidrofóbicos aumenta ocorre, consequentemente, a força atrativa entre as moléculas anfífilicas favorecendo a formação de micelas e diminuindo, portanto, o valor da CMC (ASTAFIEVA *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 2008). Do ponto de vista aplicacional, copolímeros em bloco que apresentam um baixo valor de CMC são preferíveis em relação aqueles com alto valor de CMC. Isso ocorre quando se deseja formar, por exemplo, um sistema de liberação de fármacos para atuar em administração intravenosa.

O movimento browniano das nanopartículas, as quais em meio aquoso mantêm-se em constante movimento, tem influência direta nas flutuações de intensidade da luz espalhada. A técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS) é capaz de medir e correlacionar essas flutuações na intensidade da luz espalhada, com as dimensões das nanopartículas em meio aquoso. Essas flutuações têm caráter temporal e fornecem informações a respeito da dinâmica das partículas quando em solução (ASTAFIEVA *et al.*, 1993). Nas Figuras 5.11 e 5.12 são mostrados: i) dados de função de correlação [$C(q,t)$] medida nos ângulos de espalhamento de 60°, 90° e 120°; ii) a distribuição dos tempos de relaxamento (A) medidos no ângulo de 90°; iii) a distribuição dos raios hidrodinâmicos (R_H) em função dos tempos de relaxação; iv) a dependência da frequência de relaxação (f) em função de q^2 , calculada usando a análise CONTIN; e v) os plotes de Guinier, os quais são calculados a partir da intensidade de

espalhamento de luz para nanopartículas dos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ em meio aquoso.

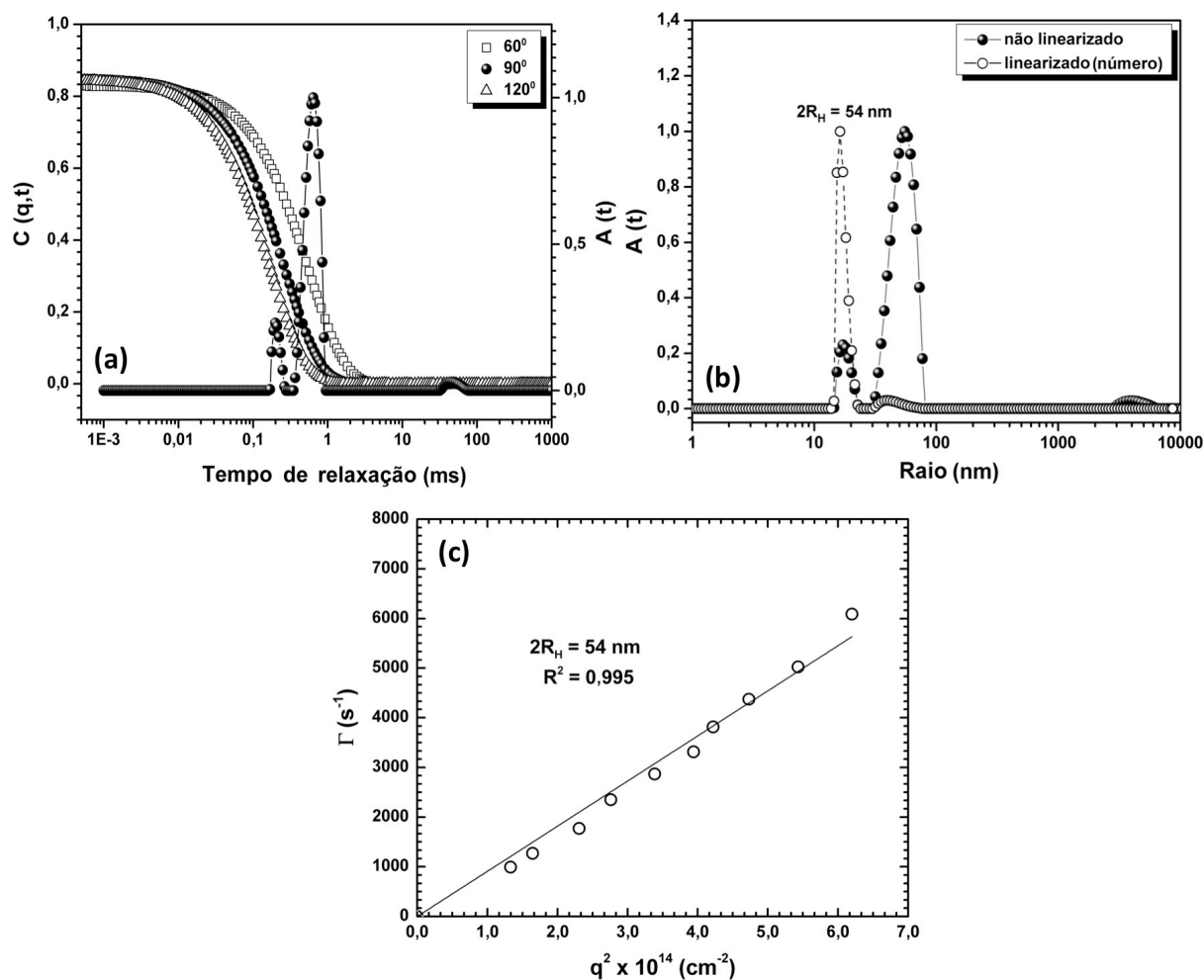


Figura 5.11. (a) Funções de correlação $C(q,t)$ medidas nos ângulos de varredura de 60° ($\square$), 90° ($\bullet$) e 120° (Δ) e distribuição do tempo de relaxação à 90° ($\bullet$) para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ em meio aquoso, (b) distribuição do raio hidrodinâmico (R_H) em função do tempo de relaxação (distribuição não linearizada e linearizada em função do número de partículas em solução) e (c) variação da frequência de relaxação (Γ) em função do valor quadrático do vetor de onda (q^2) (condições: [SC-*b*-PLA₁₇₀₀] = 3,0 mg/ml; temperatura = 25 °C).

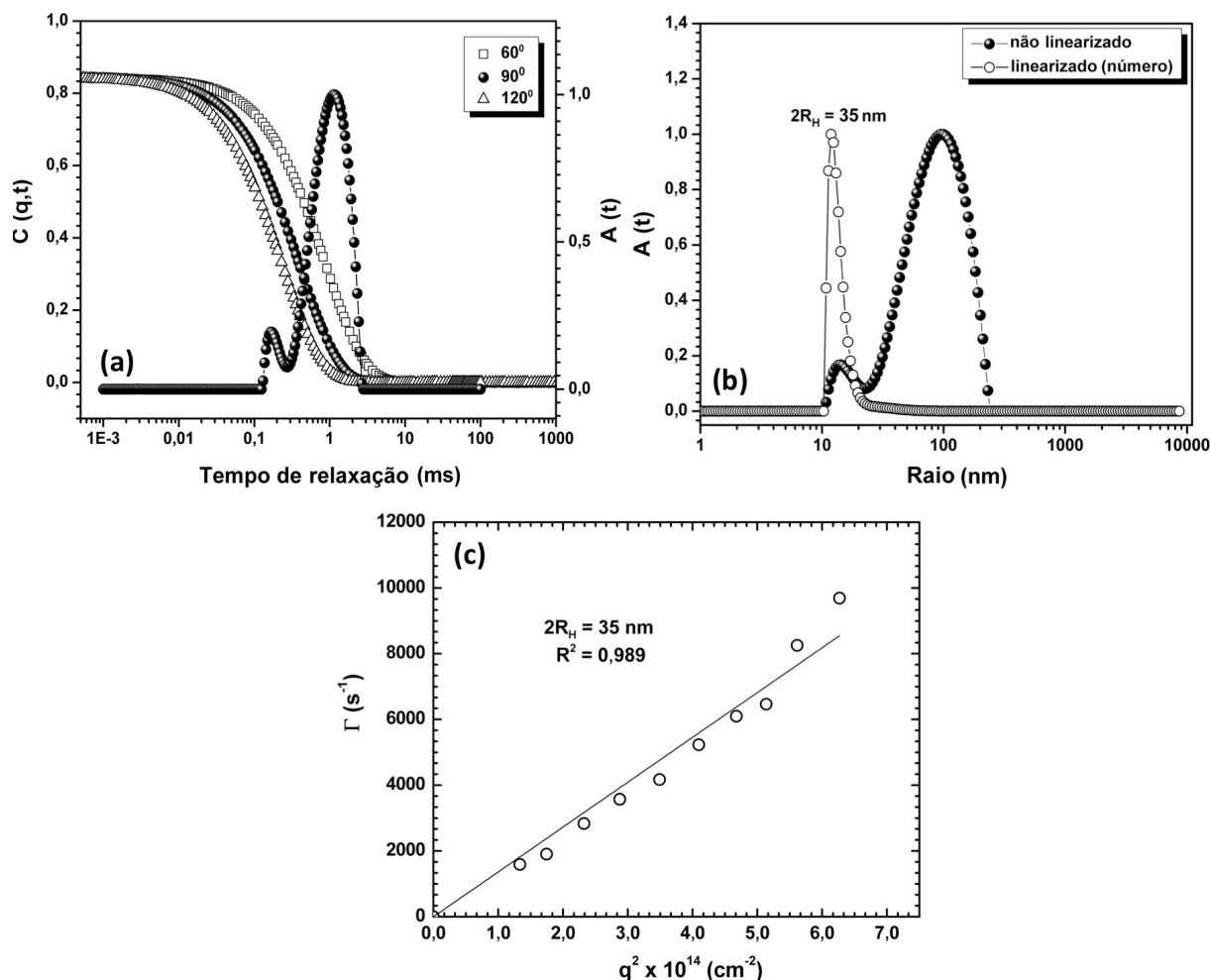


Figura 5.12. (a) Funções de correlação $C(q,t)$ medidas nos ângulos de varredura de 60° ($\square$), 90° ($\bullet$) e 120° ($\triangle$) e distribuição do tempo de relaxação à 90° ($\bullet$) para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ em meio aquoso, (b) distribuição do raio hidrodinâmico (R_H) em função do tempo de relaxação (distribuição não linearizada e linearizada em função do número de partículas em solução) e (c) variação da frequência de relaxação (Γ) em função do valor quadrático do vetor de onda (q^2) (condições: [SC-*b*-PLA₆₅₀₀] = 3,0 mg/ml; temperatura = 25 °C).

A partir das medidas de DLS para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ (Figura 5.11a) é possível visualizar o aparecimento de dois picos bem definidos na distribuição do tempo de relaxação, o que significa que esse sistema possui nanopartículas com dois diferentes tamanhos médios. O primeiro pico pode ser relacionado às micelas formadas pelo copolímero, uma vez que apresentam estruturas com menores tamanhos e, conseqüentemente, menores diâmetros. O segundo pico está relacionado a agregados mal definidos e que possuem

estruturas com maior escala dimensional, portanto, maiores diâmetros. Essa inferência é comprovada quando se lineariza a distribuição do tempo de relaxação em função do número de espécies em solução (Figura 5.11b). Como o número de micelas em solução é maior que o número de agregados, observa-se o desaparecimento do pico atribuído aos agregados após a linearização da distribuição do tempo de relaxação. De modo semelhante, analisando os dados obtidos por medidas de DLS para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ é possível verificar o aparecimento de dois picos na distribuição do tempo de relaxação (ver Figura 5.12a). Porém, a polidispersidade, neste caso, é maior do que aquela observada para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀. Isso se deve ao alargamento dos picos registrados para o sistema do copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀, o qual apresenta um pico menor relacionado às micelas com menores diâmetros e um segundo pico relacionado aos agregados mal definidos com maiores diâmetros. Novamente, após a linearização da distribuição do tempo de relaxamento é observado que o pico relacionado aos agregados formados no sistema desaparece (ver Figura 5.12b). Deve ser entendido a partir desses resultados, que as distribuições apresentadas nas Figuras 5.11a e 5.12a levam em consideração a massa ponderada das estruturas formadas. Isso significa que apesar dos picos relacionados às estruturas com grandes dimensões (agregados) possuírem maior intensidade, sua quantidade em número é muito menor (DAL BO *et al.*, 2012). Isto se deve ao fato da técnica de DLS ser extremamente sensível à presença de agregados mal-definidos. Para ambos os sistemas de copolímeros (SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀), os valores de R_H foram calculados a partir da frequência de relaxação usando a relação de Stokes-Einstein (equação 5.3). As Figuras 5.11c e 5.12c demonstram as variações angulares típicas das frequências de relaxação (I) plotadas em função de q^2 . O valor calculado de R_H para o sistema SC-*b*-PLA₁₇₀₀ foi de 27 nm (diâmetro, $2R_H = 54$ nm) e para o sistema SC-*b*-PLA₆₅₀₀ foi de 17,5 nm (diâmetro, $2R_H = 35$ nm) em meio aquoso.

Além da técnica de DLS, os sistemas aquosos formados pelos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ foram observados por microscopia eletrônica de varredura (SEM) em um microscópio equipado com uma fonte de elétrons por emissão de campo (SEM-FEG) e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). A partir das imagens, foi obtido o diâmetro

médio das nanopartículas utilizando o software Size Meter[®]. A Figura 5.13 mostra as imagens de SEM-FEG para os sistemas dos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ e também, as distribuições do diâmetro das nanopartículas.

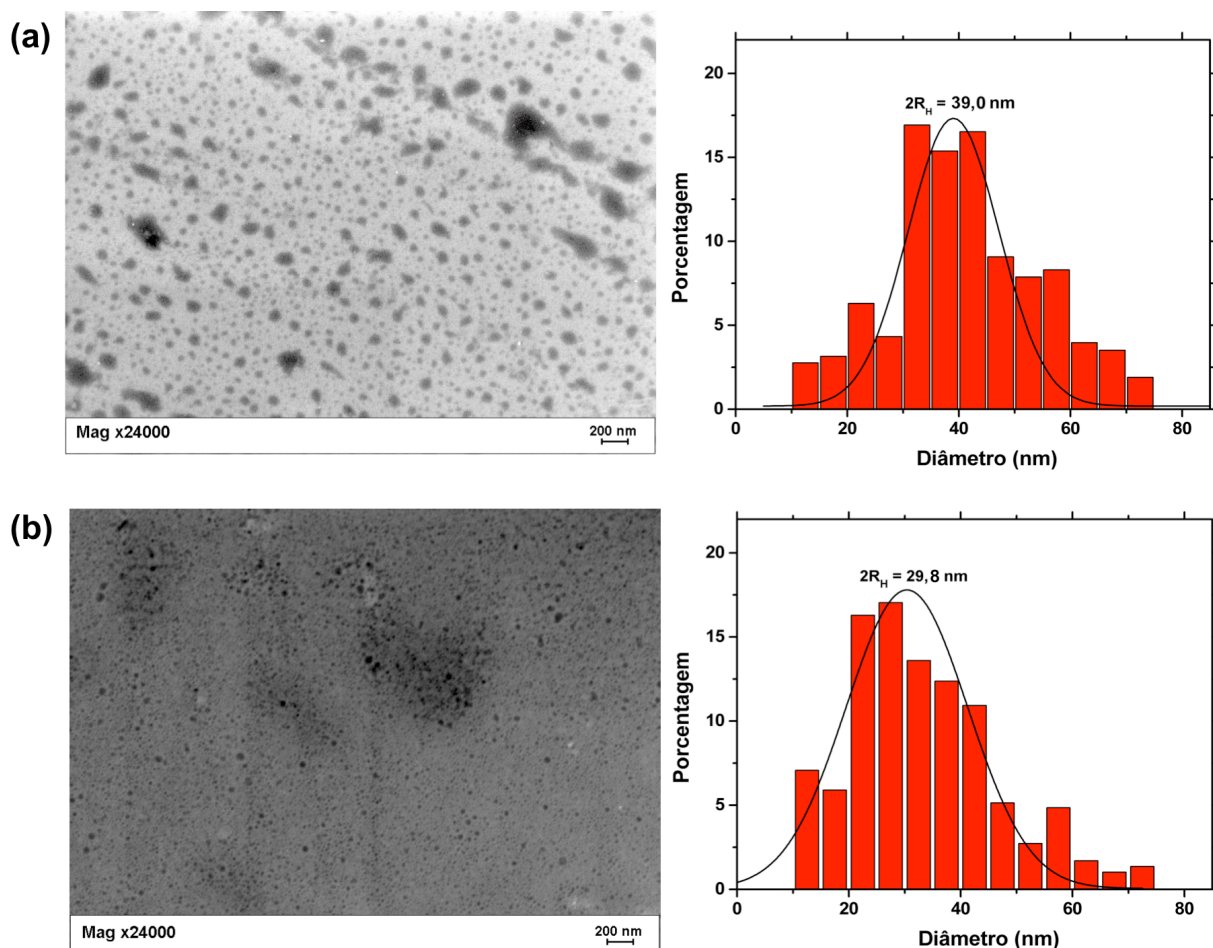


Figura 5.13. Imagens obtidas por SEM-FEG a partir dos sistemas formados pelos copolímeros **(a)**SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e **(b)**SC-*b*-PLA₆₅₀₀ com as distribuições do diâmetro das nanopartículas. ([copolímero] = 0,1 mg/ml, Mag x24000, barra de escala 200 nm).

A partir das imagens de SEM-FEG dos sistemas formados pelos copolímeros de SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ em meio aquoso, foram determinados os diâmetros médios das nanopartículas automontadas. Para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, as nanopartículas possuem diâmetro médio de $39,0 \pm 3,0$ nm enquanto que para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀, o diâmetro médio estimado foi de $29,8 \pm 3,0$ nm. Esses valores corroboram com os resultados obtidos a

partir das análises de DLS. Contudo, vale ressaltar que a discrepância nos valores dos diâmetros médios das nanopartículas determinados por DLS em relação aos valores determinados com base nas imagens de SEM-FEG está relacionada ao processo de desidratação sofrido pelas nanopartículas durante a preparação das amostras para microscopia. Para a obtenção das imagens, uma alíquota do sistema aquoso contendo os copolímeros é depositada sobre uma lâmina de sílica e, após, seca. Já a técnica de DLS, mede o tamanho aparente das nanopartículas em solução e os dados registrados levam em consideração a sua camada de hidratação/solvatação (SCHÄRTL, 2007). É possível verificar ainda que o processo de secagem favorece a formação de grandes agregados de nanopartículas. A fim de se obter uma melhor avaliação da morfologia e da dimensão das nanopartículas formadas pelos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀, imagens de microscopia eletrônica em transmissão (TEM) foram obtidas e são apresentadas na Figura 5.14. A partir das imagens de TEM foi observado que as nanopartículas formadas pelo sistema SC-*b*-PLA₁₇₀₀ apresentam diâmetro médio de $31,0 \pm 4,0$ nm enquanto que o sistema SC-*b*-PLA₆₅₀₀ mostra nanopartículas com diâmetro médio de $23,4 \pm 3,0$ nm. Para ambos os sistemas observou-se, ainda, que a morfologia das nanopartículas formadas é do tipo micelar onde é possível notar a formação de uma estrutura do tipo “*core-shell*” (casca-carço). Quando o feixe de elétrons, proveniente da fonte de emissão (neste caso um filamento de tungstênio), atravessa as nanopartículas, ocorre o espalhamento devido às diferentes densidades eletrônicas existentes nas mesmas. Pode ainda ocorrer, diferentes interações físicas entre os elétrons e as nanopartículas (SCHÄRTL, 2007). No caso dos copolímeros em bloco formados nesse Capítulo, o bloco formado pelo SC possui maior densidade eletrônica do que o bloco PLA. Isso faz com que na imagem obtida por TEM a região mais clara das nanopartículas (carço) seja atribuída ao PLA_n enquanto que a região mais escura (casca), seja atribuída ao SC.

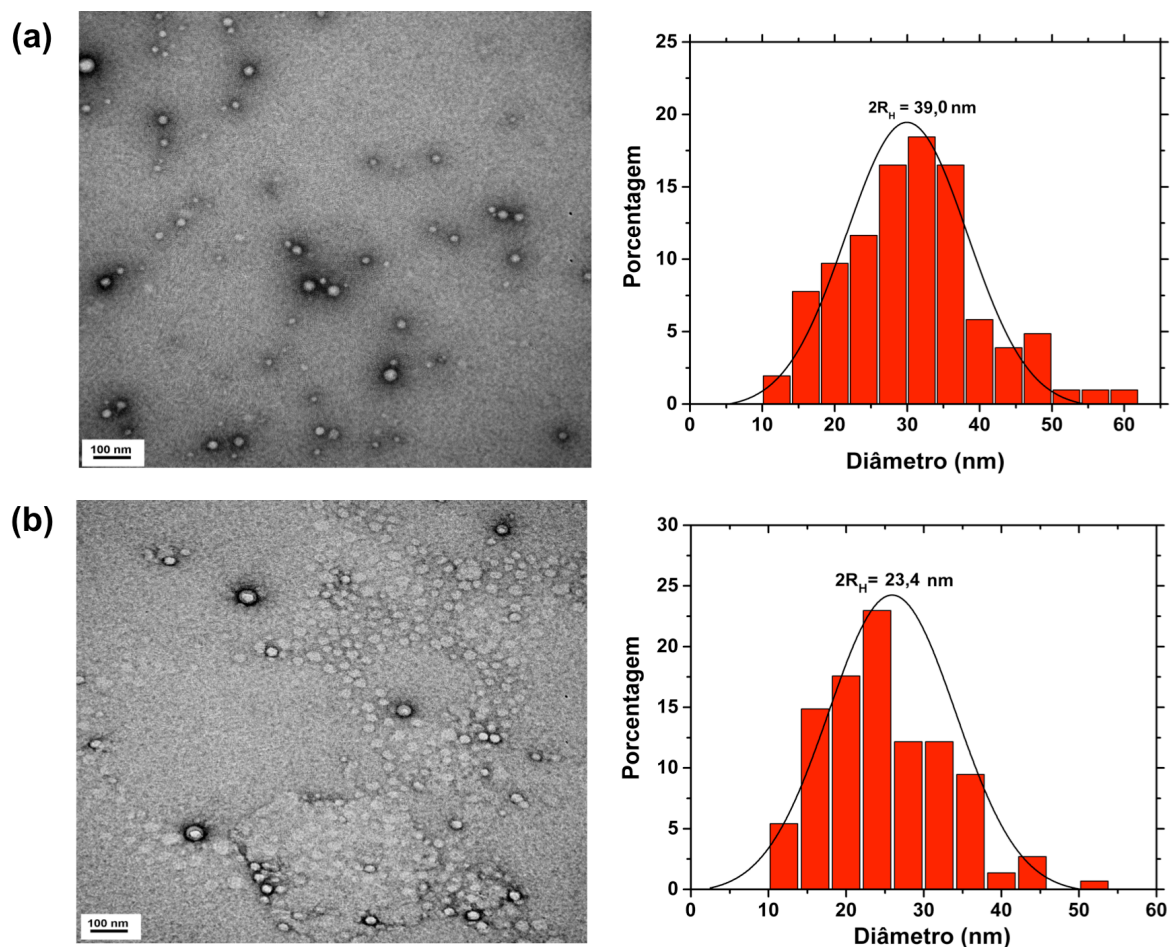


Figura 5.14. Imagens obtidas por TEM a partir dos sistemas formados pelos copolímeros **(a)** SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e **(b)** SC-*b*-PLA₆₅₀₀ com as distribuições do diâmetro das nanopartículas.

([copolímero] = 0,1 mg/ml, Mag x120000, barra de escala 100 nm)

Ao analisar os dados obtidos por DLS, SEM-FEG e TEM é possível inferir que as nanopartículas formadas pelo copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ apresentaram diâmetro médio maior que as nanopartículas formadas pelo copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀. Essa discrepância no diâmetro das nanopartículas pode ser explicada pelo fato de que para a automontagem das nanopartículas de SC-*b*-PLA₁₇₀₀, o número de cadeias do copolímero é maior. O valor da CMC para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ é de 0,158 mg/ml enquanto que para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀ esse valor cai para 0,048 mg/ml, ou seja, o número de cadeias necessárias para formação das nanopartículas de SC-*b*-PLA₁₇₀₀ é maior que o número de cadeias de SC-*b*-PLA₆₅₀₀ necessárias para a mesma finalidade. Sendo a automontagem das nanopartículas

governada pelas forças hidrofóbicas, a redução no tamanho do bloco hidrofóbico exige que um número maior de cadeias interaja para a formação da micela. O maior número de cadeias de copolímero aumenta a densidade de blocos hidrofílicos (casca) e hidrofóbicos (caroço). Esse aumento na densidade de cadeias produz um aumento na espessura das nanopartículas e um aumento no diâmetro do interior hidrofóbico, o que foi confirmado por meio da análise das imagens obtidas por TEM. Ainda, sendo a parte exterior das nanopartículas formadas por SC, um polissacarídeo com característica polianiônica, devido à presença de grupos sulfato e carboxilato em sua estrutura tem-se que a formação das nanopartículas em meio aquoso aumenta a densidade de cargas negativas nessa região. Em meio aquoso, os grupos funcionais do SC encontram-se em sua forma não protonada ($-\text{OSO}_3^-$ e $-\text{COO}^-$), o que gera uma repulsão do tipo ânion-ânion entre as cadeias de SC. Tal repulsão causa o afastamento das cadeias de SC e promove o aumento da camada hidratada ao redor das nanopartículas. Esse efeito é mais evidente nas nanopartículas formadas pelo copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, uma vez que a densidade de cadeias de SC que formam a camada externa das nanopartículas é maior. Os dados de DLS, onde se leva em conta a camada de hidratação, demonstraram a maior disparidade entre o diâmetro médio calculado para as nanopartículas de SC-*b*-PLA₁₇₀₀ ($2R_H = 54 \text{ nm}$) e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ ($2R_H = 35 \text{ nm}$). A disparidade é atenuada quando são comparados os valores do diâmetro médio das nanopartículas de SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ obtidos por técnicas de microscopia. A formação desse tipo de nanopartículas possibilita, além da incorporação de espécies hidrofóbicas no interior das nanopartículas automontadas, a incorporação/decoração de espécies catiônicas na parte externa (casca) das nanopartículas. Essa característica aumenta o potencial de aplicação das nanopartículas formadas nesse Capítulo.

5.4. CONCLUSÃO

Neste Capítulo foi apresentada uma metodologia eficiente para obtenção de um novo tipo de copolímero em bloco, com característica anfifílica, baseado em sulfato de condroitina (SC) e poli(ácido láctico) (PLA). A síntese desenvolvida permitiu a preparação de copolímeros em blocos, com partes hidrofílicas e partes hidrofóbicas de tamanhos diferentes. Para a síntese dos copolímeros, o SC, após ter sua massa molar reduzida por meio de uma reação de degradação enzimática, foi funcionalizado com grupos alcino em sua posição terminal (SC-alcino). Já o PLA foi funcionalizado com grupos azida em sua posição terminal, porém, foi necessária a preparação de um composto intermediário. Os polímeros funcionalizados (SC-alcino e PLA_n-N₃) foram obtidos com sucesso e caracterizados por diferentes técnicas instrumentais (NMR ¹H e ¹³C e FTIR). Os copolímeros SC-*b*-PLA foram sintetizados por “*click chemistry*” utilizando Cu(I) como catalisador e caracterizados por NMR (¹H, DOSY) e por FTIR. Foram investigados, também, a capacidade e o comportamento de automontagem dos copolímeros em meio aquoso. Para o copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀, o valor da CMC determinado foi de 0,158 mg/ml enquanto que para o copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀, o valor da CMC foi de 0,048 mg/ml. O diâmetro médio e a morfologia das nanopartículas automontadas dos copolímeros SC-*b*-PLA₁₇₀₀ e SC-*b*-PLA₆₅₀₀ em meio aquoso foram determinados por DLS e por microscopia (SEM-FEG e TEM). Verificou-se por meio dessas técnicas, que as nanopartículas formadas pelo copolímero SC-*b*-PLA₁₇₀₀ apresentam diâmetro médio maior do aquele observado para as nanopartículas formadas pelo copolímero SC-*b*-PLA₆₅₀₀. A morfologia das nanopartículas para ambos os copolímeros é do tipo micelar onde a parte externa (“*shell*”) é formada pelo SC (parte hidrofílica) e a parte interna (“*core*”) é formada pelo PLA (parte hidrofóbica). A síntese desse novo copolímero com caráter anfifílico (SC-*b*-PLA) por meio de uma metodologia viável e a obtenção de nanopartículas automontadas possibilita a obtenção de um novo tipo de biomaterial capaz, por exemplo, de ser aplicado como veículo para liberação controlada de fármacos.

5.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M. L.; LAVASANIFAR, A.; KWON, G. S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 92, n. 7, p. 1343-1355 (2003).

ADEBOWALE, A. O. *et al.* Analysis of glucosamine and chondroitin sulfate content in marketed products and the Caco-2 permeability of chondroitin sulfate raw materials. *Journal of American Nutraceutical Association*, v. 3, p. 7 (2000).

ARIGELA, R. K. *et al.* Cascade intermolecular michael addition-intramolecular azide/internal alkyne 1,3-dipolar cycloaddition reaction in one pot. *Organic Letters*, v. 14, n. 7, p. 1804-1807 (2012).

ASTAFIEVA, I.; ZHONG, X. F.; EISENBERG, A. Critical micellization phenomena in block polyelectrolyte solutions. *Macromolecules*, v. 26, n. 26, p. 7339-7352 (1993).

BORSALI, R. *et al.* Scattering properties of rod-coil and once-broken rod block copolymers. *Macromolecules*, v. 34, n. 12, p. 4229-4234 (2001).

BOUGARD, F. *et al.* Influence of the macromolecular architecture on the self-assembly of amphiphilic copolymers based on poly(N,N-dimethylamino-2-ethyl methacrylate) and poly(epsilon-caprolactone). *Langmuir*, v. 24, n. 15, p. 8272-8279 (2008).

CHO, S. Y. *et al.* Effects of low molecular weight chondroitin sulfate on type II collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 27, n. 1, p. 47-51 (2004).

CLARKE, S. The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. *Journal of Chemical Education*, v. 58 (1981).

DAL BO, A. G. *et al.* Self-assembly of amphiphilic glycoconjugates into lectin-adhesive nanoparticles. *Langmuir*, v. 28, n. 2, p. 1418-1426 (2012).

FRANCO, R. A.; THI HIEP, N.; LEE, B.-T. Preparation and characterization of electrospun PCL/PLGA membranes and chitosan/gelatin hydrogels for skin bioengineering applications. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, v. 22, n. 10, p. 2207-2218 (2011).

FU, L. *et al.* Fabrication of novel cellulose/chitosan artificial skin composite. *Materials Research*, Pts 1 and 2, v. 610-613, p. 1034-1038 (2009).

- GACAL, B. N. *et al.* Pyrene functional poly(vinyl alcohol) by "click" chemistry. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, v. 47, n. 5, p. 1317-1326 (2009).
- GONCALVES, C.; MARTINS, J. A.; GAMA, F. M. Self-assembled nanoparticles of dextrin substituted with hexadecanethiol. *Biomacromolecules*, v. 8, n. 2, p. 392-398 (2007).
- GORUR, M. *et al.* Synthesis of pyrene end-capped a6 dendrimer and star polymer with phosphazene core via "click chemistry". *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, v. 49, n. 14, p. 3193-3206 (2011).
- GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *Journal of Organic Chemistry*, v. 62, n. 21, p. 7512-7515 (1997).
- GUERRY, A. *et al.* Aniline-catalyzed reductive amination as a powerful method for the preparation of reducing end-"clickable" chitooligosaccharides. *Bioconjugate Chemistry*, v. 24, p. 544-549 (2013).
- GUO, Y. *et al.* Self-assembly and paclitaxel loading capacity of cellulose-graft-poly(lactide) nanomicelles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, n. 15, p. 3900-3908 (2012).
- HUANG, S.-J. *et al.* Folate-mediated chondroitin sulfate-Pluronic (R) 127 nanogels as a drug carrier. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 38, n. 1, p. 64-73, Aug 12 (2009).
- HVILSTED, S. Facile design of biomaterials by 'click' chemistry. *Polymer International*, v. 61, n. 4, p. 485-494 (2012).
- ISRALELACHVILI, J. *Intermolecular and surfaces forces*. 2ed. Academic Press (1992).
- JEONG, J. H. *et al.* Polymer micelle-like aggregates of novel amphiphilic biodegradable poly(asparagine) grafted with poly(caprolactone). *Polymer*, v. 44, n. 3, p. 583-591 (2003).
- KLOK, H. A. Biological-synthetic hybrid block copolymers: Combining the best from two worlds. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, v. 43, n. 1, p. 1-17 (2005).
- LASPRILLA, A. J. R. *et al.* Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 1, p. 321-328 (2012).

LEE, C. T.; HUANG, C. P.; LEE, Y. D. Preparation of amphiphilic poly(L-lactide)-graft-chondroitin sulfate copolymer self-aggregates and its aggregation behavior. *Biomacromolecules*, v. 7, n. 4, p. 1179-1186 (2006).

MENG, F.; ZHONG, Z.; FEIJEN, J. Stimuli-Responsive Polymersomes for Programmed Drug Delivery. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 2, p. 197-209 (2009).

MODOLON, S. D. M. *et al.* Sweet block copolymer nanoparticles: preparation and self-assembly of fully oligosaccharide-based amphiphile. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 4, p. 1129-1135 (2012).

MORRIS, K. F.; JOHNSON, C. S. Diffusion-ordered 2-dimensional nuclear-magnetic-resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, v. 114, n. 8, p. 3139-3141 (1992).

NAKAHARA, Y. *et al.* New fluorescence method for the determination of the critical micelle concentration by photosensitive monoazacryptand derivatives. *Langmuir*, v. 21, n. 15, p. 6688-6695 (2005).

NARDIN, C. *et al.* Amphiphilic block copolymer nanocontainers as bioreactors. *European Physical Journal E*, v. 4, n. 4, p. 403-410 (2001).

PIERRE-ANTOINE, F.; FRANCOIS, B.; RACHIDA, Z. Crosslinked cellulose developed by CuAAC, a route to new materials. *Carbohydrate Research*, v. 356, p. 247-251 (2012).

SAITOH, H. *et al.* Enzymatic Reconstruction Of Glycosaminoglycan Oligosaccharide Chains Using The Transglycosylation Reaction Of Bovine Testicular Hyaluronidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 8, p. 3741-3747 (1995).

SCHÄRTL, W. *Light scattering from polymer solutions and nanoparticles dispersions*. Springer Laboratory (2007).

TAKAGAKI, K. *et al.* Characterization Of Hydrolysis And Transglycosylation By Testicular Hyaluronidase Using Ion-Spray Mass-Spectrometry. *Biochemistry*, v. 33, n. 21, p. 6503-6507 (1994).

TOPEL, O. *et al.* Determination of critical micelle concentration of polybutadiene-block-poly(ethyleneoxide) diblock copolymer by fluorescence spectroscopy and dynamic light scattering. *Journal of Molecular Liquids*, v. 177, p. 40-43 (2013).

WANG, Y.-C. *et al.* Self-assembled micelles of biodegradable triblock copolymers based on poly(ethyl ethylene phosphate) and poly(epsilon-caprolactone) as drug carriers. *Biomacromolecules*, v. 9, n. 1, p. 388-395 (2008).

WASTESON, A. Properties of fractionated chondroitin sulphate from ox nasal septa. *Biochemical Journal*, v. 122, n. 4, p. 477-483 (1971).

YAMAGUCHI, K.; TAMAKI, H.; FUKUI, S. Detection of oligosaccharide ligands for Hepatocyte growth factor/Scatter factor (HGF/SF), Keratinocyte growth factor (KGF/FGF-7), RANTES and Heparin cofactor II by neoglycolipid microarrays of glycosaminoglycan-derived oligosaccharide fragments. *Glycoconjugate Journal*, v. 23, n. 7-8, p. 513-523(2006).

CAPÍTULO 6

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados contidos nesta Tese demonstram a potencialidade dos polissacarídeos quitosana (QT) e sulfato de condroitina (SC) e do polímero poli(ácido láctico) (PLA) na obtenção de novos materiais, com o objetivo de serem aplicados como biomateriais. A partir dos dois polissacarídeos foram obtidos e estudados diferentes materiais com propriedades interessantes. Esses materiais demonstraram grande potencial para serem utilizados eficientemente no campo da biotecnologia, sendo boas alternativas para superar alguma limitação dos materiais já existentes, por meio de aplicação conjunta, ou mesmo substituí-los. Os resultados apresentados no Capítulo 2 demonstram a formação de um novo tipo de hidrogel onde ambos tipos de rede, química e fisicamente reticuladas, estão presentes. A perspectiva é que aquela metodologia possa ser utilizada para melhorar alguma(s) propriedade(s) dos hidrogéis químicos ou ainda, modular esses hidrogéis para serem aplicados com maior especificidade, por exemplo, em sistemas de liberação controlada de fármacos. Já no Capítulo 3, uma série de ensaios biológicos mostra que o complexo polieletrólítico de QT/SC, material já conhecido na literatura, apresenta características físico-químicas e biológicas interessantes e desejáveis para aplicação como substrato no cultivo de células e de tecidos. Esse material poderá ser testado, posteriormente, como substrato para diferentes tipos de células, na reconstrução óssea, como implantes injetáveis e na formação de órgãos. Seguindo essa mesma linha de pesquisa, os filmes de QT/SC carregados com o fármaco AgSD, apresentados no Capítulo 4, mostraram potencial para atuarem como revestimento de ferimentos decorrentes, por exemplo, de queimadura. Além de evitar a contaminação da região afetada, estes filmes podem auxiliar na reconstrução celular e acelerar a recuperação do paciente. Estudos posteriores podem ser realizados para incorporar outros fármacos na matriz polimérica. Ensaios *in vivo* podem confirmar a viabilidade de aplicação dos mesmos. Por fim, fazendo uso de diferentes técnicas de síntese orgânica e de uma reação do tipo “click

chemistry”, foi possível sintetizar um copolímero em bloco entre o SC e o PLA como descrito no Capítulo 5. Esse novo copolímero, inédito, demonstrou ter a capacidade de se automontar em meio aquoso, formando estruturas micelares do tipo casca-caroço, as quais podem atuar eficientemente como carreadores na liberação controlada de fármacos hidrofóbicos. A casca hidrofílica formada por SC poderá ser decorada com compostos carregados positivamente (por exemplo, QT) visando futuras aplicações. Além disso, outros testes podem ser realizados utilizando o copolímero SC-*b*-PLA para a formação de diferentes estruturas automontadas, de filmes finos organizados e, também, de outros materiais.