

DOUGLAS LOPES CASSIMIRO

**Obtenção e estudo de polímeros supramoleculares derivados de ácidos carboxílicos-meglumina em fase aquosa**

Tese apresentada ao Instituto de Química,  
Universidade Estadual Paulista, como  
parte dos requisitos para a obtenção do  
título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roselena Faez

Araraquara

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

C345o	<p>Cassimiro, Douglas Lopes Obtenção e estudo de polímeros supramoleculares derivados de ácidos carboxílicos-meglumina em fase aquosa / Douglas Lopes Cassimiro. – Araraquara : [s.n], 2015 98 f. : il.</p> <p>Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Clóvis Augusto Ribeiro Coorientador: Roselena Faez</p> <p>1. Química supramolecular. 2. Polímeros. 3. Ligação de hidrogênio. 4. Equilíbrio. 5. Ácidos graxos. I. Título.</p>
-------	---

DOUGLAS LOPES CASSIMIRO

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Araraquara, 25 de fevereiro de 2015.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. CLÓVIS AUGUSTO RIBEIRO (Orientador)  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara – SP



Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES  
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD  
Centro Universitário de Araraquara / UNIARA / Araraquara – SP



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. MARIA PALMIRA DAFLON GREMIÃO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP



Prof. Dr. SALVADOR CLARO NETO  
Instituto de Química / USP / São Carlos - SP

## **DADOS CURRICULARES**

### **DOUGLAS LOPES CASSIMIRO**

#### **1. Dados Pessoais**

Nascimento: 20 de abril de 1982

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Nova Iguaçu-RJ

Filiação: José Roberto Cassimiro

Lizete França Lopes Cassimiro

Estado civil: solteiro

Profissão: Farmacêutico industrial

Endereço: Rua Jardel Filho, 360, Bairro Vila Regina

CEP: 39400 - 125, Montes Claros - MG

#### **2. Formação acadêmica/Titulação**

##### **2.1. Mestrado**

Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. Concluído em 28 de junho de 2010.

##### **2.2. Graduação**

Bacharel em Farmácia – Habilitação em Farmácia Industrial, Universidade de Uberaba, Uberaba, MG. Concluído em 22 de dezembro de 2007.

#### **3. Atividades acadêmicas relevantes**

Supervisão da aluna de iniciação científica Livia Ferreira no trabalho “Síntese e avaliação em meio aquoso de surfactantes poli-hidroxilados na forma de adutos carboxilato-meglumina”. Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2015.

Supervisão do aluno Marco Antonio Lopes Junior no TCC intitulado “Síntese do surfactante derivado do ácido esteárico-meglumina e sua avaliação em meio aquoso.” Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2012.

Participação em banca de conclusão de curso de Naiara Fachinetti. Título do trabalho: “Avaliação do potencial de carreadores lipídicos nanoestruturados para administração cutânea de trans-revesteroil.” Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2013.

Membro da Comissão organizadora do VIII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria – CBRATEC, Campos do Jordão, SP, 2011.

Membro da Comissão organizadora do VII Congresso Brasileiro de Análise Térmica e Calorimetria – CBRATEC, Águas de São Pedro, SP, 2010.

Bolsista didático das disciplinas Química Analítica Quantitativa e Métodos Instrumentais de Análise nos cursos de bacharelado em Química e bacharelado em farmácia. Instituto de Química – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2010-2012.

Monitoria da disciplina Ciências Tecnológicas III (Química analítica) – Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, 2006.

Monitoria da disciplina Formação Profissional II (Química geral) – Universidade de Uberaba, Uberaba, MG, 2004.

#### **4. Trabalhos publicados**

CHANDRAN, R.; CASSIMIRO, D. L.; MELO, W. C. M. A. Polymeric nanomaterials for tissue regeneration In: MISHRA, M. **Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials** New York: Taylor & Francis, 2015.

CASSIMIRO, D. L.; FERREIRA, L. M. B.; CAPELA, J. M. V.; CRESPI, M. S.; RIBEIRO, C. A. Kinetic parameters for thermal decomposition of supramolecular polymers derived from diclofenac-meglumine supramolecular adducts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, n. 1 p. 24-28, 2013.

CASSIMIRO, D. L.; KOBELNIK, M.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; BORALLE, N. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin-meglumine supramolecular adducts. **Thermochemica Acta**, v. 529, n. 1, p. 59-67, 2012.

CASSIMIRO, D. L.; CAPELA, J. M. V.; CRESPI, M. S.; CAPELA M. V. Kinetic parameters for thermal decomposition of supramolecular polymers derived from flunixin-meglumine adducts. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 105, n. 2, p. 405-410, 2011.

*Aos meus pais Roberto e Lizete pelo amor, carinho, incentivo e força. Obrigado pelo ombro amigo que sei que posso contar sempre.*

*A Wanessa que sempre esteve ao meu lado nos momentos mais importantes da minha vida.*

*Ao Prof. Dr. Clóvis Augusto Ribeiro e a Profa. Dra. Marisa Spirandeli Crespi pela amizade sincera, conselhos, orientação e confiança.*

## RESUMO

Polímeros que possuem monômeros unidos via interações intermoleculares são definidos como polímeros supramoleculares. A natureza reversível das interações assegura que o polímero supramolecular exista em equilíbrio termodinâmico com seus monômeros. Isto implica que as cadeias do polímero podem romper-se e recombinar, tornando este material hábil em responder a mudanças externas ao sistema, como variação de temperatura, solvente, variação de pH, força mecânica, radiação, etc. Poucas substâncias são capazes de sofrer polimerização supramolecular, pois para que propriedades poliméricas sejam aparentes em fase sólida ou em solução, as interações intermoleculares devem ser fortes e direcionais. Reagindo qualquer tipo de ácido orgânico com um aminocarboidrato denominado meglumina é produzido o par iônico, genericamente chamado de carboxilato-meglumina. Este estudo mostra que compostos carboxilato-meglumina anfífilos derivados de ácidos graxos polimerizam em fase aquosa via interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. Os monômeros adotam um arranjo lamelar e o polímero supramolecular resultante, se estrutura em uma rede tridimensional de fibras onde a água é imobilizada formando um hidrogel. A correlação entre a polimerização e a característica da cadeia carbônica proveniente do ácido graxo precursor foi elucidada, permitindo identificar que o *balanço hidrofílico/hidrofóbico* é a propriedade que governa a polimerização supramolecular dos compostos carboxilato-meglumina em água. Para tanto foram utilizados ácidos análogos com cadeias de tamanhos iguais C18, neste caso, os ácidos esteárico (octadecanóico) e oleico (9-*cis*-octadecenóico) e também ácidos saturados de cadeias distintas, undecanóico (C11) e palmítico (hexadecanóico) (C16). O caráter reversível das interações intermoleculares no polímero supramolecular em função da temperatura e também com a concentração foi demonstrado. Por fim, foi estudado o potencial do hidrogel estearato-meglumina associado com os antifúngicos cetoconazol e fluconazol, como estratégia para inibição do biofilme da *Candida albicans*, o fungo causador da candidíase. Estes antifúngicos foram capazes de inibir no máximo 80 % do biofilme enquanto que na presença do hidrogel estearato-meglumina, os mesmos apresentaram maior eficiência, inibindo praticamente 100 % do biofilme fúngico. Possivelmente o aumento da permeabilidade do biofilme causada pelo hidrogel estearato-meglumina foi o responsável pela maior eficiência dos antifúngicos.

**Palavras-chave:** compostos carboxilato-meglumina, interações intermoleculares, polímero supramolecular, hidrogel

## ABSTRACT

Supramolecular polymers are monomer units held together by intermolecular interactions. The reversible nature of the interactions makes that supramolecular polymer be under thermodynamic conditions with the monomers. Thus the polymer chains undergo reversible breaking and reformation making the supramolecular material highly susceptible to temperature, solvents, pH, mechanical force, radiation and so on. Only a few compounds are able to undergoing supramolecular polymerization, once to obtain high polymerization degrees in bulk or in solution is required a strong and directional intermolecular force. When any type of organic acid is reacted with meglumine occurs the formation of a ionic pair, called carboxilate-meglumine compound. This study shows the amphiphilic carboxilate-meglumine compounds originated from fatty acids, suffer polymerization in aqueous phase by hydrophobic interaction and hydrogen bonds. The monomers adopt a lamellar array that result in a supramolecular polymer which form a tridimensional net where the water is immobilized forming a hydrogel. The relationship between polymerization and the carbonic chain of fatty acid allowed identify that the hydrophilic/hidrophobic is the property that controls the supramolecular polymerization of the carboxilate-meglumine compound in water. To prove that were used the estearic acids (octadecanoic) and oleic acid (9-*cis*-octadecanoic) that have chains of C18 size; and the saturated acids with distinct chains as underdecanoic (C11) and hexadecanoic (C16). The dynamic behavior of these materials was evaluated, once the intermolecular interactions of supramolecular polymer present a reversible character that is dependent of temperature and concentration. Finally, we studied the potential of stearate-meglumine hydrogel associated with antifungals (ketoconazole and fluconazole), as a strategy for inhibiting biofilm of *Candida albicans*, the fungus that causes candidiasis. This association increased the antimicrobial efficiency once inhibited almost 100 % of the fungal biofilms, while only the antifungal were capable to inhibit at maximum 80 %. So, we suggest that hydrogel enhance the *C. albicans* biofilms permeability, allowing greater interaction of the antifungal with the fungal.

**Keywords:** carboxilate-meglumine compounds, intermolecular interactions, supramolecular polymer, hydrogel.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular do monômero carboxilato-meglumina conhecido como flunixinameglumina. Após a fusão do composto cristalino e resfriamento do líquido, os monômeros se organizam formando um filme polimérico caracterizado como um PS de elevada massa molecular. Em destaque estão indicados os grupos hidroxila que de acordo com resultados experimentais são os principais envolvidos na polimerização supramolecular mediante ligações de hidrogênio .....17
- Figura 2.** Estrutura dos monômeros derivados da ureia que polimerizam em solventes polares na forma de camadas, mediante ligações de hidrogênio através dos grupos amida (a). Os anéis aromáticos (b) contribuem com interações do tipo  $\pi\cdots\pi$  auxiliando as ligações de hidrogênio, aumentando a força de atração entre os monômeros. O PS é estável, pois moléculas do solvente entram em contato com a região polar mais periférica (c), enquanto que as ligações de hidrogênio ficam protegidas em um ambiente hidrofóbico ou solvatofóbico formado pelas cadeias alquílicas (d) que se agregam pela ação das interações hidrofóbicas, em água, ou solvatofóbicas, que surgem em outros solventes polares .....18
- Figura 3.** Obtenção de compostos anfífilos derivados da meglumina: (a) composto carboxilato-meglumina no qual a cadeia carbônica e o aminocarboidrato são unidos por interação eletrostática (síntese supramolecular) empregando uma reação ácido-base. (b) surfactante poli-hidroxiado no qual o aminocarboidrato é unido à cadeia carbônica através de ligação covalente empregando uma reação de acilação .....20
- Figura 4.** Exemplos comuns de ligações entre os fragmentos hidrofílicos e hidrofóbicos em surfactantes poli-hidroxiados. (a) Éster de sacarose, (b) Alquil glicosídeo, (c) Éster de sorbitano e (d) N-metil glucamida .....20
- Figura 5.** Formação do biofilme de *C. albicans* .....24
- Figura 6.** Tempo de ação do antimicrobiano no biofilme..... 25
- Figura 7.** Canais aquosos no biofilme.....25
- Figura 8.** Domínios da Química molecular e supramolecular .....28
- Figura 9.** Primeira proposta de estrutura da borracha natural datada de 1905 resultante da auto-montagem do dimetil-ciclo-octadieno através de interações  $\pi\cdots\pi$ , anterior aos conceitos da química supramolecular.....28
- Figura 10.** Evolução temporal da Química de Polímeros.....29
- Figura 11a.** Figura 11a: Estrutura do polímero supramolecular  $(TP_2, TU_2)_n$  formado pela associação dos monômeros derivados da 2,6-diacilaminopiridina ( $TP_2$ ) e do uracil ( $TU_2$ ) via três ligações de hidrogênio. O espaçador (T) derivado do ácido tartárico pode ser (L,L); (D,D) ou meso devido a presença de dois centros quirais indicados pelos asteriscos.  $R = C_{12}H_{25}$  .....30
- Figura 11b.** Micrografias eletrônicas de varredura evidenciando o aspecto helicoidal de (A)  $(TP_2, TU_2)_n$  (L,L) e (B)  $(TP_2, TU_2)_n$  (D,D).  $(TP_2, TU_2)_n$  meso não apresenta morfologia em hélice por ser aquiral .....32
- Figura 12.** Estrutura em dupla-hélice da cadeia DNA. A construção de unidades complementares compostas por átomos doadores e aceitadores das ligações de hidrogênio em PS sintéticos é inspirada em sistemas supramoleculares naturais. T=Timina, A=Adenina, G=Guanina, C=Citosina .....31
- Figura 13.** Figura 13: Transições a partir de um estado isotrópico (esquerda) a um estado orientado (direita) para A: polímeros convencionais e B: polímeros supramoleculares em que monômeros da cadeia principal estão unidos por interações intermoleculares. É possível observar que a indução de mesofase aumenta o grau de polimerização em PS. Interações intermoleculares são representadas por ... enquanto que --- representam as interações que estabilizam a mesofase .....33

**Figura 14.** (a) Exemplo de um PS que múltiplas ligações de hidrogênio e interações do tipo  $\pi\cdots\pi$  de empilhamento promovem a formação de estruturas colunares sensíveis a temperatura devido a reversibilidade das interações intermoleculares (b).....35

**Figura 15.** Variação do grau de polimerização (GP) de um PS como função da constante de associação (K) em diferentes concentrações dos monômeros (Ct) .....38

**Figura 16.** Polibutadieno reticulado através de ligações de hidrogênio laterais. O material é um termoplástico que possui baixa temperatura de transição vítrea devido à presença de interações intermoleculares, permitindo que seja moldado e reciclado inúmeras vezes. Como a temperatura de aquecimento não é alta o bastante para levar a fragmentação das cadeias principais do PS, mas apenas para romper as ligações de hidrogênio, evita-se a polidispersão do material e perda de suas propriedades.....39

**Figura 17.** Elastômero supramolecular auto-regenerável (fotos em destaque) obtido a partir de monômeros de diferentes estruturas preparados através da reação entre uma mistura de ácidos graxos, dietilenotriamina (1ª etapa) e ureia (2ª etapa). Os grupos doadores (verde) e aceptores (vermelho) das ligações de hidrogênio que compõem as unidades complementares dos monômeros ao associarem via ligações de hidrogênio formam um rede supramolecular. Além dos colchetes, a partir da ligação amida, estendem-se as cadeias carbônicas derivadas de ácidos graxos .....40

**Figura 18.** Efeito das interações atrativas e repulsivas entre átomos vizinhos envolvidos nas ligações de hidrogênio, sobre a constante de associação (K) das unidades complementares 1-6. A=átomos aceptores e D=átomos doadores do H .....41

**Figura 19.** Esquema do arranjo adotado por alguns monômeros o qual se estende por todo o PS ....42

**Figura 20.** Seção transversal do gel supramolecular formado em (A) água e (B) acetronitrila. A estrutura dos monômeros no PS é representada à direita. Em água, as interações hidrofóbicas orientam os monômeros em um arranjo lateral e vertical, acomodando um maior número de monômeros na seção transversal enquanto que interações solvatofóbicas que surgem em acetonitrila organizam os monômeros apenas no sentido vertical agrupando um menor número por seção. Conforme evidenciado pela estrutura do PS, as ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amida surgem acima e abaixo do plano, assim como as interações do tipo  $\pi\cdots\pi$ , independentemente do solvente. Devido à organização distinta dos monômeros, a viscosidade do gel formado em água é maior do que em acetonitrila em todas as concentrações.....43

**Figura 21.** Tautômeros da ureido-pirimidinona em solução. Apenas as formas ceto e enólica podem se associar via quatro ligações de hidrogênio .....44

**Figura 22.** Policarbonato (3), poliéster (4) e polietileno/butileno (5) modificados com a ureido-pirimidinona. PS=polímero supramolecular .....45

**Figura 23.** Comportamento do Polietileno/butileno modificado com a ureido-pirimidinona diante de aquecimento e quando dissolvido em clorofórmio .....45

**Figura 24.** (a) Comportamento redox do PS formado pela auto-montagem de oligômeros polidimetilacrilamida e polidietilacrilamida funcionalizados com grupos ferroceno e beta-ciclodextrina (macrociclo em formato de cálice), respectivamente. (b) Em meio aquoso o PS forma micelas que podem ser reversivelmente colapsadas e auto-montadas através de estímulo eletroquímico .....47

**Figura 25.** PS utilizado como sensor fluorescente para os íons  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $OH^-$  e gás amônia. Na presença destas substâncias há um deslocamento dos grupos diabenzilamônio das cavidades dos éteres-coroa pela maior afinidade do ligante, levando à despolimerização do PS. Com o macromonômero 1 livre, há um aumento na intensidade de fluorescência que é atribuída aos anéis aromáticos conjugados com as ligações triplas.....48

**Figura 26.** PS com capacidade de auto-reparação (a) obtenção a partir da funcionalização do polietileno/butileno com ligante derivado da biperidina. Na presença de íons  $Zn^{2+}$ , interações metal-ligante são formadas agindo como ligações cruzadas reversíveis. (b) Unidades complementares

sensíveis à radiação ultravioleta. (c) Auto-reparação local do PS pela incidência da radiação ultravioleta. (d) Curvas de tensão-deformação para o PS. A eficiência de auto reparação igual a  $100 \pm 36\%$  foi obtida através da relação: (tenacidade do PS reparado)/(tenacidade do PS original) x100.....49

**Figura 27.** Curva de crescimento microbiano.....57

**Figura 28.** (a) Reação ácido-base de formação dos compostos carboxilato-meglumina (par iônico). (b) Estruturas dos ácidos graxos precursores investigados: esteárico (octadecanóico) e oleico (9-cis-octadecenoico), ambos com cadeia de mesmo tamanho (C18). Undecanóico e palmítico (hexadecanóico) com cadeias de tamanhos distintos (C11) e (C16), respectivamente.....59

**Figura 29.** Espectros na região do infravermelho para os compostos EM e OM. FTIR refere-se ao espectro de absorção obtido em KBr enquanto que PM-IRRAS é o espectro de reflexão obtido na interface ar-água .....61

**Figura 30.** Curvas de tensão superficial da água ( $\gamma$ ) em função da concentração de EM e OM. Os valores médios ( $n=5$ ) da c.a.c correspondem a 0,0809 e 0,153 % (m/m), respectivamente .....63

**Figura 31.** Isotermas de pressão superficial ( $\pi$ ) vs área molecular em  $\text{Å}^2$ , obtidas para as monocamadas de EM e OM na interface água-ar. O eixo das ordenadas à esquerda e direita referem-se à EM e OM, respectivamente .....64

**Figura 32.** Misturas de EM e OM em água. (a) Aspecto característico de EM, em concentrações abaixo de 2% (m/m) preparadas sem aquecimento e (b) no intervalo de 4-10% (m/m) preparadas com aquecimento (polimerizado). (c) Aspecto característico de OM, em concentrações abaixo de 25 % (m/m) preparadas sem aquecimento e (d) acima de 40% (m/m) preparadas com aquecimento (não polimerizado) .....66

**Figura 33.** Curvas DSC dos compostos EM e OM. O pico endotérmico em  $77,72 \text{ }^\circ\text{C}$  ( $T_{\text{onset}}=75,92 \text{ }^\circ\text{C}$ ) refere-se à fusão de EM. OM não apresenta evento térmico no intervalo de temperatura investigado .....67

**Figura 34.** Curvas DSC de resfriamento e aquecimento das misturas viscosas EM 4% (m/m) e OM 40% (m/m) previamente obtidas. À esquerda são apresentadas como referência as curvas DSC de resfriamento/aquecimento da água pura. Em destaque são mostrados os picos de congelamento (exotérmico) e fusão da água (endotérmico) pura e participando como fase líquida nas misturas. Os picos endotérmicos alargados observados por volta de  $115^\circ\text{C}$  e  $70^\circ\text{C}$  nas curvas de EM 4% e OM 40% (m/m), respectivamente são resultantes da vaporização da água .....67

**Figura 35.** Comportamento termorreversível do PS EM. O aquecimento acima de  $53 \text{ }^\circ\text{C}$  (transição gel-sol) leva o rompimento das ligações de hidrogênio, resultando no colapso da arquitetura do hidrogel e liberação da fase aquosa. Com o resfriamento, as interações são recuperadas e o material supramolecular é novamente formado.....69

**Figura 36.** Curvas DSC de aquecimento dos hidrogéis EM 4-10% (m/m). A transição gel-sol em torno de  $53 \text{ }^\circ\text{C}$  fica mais intensa com o aumento da concentração do PS EM .....69

**Figura 37.** Padrão de SAXS de EM 4% (m/m). A relação 1: 2: 3: 4: 5: 6 obtida a partir dos valores de  $q$  mostra que os monômeros no PS se arranjam em um formato lamelar .....71

**Figura 38.** Proposta de arranjo lamelar dos monômeros EM no PS (estrutura primária do hidrogel). A estrutura se estende a partir das cadeias carbônicas sempre com a região da meglumina voltada para o interior, de forma que os grupos OH sejam protegidos da solvatação formando ligações de hidrogênio entre si.  $n = 13$ .....72

**Figura 39.** Padrão de SAXS de OM 40% (m/m). A relação  $1: \sqrt{3} : 2$  obtida a partir dos valores de  $q$ :  $q_1 = 0,91$ ;  $q_2 = 1,57$  e  $q_3 = 1,81$  confirma a mesofase hexagonal visualizada como estrias na micrografia em anexo .....72

<b>Figura 40.</b> Espectros de RMN <sup>1</sup> H do PS EM (vermelho) e do composto anfifílico OM (azul), obtidos em uma mistura de H <sub>2</sub> O/DMSO-d <sub>6</sub> .....	74
<b>Figura 41.</b> Espectros de RMN <sup>1</sup> H do PS EM (vermelho) e do composto anfifílico OM (azul) ampliados na região do cátion meglumina. Os sinais referem-se aos H adjacentes aos grupos hidroxila envolvidos nas ligações de H (H-c, H-d, H-f, H-g) .....	75
<b>Figura 42.</b> Micrografia do PS EM .....	76
<b>Figura 43.</b> Efeito da diluição sobre as viscosidades relativas médias de EM e OM em fase aquosa. $\eta$ =viscosidade do solvente e $\eta_0$ =viscosidade da água pura. As barras paralelas nos círculos são os desvios padrão obtidos para n=5 medidas .....	77
<b>Figura 44.</b> Distribuição do tamanho (diâmetro em nm) de EM e OM em meio aquoso como função da intensidade de espalhamento (%). Os diâmetros médios (n >105) das estruturas em EM considerando o modelo de Stokes-Einstein são: 0,6% (1,321 $\mu$ m); 0,3% (848,1; 124,7; 22,2 nm); 0,2% (284,3 nm). Enquanto que em OM são: 0,6% (180,3 nm) e 0,2% (156 nm). As concentrações investigadas correspondem aos pontos da curva de viscosidade conforme a Figura 43 .....	79
<b>Figura 45.</b> Curvas DSC do PS PM (em vermelho) em fase aquosa como um hidrogel, nas concentrações 4%, 6%, 8% e 10% (m/m). Como já observado na seção 4.2, a mudança de posição da linha base, neste caso verificado para PM em 36,27 °C decorre da temperatura de rompimento das ligações de hidrogênio do PS e colapso da estrutura terciária do hidrogel. As curvas DSC de UM (em azul) não evidenciam evento térmico semelhante, excluindo a polimerização supramolecular do composto. Mesmo possuindo cadeia linear e saturada, como EM (C18) e PM (C16), a cadeia muito curta de UM (C11) desfavorece a polimerização supramolecular .....	81
<b>Figura 46.</b> Curvas DSC dos compostos sólidos PM (C16) e UM (C11). O pico endotérmico observado em 70,40 °C (Tonset = 67,63 °C) refere-se à fusão de PM. UM não apresentou temperatura de fusão, mas temperatura de transição vítrea em 62,61 °C caracterizada pela mudança de posição da linha base .....	82
<b>Figura 47.</b> Curvas DSC de EM (C18) e PM (C16). As temperaturas de fusão dos sólidos e de transição gel-sol dos hidrogéis são correlacionadas, ou seja, os compostos carboxilato-meglumina que apresentaram temperatura de fusão são capazes de polimerizar formando hidrogéis em fase aquosa. Além disso, as temperaturas de ambos os eventos diminuem com o encurtamento da cadeia. Temperaturas de fusão EM e PM: 77,72 °C e 70,40 °C, respectivamente. Temperaturas gel-sol dos hidrogéis EM e PM: 53,49°C e 36,27 °C, respectivamente .....	84
<b>Figura 48.</b> Efeito da diluição sobre as viscosidades relativas médias de PM e UM em fase aquosa. $\eta$ =viscosidade do solvente e $\eta_0$ =viscosidade da água pura. As barras paralelas nos círculos são os desvios padrão obtidos para n=5 medidas .....	84
<b>Figura 49.</b> Índice de sobrevivência de <i>C. albicans</i> após (A) 12 e (B) 24 horas de incubação com diferentes concentrações de cetozonazol ou fluconazol, na presença e ausência do hidrogel EM 8% (m/m).....	85
<b>Figura 50.</b> Índice de sobrevivência de <i>C. albicans</i> na forma de biofilme, após (A) 24 e (B) 48 horas de incubação com diferentes concentrações de cetozonazol ou fluconazol, na presença e ausência do hidrogel EM 8% (m/m).....	87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração das misturas de EM e OM em água para medidas de tensão superficial .....	53
<b>Tabela 2.</b> Preparo das misturas de EM em água para medidas de viscosidade e DLS.....	55
<b>Tabela 3.</b> Preparo das misturas de OM em água para medidas de viscosidade e DLS.....	55
<b>Tabela 4.</b> Concentração das misturas de EM e OM em água para medidas de tensão superficial .....	56
<b>Tabela 5.</b> Preparo das misturas de PM em água para medidas de viscosidade.. .....	56
<b>Tabela 6.</b> Temperaturas de congelamento e fusão da água pura e da fase aquosa nas misturas EM e OM .....	68

## LISTA DE ABREVIações

<i>C. albicans</i> :	<i>Candida albicans</i>
c.a.c:	concentração de agregação crítica
C11:	cadeia de onze carbonos
C16:	cadeia de dezesseis carbonos
C18:	cadeia de dezoito carbonos
DLS:	Espalhamento de luz dinâmico
DSC:	Calorimetria exploratória diferencial
EPS:	substâncias poliméricas extracelulares
EM :	estearato-meglumina
FTIR:	Espectroscopia de absorção no infravermelho
GP:	grau de polimerização
IS:	índice de sobrevivência
MEV:	Microscopia eletrônica de varredura
N	viscosidade da amostra
OM:	oleato-meglumina
PBS:	solução tampão fosfato-salino
$\pi$	pressão superficial
PM:	palmitato-meglumina
PM-IRRAS:	Espectroscopia de reflexão-absorção
PS:	polímero supramolecular
RMN:	Ressonância magnética nuclear
SAXS:	Espalhamento de raios-X à baixo ângulo
$\gamma$ :	tensão superficial
T <sub>onset</sub> :	temperatura inicial
UM:	undecanoato-meglumina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 Conceção do trabalho.. .....	16
1.2 Química supramolecular e advento dos polímeros supramoleculares.....	26
1.3 Propriedades dos polímeros supramoleculares.....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	51
<b>3. MATERIAIS E METODOS</b> .....	51
3.1 Exemplo de preparação do composto estearato-meglumina (EM).....	51
3.2 Exemplo de preparação do composto oleato-meglumina (OM).....	51
3.3 Exemplo de preparação do composto palmitato-meglumina (PM).....	52
3.4 Exemplo de preparação do composto undecanoato-meglumina (UM).....	52
3.5 Espectroscopias de absorção no infravermelho (FTIR) e de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS).....	52
3.6 Medidas de tensão superficial e Isotermas de Langmuir .....	53
3.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	55
3.8 Espalhamento de raios X em ângulo baixo (SAXS) e Microscopia de luz polarizada .....	54
3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	54
3.10 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	54
3.11 Viscosidade capilar e Espalhamento de luz dinâmico (DLS) .....	54
3.12 Estudo da inibição do biofilme da <i>Cândida albicans</i> .....	56
3.12.1 Micro-organismos.....	56
3.12.2 Preparo da suspensão celular .....	56
3.12.3 Formação dos biofilmes de <i>C. albicans</i> .....	57
3.12.4 Teste de sensibilidade de <i>C. albicans</i> aos antifúngicos na presença de hidrogel EM .....	57
3.12.4.1 Células planctônicas .....	57
3.12.4.2 Biofilme.....	58
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	59
4.1 Caracterização estrutural dos compostos carboxilato-meglumina e evidências experimentais de sua natureza anfifílica .....	60
4.2 Polimerização supramolecular em fase aquosa .....	65
4.3 Estudo do hidrogel estearato-meglumina no controle do biofilme da	

<b><i>Candida albicans</i></b> .....	85
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	89
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Concepção do Trabalho

Nosso grupo de pesquisa vem se dedicando recentemente ao estudo de polímeros supramoleculares (PS) que, diferentemente de polímeros convencionais, a união dos monômeros se dá através de interações intermoleculares, ao invés de ligações covalentes [1].

Interações são mais fracas que ligações covalentes e possuem natureza reversível, ou seja, quebram e se refazem continuamente. Em virtude dessas características, um PS diante de estímulos externos como temperatura, variação de pH, força mecânica, radiação, etc tem suas cadeias fragmentadas parcialmente ou completamente em um processo de despolimerização. Cessando o estímulo, fragmentos de cadeia e monômeros são capazes de se recombinar em tempo experimental, recuperando completamente o material [2].

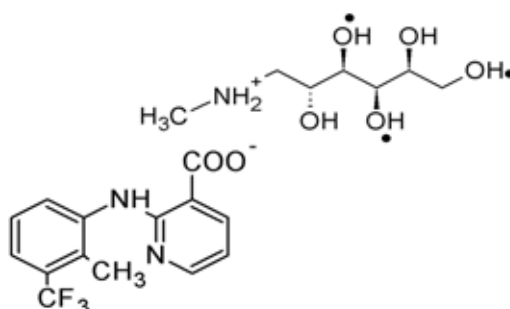
Por serem materiais “estímulo-responsivos” por natureza, o mecanismo de despolimerização/polimerização confere aos PS propriedades peculiares, interessantes do ponto de vista tecnológico. Por exemplo, são materiais que possuem capacidade de auto-regeneração ou auto-reparação de fraturas em sua estrutura [3]; mantêm constante a polidispersão de sua massa molecular quando submetidos a processos de reciclagem [4]; apresentam viscosidades semelhantes as de moléculas de pequena massa molecular quando aquecidos [5], etc.

O interesse nos PS pelo grupo de pesquisa surgiu ao ser investigado o comportamento térmico de compostos obtidos pela funcionalização de ácidos orgânicos com um aminocarboidrato denominado meglumina (*2R, 3R, 4R, 5S*)-6-metilaminoexano-1,2,3,4,5-pentol. Curiosamente, quando estes compostos funcionalizados, nomeados genericamente de carboxilato-meglumina, foram aquecidos até sua temperatura de fusão, os materiais obtidos após o resfriamento assemelhavam-se a filmes que apresentavam temperatura de transição vítrea e alta capacidade calorífica, levando a acreditar que uma polimerização tivesse ocorrido. A elevada massa molecular média, em torno de  $291 \pm 88$  MDa, determinada por medidas de espalhamento de luz (DLS) para a flunixinina-meglumina, um dos compostos investigados na ocasião, confirmou o indício de polimerização. Além disto, a caracterização estrutural por espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR) e ressonância magnética nuclear (RMN) permitiu identificar que grupos hidroxila do aminocarboidrato faziam ligações de hidrogênio

intermoleculares responsáveis pela polimerização supramolecular, independentemente da estrutura do ácido precursor [6,7]. O arranjo dos monômeros nos PS estudados, no entanto, não foi definido, o que é um dos objetivos deste trabalho.

A Figura 1 mostra a estrutura da flunixina-meglumina. A funcionalização do ácido precursor com a meglumina é feita por *síntese não covalente ou supramolecular*, isto é, a inserção do aminocarboidrato não envolve formação de ligação covalente. Neste caso, a funcionalização ocorre mediante uma reação ácido-base produzindo o par iônico carboxilato-meglumina que é muito solúvel em meio aquoso. A interação eletrostática entre os íons é suficientemente forte para manter o par iônico praticamente não dissociado em fase aquosa.

**Figura 1. Estrutura molecular do monômero carboxilato-meglumina conhecido como flunixina-meglumina. Após a fusão do composto cristalino e resfriamento do líquido, os monômeros se organizam formando um filme polimérico caracterizado como um PS de elevada massa molecular. Em destaque estão indicados os grupos hidroxila que de acordo com resultados experimentais são os principais envolvidos na polimerização supramolecular mediante ligações de hidrogênio.**

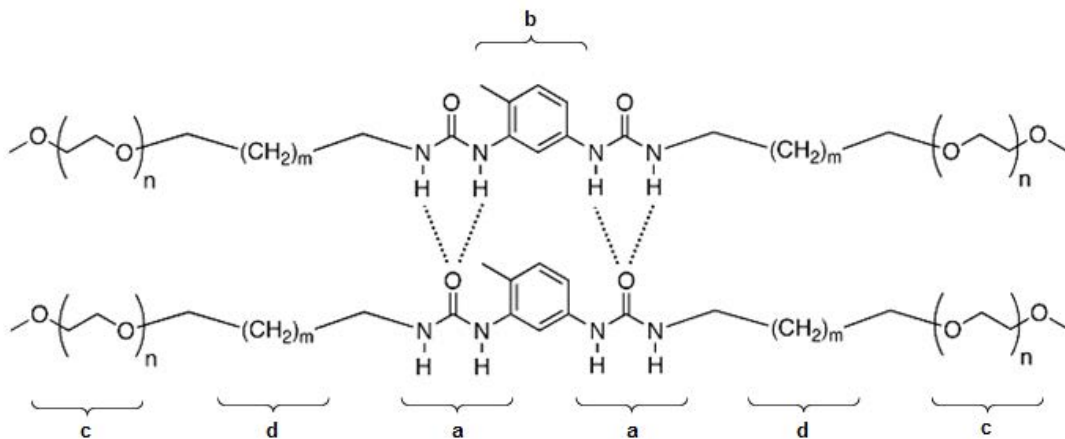


O inconveniente apresentado pelos PS obtidos no início dos trabalhos foi sua pouca estabilidade. Esta foi determinada medindo-se o tempo de despolimerização do filme polimérico por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Foi verificado que após um período de aproximadamente 30 horas, as ligações de hidrogênio que uniam os monômeros através da meglumina rompiam-se por completo, resultando na cristalização do material. A despolimerização dos PS carboxilato-meglumina foi observada também quando dissolvidos em água, visto que moléculas de solventes polares tendem a competir pelas ligações de hidrogênio no aminocarboidrato, ao solvatar os grupos hidroxila.

Os resultados obtidos no estudo inicial foram tão promissores que encorajaram o grupo a buscar meios de estabilizar os PS carboxilato-meglumina permitindo então explorar suas propriedades. A pouca estabilidade pode ser contornada pela presença de

outras interações intermoleculares que contribuem com as ligações de hidrogênio, aumentando a força de interação dos monômeros. Em solventes polares é necessário proteger os átomos doadores e aceptores da ligação de hidrogênio em um ambiente hidrofóbico (quando o PS está dissolvido em água) ou solvatofóbico (quando o PS está dissolvido em outro solvente polar) restringindo a solvatação, como é mostrado na Figura 2 [8].

**Figura 2. Estrutura dos monômeros derivados da ureia que polimerizam em solventes polares na forma de camadas, mediante ligações de hidrogênio através dos grupos amida (a). Os anéis aromáticos (b) contribuem com interações do tipo  $\pi$ - $\pi$  auxiliando as ligações de hidrogênio, aumentando a força de atração entre os monômeros. O PS é estável, pois moléculas do solvente entram em contato com a região polar mais periférica (c), enquanto que as ligações de hidrogênio ficam protegidas em um ambiente hidrofóbico ou solvatofóbico formado pelas cadeias alquílicas (d) que se agregam pela ação das interações hidrofóbicas, em água, ou solvatofóbicas, que surgem em outros solventes polares.**



Adaptado de Obert et al. [8].

A agregação em água de monômeros anfifílicos como os formadores do PS da Figura 2 é um processo direcionado pela entropia, importante nas polimerizações supramoleculares. Como as cadeias alquílicas são apolares, estas forçam as moléculas de água circunvizinhas a formarem ligações de hidrogênio apenas entre si. Tal comportamento faz com que as moléculas de água nas vizinhanças das cadeias alquílicas se tornem altamente organizadas em comparação com as do interior do líquido, diminuindo a entropia do sistema. Para aumentar a entropia, as cadeias alquílicas se agregam reduzindo a área superficial resultando assim na diminuição do número de moléculas de água organizadas. As forças que mantêm juntas as regiões apolares das espécies anfifílicas em água são chamadas de interações hidrofóbicas e

não resultam da atração intrínseca entre suas porções apolares. Ao contrário, surgem do fato de o sistema atingir maior estabilidade termodinâmica, minimizando o número de moléculas de água ordenadas, requeridas para envolver as regiões apolares [9].

A estratégia para a obtenção de PS carboxilato-meglumina adotada neste trabalho envolveu construir monômeros utilizando ácidos graxos de cadeia longa como precursores. Com isso foi possível produzir monômeros anfifílicos nos quais a meglumina fornece a cabeça polar. Em fase aquosa, satisfazendo as condições necessárias, interações hidrofóbicas agem para organizar os monômeros viabilizando o surgimento de ligações de hidrogênio protegidas do solvente entre as cabeças polares, levando à polimerização supramolecular. Parte deste estudo concentrou-se em investigar a correlação entre a característica da cadeia carbônica do ácido graxo precursor e a formação do PS carboxilato-meglumina. Para tanto, ácidos análogos com cadeias de tamanhos iguais (C18) foram avaliados: os ácidos esteárico (octadecanóico) e oleico (9-cis-octadecenóico). Os resultados foram confrontados com os obtidos para os ácidos saturados, undecanóico (C11) e palmítico (hexadecanóico) (C16), permitindo identificar que o *balanço hidrofílico/hidrofóbico* é a propriedade que governa a polimerização supramolecular dos compostos carboxilato-meglumina em água.

Na Figura 3a abaixo é esquematizado a obtenção dos compostos carboxilato-meglumina, por síntese não-covalente ou supramolecular envolvendo uma reação ácido-base entre um ácido graxo e a meglumina. A formação de subprodutos não é esperada, o que reduz etapas de purificação e proporciona elevado rendimento. A natureza anfifílica dos compostos carboxilato-meglumina confere aos mesmos, propriedades surfactantes. Compostos anfifílicos semelhantes, mas que o açúcar está unido à cadeia alquílica por ligação covalente são conhecidos como surfactantes poli-hidroxilados. Sua manufatura envolve a acilação da meglumina por um éster de ácido graxo ( $\text{RCO}_2\text{CH}_3$ ) normalmente derivado de óleos, na presença de metóxido de sódio ( $\text{CH}_3\text{ONa}$ ) como catalisador (Figura 3b). Estes compostos estão presentes em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, detergentes, agroquímicos e explosivos. Grandes empresas são detentoras de patentes que envolve sua síntese e aplicação, como Procter & Gamble, BASF, Henkel, SEPPIC, dentre outras [10]. Na Figura 4 são mostradas as estruturas de alguns surfactantes poli-hidroxilados. A união entre o açúcar e a cadeia alquílica se dá através de ligações do tipo éster (a,c), éter (b) e amida (d), sendo esta última, permitida apenas para aminocarboidratos como a meglumina [11].

Figura 3. Obtenção de compostos anfífilos derivados da meglumina: (a) composto carboxilato-meglumina no qual a cadeia carbônica e o aminocarboidrato são unidos por interação eletrostática (síntese supramolecular) empregando uma reação ácido-base. (b) surfactante poli-hidroxilado no qual o aminocarboidrato é unido à cadeia carbônica através de ligação covalente empregando uma reação de acilação.

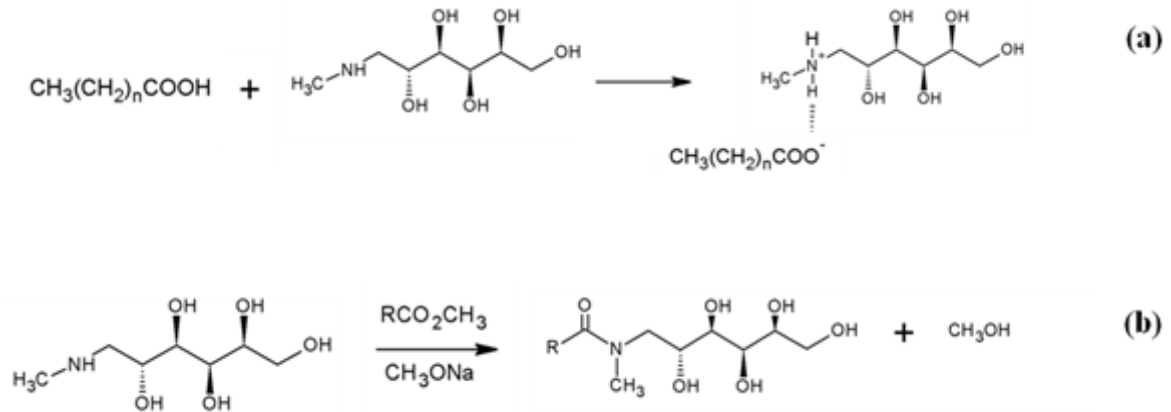
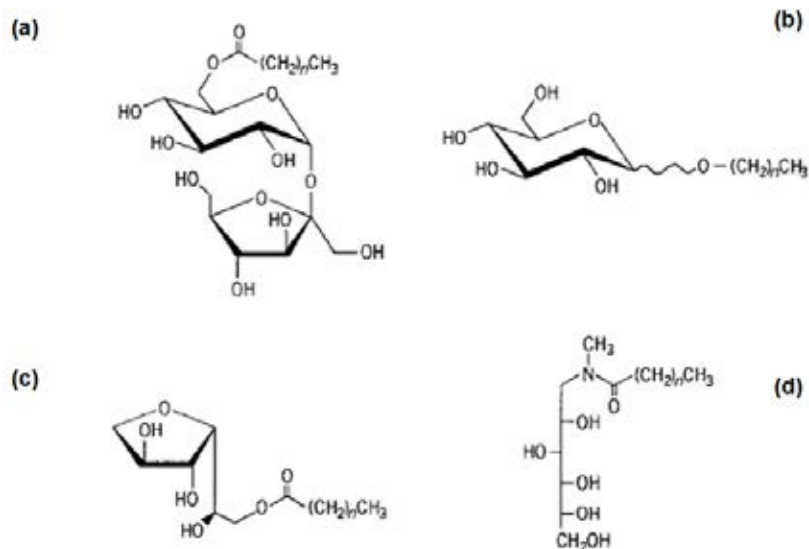


Figura 4. Exemplos comuns de ligações entre os fragmentos hidrofílicos e hidrofóbicos em surfactantes poli-hidroxilados. (a) Éster de sacarose, (b) Alquil glicosídeo, (c) Éster de sorbitano e (d) *N*-metil glucamida.



Adaptado de Sodermana e Johanssonb [11].

Apesar da semelhança estrutural entre os compostos carboxilato-meglumina estudados neste trabalho e os surfactantes poli-hidroxilados derivados da meglumina, não há relatos na literatura de que estes últimos formem PS. Como consequência da polimerização supramolecular em meio aquoso dos compostos carboxilato-meglumina, a

formação de um *hidrogel* termorreversível com natureza anfifílica foi observada. Estes materiais, que se caracterizam pela estrutura reticulada tridimensional e elevado conteúdo de água imobilizada, têm extensa aplicação principalmente na área biomédica [12].

Na pesquisa com células-tronco, por exemplo, hidrogéis são projetados para mimetizar a complexidade da matriz extracelular, indispensável para a regulação da diferenciação celular e desenvolvimento. As células são sensíveis aos seus arredores interagindo com a matriz extracelular com base na topografia, propriedades mecânicas (como rigidez, elasticidade e viscosidade), concentração de fatores de crescimento imobilizados e composição molecular.

Em engenharia tecidual, hidrogéis podem ser implantados no corpo servindo como suporte temporário (*scaffolds*) para a reconstrução de tecidos ou até mesmo órgãos lesionados. Para essa finalidade são imobilizadas em sua estrutura células e fatores de crescimento. A estrutura reticulada do hidrogel permite vascularização e ser biocompatível é imprescindível para que o *scaffold* seja substituído pelo novo tecido formado.

Em procedimentos cirúrgicos, hidrogéis de fibrina (uma proteína fibrosa) são utilizados como adesivos biológicos promovendo a união de tecidos. Curativos a base de hidrogéis de ácido algínico (um polissacarídeo presente na parede celular de algas marinhas) aceleram o processo de cicatrização.

No uso como sistemas de liberação, a porosidade da rede tridimensional dos hidrogéis é controlada para regular a difusão de substâncias como fármacos e proteínas.

Os hidrogéis também vêm se tornando um recurso importante no combate de micro-organismos multiresistentes, em especial prevenindo a formação de biofilme ou inibindo o mesmo após formado [13]. Biofilmes são colônias de bactérias ou fungos envolvidas por EPS (uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares majoritariamente polissacarídeos, proteínas e lipídios). Dentre outras funções na manutenção da colônia microbiana, o EPS permite a adesão em quase todos os tecidos ou superfícies e compreende a barreira de defesa contra medicamentos mais importante [14]. Já é relatado na literatura que a formação de biofilmes microbianos representa um problema de saúde pública, sendo responsáveis por cerca de 80% das infecções em diferentes partes do corpo e participam da grande maioria das infecções hospitalares, especialmente em associação com equipamentos e dispositivos médicos [15]. Por ser formados por mais de 90% de água, o hidrogel é ideal para aplicações sobre feridas na

pele, em orifícios do corpo de difícil acesso e em regiões que estão em contato com implantes ou cateteres. A atividade inibitória do hidrogel contra o biofilme ocorre diretamente por mecanismo de lise celular ou mais comumente sendo utilizado como matriz para incorporar e liberar lentamente um antimicrobiano. Em ambos os casos, como requisito para se atingir a células mais profundas da colônia, deve existir primeiramente compatibilidade química do hidrogel com a composição heterogênea do EPS [16]. Neste trabalho é mostrado que o hidrogel carboxilato-meglumina aumenta a penetração dos antifúngicos fluconazol e cetoconazol no biofilme da *Cândida albicans* (fungo responsável pela candidíase), possivelmente através do aumento da permeabilidade do EPS. A incorporação do antifúngico no hidrogel foi facilmente promovida mediante o processo de despolimerização/polimerização termorreversível do PS.

### **Biofilme da *Cândida albicans***

Bactérias e fungos adquiriram traços genéticos como os fatores de virulência, que os capacitaram a provocar doenças, destruindo diretamente o tecido do hospedeiro ou liberando toxinas que são disseminadas pelo sangue e causam uma ampla patogenicidade [17]. Esses mecanismos de virulência microbiana contribuíram para o aumento de infecções hospitalares que, segundo o Ministério da Saúde, matam mais de 100 mil pessoas por ano no Brasil [18].

A maioria das infecções hospitalares é causada por um desequilíbrio da relação existente entre a microbiota humana normal e os mecanismos de defesa do hospedeiro. Isto pode ocorrer devido à própria patologia do paciente, procedimentos invasivos e alterações da população microbiana, geralmente induzida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos [17]. Os micro-organismos que predominam nas infecções hospitalares raramente causam infecções em outras situações, pois apresentam baixa virulência, mas em decorrência do seu inócuo e da queda de resistência do hospedeiro, o processo infeccioso desenvolve-se. Vários são os micro-organismos envolvidos nesse problema de saúde pública, podendo-se destacar os fungos do gênero *Candida* [19].

Estes fungos fazem parte da microbiota normal do homem colonizando mucosas do trato gastrointestinal (50 a 70%), boca (30 a 50%), vagina (5 a 30%) e pele (4 a 7%) [20]. Alterações das barreiras teciduais, da própria microbiota ou da resposta imune promovem um desequilíbrio na relação hospedeiro-parasita, permitindo a invasão do

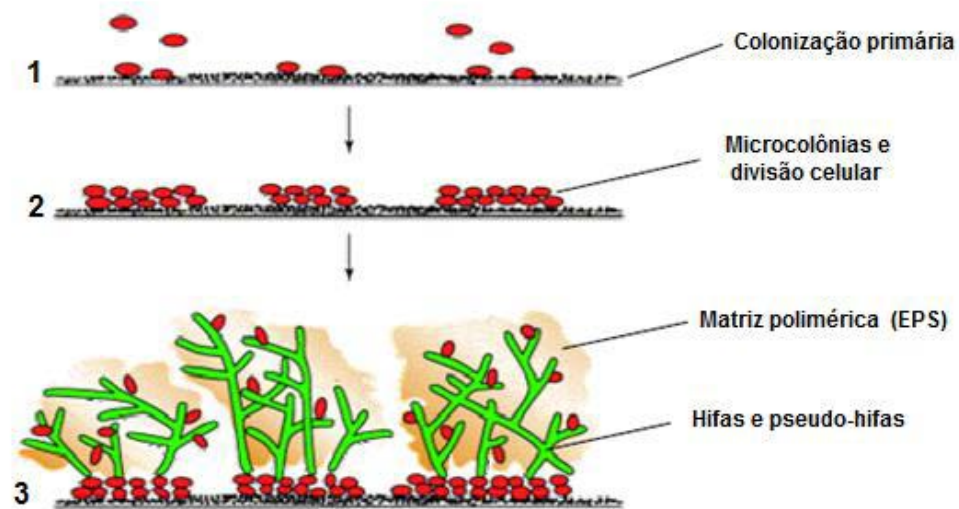
micro-organismo nos tecidos do hospedeiro, causando infecções denominadas de candidíases [21,22].

A *Candida albicans* é considerada uma das leveduras mais patogênicas para o ser humano, causando um grande número de infecções oportunistas que em doentes imunocomprometidos podem ser fatais [23,24]. Esta levedura é um organismo comensal estando presente no ser humano sem causar infecções, coexistindo com o hospedeiro. Contudo, num paciente imunocomprometido, esta levedura pode causar sérias infecções nas mucosas, que incluem candidíases vaginais e infecções orais ou sistêmicas [25]. Este fungo ainda apresenta dois importantes mecanismos de virulência que são: **i)** sua versatilidade de adaptação e **ii)** capacidade de adesão em sítios variados ocasionando a formação de biofilme [26].

Basicamente o biofilme permite a adesão e desenvolvimento dos mesmos sobre células, tecidos ou outro tipo de superfícies expostas à circulação de fluidos [27]. De uma maneira geral a formação do biofilme ocorre em etapas distintas: **(i)** adesão, **(ii)** maturação, **(iii)** biofilme maduro e **(iv)** dispersão biofilme [28]. Entretanto, a estrutura e função dos biofilmes variam conforme o tipo de micro-organismo [29].

O biofilme de *C. albicans* inicia com a adesão do fungo a uma superfície biótica ou abiótica e formação de uma camada basal de células confluentes, que se dividem e diferenciam em células com projeções longas, tubulares que se entrelaçam na região superior do biofilme chamadas de hifas. Estas células são responsáveis pela liberação do EPS. Dessa forma é criado um micro-ambiente que protege as células, evitando que sejam lavadas e levadas de áreas com fluxo de líquidos, como boca, intestinos e vagina, além de promover resistência aos antifúngicos e a invasão por células de defesa do sangue [30]. Em um último estágio, são produzidas células filhas menos aderidas, que podem se desprender do biofilme maduro, funcionando como um reservatório de células infectantes podendo ser responsável por septicemia no paciente (Figura 5) [31,32].

Figura 5: Formação do biofilme de *C. albicans*.



Adaptado de Douglas [32].

As células de biofilmes microbianos têm propriedades e padrões de expressão gênica distintas das células planctônicas (suspensão celular), que incluem variações fenotípicas da atividade enzimática, diferenças na composição da parede celular e da estrutura da superfície, dentre outras [28]. Estas características promovem o aumento da resistência dos biofilmes aos antimicrobianos, impedem o acesso das células de defesa do hospedeiro ao micro-organismo, bem como alteram o metabolismo do paciente [33].

No caso de *C. albicans* foi comparada a ação de diferentes antifúngicos nas células planctônicas e de biofilme, constatando-se que as concentrações dos antifúngicos necessárias para obter 50% de inibição microbiana foram 5 a 8 vezes mais altas nos biofilmes do que nas suspensões planctônicas [34]. Assim, pode-se afirmar que uma das consequências mais importantes deste fungo crescer na forma de biofilme é uma marcada resistência à terapia antifúngica [35,36]. Esta resistência está, principalmente, relacionada a dois fatores: **i)** as limitações difusionais dos antifúngicos pela matriz do biofilme devido a alta secreção de EPS e **ii)** pela baixa atividade metabólica das células no biofilme, especialmente as células localizadas nas camadas mais profundas [37,38].

Alguns autores afirmam que o EPS representa o primeiro mecanismo de resistência dos biofilmes, pois atua como um fator de virulência promovendo maior resistência aos antimicrobianos e, portanto, contribui para a vitalidade dos micro-organismos [39,40]. Isso ocorre pelo fato do EPS agir como um adsorvente, reduzindo a

quantidade de antimicrobiano disponível para interagir com o biofilme, bem como sua estrutura morfológica impede a penetração de 100% dos antifúngicos (Figura 6) [41].

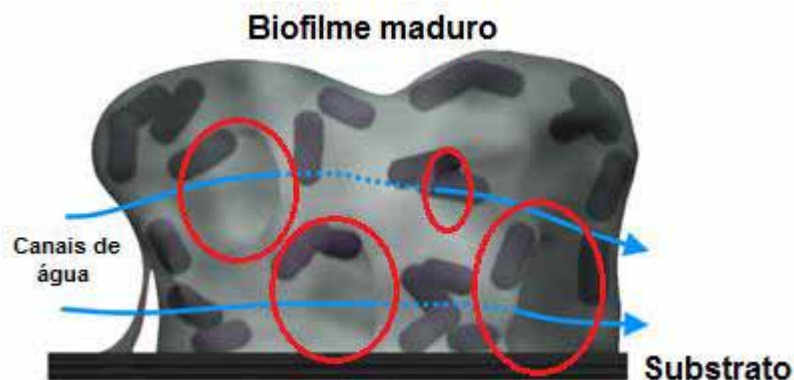
**Figura 6: Tempo de ação do antimicrobiano no biofilme.**



Adaptado de Davies [41].

Conforme já salientado as células microbianas em biofilme apresentam uma baixa atividade metabólica, principalmente, aquelas localizadas nas camadas mais profundas dessa comunidade. Esse fato se deve aos canais aquosos, que transportam água, nutrientes e metabólitos para as células microbianas, não atingirem a camada mais profunda do biofilme (Figura 7). Isso promove um estado de dormência nas células que se dividem infrequentemente. Assim, este estado de dormência é considerado outro mecanismo de resistência, uma vez que a maioria dos antimicrobianos agem sobre às células com rápida divisão celular [42,43].

**Figura 7: Canais aquosos no biofilme.**



Adaptado de Costerton [43].

Diante dos mecanismos de resistência dos biofilmes têm-se tornado necessário o desenvolvimento de novas estratégias para facilitar a interação dos antifúngicos com os micro-organismos. Os agentes antifúngicos aplicados no tratamento de micoses invasivas provocadas por *C. albicans*, são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células dos fungos. Nas classes mais comumente utilizadas encontram-se, os polienos (ex. anfotericina B, nistatina); nucleósidos análogos (ex. 5 - fluorocitosina), azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol e itraconazol), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benanomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos.

Neste estudo foram utilizados os derivados azólicos: fluconazol (triazol) e o cetoconazol (imidazol) que possuem como mecanismos de ação a inibição da biossíntese do ergosterol pela interação com a enzima lanosterol 14- $\alpha$ -demetilase, responsável pela conversão do lanosterol a ergosterol, componente essencial da membrana plasmática fúngica [44].

O cetoconazol foi o primeiro antifúngico disponibilizado para tratamento de infecções sistêmicas por *C. albicans*, entretanto o uso indiscriminado e inadequado dessa droga promoveu o aparecimento de cepas de *C. albicans* resistentes ao mesmo [45]. Diante disso, surgiu o fluconazol que é um dos agentes mais eficazes no tratamento da candidíase orofaríngea, vaginal e do esôfago, especialmente em pacientes imunocomprometidos, provocando poucos efeitos secundários [46]. No entanto, células de *C. albicans* dispostas como biofilme são 100 vezes ou mais resistentes ao fluconazol em comparação às células planctônicas [47]. O aumento da resistência ao fluconazol durante a maturação do biofilme parece estar associado com um decréscimo significativo no conteúdo total de ergosterol, que conforme comentado anteriormente é o sítio de ação deste fármaco [48].

Assim para minimizar a resistência dos biofilmes de *C. albicans* com relação aos antifúngicos têm se desenvolvido agentes, tais como lipossomos, nanopartículas e polímeros os quais promovem o transporte do antimicrobiano aumentando a penetração do mesmo até a camada mais profunda do biofilme.

## 1.2 Química supramolecular e advento dos polímeros supramoleculares

O primeiro polímero tendo sua cadeia principal unida por forças de interação, mais especificamente, ligações de hidrogênio, foi sintetizado em 1990 por **Jean-Marie Lehn**. Tal fato foi considerado o início do campo da química de polímeros

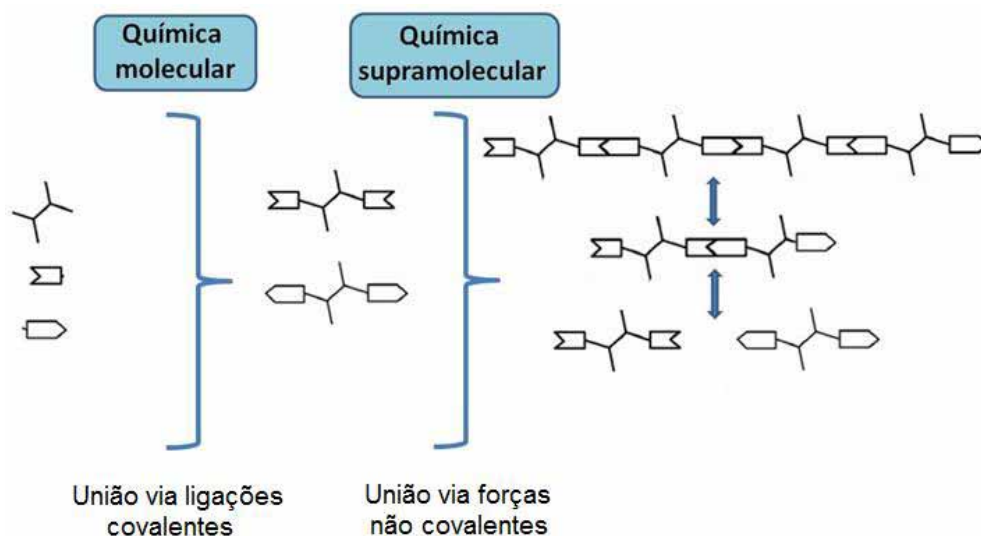
supramoleculares, fruto do encontro entre a química supramolecular e a química de polímeros [49].

A química supramolecular é um campo muito recente da química, surgindo no início dos anos 1960 a partir dos trabalhos de **Charles J. Pedersen**, **Jean-Marie Lehn** e **Donald J. Cram** [50]. Estes pesquisadores mostraram que espécies com propriedades físicas e químicas definidas podem ser originadas da associação de dois ou mais componentes (íons e/ou moléculas) que interagem entre si de forma a propiciar o aparecimento de novas propriedades que não sejam simplesmente a somatória das propriedades dos componentes, bastando que haja entre os mesmos, *reconhecimento molecular*. Esta característica envolve *complementaridade interacional*, isto é, presença de múltiplos sítios de interação (eletrostáticos tais como positivo/negativo, carga/dipolo, dipolo/dipolo, ligação de hidrogênio, doador/aceptor, van der Waals, etc.) e complementaridade estérica, ou seja, de forma e tamanho [51,52].

A química supramolecular denomina genericamente as forças de interação que unem os componentes, de *forças não covalentes de ligação*. Estas compreendem as interações intermoleculares como as ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas (íon-íon, íon-dipolo, dipolo-dipolo), interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , forças de van der Waals, interações hidrofóbicas e solvatofóbicas. Incluem também as ligações metal-ligante cineticamente lábeis (o que é muitas vezes descrito na literatura de forma contraditória). Estas últimas, do ponto de vista da química supramolecular, são tratadas como interações metal-ligante por possuírem caráter eletrostático predominante sobre o caráter covalente [53], e também por se assemelharem às interações intermoleculares do ponto de vista termodinâmico e cinético. Isto implica que as interações metal-ligante são formadas no equilíbrio sendo reversíveis e possuem taxas de dissociação/formação elevadas, fazendo com que sejam hábeis em responder prontamente a perturbações externas. Muitos PS são construídos com base neste tipo de força não covalente [54].

A Figura 8 ilustra os limites dos campos da química molecular e supramolecular, respectivamente. O domínio do primeiro está no controle das ligações covalentes enquanto que do último está no controle de forças não covalentes direcionais reversíveis que são responsáveis pelo reconhecimento molecular e auto-montagem de estruturas [52]. A partir desta classificação polímeros convencionais são inseridos na química molecular enquanto que PS estão inseridos no domínio da química supramolecular. O termo supramolecular significa “além da molécula”.

Figura 8. Domínios da Química molecular e Química supramolecular.



A ideia de monômeros serem unidos por interações moleculares parece, à primeira vista, um conceito bastante recente, mas antes do conceito de macromoléculas criado por **Herman Staudinger** ser reconhecido por toda a comunidade científica nos anos 1930, as propriedades dos polímeros convencionais eram explicadas usando os conceitos da química de colóides que **Thomas Graham** introduziu em 1861 [55]. A maioria dos cientistas estava convencida de que as propriedades dos polímeros convencionais resultavam da agregação coloidal de partículas. Não era surpresa de que algumas propostas estruturais fossem baseadas inclusive na auto-montagem de moléculas como é o caso do arranjo da borracha natural proposto em 1905 por **Harries**. Na sua concepção, a borracha era formada por moléculas de dimetil-ciclo-octadieno unidas através de interações do tipo  $\pi$ - $\pi$ , assim como um polímero supramolecular, conforme mostrado na Figura 9.

Figura 9. Primeira proposta de estrutura da borracha natural datada de 1905 resultante da auto-montagem do dimetil-ciclo-octadieno através de interações  $\pi$ - $\pi$ , anterior aos conceitos da química supramolecular.

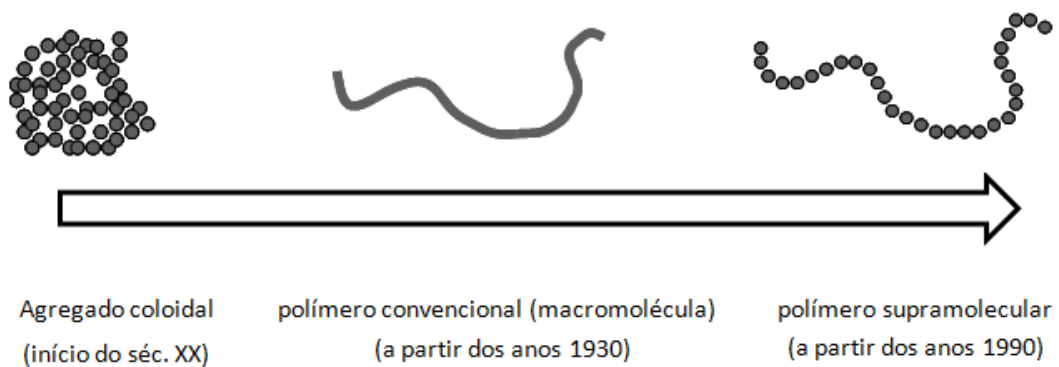


Adaptado de Mulhaupt [55].

Somente após o pioneirismo de Staudinger tornou-se evidente que as propriedades dos polímeros convencionais em solução e no estado sólido resultam de

sua natureza macromolecular. Desde então a ideia de que cadeias poliméricas principais pudessem ser construídas somente através de ligações covalentes estava mais do que consolidada, o que mudou com o advento da química supramolecular e o controle das forças de interação. A evolução temporal dos conceitos da química de polímeros passou a ser vista como esquematizado na Figura 10, iniciando a partir dos colóides, passando pela visão de macromolécula atribuída a Staudinger, chegando finalmente aos PS que são uma combinação de ambos os conceitos anteriores, ou seja, uma cadeia extensa de monômeros mantida por forças de interação, com propriedades de macromolécula [56].

**Figura 10. Evolução temporal da Química de Polímeros.**



Adaptado de Bosman et al. [56].

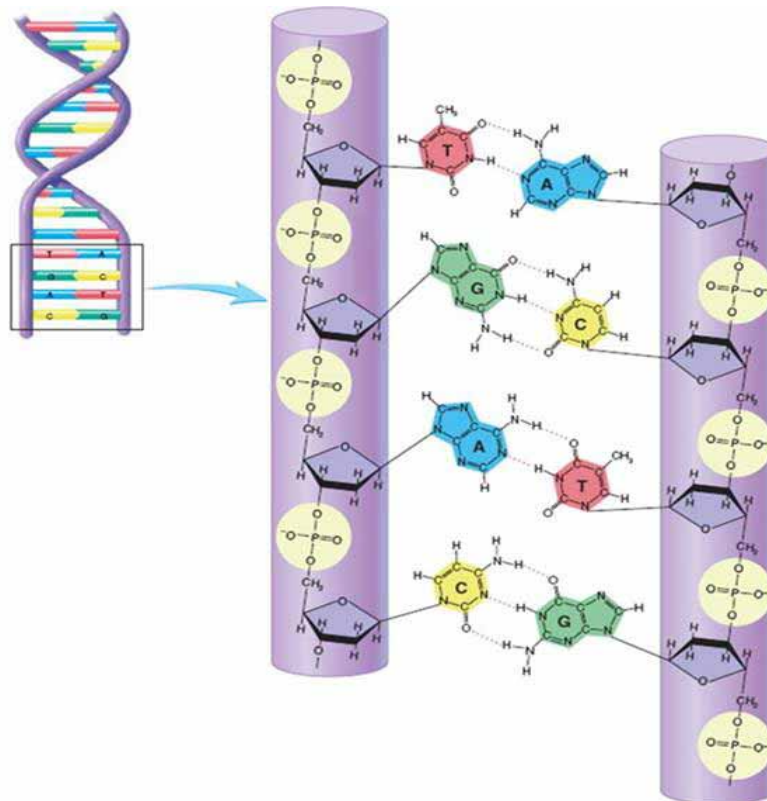
A Figura 11a mostra a estrutura do primeiro PS sintetizado. Os monômeros possuem unidades complementares 2,6-diacilaminopiridina (P) e uracil (U) que são espaçadas por uma cadeia derivada do ácido tartárico (T) com dois centros quirais. As unidades polimerizam via três ligações de hidrogênio. A quiralidade do espaçador derivado do ácido tartárico (*L,L*) ou (*D,D*) é transferida para a estrutura supramolecular que adota uma conformação helicoidal com suas fibras orientadas no sentido oposto aos centros quirais moleculares, enquanto que para o espaçador *meso*, não há expressão de quiralidade supramolecular, como mostrado pelas micrografias eletrônicas na Figura 11b [57].



Os químicos se inspiram na perfeição da natureza para o desenvolvimento de novos materiais. Ligações de hidrogênio muito fortes estão presentes no colágeno e na celulose, ambos com função estrutural. Este tipo de interação intermolecular possui também um papel de destaque em polímeros sintéticos. As propriedades do nylon, por exemplo, são em parte, devido à presença de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas.

Certamente o mais notável sistema supramolecular natural é o DNA, cuja arquitetura em dupla-hélice depende da cooperação de várias ligações de hidrogênio (Figura 12). Por conta da reversibilidade das ligações de hidrogênio, a dupla-hélice pode ser desfeita e reconstruída durante o processo de divisão celular. É possível notar a semelhança entre as unidades formadoras da ligação de hidrogênio que estabilizam a hélice de DNA, e as presentes no PS de Lehn, mostrado anteriormente na Figura 11a. Outras similaridades entre ambas as estruturas supramoleculares, como o número de ligações de hidrogênio e o formato helicoidal são também evidentes [58].

**Figura 12. Estrutura em dupla-hélice da cadeia DNA. A construção de unidades complementares compostas por átomos doadores e aceitadores das ligações de hidrogênio em PS sintéticos é inspirada em sistemas supramoleculares naturais. T=Timina, A=Adenina, G=Guanina, C=Citosina.**



Adaptado de Binder [58].

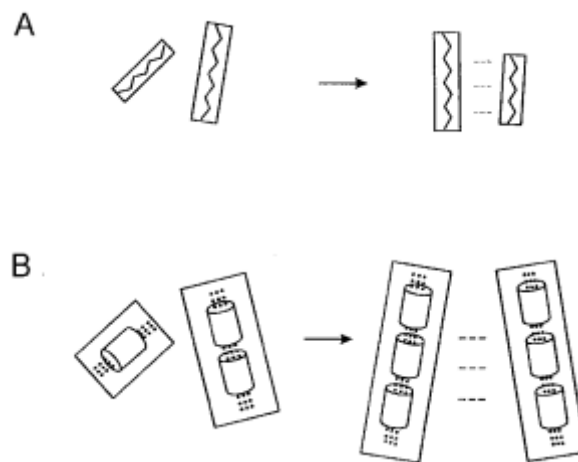
Os pioneiros na química de polímeros supramoleculares, Lehn e seus contemporâneos **Takashi Kato, Jean M.J. Fréchet e A. C. Griffin** foram responsáveis pela primeira geração de PS [59]. Estes pesquisadores forneceram as primeiras informações de como controlar as polimerizações supramoleculares identificando que há um aumento no grau de polimerização dos monômeros quando ocorre simultaneamente, a formação de interações intermoleculares na cadeia principal e indução de mesofase nos PS. Atualmente, a forma de se obter graus de polimerização elevados e propriedades mecânicas próximas às dos polímeros convencionais, envolve a atuação de múltiplas forças não covalentes unindo os monômeros.

Em qualquer polímero, seja ele convencional ou supramolecular, a indução de mesofases liotrópicas (formadas na presença de solvente) e termotrópicas (formadas a partir da fusão da fase sólida) pode ser promovida por atrações intermoleculares, se estas surgem devido à orientação relativa dos grupos presentes nas cadeias [60]. Forças de London são um bom exemplo de interações dependentes de orientação. Tais forças atrativas se originam da flutuação da nuvem eletrônica das moléculas ou de certos grupos funcionais resultando em dipolos elétricos instantâneos que provocam atração. A energia das forças de London depende da polarizabilidade, a qual expressa a facilidade de deformação da nuvem eletrônica. A polarizabilidade possui natureza anisotrópica, isto é, varia conforme a direção. O grupo p-fenileno, por exemplo, que é bastante utilizado como grupo mesogênico (indutor de mesofase) em polímeros convencionais, exibe uma polarizabilidade substancialmente maior ao longo do seu eixo principal em comparação com as direções transversais. Desta forma, a presença do grupo p-fenileno provoca ordenação das cadeias do polímero preferencialmente na direção principal devido à anisotropia da polarizabilidade que leva a forças de London mais fortes nesta direção.

A Figura 13 esquematiza as transições de um estado isotrópico, ou seja, desordenado (a esquerda da seta) para um estado orientado (a direita da seta), isto é, com formação de mesofase, envolvendo polímeros [61]. Para um polímero convencional (Figura 13a), apenas é observado a orientação das cadeias anteriormente dispersas, devido o aparecimento de interações intermoleculares dependentes de orientação. No entanto, quando há a associação das interações intermoleculares dependentes de orientação, que estabilizam a mesofase, e interações intermoleculares que unem os monômeros, ocorre o crescimento da cadeia (Figura 13b), implicando-se em um tipo de

mecanismo de polimerização supramolecular semelhante ao mecanismo de auto-montagem de micelas em estruturas lineares numa fase nemática [62] .

**Figura 13. Transições a partir de um estado isotrópico (esquerda) a um estado orientado (direita) para A: polímeros convencionais e B: polímeros supramoleculares em que monômeros da cadeia principal estão unidos por interações intermoleculares. É possível observar que a indução de mesofase aumenta o grau de polimerização em PS. Interações intermoleculares são representadas por ... enquanto que --- representam as interações que estabilizam a mesofase.**



Adaptado de Ciferri [61].

### 1.3 Propriedades dos polímeros supramoleculares

Assim como os polímeros convencionais, os PS possuem propriedades físicas típicas de macromoléculas, definidas pela força de atração entre os monômeros, observadas tanto no sólido quanto em solução diluída ou concentrada. Mas, diferentemente de um polímero convencional um PS é formado no equilíbrio termodinâmico e devido à reversibilidade das forças não covalentes, suas cadeias podem romper e recombinar-se em temperatura ambiente [59]. Quando uma perturbação exterior é aplicada ao sistema, e o equilíbrio ajusta-se em escala de tempo experimental, há uma significativa alteração nas propriedades físicas dos PS, não observadas na maioria dos polímeros convencionais. Por exemplo, estes quando fundidos tornam-se altamente viscosos como resultado do emaranhamento de suas cadeias. Altas temperaturas e pressão elevada são necessárias para reduzir a viscosidade do material permitindo seu processamento. PS por outro lado, demonstram intensa redução da viscosidade quando submetidos a temperaturas pouco elevadas, devido o rompimento das forças não covalentes. Como estas são reversíveis, com o

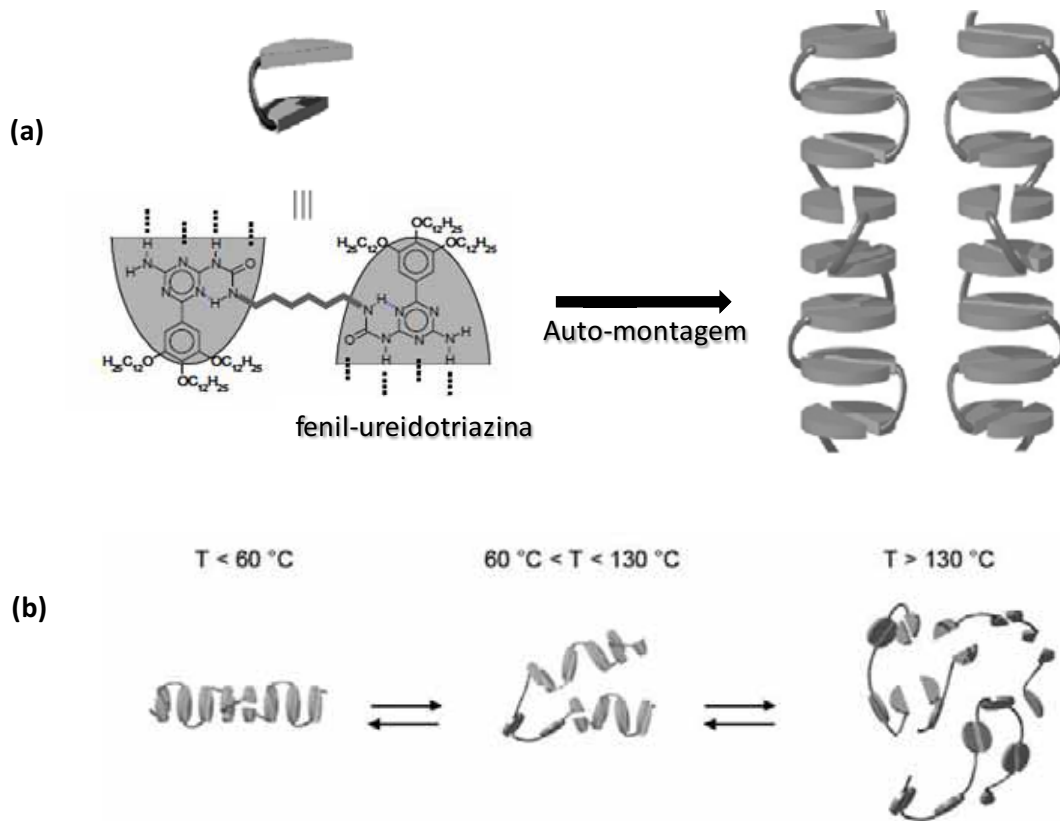
resfriamento do material, suas características são integralmente recuperadas. Interessante também, o mecanismo pelo qual se dá a relaxação de tensão nos PS [56]. Além de suas cadeias escoarem uma sobre as outras devido à mobilidade natural como fazem os polímeros convencionais, os PS relaxam uma tensão aplicada fragmentando as cadeias tensionadas pelo rompimento das forças não covalentes, seguido por recombinação destes fragmentos com cadeias livres de tensão.

O equilíbrio pode também responder a outros estímulos, além da temperatura e força mecânica, como substâncias, estímulos eletroquímicos, radiação, etc [63]. Em virtude disso uma gama de materiais funcionais “estímulo-responsivos” pode ser obtida como elastômeros, adesivos, biomateriais, dispositivos eletrônicos, superfícies super-hidrofóbicas, e muitos outros [64-67]. Polímeros convencionais podem ser transformados em PS visando propriedades como a auto-regeneração ou auto-reparação, isto é, a recuperação espontânea de fraturas no material [68].

A obtenção de um PS inicia-se com a construção dos monômeros que são funcionalizados com unidades complementares, capazes de se unir espontaneamente levando o crescimento da cadeia. A união através do reconhecimento molecular entre essas unidades é chamada de auto-montagem ou polimerização supramolecular, uma vez que se observa o aumento da massa molecular. Para ilustrar, a Figura 14a mostra um PS em forma de coluna.

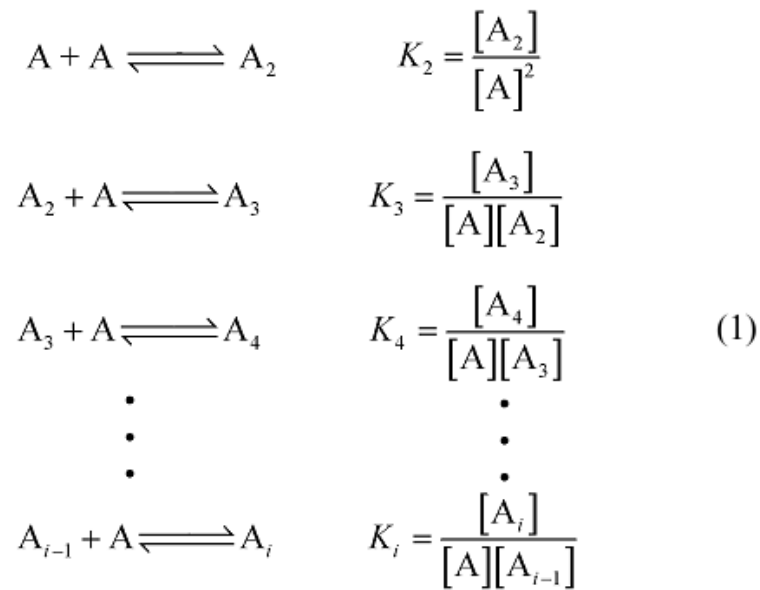
Os monômeros são formados por uma cadeia de 6 carbonos funcionalizada com dois grupos complementares conhecidos como fenil-ureidotriazina, que se reconhecem mediante quatro ligações de hidrogênio permitindo o crescimento da cadeia [69]. A estabilidade da coluna, por sua vez, resulta de dois fatores sobrepostos: das interações do tipo  $\pi \cdots \pi$  de empilhamento entre os anéis aromáticos, presentes em cada unidade complementar, e também da flexibilidade da cadeia alquílica que viabiliza a aproximação dos anéis aromáticos no monômero. Na Figura 14b verifica-se o efeito da temperatura sobre o equilíbrio termodinâmico e conseqüentemente sobre as propriedades físicas do material. O PS é um cristal líquido termotrópico em temperaturas abaixo de 60°C devido ao arranjo ordenado das colunas. Entre 60 e 130 °C as interações  $\pi \cdots \pi$ , mais fracas, são perdidas e a estrutura colunar é colapsada. Em temperaturas mais elevadas, as ligações de hidrogênio são rompidas, enquanto que com o resfriamento, todo o arranjo do material é recuperado.

Figura 14. (a) Exemplo de um PS que múltiplas ligações de hidrogênio e interações do tipo  $\pi\cdots\pi$  de empilhamento promovem a formação de estruturas colunares sensíveis a temperatura devido a reversibilidade das interações intermoleculares (b).



Adaptado de Brunsveld et al. [69].

A polimerização supramolecular pode ser descrita, do ponto de vista termodinâmico, com base em um modelo simples que envolve um mecanismo de múltiplos estágios, de forma que a adição de um monômero a outro monômero ou ao polímero ocorre com idêntica mudança de energia livre. Conseqüentemente, as constantes de equilíbrio para cada um dos estágios da auto-montagem possuem o mesmo valor [70]. Sucessivas equações de equilíbrio podem ser escritas para associação de  $i$  unidades monoméricas  $A$  em uma sequência linear  $A_i$ , a uma temperatura  $T$ :



Rearranjando as equações acima, as concentrações molares de cada espécie no equilíbrio ( $A_2, A_3, A_4 \dots A_i$ ) com diferentes graus de polimerização são definidas de acordo com as equações (2), enquanto que a concentração total inicial do monômero,  $C_t$ , e a concentração total dos produtos,  $C_p$ , incluindo monômeros, oligômeros e polímero podem ser obtidas conforme as equações (3) e (4), respectivamente:

$$\begin{array}{l}
 [A_2] = K_2 [A]^2 \\
 [A_3] = K_3 [A_2][A] = K_3 K_2 [A]^3
 \end{array} \quad (2)$$

$$\begin{array}{l}
 [A_4] = K_4 [A_3][A] = K_4 K_3 K_2 [A]^4 \\
 \vdots \\
 [A_i] = K_i [A_{i-1}][A] = K_i \dots K_3 K_2 [A]^i = [A]^i \cdot \prod_{j=2}^i K_j
 \end{array}$$

$$c_t = \sum_{i=1}^{\infty} i [A_i] \quad (3)$$

$$c_p = \sum_{i=1}^{\infty} [A_i] \quad (4)$$

Assumindo que  $K_2 = K_3 = \dots = K_i = K$ , as equações (2) – (4) podem ser simplificadas como segue, na forma das equações (5) – (7) :

$$[A_i] = K^{-1}(K[A])^i \quad (5)$$

$$c_t = \sum_{i=1}^{\infty} iK^{-1}(K[A])^i = \frac{[A]}{(1-K[A])^2} \quad (K[A] < 1) \quad (6)$$

$$c_p = \sum_{i=1}^{\infty} K^{-1}(K[A])^i = \frac{[A]}{1-K[A]} \quad (7)$$

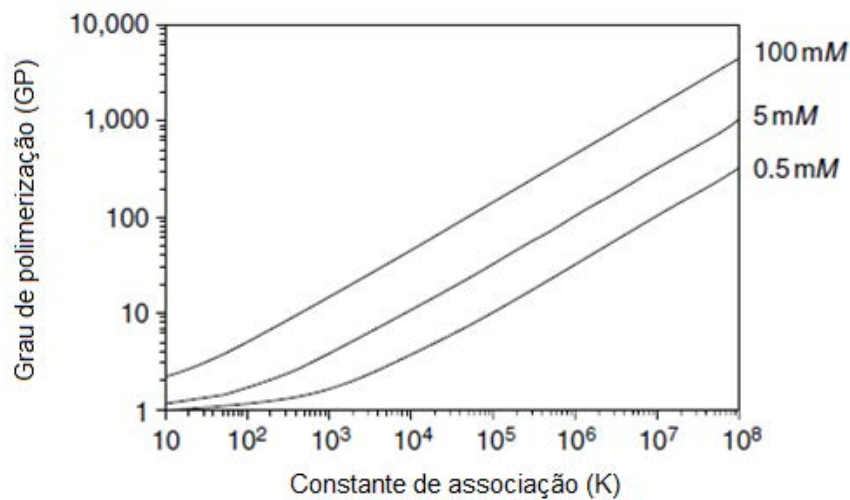
Se  $C_t$  é conhecido, a equação (8) pode ser derivada a partir da equação (6). O grau de polimerização (GP) do PS no equilíbrio (9) pode ser obtido relacionando as equações (6) e (7):

$$K[A] = 1 + \frac{1}{2Kc_t} - \left( \frac{1}{Kc_t} + \frac{1}{4(Kc_t)^2} \right)^{1/2} \quad (8)$$

$$GP = \frac{\sum_{i=1}^{\infty} i[A_i]}{\sum_{i=1}^{\infty} [A_i]} = \frac{c_t}{c_p} = \frac{1}{1-K[A]} \quad (9)$$

Com base nas equações (8) e (9) é possível perceber que o GP de um PS depende da concentração inicial total do monômero ( $C_t$ ) e também da constante de equilíbrio ( $K$ ), comumente chamada de constante de associação. O gráfico mostrado na Figura 15 demonstra esta relação [71].

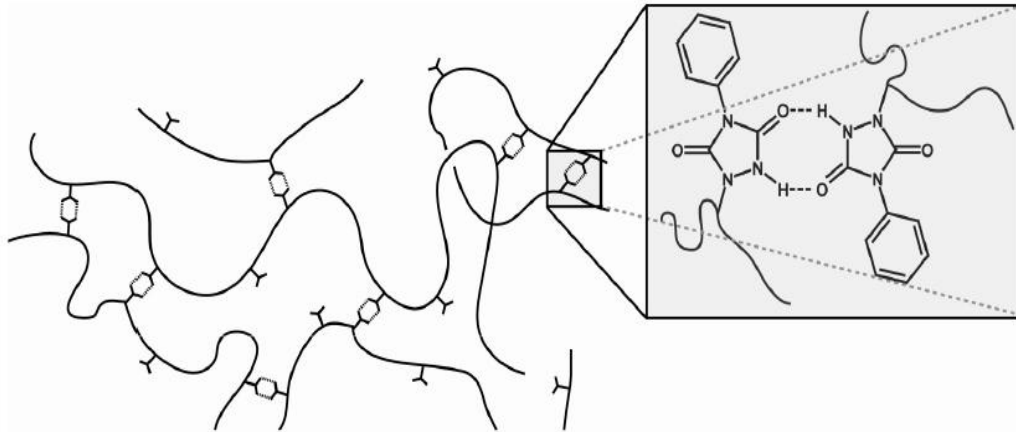
Figura 15. Variação do grau de polimerização (GP) de um PS como função da constante de associação (K) em diferentes concentrações iniciais dos monômeros ( $C_i$ ).



Adaptado de Ciferri [71].

Ligações de hidrogênio têm um papel de destaque nas polimerizações supramoleculares, pois permitem a obtenção de materiais com graus de polimerização elevados e controle da arquitetura molecular. Três características tornam as ligações de hidrogênio bastante eficientes no processo de auto-montagem [72]. Duas delas são a especificidade e direcionalidade, pois esta interação intermolecular envolve apenas os átomos doadores que fornecem o H e aceptores que possuem par de elétrons livres. Isto permite que as ligações de hidrogênio sejam localizadas em posições específicas, viabilizando o controle da arquitetura dos materiais. Por exemplo, há PS em que ligações de hidrogênio unem os monômeros linearmente na cadeia principal como mostrado anteriormente na Figura 14, ou dispostas lateralmente como ilustrado na Figura 16 abaixo. Neste caso, o polibutadieno é funcionalizado lateralmente com unidades 4-fenil-2,4-triazol-3,5-diona que se reconhecem através de duas ligações de hidrogênio agindo como ligações cruzadas reversíveis. O material é um elastômero termoplástico em que o aumento do número de unidades complementares, e conseqüentemente das ligações cruzadas, eleva tanto a elasticidade quanto a sua massa molecular [73].

**Figura 16. Polibutadieno reticulado através de ligações de hidrogênio laterais. O material é um termoplástico que possui baixa temperatura de transição vítrea devido à presença de interações intermoleculares, permitindo que seja moldado e reciclado inúmeras vezes. Como a temperatura de aquecimento não é alta o bastante para levar a fragmentação das cadeias principais do PS, mas apenas para romper as ligações de hidrogênio, evita-se a polidispersão do material e perda de suas propriedades.**



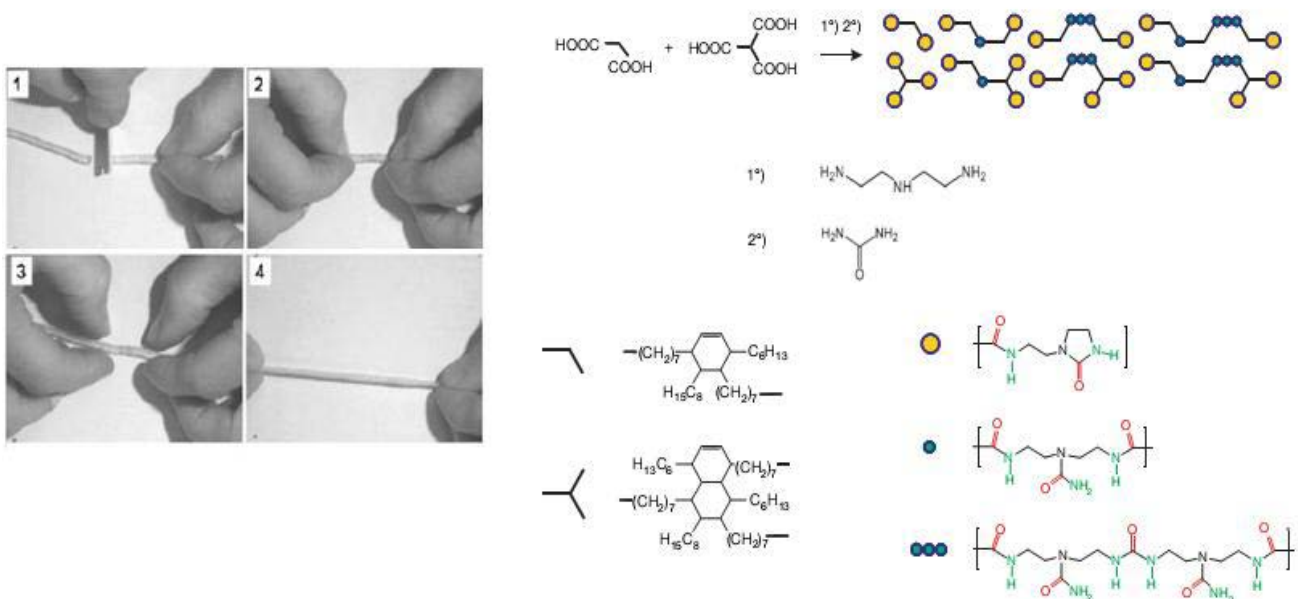
Adaptado de Stadler e Freitas [73].

Diferentemente dos exemplos anteriores em que as ligações de hidrogênio estão localizadas ora linearmente, ora lateralmente, o PS mostrado na Figura 17 foi obtido ao utilizar múltiplas ligações de hidrogênio para conectar monômeros em ambos os sentidos, simultaneamente. O material resultante de um arranjo em rede dos monômeros é um elastômero auto-regenerável. Quando cortado ou fragmentado através de força mecânica, o simples contato entre os pedaços é suficiente para regenerar o material [74]. Normalmente redes supramoleculares comportam-se como plásticos semicristalinos e não como elastômeros. Para se evitar a cristalização, os monômeros foram construídos com estruturas diversificadas reagindo uma mistura de ácidos graxos com a dietilenotriamina em uma primeira etapa e posteriormente com a ureia. A reação entre a dietilenotriamina e ureia produzem unidades complementares (representadas na Figura 17 entre colchetes) unidas às cadeias dos ácidos graxos a partir da ligação amida.

Após a fragmentação do elastômero supramolecular, o contato entre as partes por aproximadamente 15 minutos, sem aquecimento ou pressão, é suficiente para que o material seja recuperado parcialmente, demonstrando uma deformação de 200 % no ponto de ruptura. Após 180 minutos de contato, o PS recupera completamente suas propriedades mecânicas originais (deformação de aproximadamente 500 % no ponto de

ruptura). A auto-reparação ocorre como consequência do restabelecimento do equilíbrio termodinâmico, fazendo com que as ligações de hidrogênio quebradas com o rompimento do material sejam refeitas quando os fragmentos são colocados em contato. No entanto, se o contato entre os fragmentos não ocorre por um período de 6 horas, grande parte das interações é restabelecida entre os monômeros e oligômeros livres em cada fragmento. Após o período de uma semana, nenhuma propriedade de auto-reparação é observada.

**Figura 17. Elastômero supramolecular auto-regenerável (fotos em destaque) obtido a partir de monômeros de diferentes estruturas preparados através da reação entre uma mistura de ácidos graxos, dietilenotriamina (1ª etapa) e ureia (2ª etapa). Os grupos doadores (verde) e aceitadores (vermelho) das ligações de hidrogênio que compõem as unidades complementares dos monômeros ao associarem via ligações de hidrogênio formam um rede supramolecular. Além dos colchetes, a partir da ligação amida, estendem-se as cadeias carbônicas derivadas de ácidos graxos.**

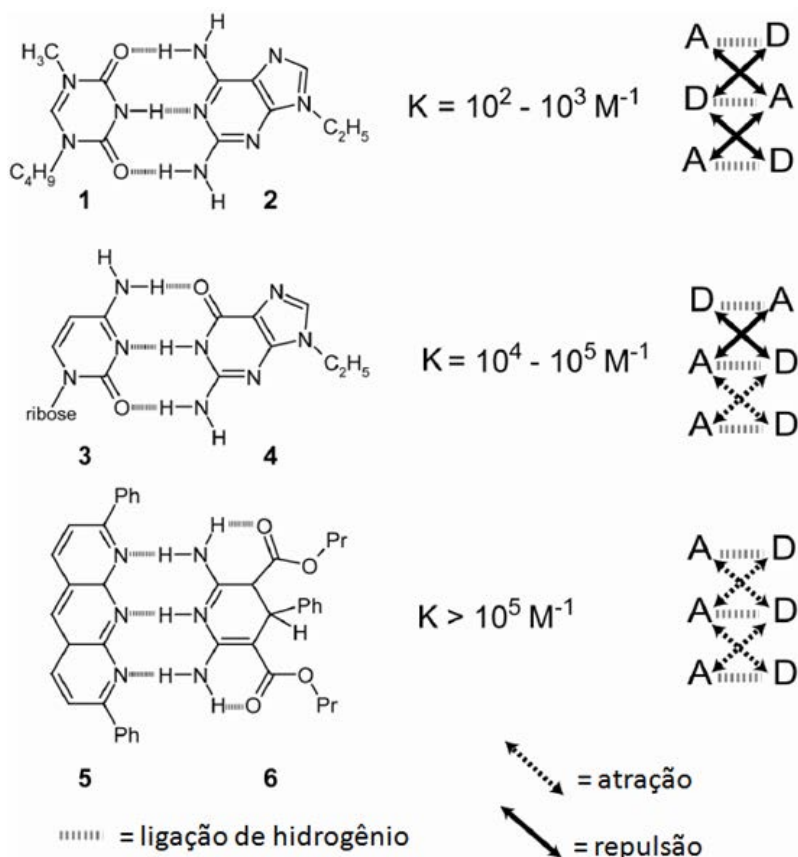


Adaptado de Cordier et al. [74].

Além da especificidade e direcionalidade das ligações de hidrogênio, discutidas acima, outra característica fundamental deste tipo de força não covalente é conhecida como cooperatividade. Isto significa que quanto maior o número de ligações de hidrogênio entre as unidades complementares, mais forte é a união entre os monômeros. Contudo, este efeito é influenciado pelas interações atrativas e repulsivas (eletrostáticas) que surgem devido ao arranjo dos vários átomos doadores e aceitadores do H vizinhos [75]. Conforme esquematizado na Figura 18, as interações primárias,

representadas pelas ligações de hidrogênio, e também as secundárias, representadas pelas interações eletrostáticas contribuem para a força resultante entre duas unidades complementares, influenciando diretamente nas constantes de associação ( $K$ ).

**Figura 18. Efeito das interações atrativas e repulsivas entre átomos vizinhos envolvidos nas ligações de hidrogênio, sobre a constante de associação ( $K$ ) das unidades complementares 1-6. A=átomos aceitadores e D=átomos doadores do H.**



Adaptado de Jorgensen e Pranata [75].

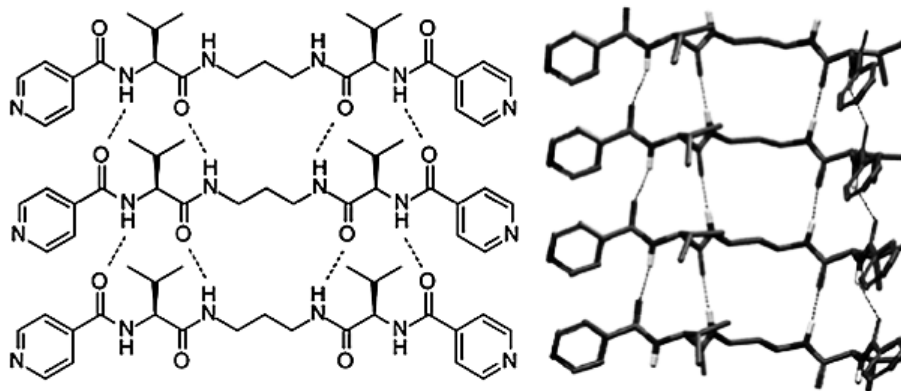
Quando os átomos vizinhos envolvidos na ligação de hidrogênio estão em um arranjo do tipo ADA-DAD (Fig. 18, unidades 1-2), a força de atração proveniente destas interações intermoleculares entre as unidades complementares é reduzida pelas interações eletrostáticas repulsivas, produzindo tipicamente valores de  $K$  entre  $10^2$  e  $10^3$ . Em um arranjo intermediário DAA-ADD (Fig. 18, unidades 3-4), a disposição dos átomos faz surgir além de interações repulsivas, interações atrativas que aumentam o valor de  $K$  ( $10^4$ - $10^5$ ) em comparação ao arranjo anterior, ou seja, a força de atração entre as unidades complementares aumenta porque interações eletrostáticas atrativas se somam com as ligações de hidrogênio. No arranjo AAA-DDD (Fig. 19, unidades 5-6), por sua

vez, existem apenas forças atrativas o que produz valores mais elevados do que as conformações anteriores, ou seja,  $K > 10^5$ . Resumindo: quanto mais forte é a união dos monômeros, maior o valor de  $K$  e mais deslocado está o equilíbrio termodinâmico no sentido da formação do PS. Conseqüentemente maiores graus de polimerização são observados assim como o comportamento mecânico, térmico e reológico que acompanham tipicamente todos os materiais poliméricos, sejam eles unidos por ligações covalentes ou forças não covalentes.

A natureza do solvente tem forte influência sobre as ligações de hidrogênio afetando também as constantes de associação e conseqüentemente o grau de polimerização do PS [76]. Como regra, as ligações de hidrogênio são mais efetivas em solventes apolares como tolueno e clorofórmio, enquanto que em solventes polares como água, acetonitrila e dimetilsulfóxido (DMSO), a competição pelas ligações de hidrogênio nas unidades complementares resulta em graus de polimerização mais reduzidos. No entanto PS que formam géis em solventes polares persistem estruturados demonstrando elevados graus de polimerização [77].

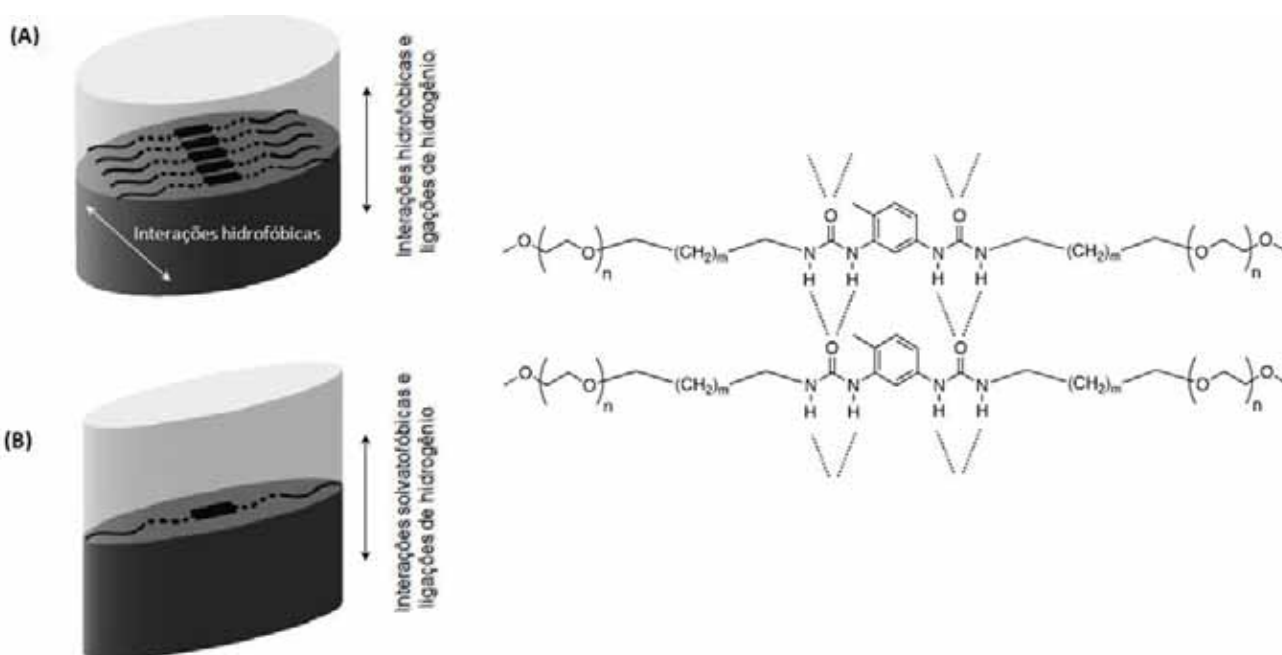
Na estrutura da Figura 19, interações hidrofóbicas conduzem a organização dos monômeros em uma disposição na qual as ligações de hidrogênio em conjunto com interações  $\pi \cdots \pi$  são fortes o suficiente para formar fibras [78]. No ambiente hidrofóbico entre os monômeros, as moléculas de água não solvatam os átomos doadores e aceptores do H, mas são encerradas entre as fibras do PS formando um gel supramolecular. Interações hidrofóbicas e solvatofóbicas afetam a organização dos monômeros de maneiras distintas [8], como é possível observar na Figura 20, onde é esquematizada a seção transversal de um gel supramolecular em água e acetonitrila.

**Figura 19. Esquema do arranjo adotado por alguns monômeros o qual se estende por todo o PS.**



Adaptado de Yu et al. [77].

Figura 20. Seção transversal do gel supramolecular formado em (A) água e (B) acetonitrila. A estrutura dos monômeros no PS é representada à direita. Em água, as interações hidrofóbicas orientam os monômeros em um arranjo lateral e vertical, acomodando um maior número de monômeros na seção transversal enquanto que interações solvatofóbicas que surgem em acetonitrila organizam os monômeros apenas no sentido vertical agrupando um menor número por seção. Conforme evidenciado pela estrutura do PS, as ligações de hidrogênio envolvendo os grupos amida surgem acima e abaixo do plano, assim como as interações do tipo  $\pi\cdots\pi$ , independentemente do solvente. Devido à organização distinta dos monômeros, a viscosidade do gel formado em água é maior do que em acetonitrila em todas as concentrações.

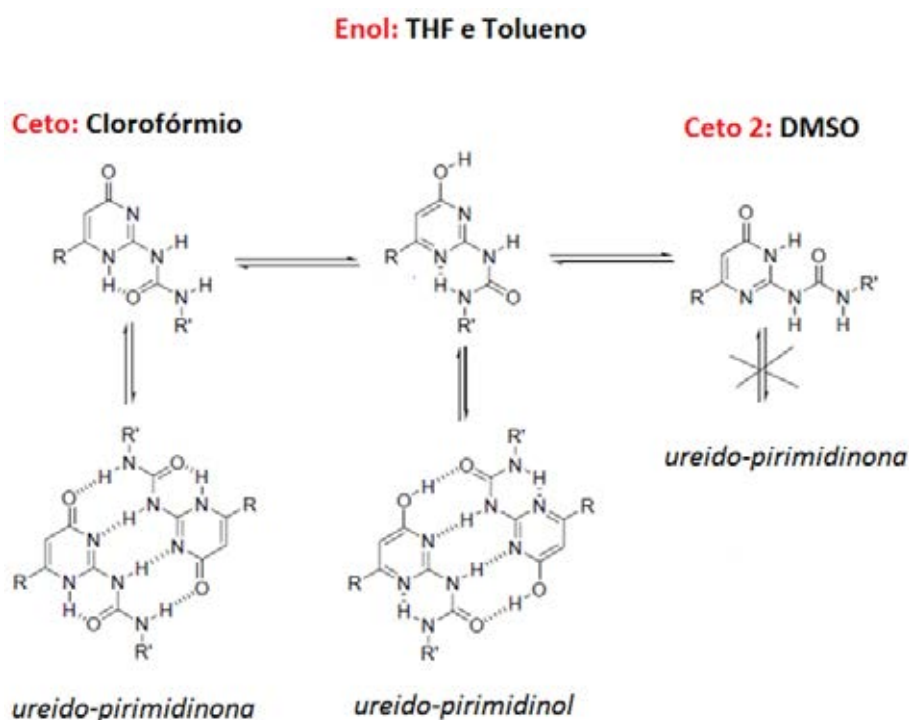


Adaptado de Obert et al. [8].

Uma situação interessante surge quando as unidades complementares podem apresentar isômeros em solução. Neste caso, além do efeito que a polaridade do solvente causa sobre a força da ligação de hidrogênio, há influência também do arranjo dos átomos em cada isômero. Isto pode ser percebido pelos valores de  $K$  distintos obtidos em solventes diferentes.

Conforme mostrado na Figura 21, a unidade complementar conhecida como ureido-pirimidinona, apresenta três isômeros em solução (ceto 1, ceto 2 e enol) sendo que o equilíbrio ceto-enólico favorece cada tautômero em maior proporção, dependendo do solvente utilizado [79].

Figura 21. Tautômeros da ureido-pirimidinona em solução. Apenas as formas ceto e enólica podem se associar via quatro ligações de hidrogênio.



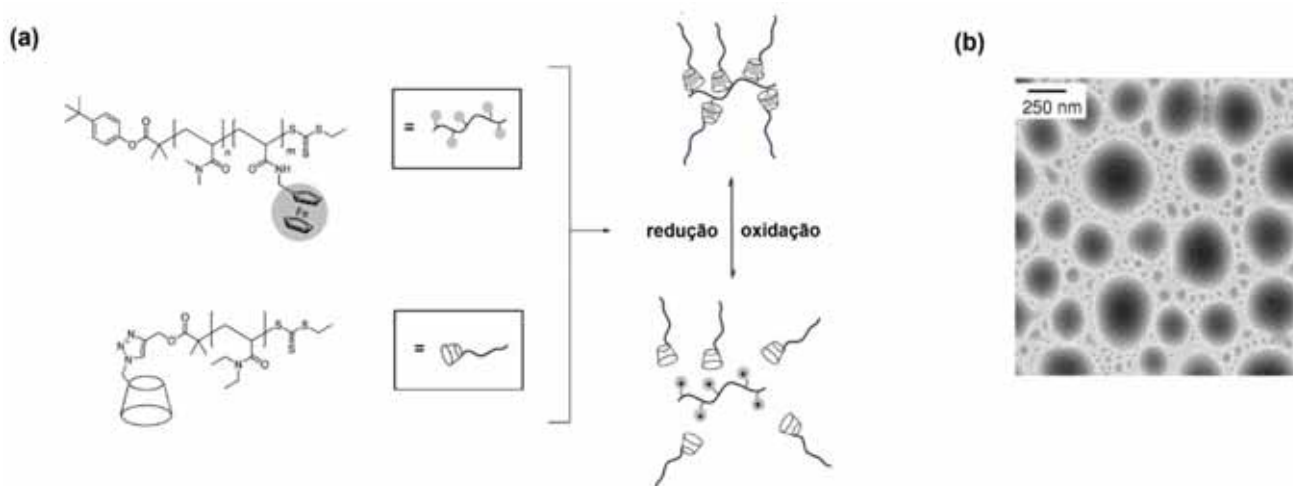
Adaptado de Schoot [79].

Na forma ceto 1 a disposição dos átomos (AADD-DDAA) na unidade complementar produz na maioria forças atrativas enquanto que na forma enólica, ureido-pirimidinol (DADA-ADAD), todas as interações entre os átomos vizinhos são repulsivas. Os valores de  $K$ , levando em conta a prevalência das espécies, correspondem a  $6,0 \times 10^7$  e  $4,5 \times 10^5$  em clorofórmio e tolueno, respectivamente. O valor elevado de  $K$  encontrado em tolueno é explicado pela presença das múltiplas ligações de hidrogênio que compensam as interações repulsivas. Como a forma ceto 2 não associa-se devido a falta de complementaridade, sua prevalência em relação as demais espécies em DMSO faz com que a viscosidade dos PS funcionalizados com a ureido-pirimidinona seja mais próxima de compostos de pequena massa molecular. No estado sólido, por sua vez, a forma ceto 1 que é presente, possibilita a obtenção de materiais com propriedades mecânicas bem próximas dos polímeros convencionais, dado a forte interação entre os monômeros. É possível funcionalizar homopolímeros como policarbonatos, poliésteres e copolímeros como polietileno/butileno [80,81] (Figura 22). Após serem modificados com a ureido-pirimidinona os polímeros demonstram intensa redução de viscosidade com o aquecimento, diferentemente dos precursores. Uma vez dissolvidos podem ser



PS podem ser construídos para apresentar resposta macroscópica mais específica diante de estímulos externos. Neste caso, o comportamento é definido, não apenas pela reversibilidade das forças não covalentes, mas também pelas propriedades das unidades complementares. Alguns exemplos interessantes são mostrados nas Figuras 24-26 envolvendo PS sensíveis a estímulo eletroquímico, substâncias e radiação, respectivamente. O copolímero supramolecular apresentado na Figura 24a, por exemplo, é formado a partir da auto-montagem de macromônmeros que são oligômeros polidimetilacrilamida e polidietilacrilamida, funcionalizados com grupos ferroceno e  $\beta$ -ciclodextrina (um macrociclo composto de sete unidades de glicose), respectivamente [82]. O reconhecimento molecular entre estas unidades complementares envolve formação de interações do tipo  $\text{CH}\cdots\pi$  (complementaridade interacional) e alojamento do grupo ferroceno no interior da cavidade da ciclodextrina (complementaridade estérica). Como o grupo ferroceno pode ser reversivelmente oxidado e reduzido diante de estímulo eletroquímico em meio aquoso, tal propriedade pode ser utilizada para controlar o processo de polimerização e despolimerização. Aplicando-se uma tensão de 596 mV os grupos ferroceno são oxidados a cátions ferrocênio, o que altera a densidade eletrônica nos anéis aromáticos levando ao rompimento das interações  $\text{CH}\cdots\pi$  com a ciclodextrina, e conseqüentemente, à despolimerização. Com a redução do ferrocênio, aplicando -506 mV, o PS é novamente formado. Quando a polimerização supramolecular é conduzida em meio aquoso há a formação de micelas com tamanho entre 10-300 nm, o que é possível perceber pelas micrografias na Figura 24b. A propriedade redox do grupo ferroceno foi utilizada para controlar a abertura e fechamento das micelas permitindo o uso deste PS como sistemas de liberação controlada de fármacos.

**Figura 24.** (a) Comportamento redox do PS formado pela auto-montagem de oligômeros polidimetilacrilamida e polidietilacrilamida funcionalizados com grupos ferroceno e  $\beta$ -ciclodextrina (macrocíclo em formato de cálice), respectivamente. (b) Em meio aquoso o PS forma micelas que podem ser reversivelmente colapsadas e auto-montadas através de estímulo eletroquímico.

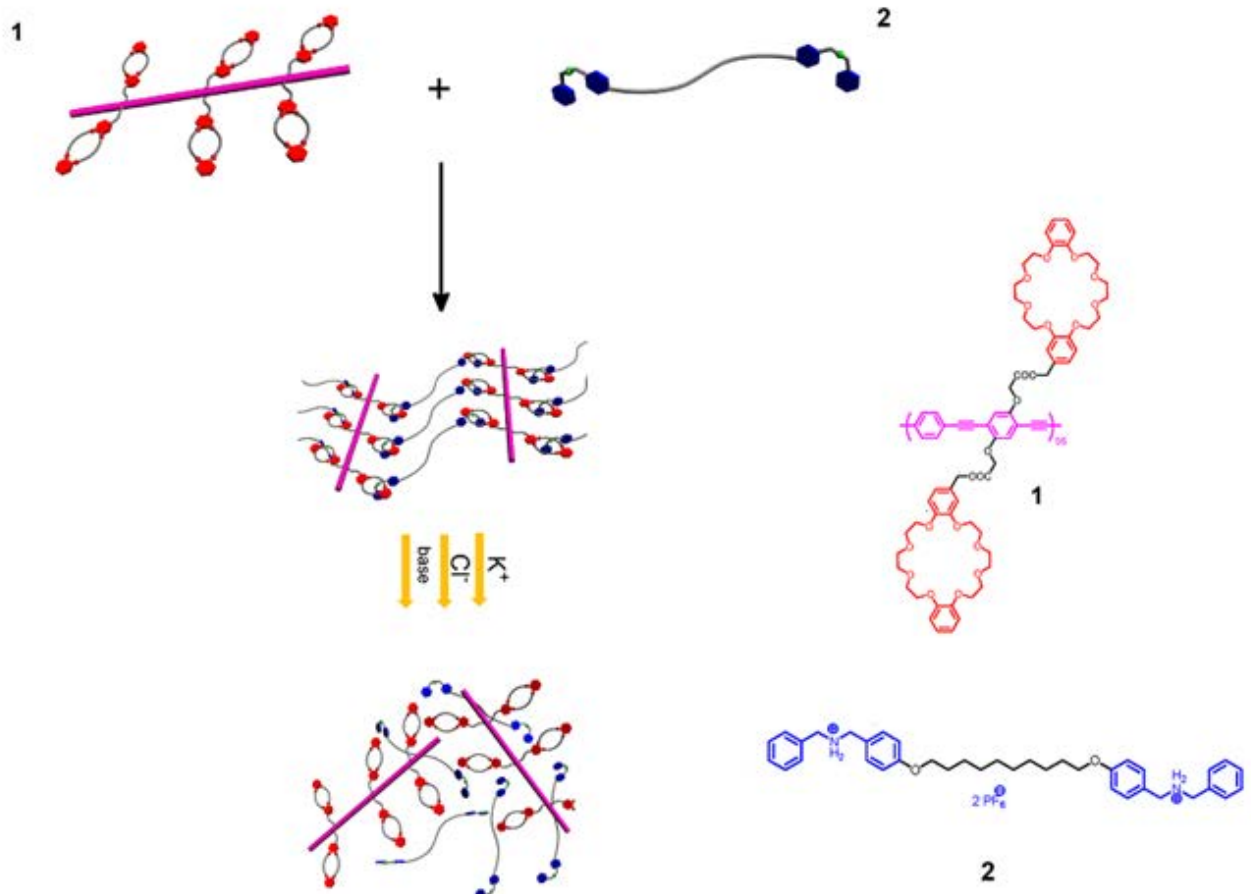


Adaptado de Szillat et al. [82].

A Figura 25 mostra um copolímero supramolecular que se comporta como um sensor químico [83], obtido funcionalizando o macromonômero 1 fluorescente (oligômero polifenileno/etinileno destacado em rosa) com o ligante macrocíclico conhecido como éter-coroa (destacado em vermelho). A segunda unidade complementar presente no monômero 2 é um diabenxilamônio (em azul). O reconhecimento molecular entre 1 e 2 se dá por forças íon-dipolo e alojamento de um dos anéis aromáticos do grupo diabenxilamônio no interior da cavidade do éter-coroa. Os éteres-coroa são ligantes sofisticados que possuem cavidades que podem ser modificadas para complexar diversas espécies, através de interações intermoleculares, como cátions de metais alcalinos, cátions orgânicos como diazônio e alquilamônio, bem como moléculas neutras e ânions como fosfatos, carboxilatos,  $\text{Cl}^-$  e  $\text{OH}^-$ . Alguns destes ligantes são capazes inclusive de reconhecimento quiral, ou seja, a habilidade de distinguir enantiômeros mimetizando o modo de ação de enzimas [51].

O PS da Figura 25 é utilizado como sensor fluorescente para os íons  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{OH}^-$  e gás amônia. Devido a maior afinidade do éter-coroa por estas espécies, o PS despolimeriza na presença dos mesmos, tornando-se mais fluorescente, o que é ocasionado pela presença do macromonômero 1 livre. Na forma polimerizada a sua imobilização leva uma redução da intensidade de fluorescência.

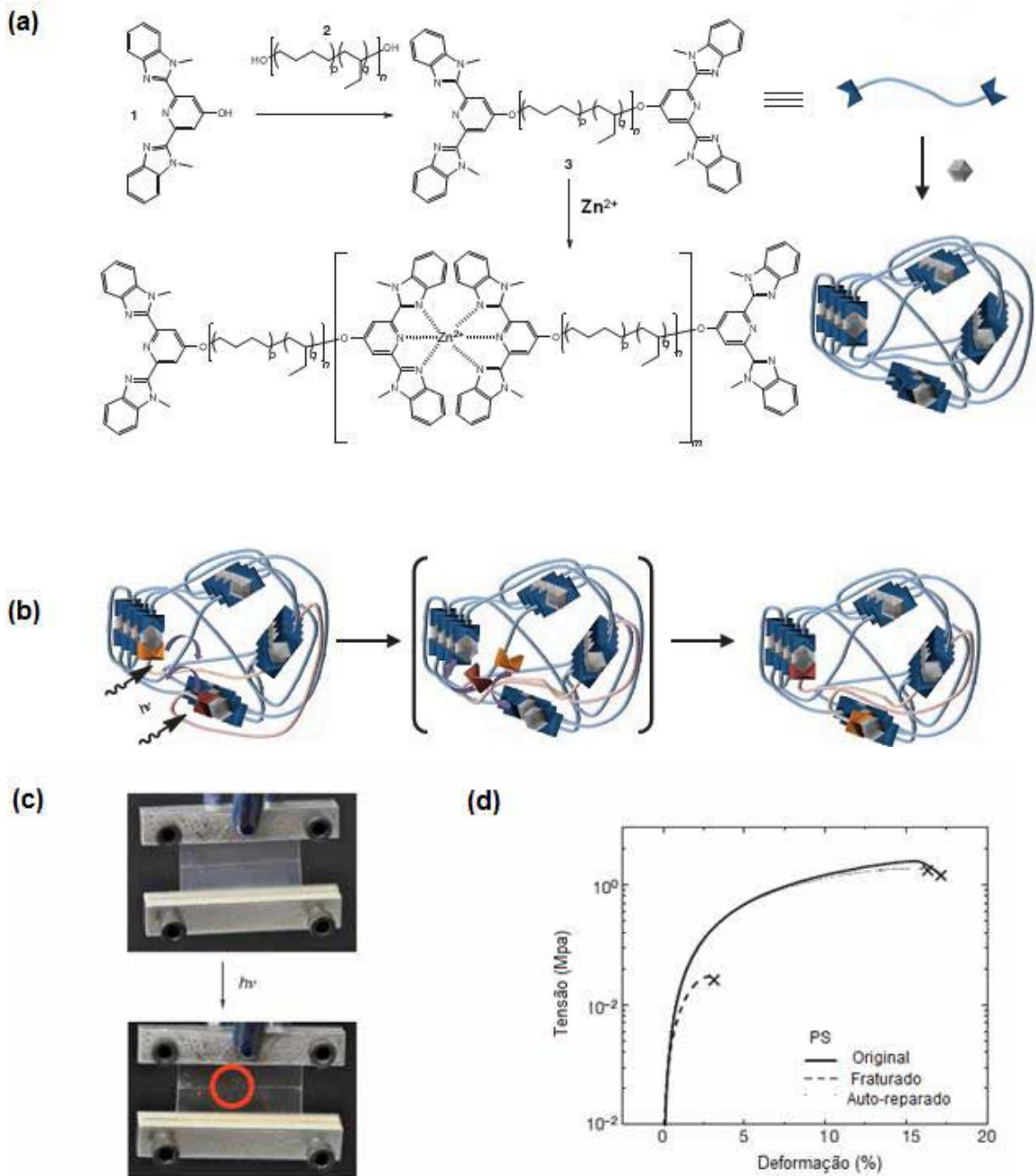
Figura 25. PS utilizado como sensor fluorescente para os íons  $K^+$ ,  $Cl^-$ ,  $OH^-$  e gás amônia. Na presença destas substâncias há um deslocamento dos grupos di-benzilamônio das cavidades dos éteres-coroa pela maior afinidade do ligante, levando à despolimerização do PS. Com o macromonômero 1 livre, há um aumento na intensidade de fluorescência que é atribuída aos anéis aromáticos conjugados com as ligações triplas.



Adaptado de Ji et al. [83].

A Figura 26a esquematiza a obtenção de um PS com capacidade de auto-reparação de fraturas em sua estrutura, construído através da funcionalização do macromonômero polietileno/butileno com o ligante 2,6-bis(19-metilbenzimidazolil)piridina [84]. Na presença de  $Zn^{2+}$ , interações metal-ligante são formadas agindo como ligações cruzadas reversíveis que reticulam o material.

Figura 26. PS com capacidade de auto-reparação (a) obtenção a partir da funcionalização do polietileno/butileno com ligante derivado da biperidina. Na presença de íons  $Zn^{2+}$ , interações metal-ligante são formadas agindo como ligações cruzadas reversíveis. (b) Unidades complementares sensíveis à radiação ultravioleta. (c) Auto-reparação local do PS pela incidência da radiação ultravioleta. (d) Curvas de tensão-deformação para o PS. A eficiência de auto reparação igual a  $100 \pm 36\%$  foi obtida através da relação: (tenacidade do PS reparado)/(tenacidade do PS original) x 100.



Adaptado de Burnworth et al. [82].

Ao ser exposto à luz ultravioleta, as unidades complementares são eletronicamente excitadas. A energia absorvida é convertida em calor que rompe as interações conduzindo a despolimerização e redução da viscosidade pela presença dos macromônmeros livres. Cessando o estímulo, as ligações cruzadas são completamente recuperadas. Esta propriedade permite que fraturas no polímero sejam reparadas localmente como mostrado na Figura 26b, sem a necessidade de processar todo o material. O mecanismo de auto-reparação em uma interface formada por uma fratura envolve a difusão dos macromônmeros livres entre a interface, que é facilitada pela baixa viscosidade, e em seguida pela formação das ligações cruzadas após cessado o estímulo. Na Figura 26c são mostradas as curvas de tensão-deformação para o PS original, para o PS após ser danificado, e após ser regenerado. A eficiência de auto-reparação igual a  $100\pm 36\%$ , foi determinada integrando a área sob as curvas de tensão-deformação até a ruptura dos filmes (tenacidade).

Os primeiros PS foram vistos como uma curiosidade científica, mas atualmente o campo da química de polímeros supramoleculares vem gerando materiais de diversas aplicações tecnológicas importantes. Algumas delas foram descritas nas seções anteriores sendo impossível descrevê-las em sua totalidade. Este trabalho é fruto dos primeiros passos do grupo de pesquisa neste campo promissor, sendo uma oportunidade para o desenvolvimento pesquisa básica e aplicada.

## 2. OBJETIVOS

Investigar a polimerização supramolecular em fase aquosa dos compostos carboxilato-meglumina derivados de ácidos graxos nos seguintes aspectos:

- a) relação entre características da cadeia do ácido precursor (tamanho, saturação e insaturação) e polimerização;
- b) arranjo dos monômeros no PS;
- c) comportamento do PS diante de temperatura e diluição.

Avaliar a eficiência do polímero supramolecular como um hidrogel, na inibição do biofilme da *Cândida albicans*.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Exemplo de preparação do composto estearato-meglumina (EM)

Quantidades equimolares correspondentes a 0,7292 g do ácido octadecanóico (esteárico) e 0,5004 g da n-metilglucamina (meglumina) foram dissolvidas em 20 mL de uma mistura composta de acetato de etila/metanol (1:1 v/v). O meio reacional foi mantido sob agitação constante por aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente, suficiente para se observar, após este tempo, a precipitação do produto branco. Grande parte do sobrenadante foi evaporada espontaneamente e o excesso ainda restante foi decantado. Em seguida o precipitado foi lavado com a mistura de acetato de etila/metanol a frio e secado sob fluxo de nitrogênio.

### 3.2 Exemplo de preparação do composto oleato-meglumina (OM)

Quantidades equimolares correspondentes a 0,7245 g do ácido cis-9-octadecenóico (oleico) e 0,5007 g da n-metilglucamina (meglumina) foram dissolvidas em uma mistura de acetato de etila/metanol (1:1 v/v), e esta mantida sob agitação constante por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente a solução foi concentrada evaporando-se espontaneamente o solvente até a formação do precipitado marrom, e

em seguida, o sobrenadante decantado. O produto obtido foi então lavado com a mistura de acetato de etila/metanol a frio e secado sob fluxo de nitrogênio.

### **3.3 Exemplo de preparação do composto palmitato-meglumina (PM)**

Quantidades equimolares correspondentes a 0,6580 g do ácido tetradecanóico (palmítico) e 0,5001 g da n-metilglucamina (meglumina) foram dissolvidas em 20 mL de uma mistura composta de acetato de etila/metanol (1:1 v/v). O meio reacional foi mantido sob agitação constante por aproximadamente 30 minutos em temperatura ambiente, suficiente para se observar, após este tempo, a precipitação do produto branco. Grande parte do sobrenadante foi evaporada espontaneamente e o excesso ainda restante foi decantado. Em seguida o precipitado foi lavado com a mistura de acetato de etila/metanol a frio e secado sob fluxo de nitrogênio.

### **3.4 Exemplo de preparação do composto undecanoato-meglumina (UM)**

Quantidades equimolares correspondentes a 0,4860 g do ácido undecanóico e 0,5093 g da n-metilglucamina (meglumina) foram dissolvidas em uma mistura de acetato de etila/metanol (1:1 v/v), e esta mantida sob agitação constante por aproximadamente 30 minutos. Posteriormente a solução foi concentrada evaporando-se espontaneamente o solvente até a formação do precipitado marrom, e em seguida, o sobrenadante decantado. O produto obtido foi então lavado com a mistura de acetato de etila/metanol a frio e secado sob fluxo de nitrogênio.

### **3.5 Espectroscopias de absorção no infravermelho (FTIR) e de reflexão-absorção no infravermelho com polarização modulada (PM-IRRAS)**

Os espectros de FTIR foram adquiridos em um espectrômetro Nicolet FT Impact com uma variação do número de onda de  $4000\text{ cm}^{-1}$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$ . As amostras foram preparadas em pastilhas de KBr. Os espectros de PM-IRRAS, por sua vez, foram obtidos em um instrumento KSV PMI550 acoplado à uma cuba de Langmuir preenchida com água purificada ( $18,2\text{ M}\Omega\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Neste experimento uma alíquota de  $1,5\text{ }\mu\text{L}$  da mistura do composto carboxilato-meglumina em água 1,0 % (m/m) foi transferida com o auxílio de uma seringa, para a subfase aquosa, formando um filme molecular ou monocamada adsorvida na interface água-ar. A cuba de Langmuir foi configurada para que o feixe de luz atingisse a monocamada em um ângulo de incidência de  $80^\circ$ .

### 3.6 Medidas de tensão superficial e Isotermas de Langmuir

Medidas de tensão superficial ( $\gamma$ ) como função da concentração dos compostos carboxilato-meglumina em água foram realizadas empregando o método de contagem de gotas [85].

A força exercida pelo peso de uma gota ( $m.g$ ) na ponta de uma bureta é máxima no momento exatamente anterior ao seu desprendimento da ponta. Neste momento, o peso da gota é equilibrado pela tensão superficial do líquido ( $\gamma$ ) multiplicada pelo perímetro ( $2.\pi.r$ ) da ponta da bureta. Deixando-se cair um número  $n$  de gotas do líquido e medindo-se sua massa, a tensão superficial do líquido pode ser calculada pela medida da massa de uma gota deste líquido, de acordo com a relação  $\gamma = \frac{m.g}{2\pi r}$  onde  $m = m_{ngotas}/n$ .

Tendo em vista um líquido de tensão superficial conhecida como a água ( $\gamma_o$ ) e determinando-se a massa de uma gota ( $m_o$ ) a partir da mesma bureta:  $\frac{\gamma}{\gamma_o} = \frac{m}{m_o}$

Os ensaios foram realizados a 23°C utilizando-se uma bureta de 10,00 mL. Cerca de 20 mL (~20 g) de cada amostra foi preparada por pesagem, nas concentrações mostradas na Tabela 1, utilizando-se água purificada como solvente (18,2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>). Uma massa total de aproximadamente 50 gotas foi pesada em cada replicata ( $n = 5$ ) e a tensão superficial da água purificada ( $\gamma_o$ ) foi adotada como 72,44 mN.m<sup>-1</sup>.

**Tabela 1. Concentração das misturas de EM e OM em água para medidas de tensão superficial.**

EM (% m/m)		OM (% m/m)	
C <sub>1</sub> = 0,02658	C <sub>6</sub> = 0,1409	C <sub>1</sub> = 0,02005	C <sub>6</sub> = 0,6415
C <sub>2</sub> = 0,04004	C <sub>7</sub> = 0,2804	C <sub>2</sub> = 0,04013	C <sub>7</sub> = 0,8221
C <sub>3</sub> = 0,6002	C <sub>8</sub> = 0,3203	C <sub>3</sub> = 0,08019	C <sub>8</sub> = 1,283
C <sub>4</sub> = 0,08012	C <sub>9</sub> = 0,4005	C <sub>4</sub> = 0,1604	
C <sub>5</sub> = 0,1201	C <sub>10</sub> = 0,6409	C <sub>5</sub> = 0,3207	

Isotermas de Langmuir (pressão superficial vs área) foram obtidas através da compressão da monocamada formada pela adsorção do composto carboxilato-meglumina na interface água-ar, em uma cuba de Langmuir modelo KSV 5000 preenchida com água purificada (18,2 M $\Omega$ .cm<sup>-1</sup>). Para obtenção da monocamada uma alíquota de 1,5  $\mu$ L da mistura do composto carboxilato-meglumina em água (1,0 % (m/m)) foi transferida, com o auxílio de uma seringa, para a subfase aquosa.

### 3.7 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Curvas DSC de resfriamento e aquecimento foram obtidas em um módulo DSC 1 STAR<sup>e</sup> da Mettler Toledo. As medidas foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (50 mL min<sup>-1</sup>) utilizando cerca de 5,00 mg de amostra em cadinho de alumínio com tampa furada. As razões de resfriamento e aquecimento adotadas foram de 10 °C min<sup>-1</sup>.

### 3.8 Espalhamento de raios X em baixo ângulo (SAXS) e Microscopia de luz polarizada

As análises de SAXS (Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Campinas/SP, Brasil), foram realizadas em uma geometria de transmissão com  $\lambda = 1,608 \text{ \AA}$ , com tempo de exposição de 300 s e distância entre a amostra e o detector de 1581 mm.

Amostras de OM em água (40% m/m) foram colocadas sobre lâminas de vidro e cobertas com lamínula e analisadas em um microscópio Jenamed 2, Carl Zeiss- Jena, sob luz polarizada.

### 3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia do PS EM foi analisada através de um microscópio eletrônico de varredura JSM-5310, JEOL operando em 20 kV.

### 3.10 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Espectros de <sup>1</sup>H foram adquiridos em um Espectrômetro Avance III 600 MHz – Bruker. Amostras de EM (4,0 % m/m) e OM (0,10% m/m) foram preparadas sob aquecimento em 80 e 50°C, respectivamente utilizando como solvente uma mistura (0,5:1,5) H<sub>2</sub>O e dimetil-sulfóxido deuterado, DMSO-d<sub>6</sub>. Massa de EM: 0,12 mg. Massa de OM: 3 µg.

### 3.11 Viscosidade capilar e Espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Curvas de viscosidade relativa ( $\eta/\eta_0$ ) como função da redução da concentração de EM e OM em meio aquoso foram construídas medindo-se os tempos de escoamento ( $\tau$ ) a 25°C das amostras em diferentes concentrações, em relação ao tempo de escoamento da água ( $\tau_0$ ), empregando um viscosímetro capilar Ubbelohde. A relação  $\eta/\eta_0 \cong \tau/\tau_0$  foi considerada.

Paralelamente, medidas de espalhamento foram empregadas na determinação do tamanho médio das partículas dos compostos carboxilato-meglumina em fase aquosa a 25 °C e correlacionados com as viscosidades. Para tanto, utilizou-se um instrumento

Zetasizer Nano ZS90, constituído de um laser vermelho (633nm) de He-Ne e detector disposto a 90° do feixe.

### Preparo das amostras

**EM:** Uma amostra concentrada a 6,4 % (m/m) (concentração real 6,404 % m/m) foi obtida misturando 0,1281 g do composto em 1,8722 g de água deionizada totalizando uma massa de 2,0003 g. Posteriormente esta foi aquecida a 80 °C e após resfriada a temperatura ambiente, o material foi diluído com água deionizada a 1,281 % m/m (C<sub>7</sub>) totalizando uma massa de 10,0008 g. A partir desta foram obtidas amostras por diluições sucessivas a temperatura ambiente de acordo com a Tabela 2 abaixo.

**Tabela 2. Preparo das misturas de EM em água para medidas de viscosidade e DLS.**

C <sub>6</sub> = 0,6434 % m/m	m C <sub>7</sub> = 5,0546 g	m <sub>água</sub> = 5,0091 g	m <sub>total</sub> = 10,0637 g
C <sub>5</sub> = 0,3217 % m/m	m C <sub>6</sub> = 5,0021 g	m <sub>água</sub> = 5,0021 g	m <sub>total</sub> = 10,0042 g
C <sub>4</sub> = 0,1608 % m/m	m C <sub>5</sub> = 5,0111 g	m <sub>água</sub> = 5,0142 g	m <sub>total</sub> = 10,0253 g
C <sub>3</sub> = 0,08042 % m/m	m C <sub>4</sub> = 5,0019 g	m <sub>água</sub> = 4,9994 g	m <sub>total</sub> = 10,0013 g
C <sub>2</sub> = 0,04021 % m/m	m C <sub>3</sub> = 5,0331 g	m <sub>água</sub> = 5,0331 g	m <sub>total</sub> = 10,0662 g
C <sub>1</sub> = 0,02011 % m/m	m C <sub>2</sub> = 5,0412 g	m <sub>água</sub> = 5,0387 g	m <sub>total</sub> = 10,0799 g

**OM:** Uma mistura concentrada C<sub>7</sub> = 1,28 % (m/m) (concentração real 1,284 % m/m) foi preparada misturando 0,1284 g de OM em 9,8127 g de água deionizada totalizando uma massa de 10,0011 g. A partir desta foram obtidas as demais amostras por diluições sucessivas, conforme a Tabela 3.

**Tabela 3. Preparo das misturas de OM em água para medidas de viscosidade e DLS.**

C <sub>6</sub> = 0,6409 % m/m	m C <sub>7</sub> = 5,0055 g	m <sub>água</sub> = 5,0266 g	m <sub>total</sub> = 10,0281 g
C <sub>5</sub> = 0,3211 % m/m	m C <sub>6</sub> = 5,0145 g	m <sub>água</sub> = 4,9941 g	m <sub>total</sub> = 10,0086 g
C <sub>4</sub> = 0,1621 % m/m	m C <sub>5</sub> = 5,0491 g	m <sub>água</sub> = 4,9526 g	m <sub>total</sub> = 10,0017 g
C <sub>3</sub> = 0,08087 % m/m	m C <sub>4</sub> = 5,0050 g	m <sub>água</sub> = 5,0272 g	m <sub>total</sub> = 10,0322 g
C <sub>2</sub> = 0,04070 % m/m	m C <sub>3</sub> = 5,1334 g	m <sub>água</sub> = 5,0669 g	m <sub>total</sub> = 10,2003 g
C <sub>1</sub> = 0,02047 % m/m	m C <sub>2</sub> = 5,0598 g	m <sub>água</sub> = 5,0005 g	m <sub>total</sub> = 10,0603 g

**PM:** Uma amostra concentrada foi obtida a 6,0% (m/m) (concentração real 6,003 % m/m) misturando 0,2402 g do composto em 3,7604 g de água deionizada totalizando uma massa final de 4,0016g. Posteriormente esta foi aquecida a 80 °C e resfriada a temperatura ambiente. Em seguida, o material foi diluído com água deionizada a 1,201 % (m/m) (C<sub>7</sub>) totalizando uma massa de 20,0008 g. A partir desta foram obtidas amostras por diluições de acordo com a Tabela 4 abaixo.

**Tabela 4. Preparo das misturas de PM em água para medidas de viscosidade.**

$C_6 = 0,6005 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 5,0024 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 5,0024 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0048 \text{ g}$
$C_5 = 0,5007 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 4,1695 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 5,8317 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0012 \text{ g}$
$C_4 = 0,4013 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 3,3417 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 6,6592 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0009 \text{ g}$
$C_3 = 0,3011 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 2,5074 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 7,4940 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0014 \text{ g}$
$C_2 = 0,2044 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 1,7024 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 8,3004 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0028 \text{ g}$
$C_1 = 0,1009 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 0,8405 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 9,1641 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0046 \text{ g}$

**UM:** Uma amostra concentrada  $C_7 = 1,2 \text{ \% (m/m)}$  (concentração real  $1,200 \text{ \% m/m}$ ) foi preparada misturando  $0,2403 \text{ g}$  de UM em  $19,7818 \text{ g}$  de água deionizada totalizando uma massa de  $20,0221 \text{ g}$ . A partir desta foram obtidas as demais amostras por diluições, conforme a Tabela 5.

**Tabela 5. Preparo das misturas de UM em água para medidas de viscosidade.**

$C_6 = 0,6001 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 5,0024 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 5,0008 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0032 \text{ g}$
$C_5 = 0,5018 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 4,1821 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 5,8190 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0011 \text{ g}$
$C_4 = 0,4002 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 3,3325 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 6,6689 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0014 \text{ g}$
$C_3 = 0,3009 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 2,5081 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 7,4944 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0025 \text{ g}$
$C_2 = 0,2003 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 1,6694 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 8,3319 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0013 \text{ g}$
$C_1 = 0,1006 \text{ \% m/m}$	$m_{C_7} = 0,8384 \text{ g}$	$m_{\text{água}} = 9,1624 \text{ g}$	$m_{\text{total}} = 10,0008 \text{ g}$

### 3.12 Estudo da inibição do biofilme da *Cândida albicans*

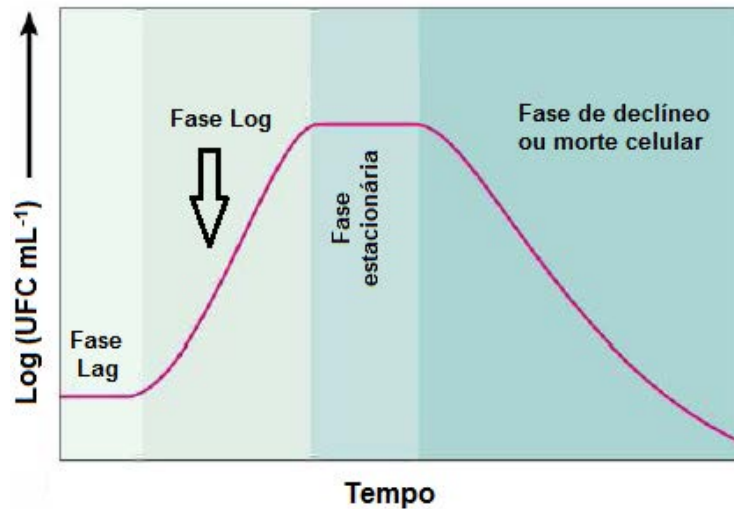
#### 3.12.1 Micro-organismos

O micro-organismo utilizado nesse estudo foi o fungo *Candida albicans* ATCC 90028 adquirido do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brasil.

#### 3.12.2 Preparo da suspensão celular

Inicialmente *C. albicans* foi cultivada em caldo Sabouraud dextrose e mantida em agitador orbital (150 rpm) a  $30^\circ\text{C}$  por 20 horas. Em seguida,  $1,0 \text{ mL}$  do meio crescido foi inoculado no caldo Sabouraud dextrose fresco e mantido em agitação a 150 rpm a  $30^\circ\text{C}$  até a *C. albicans* alcançar a fase logarítma [86] (Figura 27). Em seguida, as células foram centrifugadas a 2500 rpm por 5 minutos, lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) a fim de remover o excesso de meio de cultura, e por fim as leveduras foram suspensas em PBS até obter uma concentração celular de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ .

Figura 27: Curva de crescimento microbiano.



Adaptado de Tortora [86]

### 3.12.3 Formação dos biofilmes de *C. albicans* [87]

Inicialmente, foi preparada uma suspensão celular contendo  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$ , conforme descrito no item 3.12.2 Esta suspensão foi adicionada aos suportes que foram mantidos na incubadora (sem agitação) a  $30^\circ\text{C}$  por 4 horas, para a adesão celular. Após esse período, os suportes foram lavados com PBS, a fim de retirar as células não aderidas e adicionou-se caldo Sabouraud dextrose para o desenvolvimento do biofilme. Os suportes, então, foram mantidos no agitador (100 rpm) a  $30^\circ\text{C}$  por 48 horas.

### 3.12.4 Teste de sensibilidade de *C. albicans* aos antifúngicos na presença de hidrogel EM

#### 3.12.4.1 Células planctônicas

Foi avaliada a ação do hidrogel EM 4% (m/m) no aumento da toxicidade dos antifúngicos (fluconazol e cetoconazol) contra *C. albicans*. Para tanto 100  $\mu\text{L}$  de suspensão celular na concentração de  $1 \times 10^8$  células  $\text{mL}^{-1}$  (item 13.12.2) foi adicionada à placa de microtitulação de 96 poços junto à diferentes concentrações dos antifúngicos na presença ou ausência de EM, conforme descrito abaixo.

1. Cetoconazol ( $0 - 16,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + PBS
2. Cetoconazol ( $0 - 16,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM 4% (m/m)
3. Fluconazol ( $0 - 16,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM 4% (m/m)
4. Fluconazol ( $0 - 16,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM 4% (m/m)

As placas contendo as amostras foram incubadas a 30 °C por 12 e 24 horas. O índice de sobrevivência do fungo foi determinado pela atividade metabólica através do ensaio de redução do 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil) -5 - [carbonilo (fenilamino)]-2H-tetrazólio-hidróxido (XTT) [87]. Para tanto, foi adicionado 50 µL de solução de sal de XTT (1,0 mg mL<sup>-1</sup> em PBS) e 4 µL de solução de menadiona (1,0 mmol L<sup>-1</sup> em acetona) às placas contendo as amostras. As placas de microtitulação foram incubadas a 37 °C por 3 horas. A atividade da desidrogenase do metabolismo bacteriano reduz o sal de tetrazólio XTT a sais de formazana, resultando em alteração colorimétrica que se correlaciona com a viabilidade celular. A mudança colorimétrica foi medida utilizando um leitor de microtitulação (Versa Max – Molecular devices) a 490 nm.

Todos os experimentos foram realizados em replicatas com os seus respectivos controles.

#### **3.12.4.2 Biofilme**

Após crescimento do biofilme de *C. albicans* (item 13.2.3) foram adicionadas soluções dos antifúngicos, em diferentes concentrações, na presença ou ausência de EM, conforme descrito abaixo.

5. Cetoconazol (0 – 130 µg mL<sup>-1</sup>) + PBS
6. Cetoconazol (0 – 130 µg mL<sup>-1</sup>) + EM 4% (EM)
7. Fluconazol (0 – 130 µg mL<sup>-1</sup>) + PBS
8. Fluconazol (0 – 130 µg mL<sup>-1</sup>) + EM 4% (EM)

As placas foram mantidas a 30°C por diferentes tempos de incubação (24 e 48 horas). Em seguida, removeu-se as soluções dos antifúngicos e lavou-se os poços com PBS (2x). Assim como no ensaio com as células planctônicas, o método utilizado para determinar a sobrevivência do fungo foi o XTT [87].

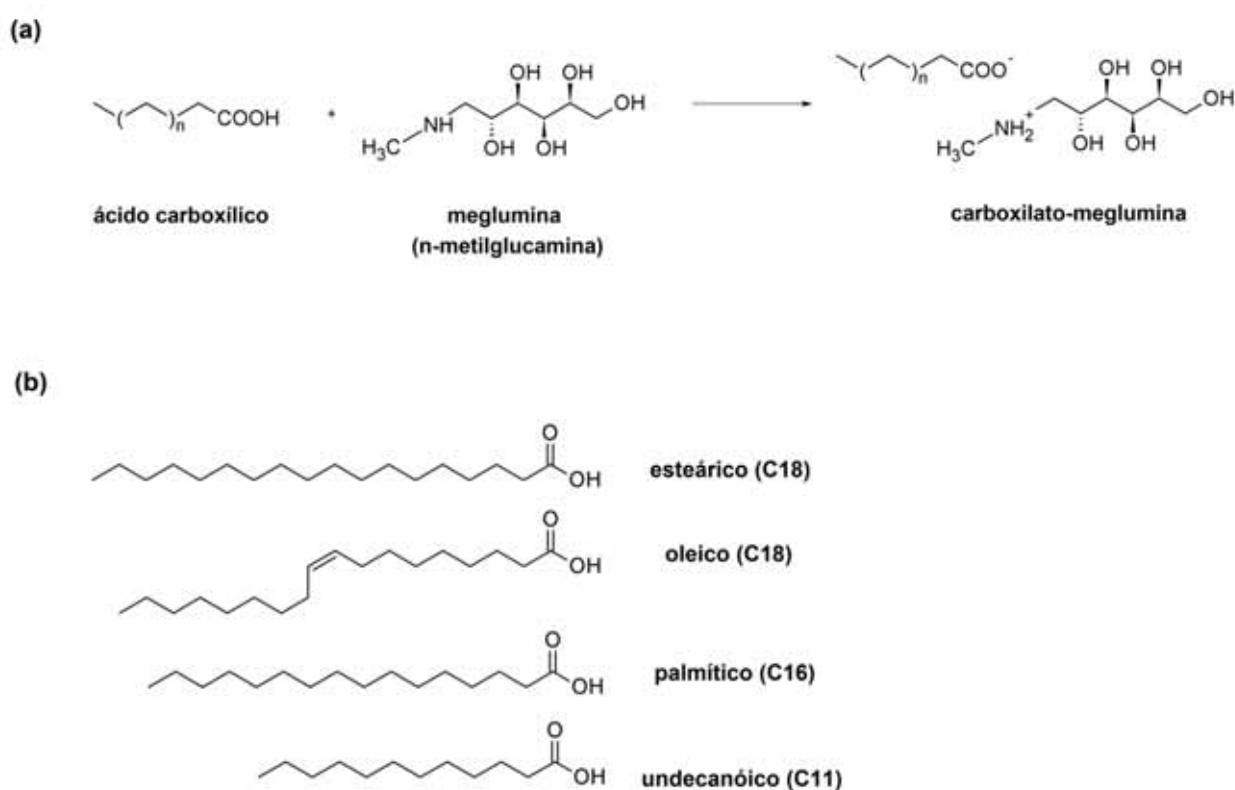
Todos os experimentos foram realizados em replicatas com os seus respectivos controles.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Compostos anfifílicos obtidos através de uma reação ácido-base entre ácidos orgânicos e aminas são bem conhecidos. Na literatura estes compostos recebem diferentes nomes, de acordo com alguma característica que os autores queiram ressaltar, mas tem em comum a formação do par iônico produzido na reação unido por interação eletrostática. Por exemplo, podem ser nomeados de “surfactantes cataniônicos” [88]. Neste caso, o termo “cataniônico” resalta o fato de que no par iônico, ambos o cátion amônio e o ânion carboxilato, possuem uma cauda alquílica extensa. Por outro lado o termo “anfifílico supramolecular”, bastante comum, resalta o fato da união entre o cátion amônio e o ânion carboxilato ser de natureza não covalente [89].

Na Figura 28a-b é mostrada a reação de obtenção dos compostos carboxilato-meglumina e os ácidos graxos precursores, empregados nesse trabalho. No par iônico anfifílico, a cauda alquílica apolar é derivada do ácido graxo e a cabeça polar formada pelos átomos carregados e grupos hidroxila do aminocarboidrato.

**Figura 28. (a) Reação ácido-base de formação dos compostos carboxilato-meglumina (par iônico anfifílico). (b) Estruturas dos ácidos graxos precursores investigados: esteárico (octadecanóico) e oleico (9-cis-octadecenóico), ambos com cadeia de mesmo tamanho (C18). Undecanóico e palmítico (hexadecanóico) com cadeias de tamanhos distintos (C11) e (C16), respectivamente.**



O caráter anfifílico de qualquer composto é responsável por dois fenômenos em fase aquosa, ambos dependentes da concentração: adsorção e agregação [90]. Em concentrações abaixo da concentração de agregação crítica (c.a.c) moléculas e supramoléculas têm a tendência de se adsorverem na interface água-ar para promover a diminuição da energia livre do sistema. Acima da c.a.c as mesmas espécies se agregam espontaneamente de forma reversível, mediante interações hidrofóbicas, levando a formação de uma variedade de estruturas ordenadas (cúbicas, lamelares, hexagonais, etc) ou desordenadas (micelas esféricas, cilíndricas, etc) dependendo das condições físico-químicas dos sistemas.

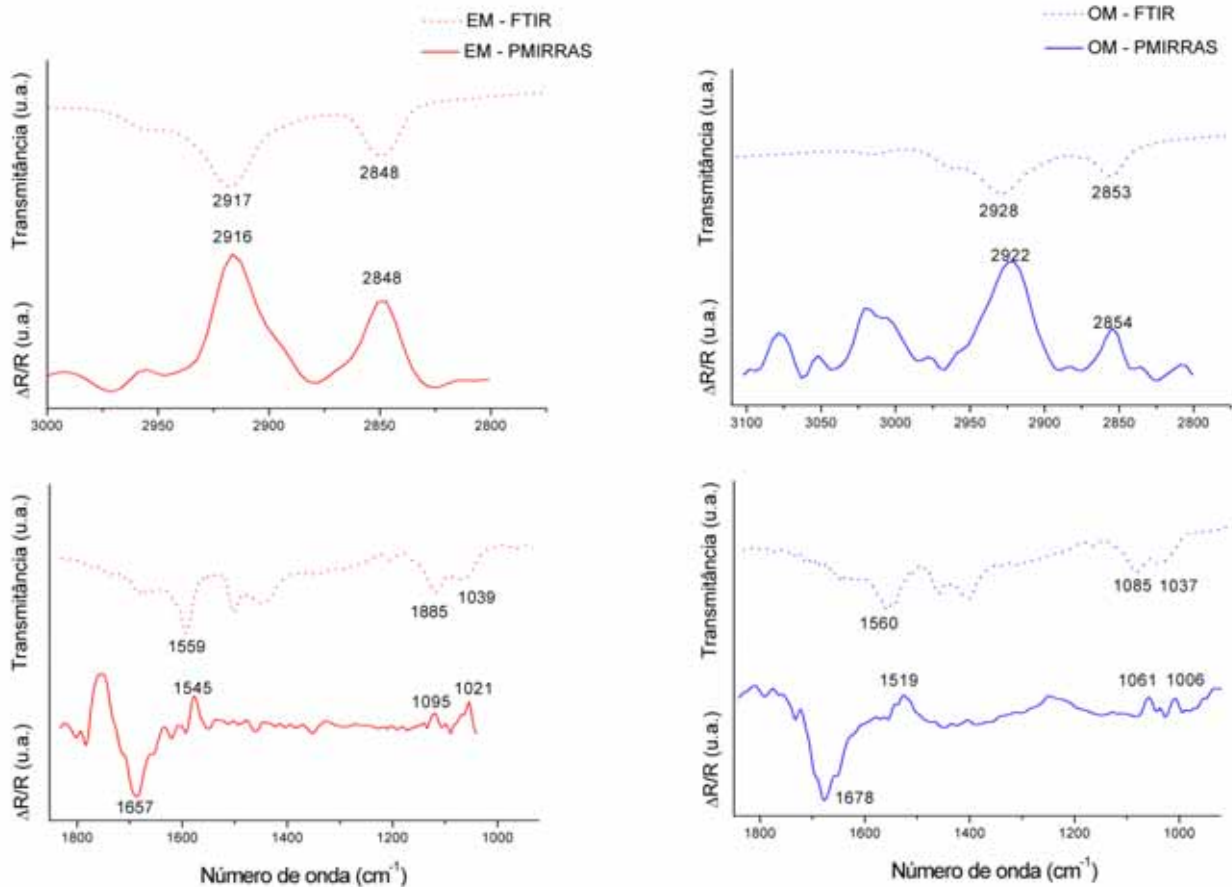
A discussão dos resultados a seguir concentra-se nos compostos derivados dos ácidos esteárico (octadecanóico) e oleico (9-cis-octadecenóico), este último insaturado permitindo avaliar o efeito da dupla ligação nas propriedades dos compostos carboxilato meglumina.

#### **4.1 Caracterização estrutural dos compostos carboxilato-meglumina e evidências experimentais de sua natureza anfifílica**

##### ***FTIR e PM-IRRAS***

Na Figura 29 são apresentados os espectros de FTIR dos compostos estearato-meglumina (EM) e oleato-meglumina (OM), onde estão indicadas as bandas mais características destas espécies. A formação do par iônico foi confirmada pelas vibrações de deformação axial assimétrica ( $\nu_{as}$  COO<sup>-</sup>) dos grupos carboxilato de EM e OM observadas em 1559 e 1560 cm<sup>-1</sup>, respectivamente. No intervalo de 3000-2800 cm<sup>-1</sup> foram evidenciadas as bandas de deformação axial dos grupos metileno referentes às cadeias carbônicas dos compostos, neste caso em 2917 ( $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>) e 2848 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>) para EM; e 2928 ( $\nu_{as}$  CH<sub>2</sub>) e 2853 cm<sup>-1</sup> ( $\nu_s$  CH<sub>2</sub>) para OM. As vibrações correspondentes às ligações  $\nu$  C–OH da meglumina foram observadas em 1084 e 1043 cm<sup>-1</sup> para EM enquanto que para OM, as mesmas bandas foram atribuídas em 1086 e 1039 cm<sup>-1</sup>.

Figura 29. Espectros na região do infravermelho para os compostos EM e OM. FTIR refere-se ao espectro de absorção obtido em KBr enquanto que PM-IRRAS é o espectro de reflexão obtido na interface ar-água.



Em conjunto com os espectros de absorção FTIR são também apresentados na Figura 29, os espectros de reflexão PM-IRRAS. A espectroscopia PM-IRRAS é empregada na caracterização do filme ou monocamada formada quando espécies anfífilas estão adsorvidas na interface ar-água, pois o modo usual de transmissão na espectroscopia de absorção torna-se impraticável, uma vez que há uma forte absorção da radiação na subfase aquosa e também na fase gasosa saturada com vapor de água [91].

A técnica consiste em incidir a um ângulo de 80°, em relação à subfase aquosa contendo a monocamada, um feixe de radiação infravermelha polarizada alternadamente (modulação) nas direções paralela (p) e perpendicular (s) ao plano de incidência. Os componentes da radiação incidente, paralelo ( $I_p$ ) e perpendicular ( $I_s$ ) ao serem refletidos ( $R_p$  e  $R_s$ ) pela superfície alcançam ao detector. Apenas o componente  $I_p$  interage com a amostra sendo parcialmente absorvido enquanto que o componente  $I_s$

é quase totalmente refletido. O espectro de reflectância diferencial para as espécies adsorvidas na interface água-ar é expresso como  $\Delta R/R=(R_p-R_s)/(R_p+R_s)$ .

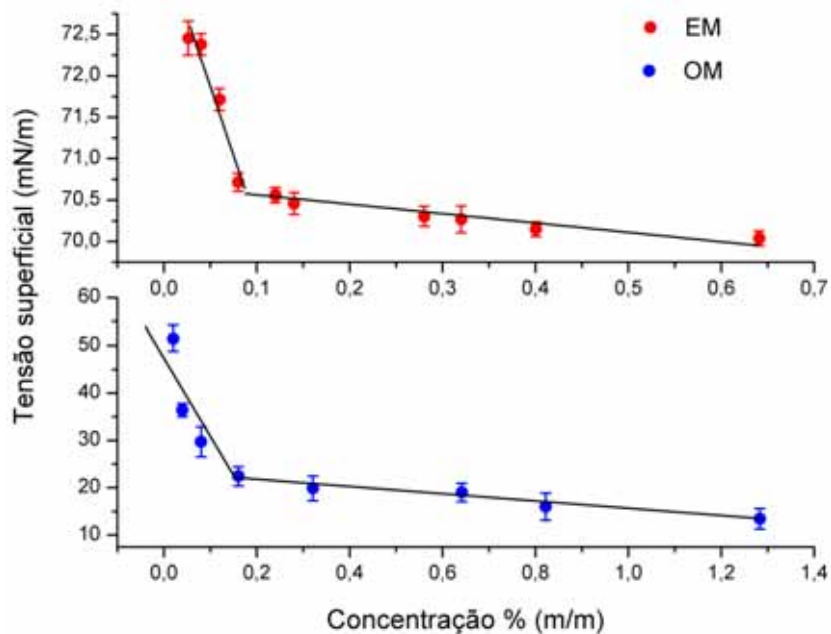
Pode se notar que os espectros de PM-IRRAS de EM e OM são correspondentes aos espectros de FTIR, referindo-se aos mesmos modos vibracionais. A ocorrência das bandas de reflexão para EM e OM indicou a distribuição de suas supramoléculas na interface água-ar, confirmando a natureza anfifílica dos compostos e que os íons carboxilato e meglumina se mantêm unidos em fase aquosa, apesar da interação entre os mesmos ser de natureza eletrostática. As bandas observadas em 1657 e 1678  $\text{cm}^{-1}$  nos espectros de PM-IRRAS para EM e OM, respectivamente, correspondem à deformação angular da água ( $\delta$  H–O–H) e são negativas devido às moléculas de água na subfase aquosa serem deslocadas e o espaço ocupado pelas cabeças polares das supramoléculas anfifílicas.

### ***Tensão superficial***

Medidas de tensão superficial da água ( $\gamma$ ) em função das concentrações de EM e OM obtidas a 23 °C são apresentadas nas curvas da Figura 30. Os valores médios de c.a.c dos compostos, determinados através do encontro das retas de regressão que melhor se ajustaram aos pontos, corresponderam a 0,0809 e 0,153 % (m/m) para EM e OM, respectivamente.

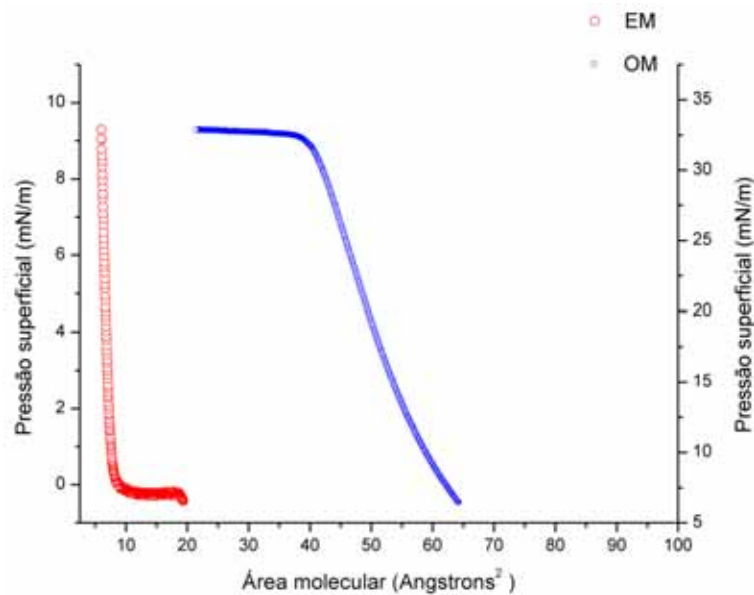
A presença de uma dupla ligação em cadeias alquílicas lineares de carboxilatos aumenta sua solubilidade em água, equivalentemente à remoção de um grupo  $\text{CH}_2$  nas cadeias dos análogos saturados [92]. Este comportamento foi reproduzido para diversos sais de ácidos graxos e o aumento da hidroflicidade ou redução da hidrofobicidade proporcionada pela dupla ligação afeta a c.a.c destes compostos, mostrando que a agregação depende do balanço hidrofílico e hidrofóbico entre as partes da molécula. Frequentemente observa-se uma c.a.c cerca de duas a três vezes maior para os análogos insaturados em relação aos saturados, o que foi visto também para OM em relação à EM.

Figura 30. Curvas de tensão superficial da água ( $\gamma$ ) em função da concentração de EM e OM. Os valores médios ( $n=5$ ) da c.a.c correspondem a 0,0809 e 0,153 % (m/m), respectivamente.



Chama atenção nos gráficos da Figura 30 que em concentrações abaixo da c.a.c, OM foi capaz de reduzir mais efetivamente a tensão superficial da água do que EM, o que foi relacionado à uma maior repulsão experimentada pelas supramoléculas de OM do que pelas supramoléculas de EM, adsorvidas na superfície do líquido. Este efeito foi melhor compreendido ao se analisar as isotermas de Langmuir para ambos os compostos adsorvidos na interface água-ar (Figura 31). A técnica consiste em utilizar uma cuba ou bandeja (cuba de Langmuir) enchida até as bordas com água, sobre a qual é formando uma monocamada da espécie anfifílica. A tensão superficial da fase aquosa contendo a monocamada é medida, ao mesmo tempo em que barreiras laterais reduzem a área da cuba, onde o filme encontra-se confinado. O gráfico gerado é uma função da diferença entre as tensões superficiais da água pura ( $\gamma_0 = 73 \text{ mN/m}$ ) e da subfase coberta pelo filme ( $\gamma$ ) vs a área ocupada pela molécula do anfifílico. A diferença  $\pi = \gamma_0 - \gamma$  é chamada de “pressão superficial”, pois as isotermas de Langmuir se parecem muito com as isotermas de um gás ideal, inclusive obedecem a uma lei muito parecida com a lei dos gases [93].

Figura 31. Isotermas de pressão superficial ( $\pi$ ) vs área molecular em  $\text{\AA}^2$ , obtidas para as monocamadas de EM e OM na interface água-ar. O eixo das ordenadas à esquerda e direita referem-se à EM e OM, respectivamente.



Quando as monocamadas de EM ou OM não estão sendo comprimidas, as supramoléculas adsorvidas ocupam toda a superfície da subfase aquosa e estando bastante afastadas uma das outras, não são efetivas na redução da tensão superficial da subfase aquosa ( $\gamma$ ). Neste estado, a tensão superficial da água coberta pelo filme possui tensão superficial igual ao da água pura ( $\gamma_0$ ) e, portanto a diferença entre estes valores, ou seja, a pressão superficial  $\pi = \gamma_0 - \gamma$  é igual à zero. Este comportamento é evidente na isoterma de EM apresentada na Figura 31. Somente após a área disponível para as supramoléculas de EM ser reduzida aproximadamente 90%, o que correspondeu cada supramolécula na monocamada ocupar uma área por volta de  $10 \text{\AA}^2$  ( $1,0 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ ) é que foi observado o aumento de  $\pi$  em decorrência da diminuição acentuada de  $\gamma$ .  $10 \text{\AA}^2$  foi o menor espaço ocupado por cada supramolécula de EM na superfície da fase aquosa resultando em um empacotamento denso com a compressão. O gráfico de EM também mostra que a monocamada não foi colapsada durante a execução do experimento.

Diferentemente de EM, a isoterma de OM mostra que aumento de  $\pi$  iniciou-se quando o espaço para a monocamada foi reduzido em cerca de 35%. Portanto as supramoléculas de OM na superfície empacotaram-se menos densamente do que EM ocupando um espaço maior, cerca de  $65 \text{\AA}^2$  por molécula ( $6,5 \times 10^{-19} \text{ m}^2$ ), e que foi

sendo reduzido com a compressão até  $40 \text{ \AA}^2$ . Este comportamento foi verificado, pois a dupla ligação presente nas cadeias de OM é uma região rica em elétrons devido à ligação pi e portanto, a repulsão entre as supramoléculas na superfície as mantiveram mais distantes quando comparado a EM. Contribuiu também com o empacotamento menos denso, a conformação *cis* das ligações duplas que tornam as cadeias de OM dobradas, diferentemente da característica linear das cadeias saturadas de EM. Com a redução ainda maior do espaço a partir de  $40 \text{ \AA}^2$  observou-se um patamar no gráfico, indicando o colapso da monocamada de OM causado pela compressão.

Uma informação interessante nos gráficos de EM e OM é que com a compressão,  $\pi$  variou de 5 a 32,5 mN/m, enquanto que para seu análogo saturado EM, a variação de  $\pi$  foi menor, entre 0 a 9 mN/m. Isto sugere que tal diferença esteja intimamente relacionada às interações repulsivas mais fortes experimentadas entre as espécies de OM que reduzem  $\gamma$ , correspondendo em um aumento equivalente em  $\pi$ .

Analisando de forma semelhante os gráficos de Figura 30, o mesmo efeito sobre a tensão superficial ( $\gamma$ ) foi visualizado com o aumento da concentração dos compostos carboxilato-meglumina, antes de atingir a c.a.c. Porém, o espaço entre as supramoléculas foi reduzido pelo o aumento da quantidade de EM ou OM na superfície da água e não pela compressão. A repulsão entre as cadeias de OM devido à dupla ligação levou a uma redução de  $\gamma$  mais acentuada do que foi observada para EM.

#### **4.2 Polimerização supramolecular em fase aquosa**

Na seção 4.1 ficou evidente que a ausência ou presença da dupla ligação na cadeia carbônica de EM e OM influenciou no empacotamento das supramoléculas na superfície do líquido e na propriedade surfactante dos mesmos. Acima da c.a.c, o aparecimento de interações hidrofóbicas conduziu à agregação das supramoléculas no seio do líquido, possivelmente na forma de micelas. Neste arranjo simples, as cabeças polares ficariam dispostas em contato com a fase aquosa, enquanto que as cadeias alquílicas, dispostas no interior do agregado. No entanto, para que a polimerização supramolecular dos compostos carboxilato-meglumina ocorra, as interações hidrofóbicas devem agregar as supramoléculas de forma distinta, em um arranjo no qual os grupos hidroxila doadores e aceitadores da ligação de hidrogênio estejam protegidos da solvatação, viabilizando o surgimento de ligações de hidrogênio fortes e direcionais entre as cabeças polares. Esta sequência de eventos leva ao aparecimento das propriedades

poliméricas dos compostos carboxilato-meglumina, mais do que suas propriedades surfactantes, o que será discutido nesta seção.

A dissolução de EM e OM em água conduzida sob aquecimento, levou a formação de misturas viscosas com aspecto semi-sólido quando resfriadas à temperatura ambiente, conforme mostrado nas fotografias da Figura 32. A concentração das espécies foi determinante para se observar tal característica, de forma que as misturas de EM e OM atingiram o aspecto semi-sólido a partir de 4,0 e 40,0 % (m/m), respectivamente. O tratamento térmico aplicado foi eficaz para induzir a polimerização supramolecular apenas de EM. Medidas de temperatura mostraram que a dissolução de EM coincidiu com a temperatura de fusão do composto, isto é, próximo de 78 °C. OM por sua vez dissolveu-se rapidamente por volta de 50 °C, a partir da qual a mistura tornou-se transparente, porém este composto não apresentou temperatura de fusão.

**Figura 32. Misturas de EM e OM em água. (a) Aspecto característico de EM, em concentrações abaixo de 2% (m/m) preparadas sem aquecimento e (b) no intervalo de 4-10% (m/m) preparadas com aquecimento (polimerizado). (c) Aspecto característico de OM, em concentrações abaixo de 25 % (m/m) preparadas sem aquecimento e (d) acima de 40% (m/m) preparadas com aquecimento (não polimerizado).**



### **DSC**

Curvas DSC dos compostos sólidos carboxilato-meglumina e das misturas viscosas correspondentes, EM 4% (m/m) (polimerizado) e OM 40% (m/m) (não polimerizado), são apresentadas na Figura 33 e 34, respectivamente.

Figura 33. Curvas DSC dos compostos EM e OM. O pico endotérmico em 77,72 °C ( $T_{\text{onset}} = 75,92$  °C) refere-se à fusão de EM. OM não apresenta evento térmico no intervalo de temperatura investigado.

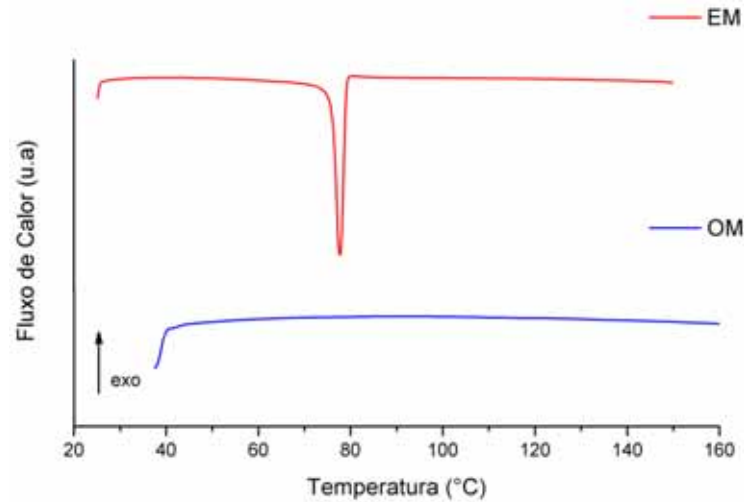
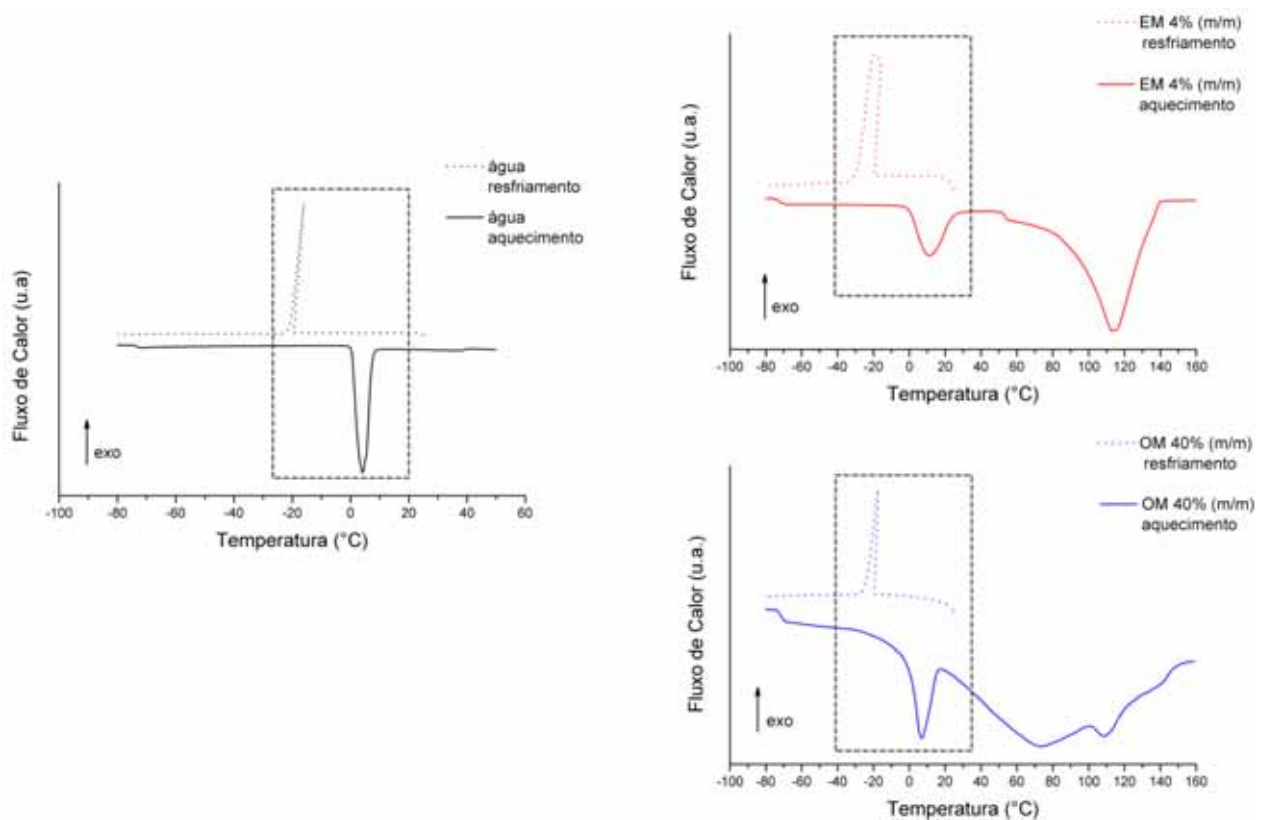


Figura 34. Curvas DSC de resfriamento e aquecimento das misturas viscosas EM 4% (m/m) e OM 40% (m/m) previamente obtidas. À esquerda são apresentadas como referência as curvas DSC de resfriamento/aquecimento da água pura. Em destaque são mostrados os picos de congelamento (exotérmico) e fusão da água (endotérmico) pura e participando como fase líquida nas misturas. Os picos endotérmicos alargados observados por volta de 115 °C e 70°C nas curvas de EM 4% e OM 40% (m/m), respectivamente são resultantes da vaporização da água.



Os dados extraídos das curvas DSC na Figura 34 estão agrupados na Tabela 6. A presença dos solutos EM e OM reduziu as temperaturas de congelamento e fusão da fase aquosa em relação à água pura, como foi possível observar através das temperaturas *onset* correspondentes a estes eventos. Porém como o abaixamento das temperaturas de congelamento e fusão são propriedades coligativas e, portanto, dependem da concentração dos solutos, estas deveriam ser mais acentuadas para OM 40% (m/m) do que para EM 4% (m/m), levando em consideração a semelhança estrutural, o que não foi obedecido. A não concordância verificada foi correlacionada à gelificação da água causada pela polimerização supramolecular de EM, não sendo visto o mesmo para OM. Devido à imobilização da fase aquosa entre as cadeias do polímero, as temperaturas de congelamento e fusão *onset* em EM 4% (m/m) foram ligeiramente menores do que em OM 40% (m/m).

**Tabela 6. Temperaturas de congelamento e fusão da água pura e da fase aquosa nas misturas EM e OM.**

	$T_{\text{congelamento onset}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{congelamento pico}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{fusão onset}} (^{\circ}\text{C})$	$T_{\text{fusão pico}} (^{\circ}\text{C})$
EM 4% (m/v)	-22,12	-19,05	-1,12	11,36
OM 40% (m/v)	-20,11	-17,09	-0,33	7,07
Água	-19,21	-16,52	0,42	4,09

A formação do PS EM e conseqüentemente do hidrogel foi verificada pela transição gel-sol na curva DSC de aquecimento de EM 4% (m/m), a qual aparece como uma mudança de posição da linha base em 53,49 °C. Uma alteração na posição da linha base em curvas DSC ocorre pela modificação na capacidade calorífica ( $C_p$ ) da amostra. No caso de EM, a mudança de  $C_p$  observada foi resultado do rompimento das ligações de hidrogênio do PS e colapso da estrutura do hidrogel. A ausência de evento semelhante na curva DSC de aquecimento de OM 40 % (m/m) exclui a polimerização supramolecular deste composto. O caráter termorreversível do PS EM é demonstrado na Figura 35. Após o resfriamento, as interações são recuperadas e conseqüentemente, a arquitetura do hidrogel. Na Figura 36 são apresentadas as curvas DSC para os hidrogéis de EM obtidas em maiores concentrações, neste caso, de 4 a 10 % (m/m).

Figura 35. Comportamento termorreversível do PS EM. O aquecimento acima de 53 °C (transição gel-sol) leva o rompimento das ligações de hidrogênio, resultando no colapso da arquitetura do hidrogel e liberação da fase aquosa. Com o resfriamento, as interações são recuperadas e o material supramolecular é novamente formado.

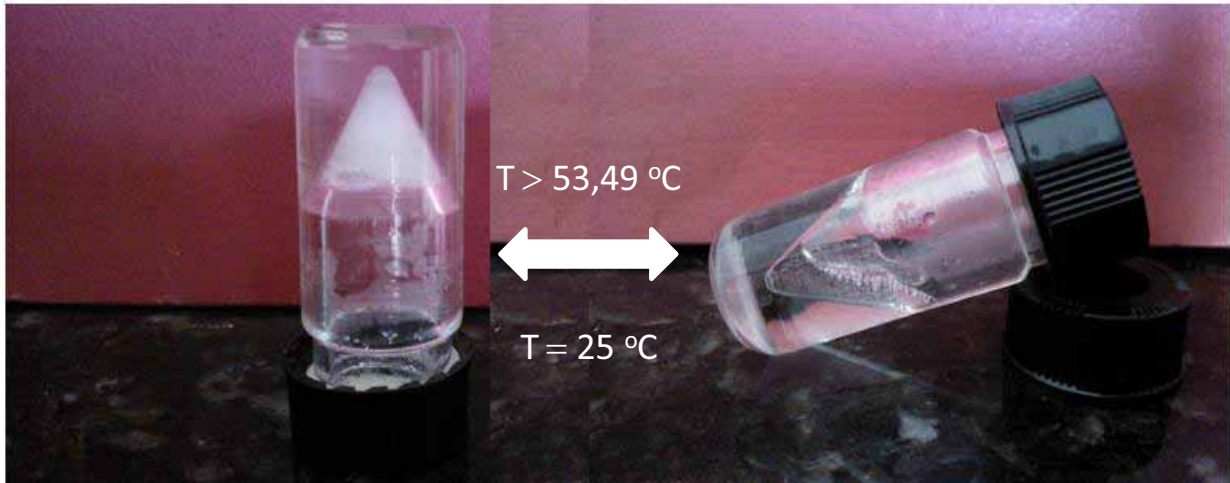
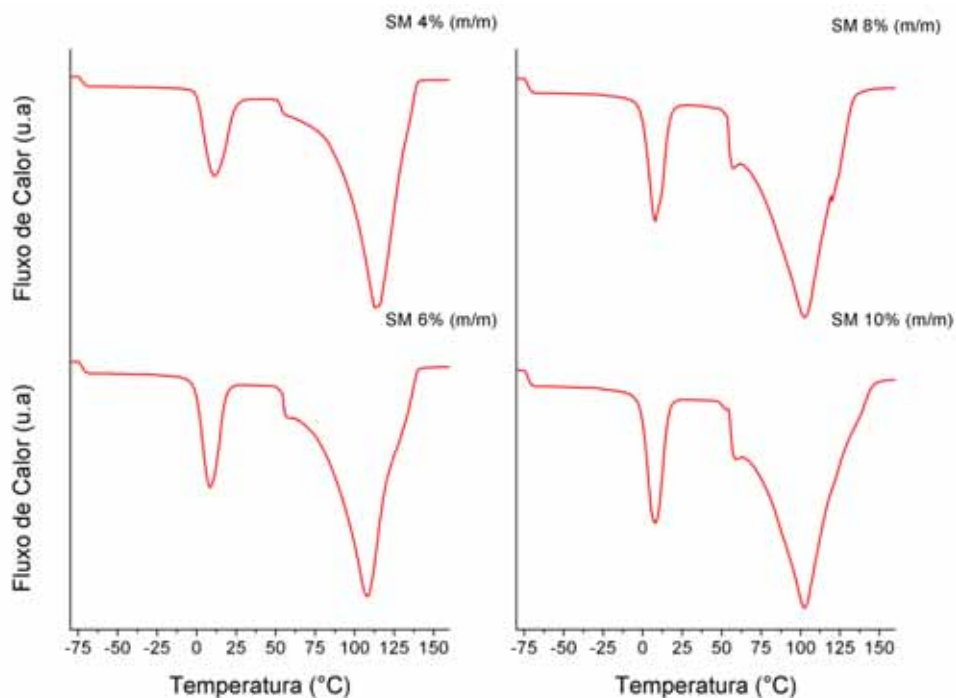


Figura 36. Curvas DSC de aquecimento dos hidrogéis EM 4-10% (m/m). A transição gel-sol em torno de 53 °C fica mais intensa com o aumento da concentração do PS EM.



Um gel supramolecular é caracterizado por uma rede tridimensional contínua, originada do emaranhamento ou reticulação de fibras, responsável pela imobilização da fase líquida. No caso de um hidrogel a fase líquida é a fase aquosa. É possível reconhecer níveis hierárquicos estruturais nos géis supramoleculares: (1) a estrutura

terciária, correspondente ao gel propriamente dito, isto é, a rede tridimensional originada do conjunto de fibras; (2) a estrutura secundária, correspondente às fibras individuais, ou seja, a estrutura microscópica do PS; e (3) a estrutura primária das fibras que corresponde ao arranjo adotado pelos monômeros decorrente da automontagem via forças não covalentes [94]. Cada um desses níveis estruturais pode ser acessado permitindo a caracterização completa do hidrogel e, também, do PS.

## SAXS

Sistemas mais ordenados, como é o caso de materiais mono e policristalinos, são comumente estudados por difração de raios X, muito útil na análise de caráter composicional e estrutural. Nos casos de sistemas com baixa correlação estrutural, ou seja, que não apresentam ordem estrutural de médio e longo alcance, mas que possuem variação de densidade eletrônica, reflexo de uma ordem de curta distância de dezenas a centenas de Angstrom, o espalhamento de raios X a baixo ângulo tem se mostrado uma ferramenta adequada na obtenção de informação de caráter morfológico ou mesmo estrutural [95].

No espalhamento de raios X a baixo ângulo, o feixe atravessa a amostra e interage com os elétrons dos átomos, fazendo-os oscilarem senoidalmente. A aceleração de um elétron produz uma onda eletromagnética secundária de mesmo comprimento ao da onda que incidiu sobre este. É dito, portanto, que as ondas incidentes, neste caso os raios X, sofrem um espalhamento pelos elétrons. A intensidade de espalhamento ( $I$ ) é expressa em função do vetor de espalhamento ( $q$ ), definido como a diferença entre o vetor espalhado ( $K_s$ ) e o vetor incidente ( $K_i$ ). Seu módulo é dado como:

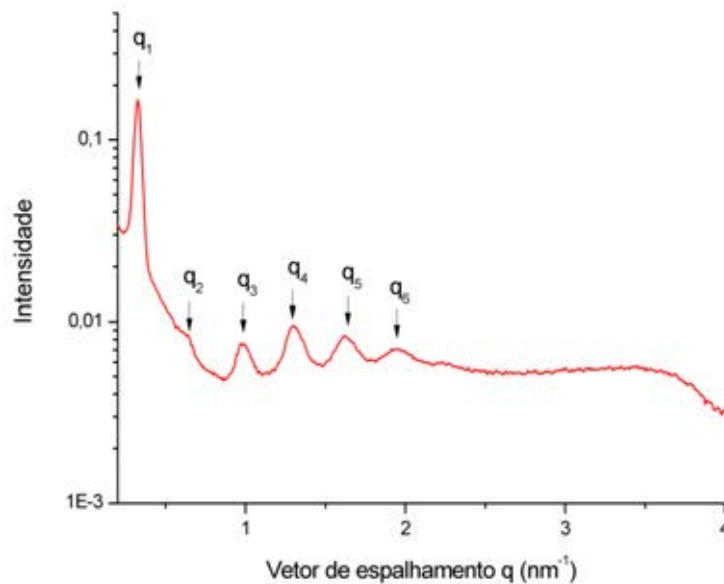
$$q = |\vec{q}| = |\vec{k}_s - \vec{k}_i| = \frac{4\pi}{\lambda} \text{sen } \theta \quad (10)$$

Sendo  $\lambda$ , o comprimento de onda e  $2\theta$  o ângulo de espalhamento.

No que se refere ao espalhamento de um objeto como um agregado, a intensidade da luz espalhada dependerá da densidade eletrônica do objeto espalhador e também da matriz na qual ele esteja embebido. Por exemplo, um sistema que consiste de uma estrutura formada por espécies anfifílicas em fase aquosa, apresenta três regiões de densidade eletrônica bem definidas. O ambiente hidrofóbico ( $0,275 \text{ e}/\text{Å}^3$ ), a região formada pelas cabeças polares com densidade eletrônica variável e a água ( $0,334 \text{ e}/\text{Å}^3$ ). Assim, para cada arranjo adotado pelas espécies anfifílicas há um padrão

de espalhamento observado nas curvas de SAXS, em decorrência da sequência ordenada das regiões de densidade eletrônica [96]. Ambos EM 4% (m/m) e OM 40% (m/m) estão em concentrações acima de sua c.a.c implicando que interações hidrofóbicas são operantes nestes sistemas conduzindo algum tipo de ordem a curta distância. Porém o arranjo adotado por EM, resultante das interações hidrofóbicas, leva o aparecimento de ligações de hidrogênio e a formação do PS, diferentemente de OM. A curva de SAXS obtida para o hidrogel EM 4% (m/m) (Figura 37) mostrou um padrão de espalhamento característico de um arranjo lamelar. Isto pode ser verificado pela razão dos números de  $q$  igual a 1:2:3:4:5:6 que é obtida dividindo-se  $q_1 = 0,33$ ;  $q_2 = 0,64$ ;  $q_3 = 0,98$ ;  $q_4 = 1,29$ ;  $q_5 = 1,62$ ;  $q_6 = 1,94$  pelo menor valor, neste caso, 0,33. O arranjo lamelar corresponde à estrutura primária do hidrogel, ou seja, a disposição que os monômeros adotam no PS.

**Figura 37. Padrão de SAXS de EM 4% (m/m). A relação 1:2:3:4:5:6 obtida a partir dos valores de  $q$  mostra que os monômeros no PS se arranjam em um formato lamelar.**



É coerente propor que nesta estrutura, as supramoléculas EM estejam dispostas lateralmente em camadas, de forma que as cabeças polares fiquem direcionadas interagindo face a face, e também acima e abaixo no plano. A Figura 38 ilustra a proposta de arranjo dos monômeros no plano. Nesta conformação, os grupos hidroxila localizam-se no interior da estrutura, estando protegidos da solvatação e próximos o suficiente para que ligações de hidrogênio apareçam.

Figura 38. Proposta de arranjo lamelar dos monômeros EM no PS (estrutura primária do hidrogel). A estrutura se estende a partir das cadeias carbônicas sempre com a região da meglumina voltada para o interior, de forma que os grupos OH sejam protegidos da solvatação formando ligações de hidrogênio entre si.  $n = 13$

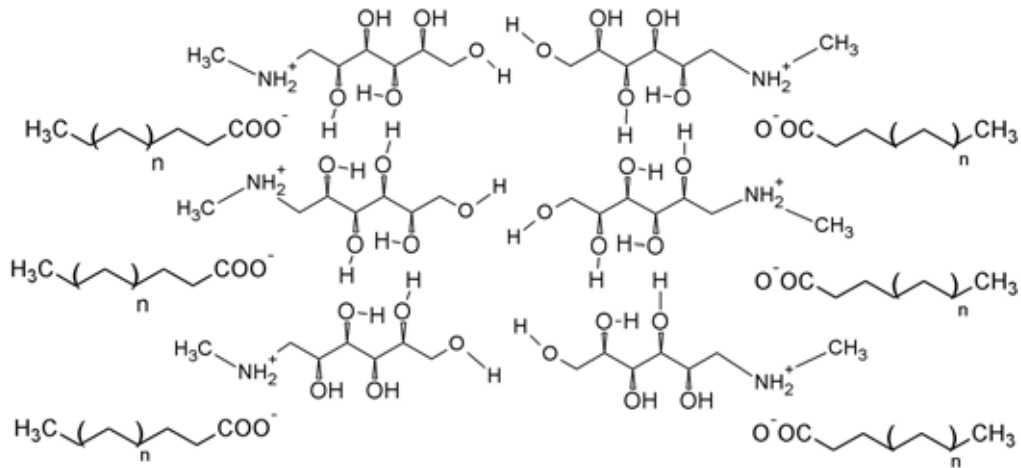
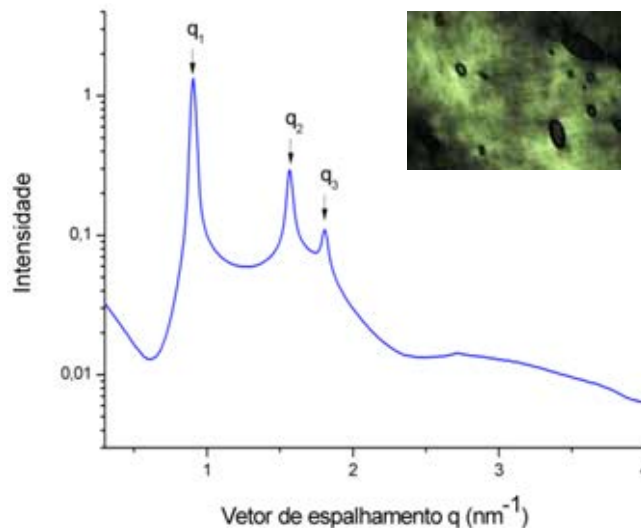


Figura 39. Padrão de SAXS de OM 40% (m/m). A relação  $1 : \sqrt{3} : 2$  obtida a partir dos valores de  $q$ :  $q_1 = 0,91$ ;  $q_2 = 1,57$  e  $q_3 = 1,81$  confirma a mesofase hexagonal visualizada como estrias na micrografia em anexo.



O padrão de SAXS obtido para OM 40% (m/m) mostrou que suas supramoléculas também se organizam, porém na forma de um cristal líquido hexagonal evidenciado pela razão  $1 : \sqrt{3} : 2$  ( $q_1 = 0,91$ ;  $q_2 = 1,57$  e  $q_3 = 1,81$ ) e visualizado por microscopia de luz polarizada na forma de estrias (Figura 39). Tipicamente neste tipo de arranjo as cabeças polares ficam orientadas para a fase aquosa, estando solvatadas. A formação de uma

mesofase explica a viscosidade elevada da mistura OM 40% (m/m) observada visualmente, resultante do arranjo moderadamente ordenado das supramoléculas.

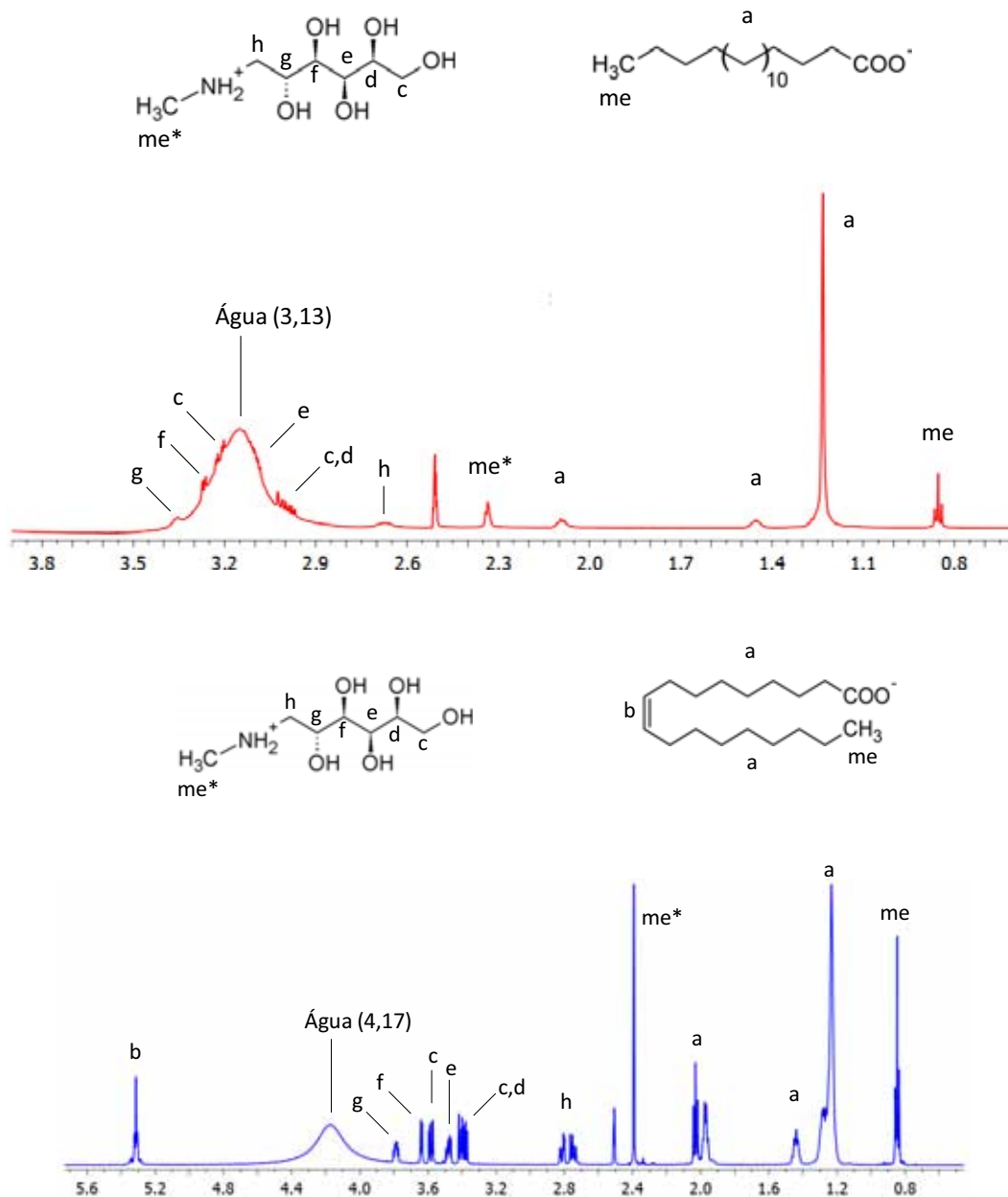
Fica evidente que a polimerização supramolecular dos compostos carboxilato-meglumina anfifílicos está condicionada à característica da cadeia carbônica, a qual defini o empacotamento compacto das supramoléculas direcionado pelas interações hidrofóbicas. No caso de EM a cadeia saturada e linear permite um arranjo no qual a proximidade entre os grupos OH e, sobretudo, proteção da fase aquosa são requisitos para a formação das ligações de hidrogênio. Diferentemente de OM, que a presença da dupla ligação na cadeia carbônica e sua conformação *cis* impedem uma organização semelhante à de EM. Como visto anteriormente na Figura 31, através das isotermas de Langmuir, a repulsão entre as duplas ligações e a conformação da cadeia carbônica de OM impedem um empacotamento mais denso de suas supramoléculas.

### **RMN**

Medidas de RMN permitiram obter mais informações sobre a auto montagem dos monômeros EM em água. Como já observado em trabalhos anteriores, devido os compostos carboxilato-meglumina serem resultantes da interação eletrostática entre o cátion meglumina e o ânion carboxilato, os deslocamentos químicos no espectro de RMN na região do cátion meglumina não se alteram significativamente, independentemente das estruturas dos ânions carboxilatos, exceto na polimerização supramolecular [6,7].

O inconveniente apresentado pela técnica de RMN é que para realização das medidas, as amostras devem ser líquidas. No entanto, a gelificação da água deuterada ( $D_2O$ ) devido à formação do PS EM, deixou a amostra semi-sólida inviabilizando o experimento. Este problema foi contornado ao preparar um hidrogel 4% (m/m) menos viscoso, polimerizando EM uma mistura (0,5:1,5) m/m de  $H_2O$  e dimetil sulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ). Como referência uma amostra de OM abaixo de sua c.a.c ~ 0,10 % (m/m) foi preparada em uma mistura dos mesmos solventes em igual proporção (seção 3.10). Os espectros de RMN adquiridos para EM e OM são apresentados na Figura 40.

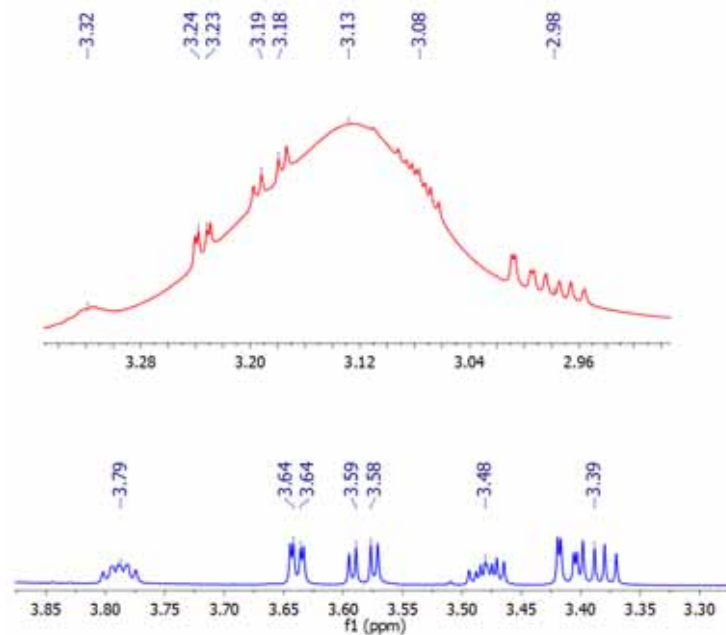
Figura 40. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do PS EM (vermelho) e do composto anfifílico OM (azul), obtidos em uma mistura de  $\text{H}_2\text{O}/\text{DMSO-d}_6$ .



No espectro de OM os sinais mostraram-se mais resolvidos, o que foi atribuído à maior mobilidade experimentada por suas supramoléculas livres na fase líquida. No PS EM, entretanto, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio mantiveram os monômeros arranjados em posições específicas restringindo sua mobilidade, resultando em um espectro de  $^1\text{H}$  com sinais mais alargados. Os sinais dos hidrogênios na região do cátion meglumina de EM (H-c, H-d, H-f, H-g) foram afetados pela mudança no ambiente químico devido a polimerização supramolecular, apresentando um deslocamento para campo alto (3,5-2,9 ppm) quando comparados aos sinais

correspondentes de OM (3,8-3,3 ppm), o que pode ser melhor apreciado na ampliação da Figura 41.

**Figura 41. Espectros de RMN  $^1\text{H}$  do PS EM (vermelho) e do composto anfifílico OM (azul) ampliados na região do cátion meglumina. Os sinais referem-se aos H adjacentes aos grupos hidroxila envolvidos nas ligações de H (H-c, H-d, H-f, H-g).**

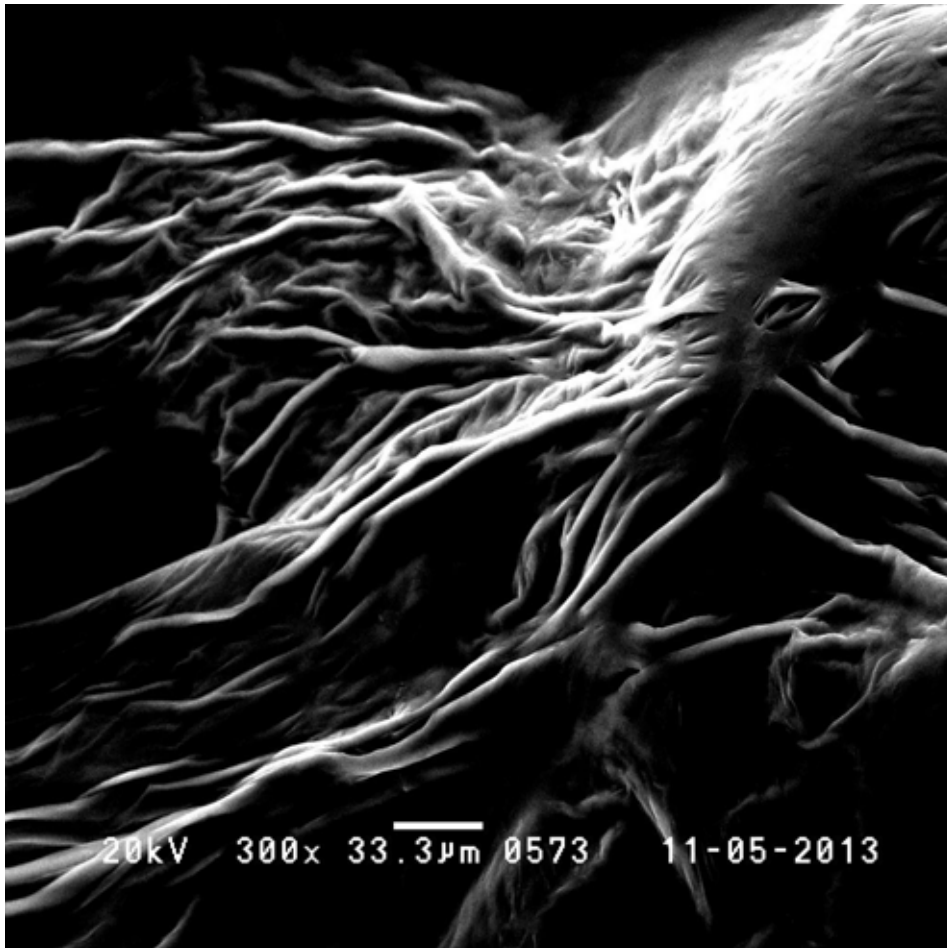


A explicação para o deslocamento químico observado está no confinamento da meglumina na região hidrofóbica, seguido pela formação das ligações de hidrogênio entre os grupos OH [97]. Esta sequência de eventos aproxima as cabeças polares do aminocarboidrato e como consequência há o aumento da densidade eletrônica nesta região, deslocando para campo alto os sinais dos hidrogênios vizinhos às hidroxilas. Uma característica interessante está nos sinais de  $\text{H}_2\text{O}$  presentes nas amostras. A imobilização da água na estrutura tridimensional do gel resultou no deslocamento químico significativamente menor (3,13 ppm) em relação ao valor observado para água livre presente na amostra de OM (4,17 ppm). Deve ser considerado que na mistura coexistem interações solvatofóbicas (DMSO) e hidrofóbicas (água) as quais afetam a organização dos monômeros do PS como discutido anteriormente na seção 1.2. De fato o hidrogel na mistura água/DMSO foi visualmente menos viscoso do que em água, o que pode ser uma evidência tanto de arranjo distinto quanto de um grau de polimerização relativamente menor.

### **MEV**

A micrografia apresentada na Figura 42 evidenciou a morfologia fibrosa do PS EM, correspondente à estrutura secundária do hidrogel. Como foi necessária a desidratação da amostra para leitura no microscópio eletrônico de varredura, a estrutura terciária em rede do hidrogel foi perdida. A permanência das fibras reforçou o fato de que o PS para ser formado necessita da ação de interações hidrofóbicas, porém sua estabilidade depende principalmente das ligações de hidrogênio, uma vez que não existem interações hidrofóbicas na ausência de água. Este resultado foi um avanço, pois os primeiros estudos com os PS carboxilato-meglumina mostraram que os mesmos eram pouco estáveis no estado sólido [6,7].

**Figura 42. Micrografia do PS EM.**



### **Viscosidade capilar e DLS**

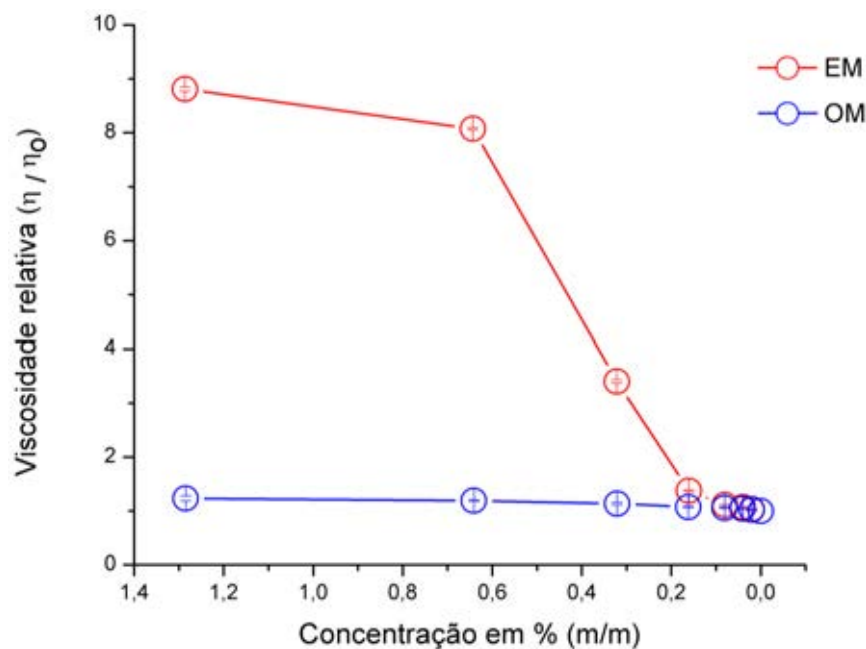
O estudo da polimerização de EM em fase aquosa foi estendido também em regime diluído. É esperado que o grau de polimerização diminua quando a concentração do meio é reduzida. Neste sentido a viscosidade em água do PS EM pode ser

modificada, dependendo de como o equilíbrio se ajusta as novas condições. Para tanto foram empregadas medidas de viscosidade e espalhamento de luz (DLS) que permitiram uma melhor descrição da dinâmica deste sistema.

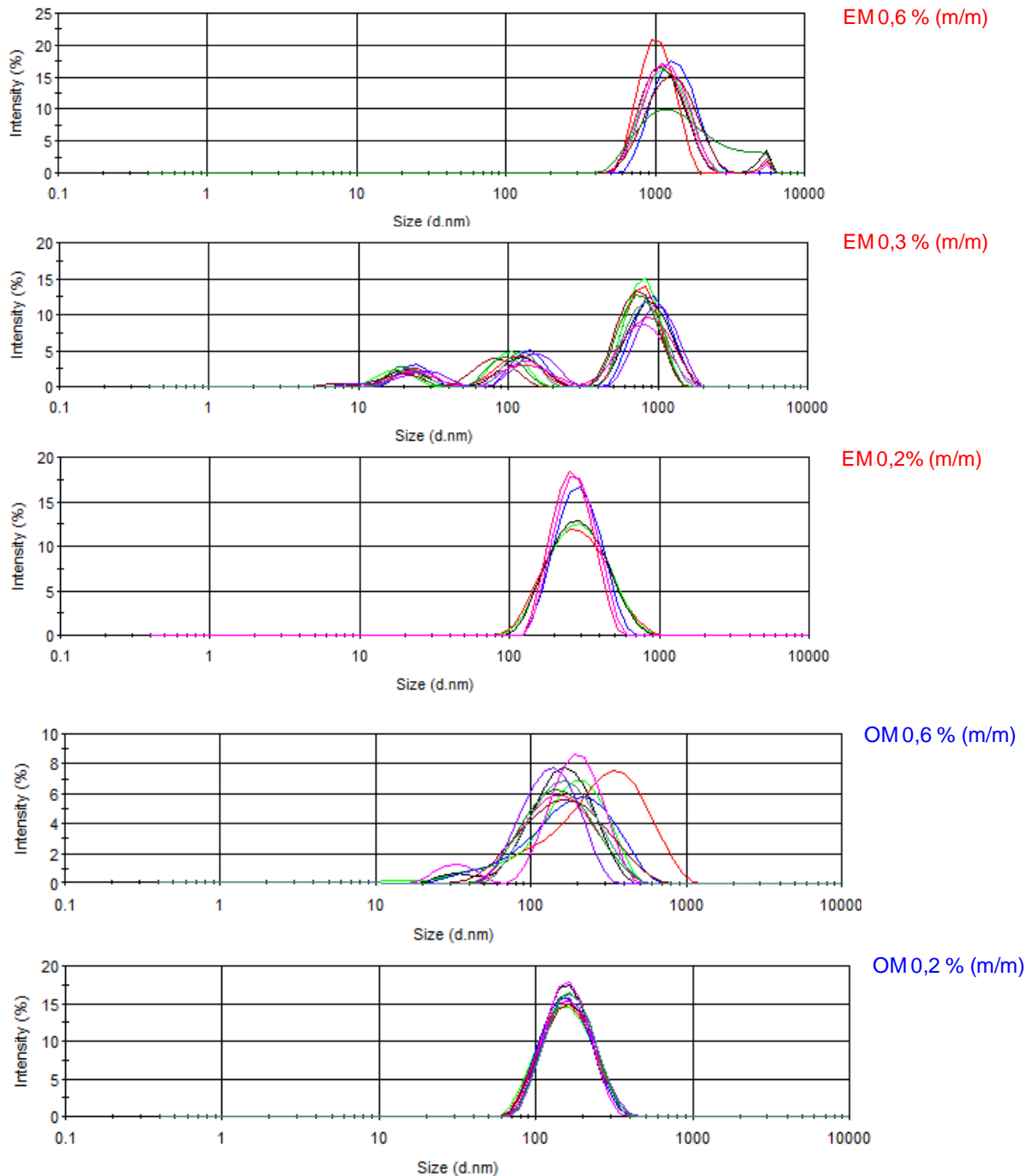
Nestes experimentos, EM foi previamente polimerizado em uma concentração igual a 6,4% (m/m), a partir da qual foram obtidas amostras diluídas. Estas foram então medidas. A concentração de 6,4% (m/m) foi escolhida apenas pela conveniência na realização das diluições (seção 3.11). Como referência amostras de OM foram medidas, preparadas também a partir de uma mistura mais concentrada do composto (1,28 % m/m).

Na Figura 43 são mostrados os gráficos das viscosidades relativas ( $\eta/\eta_0$ ) a 25 °C, como função da redução da concentração de EM e OM em meio aquoso. As curvas mostraram uma expressiva diferença de viscosidade de EM e OM acima de 0,6 % (m/m), que foi sendo reduzida com a diluição de EM. A diluição não produziu efeito expressivo em OM em todo o intervalo investigado, ou seja, de 1,3-0,02 % (m/m). Em torno 0,08 % (m/m) foi observado a sobreposição das curvas, indicando a que as viscosidades de EM e OM em fase aquosa tornaram-se semelhantes. A Figura 44 mostra a distribuição de tamanho das partículas de EM 0,6; 0,3; e 0,2 % (m/m), e de OM nas concentrações 0,6 e 0,2 % (m/m).

**Figura 43. Efeito da diluição sobre as viscosidades relativas médias de EM e OM em fase aquosa.**  $\eta$ =viscosidade do solvente e  $\eta_0$ =viscosidade da água pura. As barras paralelas nos círculos são os desvios padrão obtidos para n=5 medidas.



**Figura 44. Distribuição do tamanho (diâmetro em nm) de EM e OM em meio aquoso como função da intensidade de espalhamento (%). Os diâmetros médios ( $n > 105$ ) das estruturas em EM considerando o modelo de Stokes-Einstein são: 0,6% (1,321  $\mu\text{m}$ ); 0,3% (848,1; 124,7; 22,2 nm); 0,2% (284,3 nm). Enquanto que em OM são: 0,6% (180,3 nm) e 0,2% (156 nm). As concentrações investigadas correspondem aos pontos da curva de viscosidade conforme a Figura 43.**



As medidas de tamanho por espalhamento de luz baseiam-se no modelo de Stokes-Einstein, no qual o espalhamento é causado por partículas consideradas como esféricas, em incessante movimento (movimento browniano) [98]. O coeficiente de

difusão das partículas ( $D_T$ ) é determinado a partir das medidas e inserido na equação de Stokes-Einstein (2), a partir da qual o tamanho da partícula ( $D_h$ ) é obtido:

$$D_h = \frac{K_B T}{3\pi\eta D_T} \quad (11)$$

Onde:  $D_h$  é o diâmetro hidrodinâmico. A constante de Boltzmann,  $K_B$ . A temperatura,  $T$  e a viscosidade,  $\eta$ .

$D_h$  pode ser entendido como o diâmetro de uma partícula esférica somado de sua primeira camada de hidratação, implicando-se que independentemente da estrutura adotada pelo soluto na fase líquida, ele será sempre considerado como uma partícula esférica.

De acordo com os gráficos da Figura 44, foi possível explicar que a elevada viscosidade de EM em relação a OM na concentração de 0,6 % (m/m), está relacionada aos tamanhos das suas estruturas, neste caso, 1,321  $\mu\text{m}$  e 180,3 nm, respectivamente.

A magnitude do tamanho médio de EM 0,6 % (m/m), na ordem de micrômetros, indicou que o PS manteve-se estruturado em baixas concentrações, ou seja, suas ligações de hidrogênio ainda foram efetivas, quando a concentração do PS foi reduzida cerca de 10 vezes, considerando que foi EM foi preparado inicialmente na concentração 6,4% (m/m). No entanto, é plausível afirmar que em 0,6 % (m/m) parte da estrutura do PS foi perdida, devido o rompimento parcial das ligações de hidrogênio com a diluição e diminuição do grau de polimerização.

Os tamanhos médios de OM em 0,6 e 0,2 % (m/m) foram condizentes com valores típicos dos compostos anfífilos que se agregam (através de interações hidrofóbicas) em água acima de sua c.a.c. e, portanto não mudam acentuadamente de tamanho em um intervalo pequeno de concentração, explicando a pouca alteração de viscosidade de OM com a diluição. A queda acentuada da viscosidade de EM quando a sua concentração caiu para 0,3 % (m/m) foi correlacionada ao rompimento de grande parte das ligações de hidrogênio. De acordo com o gráfico de espalhamento de EM 0,3 % (m/m), o ajuste do equilíbrio termodinâmico às menores concentrações levou a formação de estruturas menores.

Por volta de 0,2 % (m/m) tanto, a viscosidade quanto tamanho de EM e OM, foram semelhantes, mostrando que nesta concentração as ligações de hidrogênio do PS foram completamente rompidas. Como a concentração de EM situava-se muito acima de

sua c.a.c, suas supramoléculas estavam agregadas apenas por interações hidrofóbicas, assim como as supramoléculas de OM.

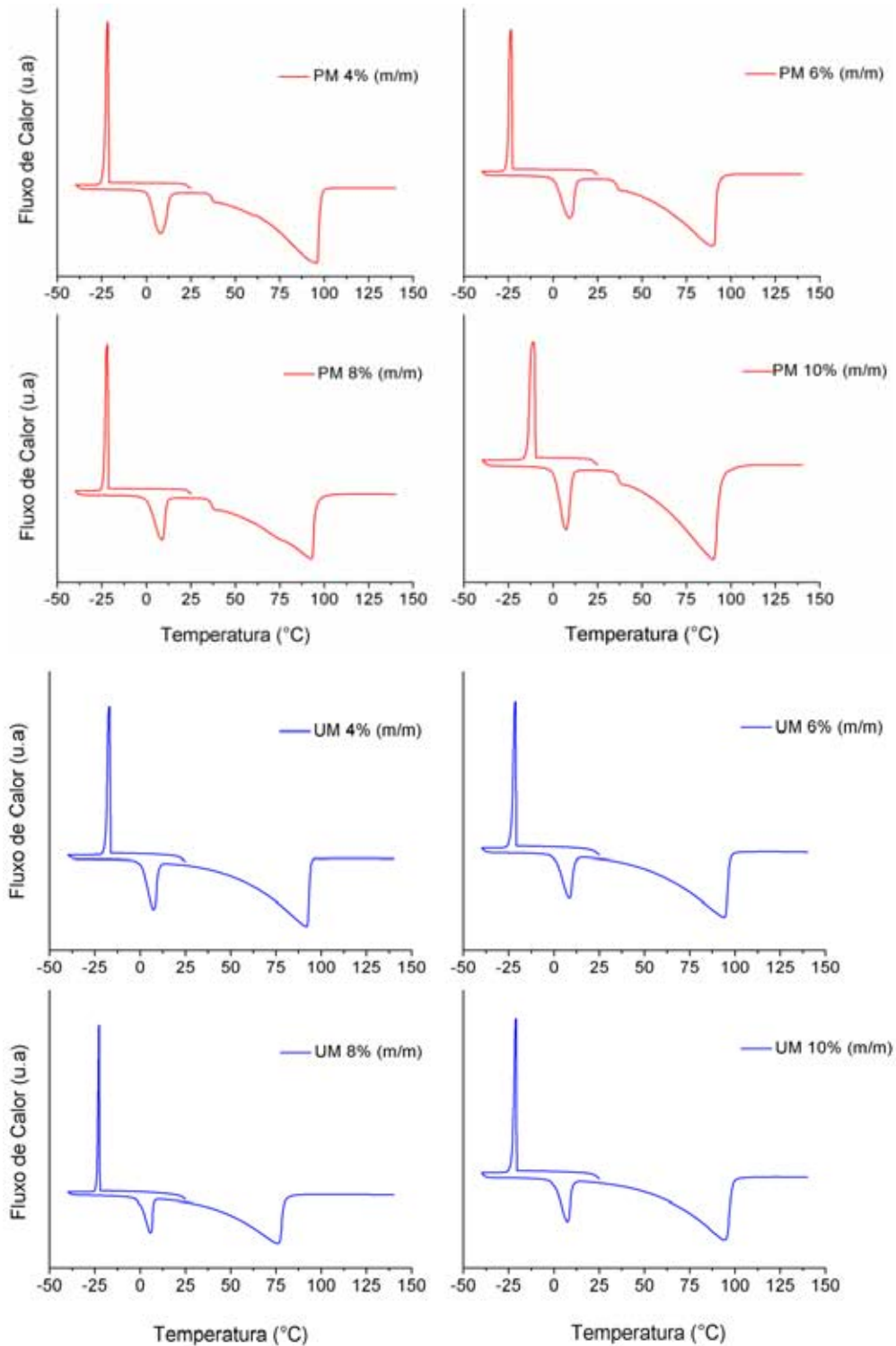
Em torno de 0,08 % (m/m) a ausência de agregados na fase aquosa fez com que ocorresse a sobreposição de ambas as curvas de viscosidade. Conforme visto anteriormente na Figura 30, os valores de c.a.c de EM e OM são próximos de 0,08 e 0,15 % (m/m), respectivamente e em concentrações menores suas supramoléculas se mantêm apenas adsorvidas superfície da subfase aquosa.

### ***Considerações finais sobre a polimerização dos compostos carboxilato-meglumina***

Ficou evidente que a polimerização supramolecular do composto EM em fase aquosa é dependente do sinergismo entre interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio. A presença de uma dupla ligação é prejudicial à formação do polímero OM, primeiramente pelo impedimento estrutural, que devido à repulsão entre as duplas ligações e conformação das cadeias alquílicas, suas supramoléculas não são hábeis em se arranjar de forma semelhante à EM. Outro fator relevante, diz respeito ao balanço hidrofílico/hidrofóbico da supramolécula anfifílica, que para conduzir a polimerização em água parece pender mais para o caráter hidrofóbico. De fato OM é mais solúvel em fase aquosa do que EM, devido à presença da insaturação, o que equivale à retirada de um grupo CH<sub>2</sub> da cadeia carbônica C18.

A relação entre o balanço hidrofílico/hidrofóbico e polimerização dos compostos carboxilato-meglumina foi demonstrada investigando o comportamento dos derivados dos ácidos graxos, palmítico (C16) e undecanóico (C11), nomeados palmitato-meglumina (PM) e undecanoato-meglumina (UM), respectivamente. Assim como EM (C18) ambos os compostos PM e UM são de cadeia saturada, porém o fato de serem mais curtas deixa o balanço hidrofílico/hidrofóbico dos mesmos, relativamente mais hidrofílico do que de EM. O limite foi atingido para UM, no qual a polimerização não foi verificada, comportando-se como uma espécie anfifílica típica que se agrega em fase aquosa apenas por interações hidrofóbicas. A presença da transição gel-sol verificada para PM em torno de 36,27 °C, como mostrado nas curvas DSC da Figura 45, evidenciou a polimerização supramolecular do composto. UM, por sua vez, apresentou um comportamento térmico semelhante ao de OM.

Figura 45. Curvas DSC do PS PM (em vermelho) em fase aquosa como um hidrogel, nas concentrações 4%, 6%, 8% e 10% (m/m). Como já observado na seção 4.2, a mudança de posição da linha base, neste caso verificado para PM em 36,27 °C, decorre da temperatura de rompimento das ligações de hidrogênio do PS e colapso da estrutura do hidrogel. As curvas DSC de UM (em azul) não evidenciam evento térmico semelhante, excluindo a polimerização supramolecular do composto. Mesmo possuindo cadeia linear e saturada, como EM (C18) e PM (C16), a cadeia muito curta de UM (C11) desfavorece a polimerização supramolecular.



A correspondência entre fusão e polimerização supramolecular mostrou-se verdadeira para PM e UM (Figura 46), assim como foi visto para EM e OM. É interessante notar que existe um padrão relacionado às temperaturas de fusão e às temperaturas de transição gel-sol: somente os compostos que apresentaram temperaturas de fusão, polimerizaram em fase aquosa demonstrando temperaturas de transição gel-sol, neste caso EM e PM. Além disto, o encurtamento da cadeia carbônica, C18 para C16, foi responsável pela diminuição na temperatura de ambos os eventos como esquematizado na Figura 47.

**Figura 46. Curvas DSC dos compostos sólidos PM (C16) e UM (C11). O pico endotérmico observado em 70,40 °C ( $T_{\text{onset}} = 67,63$  °C) refere-se à fusão de PM. UM não apresentou temperatura de fusão, mas temperatura de transição vítrea em 62,61 °C caracterizada pela mudança de posição da linha base.**

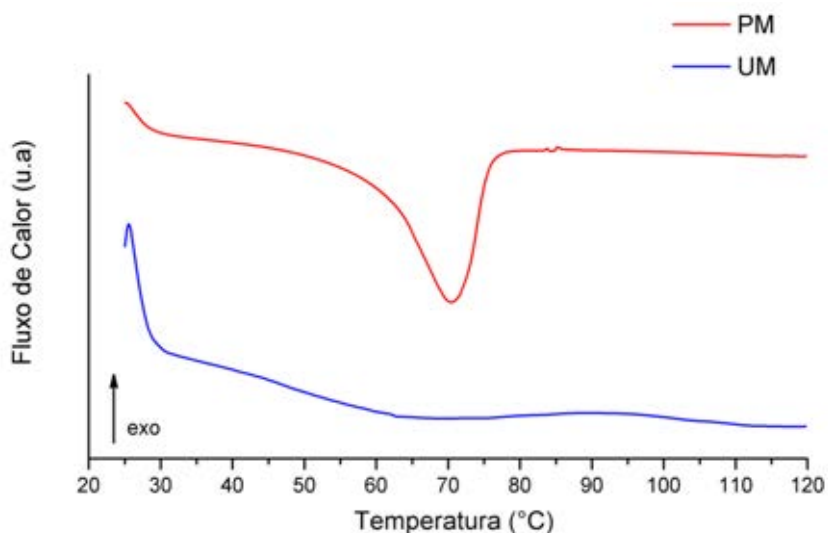
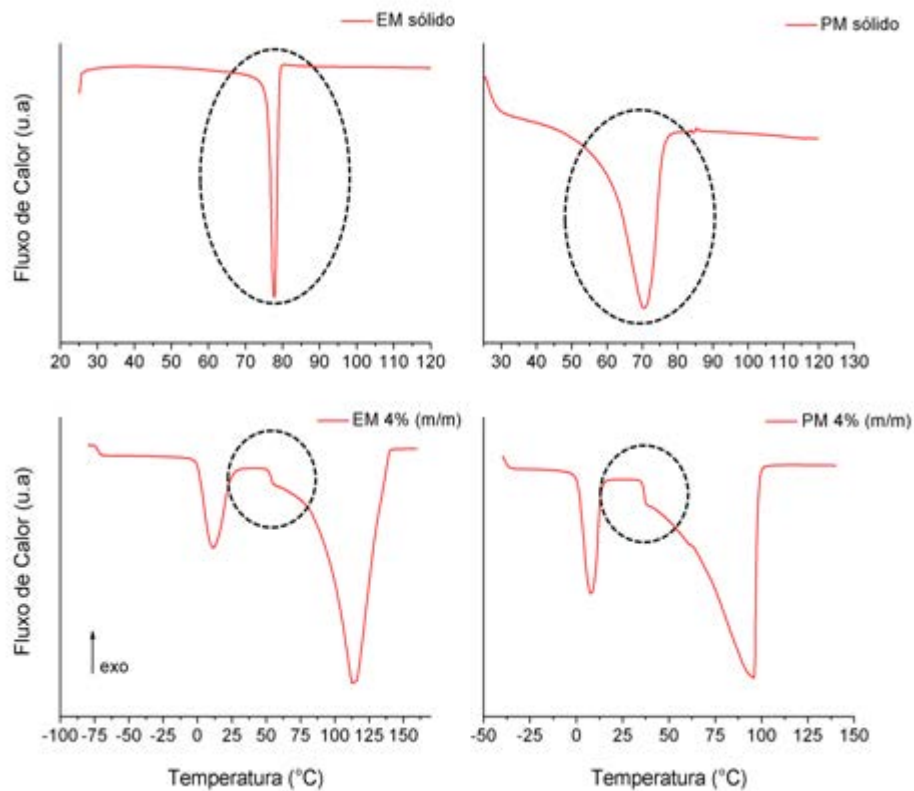


Figura 47. Curvas DSC de EM (C18) e PM (C16). As temperaturas de fusão dos sólidos (superior) e de transição gel-sol dos hidrogéis (inferior) são correlacionadas, ou seja, os compostos carboxilato-meglumina que apresentam temperatura de fusão são capazes de polimerizar formando hidrogéis em fase aquosa. Além disso, as temperaturas de ambos os eventos diminuem com o encurtamento da cadeia. Temperaturas de fusão EM e PM: 77,72 °C e 70,40 °C, respectivamente. Temperaturas gel-sol dos hidrogéis EM e PM: 53,49°C e 36,27 °C, respectivamente.



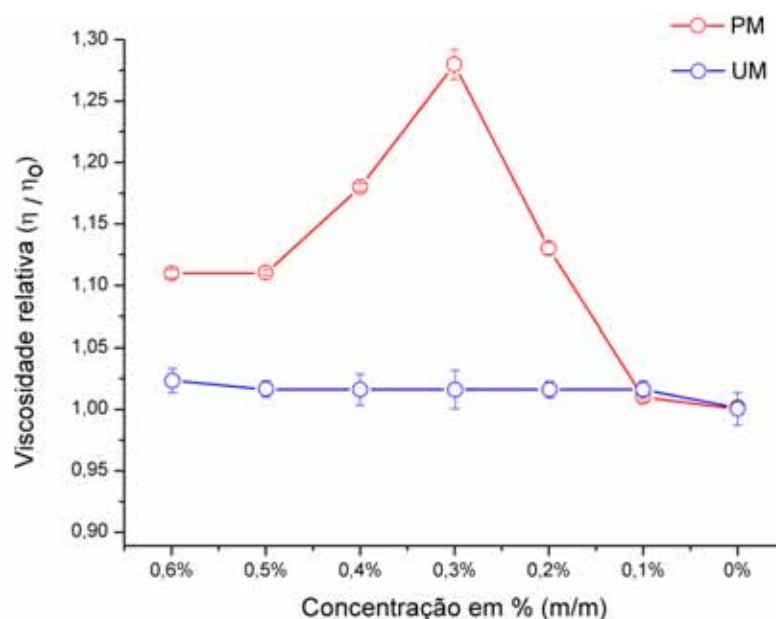
As observações apresentadas na Figura 47 acima apontam para uma semelhança entre o arranjo das supramoléculas nos sólidos cristalinos, e que deve estar se reproduzindo nos PS. Tal hipótese não foi ainda experimentalmente comprovada, mas é plausível supor que as ligações de hidrogênio que empacotam as supramoléculas no sólido cristalino seriam as mesmas que formam o PS. Dessa maneira a fusão e a transição gel-sol seriam eventos semelhantes, pois ocorrem pelo rompimento das ligações de hidrogênio. O sólido cristalino ao ser fundido, recupera sua ordem com o resfriamento devido à reversibilidade das ligações de hidrogênio. Quando uma grande quantidade do sólido é fundido na presença de água (a partir de 4 % m/m), as supramoléculas dissolvem-se completamente atingindo uma concentração que ultrapassa a c.a.c. Com o resfriamento do sistema, as interações hidrofóbicas aproximam as supramoléculas em uma disposição semelhante a do sólido, restabelecendo parte das ligações de hidrogênio, uma vez que no PS os monômeros

não se empacotam tridimensionalmente como no cristal. Isto explicaria a necessidade de fundir os compostos carboxilato-meglumina para se alcançar a polimerização supramolecular.

Na Figura 48 são mostrados os gráficos das viscosidades relativas ( $\eta/\eta_0$ ) medidas a 25 °C, como função da redução da concentração em meio aquoso do PS PM e do composto UM.

A redução da concentração de PM curiosamente aumentou a viscosidade relativa do sistema atingindo um valor máximo em 0,3 % (m/m). Este comportamento pode ser resultante do deslocamento do equilíbrio que favoreceu a formação de estruturas poliméricas distintas pelo efeito da diluição [2]. Em concentrações menores, o comportamento de PM foi semelhante ao observado para EM, ou seja, o rompimento das ligações de hidrogênio com a diluição resultou em uma viscosidade relativa semelhante à do composto carboxilato-meglumina não polimerizado, neste caso UM. Primeiramente passando pela presença de agregados mantidos apenas por interações hidrofóbicas, e posteriormente em concentrações ainda menores, pela adsorção das supramoléculas na subfase aquosa.

**Figura 48.** Efeito da diluição sobre as viscosidades relativas médias de PM e UM em fase aquosa.  $\eta$ =viscosidade do solvente e  $\eta_0$ =viscosidade da água pura. As barras paralelas nos círculos são os desvios padrão obtidos para n=5 medidas.



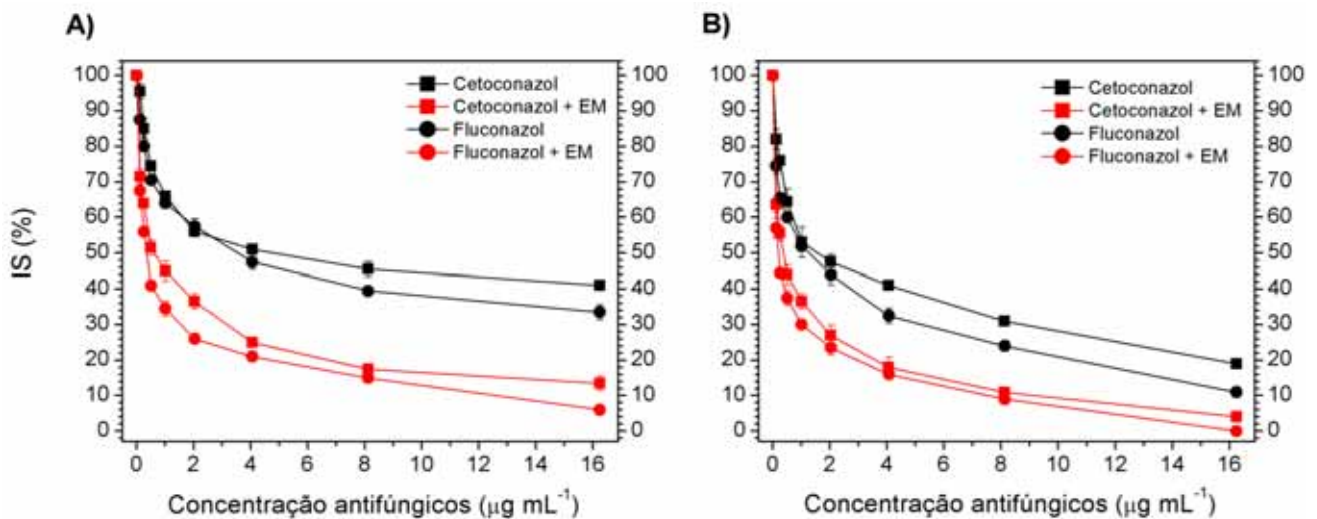
### 4.3 Estudo do hidrogel estearato-meglumina no controle da *Candida albicans*

#### Células planctônicas

A Figura 49 mostra o índice de sobrevivência (IS) de *C. albicans* (planctônica) após incubação com as diferentes condições de estudo. Primeiramente foi possível observar que o aumento da concentração dos antifúngicos bem como do tempo de incubação promoveu maior inibição do fungo, principalmente na presença do fluconazol. Comparando a ação dos antifúngicos na ausência do hidrogel é possível notar que o fluconazol inibiu 8 % a mais de *C. albicans* que o cetoconazol, independente do tempo de incubação, a  $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Esse fato corrobora com resultados já demonstrados na literatura, uma vez que o fluconazol inibe mais células de *C. albicans* que o cetoconazol, nas mesmas condições de estudo [34, 44, 46, 47].

Figura 49: Índice de sobrevivência de *C. albicans* após (A) 12 e (B) 24 horas de incubação com diferentes concentrações de cetoconazol ou fluconazol, na presença e ausência do hidrogel EM 4% (m/m). (A): cetoconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 59 %; fluconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 67 %; cetoconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 87 %; fluconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 94 %.

(B): cetoconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 81 %; fluconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 89 %; cetoconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 96 %; fluconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 0 %.



De uma maneira geral a presença do hidrogel EM provocou um aumento do efeito inibitório dos antifúngicos contra *C. albicans*. Após 12 horas de incubação foi possível notar que a associação dos antifúngicos ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com EM provocou maior inibição no crescimento do fungo, reduzindo cerca de 30 % a mais do IS de *C. albicans* se comparado ao ensaio em que utilizou-se somente os antifúngicos. Este fato também foi

observado após 24 horas de incubação, entretanto com menor intensidade. A associação de EM e cetoconazol provocou uma redução de aproximadamente 15 % a mais no IS de *C. albicans* do que apenas o cetoconazol, enquanto que EM e fluconazol reduziu 11 % a mais no IS que o fluconazol. Vale destacar que somente o hidrogel não provocou nenhuma inibição microbiana, uma vez que o IS se manteve 100 % independente do tempo de incubação.

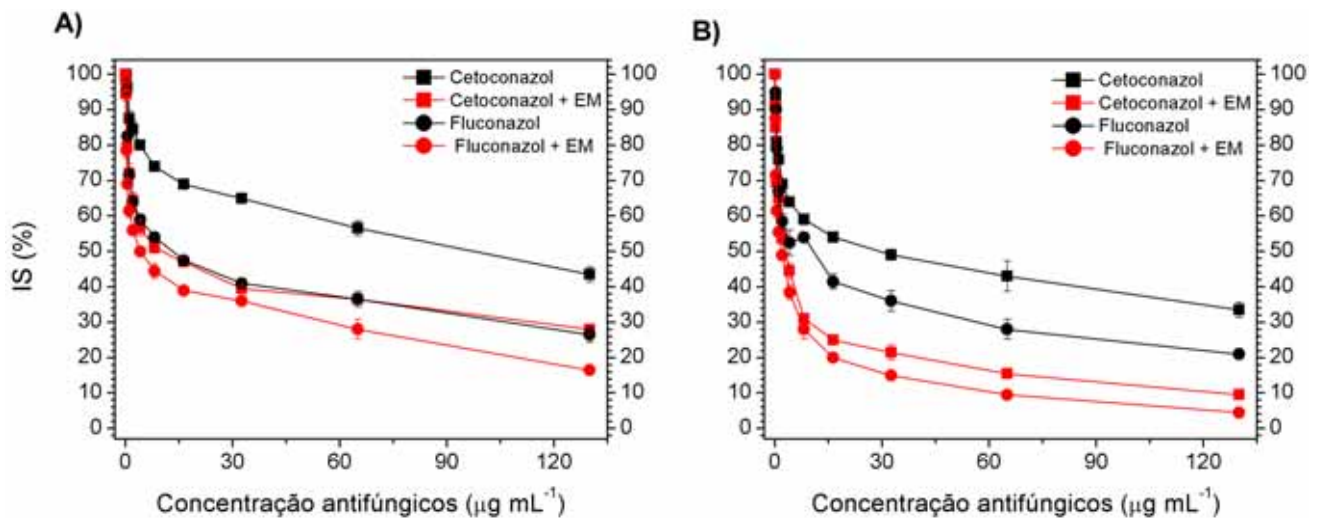
Outro ponto importante é o fato da associação do antifúngico fluconazol ( $16,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) ao hidrogel ter provocado uma inibição de quase 100 % do fungo em menos tempo de incubação, uma vez que após 12 horas de incubação inibiu 92 % de *C. albicans*. Somente o fluconazol, mesmo após 24 horas de incubação, promoveu no máximo 89 % de inibição do fungo.

### **Biofilme**

Conforme salientado anteriormente tem sido necessário novas estratégias para o controle e prevenção dos biofilmes. Neste estudo foi avaliada a ação do hidrogel EM associado aos antifúngicos fluconazol e cetoconazol, contra biofilme de *C. albicans*. A Figura 50 mostra o IS de *C. albicans* na forma de biofilme após incubação com os antifúngicos na presença e ausência do hidrogel EM.

De uma maneira geral o fluconazol foi mais eficaz que o cetoconazol para reduzir o IS do biofilme de *C. albicans*. Após 24 horas de incubação o cetoconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inibiu 57 % de células microbianas enquanto que o fluconazol na mesma concentração inibiu 74 % das células. Aumentando o período de incubação para 48 horas não houve uma diminuição expressiva no IS do fungo. O cetoconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) inibiu 67 % das células e o fluconazol na mesma concentração inibiu 79 %. Isto pode ser explicado pela presença do EPS que age como um adsorvente reduzindo a quantidade de antifúngico disponível para interagir com o biofilme, assim independente do tempo de incubação chega um momento em que o antimicrobiano presente no meio não é suficiente para continuar inibindo o fungo [41].

Figura 50: Índice de sobrevivência de *C. albicans* na forma de biofilme, após (A) 24 e (B) 48 horas de incubação com diferentes concentrações de cetoconazol ou fluconazol, na presença e ausência do hidrogel EM 4% (m/m). (A): cetoconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 57 %; fluconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 74 %; cetoconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 72 %; fluconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 84 %. (B): cetoconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 67 %; fluconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) = 79 %; cetoconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 91 %; fluconazol ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) + EM = 96 %.



Assim como no ensaio com as células planctônicas somente EM não provocou nenhuma inibição fúngica, mas sua associação aos antifúngicos intensificou a ação dos mesmos, promovendo maior inibição de *C. albicans*. Para se alcançar uma inibição de cerca de 100% do biofilme, assim como ocorreu no ensaio com células planctônicas na presença dos antifúngicos e hidrogel, foi necessário um tempo de incubação duas vezes maior (48 horas) e uma concentração do antifúngico cerca de 8 vezes maior ( $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Conforme mostrado na Figura 50b, o cetoconazol na presença do hidrogel reduziu 91 % do biofilme de *C. albicans* e o fluconazol, 96 %. O aumento dos parâmetros tempo de incubação e concentração é justificado pelas diferenças entre as propriedades e padrões de expressão gênica que os micro-organismos na forma de biofilmes apresentam em relação às células planctônicas, principalmente, variações fenotípicas da atividade enzimática, diferenças na composição da parede celular e da estrutura da superfície, promovendo o aumento da resistência dos biofilmes aos antimicrobianos [28].

O mecanismo pelo qual o hidrogel potencializa o efeito dos antifúngicos não foi determinado, mas diante dos resultados obtidos é razoável supor que o hidrogel tenha aumentado a permeabilidade do biofilme facilitando a penetração dos antifúngicos pelo EPS, o que ocorre inicialmente através da compatibilidade química do hidrogel anfífilo

com a composição heterogênea da matriz [16]. Contribui para tal suposição o fato de que o hidrogel não demonstrou ação inibitória contra o fungo, sendo necessária a presença dos antifúngicos para a redução do índice de sobrevivência, e que é bem estabelecido que o EPS apresenta uma estrutura morfológica complexa a qual impede a ação dos antimicrobianos até a células mais profundas do biofilme [37,38].

## 5. CONCLUSÕES

Diante do estudo foi possível concluir que o comportamento em fase aquosa dos compostos carboxilato-meglumina derivados de ácidos graxos é governado pelo balanço hidrofílico/hidrofóbico. Esta propriedade das espécies anfifílicas é uma resultante da diferença de solubilidade em água entre as porções polar e apolar, que no caso dos compostos carboxilato-meglumina, é definida pela característica da cadeia carbônica (saturação, instauração, tamanho). O balanço hidrofílico/hidrofóbico condiciona tanto o comportamento anfifílico típico, ou seja, adsorção e agregação, quanto a capacidade de polimerização supramolecular. Isto significa que os compostos de cadeia insaturada e saturada curta (oleato-meglumina e undecanoato-meglumina, respectivamente), por possuírem balanço hidrofílico/hidrofóbico mais hidrofílico, reduzem intensamente a tensão superficial da água em concentrações abaixo da c.a.c. Em concentrações mais elevadas que a c.a.c., as supramoléculas destes compostos agregam-se somente por intermédio de interações hidrofóbicas, mesmo que uma grande quantidade seja dissolvida em água com auxílio de aquecimento (acima de 4% m/m). Como nestas condições não há formação de ligações de hidrogênio, esses compostos não são capazes de polimerizar. Compostos de cadeia carbônica saturada longa (estearato-meglumina e palmitato-meglumina), diferentemente dos seus análogos insaturado ou de cadeia saturada curta, apresentam um balanço hidrofílico/hidrofóbico mais hidrofóbico. Em virtude disto, os compostos de cadeia saturada longa não são tão eficientes em reduzir a tensão superficial da água abaixo da c.a.c. Em concentrações mais elevadas que a c.a.c., as supramoléculas destes compostos se agregam por intermédio de interações hidrofóbicas, mas quando grande quantidade destes compostos é dissolvida em água com auxílio de aquecimento (acima de 4% m/m) são capazes de polimerizar via ligações de hidrogênio formando PS e hidrogéis.

Pode se concluir também que para a polimerização supramolecular dos compostos carboxilato-meglumina ocorra via ligações de hidrogênio, as supramoléculas devem adotar primeiramente um arranjo compacto que providencie a aproximação entre os grupos hidroxila, doadores e aceitadores da ligação, e ao mesmo tempo a proteção destes grupos contra a solvatação da água. Esta sequência de eventos é dirigida por interações hidrofóbicas, que conduzem as supramoléculas a adotarem um arranjo no qual é formado um ambiente hidrofóbico em que os grupos OH mantêm-se confinados e livres para formarem ligações de hidrogênio entre si. Uma vez polimerizado, as interações hidrofóbicas não são mais relevantes, pois o PS é estável na ausência da

água. Desde que a supramolécula possua um balanço hidrofílico/hidrofóbico adequado, isto é, mais hidrofóbico, é esperado que as interações hidrofóbicas sejam eficientes em conduzir o arranjo ideal para a formação do PS, o qual foi definido como lamelar. Como mostrado pelos experimentos, o composto undecanoato-meglumina que possui cadeia saturada muito curta, não polimeriza como os compostos estearato-meglumina e palmitato-meglumina, ambos de cadeia saturada, porém longa. Com relação ao composto oleato-meglumina, este possui também um balanço hidrofílico/hidrofóbico que desfavorece a polimerização supramolecular, neste caso, devido à cadeia carbônica insaturada. Além disso, a repulsão causada pelos elétrons pi da dupla ligação também é um fator importante por não permitir a aproximação de suas supramoléculas e conseqüentemente dos grupos hidroxila.

Os experimentos mostraram também uma correlação entre a característica da cadeia carbônica dos compostos carboxilato-meglumina, o comportamento das temperaturas de fusão destes compostos e das temperaturas de transição gel-sol dos PS. Diante disso foi possível formular a hipótese de que a origem desta relação esteja na semelhança entre o arranjo das supramoléculas nos sólidos cristalinos, e que deve estar se reproduzindo nos PS. Assim a fusão e a transição gel-sol seriam eventos semelhantes, pois ambos ocorrem pelo rompimento das ligações de hidrogênio.

Por fim, a eficiência do hidrogel estearato-meglumina na inibição da *C. albicans*, tanto de células isoladas e principalmente em colônia na forma de biofilme, mostrou que este material pode ser uma estratégia promissora no combate a microrganismos patogênicos. Chama atenção o fato do hidrogel não possuir ação inibitória contra o fungo, mas quando associado aos antifúngicos seja capaz de inibir até 96 % das células do biofilme. Isto indicou que o hidrogel aja provocando o aumento da permeabilidade do biofilme ao fármaco permitindo que o mesmo possa atingir mais profundamente as células da colônia.

## REFERÊNCIAS

- 1 HUANG, F.; SCHERMAN, O. A. Supramolecular polymers. **Chemical Society Reviews**, v. 4, n. 18, p. 5879-5880, 2012.
- 2 WOJTECKI, R. J.; MEADOR, M. A.; ROWAN, S. J. Using the dynamic bond to access macroscopically. **Nature Materials**, v. 10, n. 1, p. 14-27, 2011.
- 3 CHEN, Y.; KUSHNER, A. M.; WILLIAMS, G. A.; ZHIBIN, G. Multiphase design of autonomic self-healing thermoplastic elastomers. **Nature Chemistry**, v. 4, n. 6, p. 467-472, 2012.
- 4 BINDER, W. H.; ZIRBS, R. Supramolecular polymers and networks with hydrogen bonds in the main- and side-Chain. In: BINDER, W. (Ed.). **Hydrogen bonded polymers**. Heidelberg: Springer, 2007. p. 3-71. (Advances in polymer science, v. 207).
- 5 BERTRAND, A.; LORTIE, F.; BERNARD, J. Routes to hydrogen bonding chain-end functionalized polymers. **Macromolecules**, v. 33, n. 24, p. 2062-2091, 2012.
- 6 CASSIMIRO, D. L.; KOBELNIK, M.; RIBEIRO, C. A.; CRESPI, M. S.; BORALLE, N. Structural aspects, thermal behavior, and stability of a self-assembled supramolecular polymer derived from flunixin-meglumine supramolecular adducts. **Thermochemica Acta**, v. 529, n. 1, p. 59-67, 2012.
- 7 CASSIMIRO, D. L.; FERREIRA, L. M. B.; CAPELA, J. M. V.; CRESPI, M. S.; RIBEIRO, C. A. Kinetic parameters for thermal decomposition of supramolecular polymers derived from diclofenac-meglumine supramolecular adducts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 73, n. 1 p. 24-28, 2013.
- 8 OBERT, E.; BELLOT, M.; BOUTEILLER, L.; ANDRIOLETTI, F.; FERRENBACH, C. L.; BOUÉ, F. Both water- and organo-soluble supramolecular polymer stabilized by hydrogen-bonding and hydrophobic interactions. **Journal of American Chemical Society**, v. 129, n. 50, p. 15601-15605, 2007.
- 9 CHANDLER, D. Interfaces and the driving force of hydrophobic assembly. **Nature**, v. 437, n. 7059, p. 640-647, 2005.
- 10 von RYBINSKI, W; HILL, K. Alkyl polyglycosides-properties and applications of a new class of surfactants. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 10, p. 1328-1345, 1998.
- 11 SODERMANA, O.; JOHANSSON, I. Polyhydroxyl-based surfactants and their physico-chemical properties and applications. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 4, n. 6 p. 391-401, 2000.
- 12 SELIKTAR, D. Designing cell-compatible hydrogels for biomedical applications. **Science**, v. 336, n. 6085, p. 1124-1128, 2012.

- 13 DIAS, A. S.; OLIVEIRA, A. P.; MIRANDA I. M.; COBRADO, J. B. L.; SOARES, M. M.; QUEIROZ, J. A.; VAZ, C. P.; RODRIGUES, A. G. Anti-biofilm activity of low-molecular weight chitosan hydrogel against *Candida* species. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 203, n. 1, p. 25-33, 2014.
- 14 FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 9, p. 623-633, 2010.
- 15 NOVO hidrogel antimicrobiano combate biofilmes e bactérias multirresistentes. **Ciência Hoje**, 2013. Disponível em: <<http://www.cienciahoje.pt/index.php?oid=56824&op=all>> Acesso em: 09 dez. 2014.
- 16 LI, Y.; FUKUSHIMA, K.; COADY, D. J.; ENGLER, A. C.; LIU, S.; HUANG, Y.; CHO, J. S.; GUO, Y.; MILLER, L. S.; TAN, J. P. K.; EE, P. L. R.; FAN, W.; YANG, Y. Y.; HEDRICK, J. L. Broad-spectrum antimicrobial and biofilm-disrupting hydrogels: stereocomplex-driven supramolecular assemblies. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 2, p. 674-678, 2013.
- 17 MACIAS, A. E.; PONCE-DE-LEON, S. Infection control: old problems and new challenges. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 637-645, 2005.
- 18 SANTOS, A. C. R. B. dos; GALES, A. C.; CARVALHO, A. A.; FERREIRA, K. de A. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde-Rede RM: resistência microbiana em IPCSL relacionada a CVC em UTI (2012). **Boletim informativo: Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde**, v. 4, n. 7, mar. 2014. Disponível em: <file:///C:/Users/Win7/Downloads/boletim\_07.pdf / > Acesso em: 09 dez. 2014.
- 19 EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.
- 20 CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M. dos; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. de. Mecanismos de resistência da *Candida sp* wwa antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9, p. 30-35, 2006.
- 21 HASSAN, I.; POWELL, G; SIDHU, M.; HART, W. M.; DENNING, D. W. Excess mortality, length of stay and cost attributable to candidaemia. **Journal of Infection**, v. 59, n. 5, p. 360-365, 2009.
- 22 FALAGAS, M. E.; APOSTOLOU, K. E.; PAPPAS, V. D. Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 419-425, 2006.
- 23 BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Effect of growth rate on resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n. 8, p. 1900-1995, 1998.

- 24 LENGELER, K. B.; DAVIDSON, R. C.; D'SOUZA, C. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 64, n. 4, p. 746-785, 2000.
- 25 O'SULLIVAN, J. M.; JENKINSON, H. F.; CANNON, R. D. Adhesion of *Candida albicans* to oral streptococci is promoted by selective adsorption of salivary proteins to the streptococcal cell surface. **Microbiology**, v. 146, n. 1, p. 41-48, 2000.
- 26 MUKHERJEE, P. K.; ZHOU, G.; MUNYON, R. Candida biofilm: a well-designed protected environment. **Medical Mycology**, v. 43, n. 3, p. 191-208, 2005.
- 27 SUTHERLAND, I. W. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. **Microbiology**, v. 147, n. 1, p. 3-9, 2001.
- 28 MELO, W. C. M. A.; AVCI, P.; OLIVEIRA, M. N. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 7, p. 669-693, 2013.
- 29 O'TOOLE, G.; KAPLAN, H. B.; KOLTER, R. Biofilm formation as microbial development. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 49-79, 2000.
- 30 SENEVIRATNE, C. J.; JIN, L.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, n. 7, p. 582-590, 2008.
- 31 DRAGO, L.; MOMBELLI, B.; DE VECCHI, E.; BONACCORSO, C.; FASSINA, M. C.; GISMONDO, M. R. *Candida albicans* cellular internalization: a new pathogenic factor? **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 4, p. 545-547, 2000.
- 32 DOUGLAS, L. J. Candida biofilms and their role in infection. **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 1, p. 30-36, 2003.
- 33 CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; MUKHERJEE, P. K. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 18, p. 5385-5394, 2001.
- 34 ANDRIOLE, V. T. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 2, p. 151-162, 1999.
- 35 CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; LEIDICH, S. D.; FADDOUL, F. F.; HOYER, L. L.; DOUGLAS, L. J.; GHANNOUM, M. A. Antifungal resistance of *Candida* biofilms formed on denture acrylic *in vitro*. **Journal of Dental Research**, v. 80, n. 3, p. 903-908, 2001.
- 36 GILBERT, P.; DAS, J.; FOLEY, I. Biofilm susceptibility to antimicrobials. **Advances in Dental Research**, v. 11, n. 1, p. 160-167, 1997.
- 37 HAWSER, S. P.; DOUGLAS, L. J. Resistance of *Candida albicans* biofilms to antifungal agents *in vitro*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 9, p. 2128-2131, 1995.

- 38 BAILLIE, G. S.; DOUGLAS, L. J. Matrix polymers of *Candida* biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 397-403, 2000.
- 39 RENDUELES, O.; GHIGO, J. M. Multi-species biofilms: how to avoid unfriendly neighbors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 5, p. 972-989, 2012.
- 40 FLEMMING, H. C.; NEU, T. R.; WOZNIAK, D. J. The eps matrix: the "house of biofilm cells". **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 22, p. 7945-7947, 2007.
- 41 DAVIES, D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p. 114-122, 2003.
- 42 MONDS, R. D.; O'TOOLE, G. A. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. **Trends in Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 73-87, 2009.
- 43 COSTERTON, J. W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D. E.; KORBER, D. R.; LAPPIN-SCOTT, H. M. Microbial biofilms. **Annual Review of Microbiology**, v. 49, n. 1, p. 711-745, 1995.
- 44 SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A.; SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 1, p. 40-79, 1999.
- 45 VANDEN, B. H.; DROMER, F.; IMPROVISI, I.; LOZANO-CHIU, M.; REX, J. H.; SANGLARD, D. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **Medical Mycology**, v. 36, n. 1, p. 119-128, 1998.
- 46 GROLL, A. H.; PISCITELLI, S. C.; WALSH, T. J. Clinical pharmacology of systemic antifungal agents: a comprehensive review of agents in clinical use, current investigational compounds, and putative targets for antifungal drug development. **Advances in Pharmacology**, v. 44, n. 1, p. 343-500, 1998.
- 47 KUMAMOTO, C. A. *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 6, p. 608-611, 2002.
- 48 MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4333-4440, 2003.
- 49 LEHN, J. M. Perspectives in supramolecular chemistry-from molecular recognition towards molecular information processing and self-organization. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 29, n. 11, p. 1304-1319, 1990.
- 50 THE NOBEL Prize in Chemistry 1987: press release. 1987. Disponível em: <[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/1987/press.html](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/1987/press.html)>. Acesso em: 26 jun. 2014.
- 51 CRAM, J. D.; CRAM, M. J. Host-guest chemistry. **Science**, v. 183, n. 4127, p. 803-808, 1974.

- 52 LEHN, J. M. Supramolecular chemistry: receptors, catalysts, and carriers. **Science**, v. 227, n. 4689, p. 849-856, 1985.
- 53 STEED, J. W.; ATWOD, J. L. **Supramolecular chemistry**. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 2009. 1002 p.
- 54 ROWAN, S. J.; BECK, J. B. Metal-ligand induced supramolecular polymerization: a route to responsive materials. **Faraday Discussions**, v. 128, n. 1, p. 43-53, 2005.
- 55 MULHAUPT, R. Hermann Staudinger and the origin of macromolecular chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 43, n. 9, p. 1054-1063, 2004.
- 56 BOSMAN, A. W.; SIJBESMA, R. P.; MEIJER, E. W. Supramolecular polymers at work. **Materials Today**, v. 7, n. 4 p. 34-39, 2004.
- 57 LEHN, J. M. Supramolecular polymer chemistry-scope and perspectives. **Polymer International**, v. 51, p. 825-839, 2002.
- 58 BINDER, W. H. Polymeric ordering by H-bonds. Mimicking nature by smart building blocks. **Monatshefte für Chemie**, v. 136, n. 1, p. 1-19, 2005.
- 59 FOX, J. D.; ROWAN, S. J. Supramolecular polymerizations and main-chain supramolecular polymers. **Macromolecules**, v. 42, n. 18, p. 6823-6835, 2009.
- 60 FLORY, P. J. Molecular theory of liquid crystals. In: GORDON, M.; PLATÉ, N. A.(Ed.). **Liquid crystal polymers I**. Berlin: Springer, 1984. p. 1-35.
- 61 CIFERRI, A. Supramolecular liquid crystallinity as a mechanism of supramolecular polymerization. **Liquid Crystals**, v. 26, n. 4, p. 489-494, 1999.
- 62 HENTSCHE, R.; EDWARDS, P. J. B.; BODEN, N.; BUSHBY, R. J. A model for isotropic, nematic, and columnar ordering in a self-assembling system comparison with the phase behavior of 2,3,6,7,10,11-hexa-(1,4,7-trioxaoctyl)-triphenylene in water. **Macromolecular Symposia**, v. 81, n. 1, p. 361-367, 1994.
- 63 YAN, X.; WANG, F.; ZHENG, B.; HUANG, F. Stimuli-responsive supramolecular polymeric materials. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 18, p. 6042-6065, 2012.
- 64 KASHIF, M.; CHANG, Y. W. Preparation of supramolecular thermally repairable elastomer by crosslinking of maleated polyethylene-octene elastomer with 3-amino-1,2,4-triazole. **Polymer International**, v. 63, n. 1, p. 1936-1943, 2014.
- 65 HEINZMANN, C.; COULIBALY, S.; ROULIN, A.; FIORE, G. L.; WEDER, C. Light-induced bonding and debonding with supramolecular adhesives. **Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 7, p. 4713-4719, 2014.
- 66 AIDA, T.; MEIJER, E. W.; STUPP, S. I. Functional supramolecular polymers. **Science**, v. 335, n. 6070, p. 813-817, 2012.

67 HAN, J.T.; LEE, D. H.; RYU, C. Y.; CHO, K. Fabrication of superhydrophobic surface from a supramolecular organosilane with quadruple hydrogen bonding. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 15, p. 4796-4797, 2004.

68 HART, L. R.; HARRIES, J. L.; GREENLAND, B. W.; COLQUHOUN, H. M.; HAYES, W. Healable supramolecular polymers. **Polymer Chemistry**, v. 4, n. 18, p. 4860-4870, 2013.

69 BRUNSVELD, L.; VEKEMANS, J. A. J. M.; HIRSCHBERG, J. H. K. K.; SIJBESMA, R. P.; MEIJER, E. W. Hierarchical formation of helical supramolecular polymers via stacking of hydrogen-bonded pairs in water. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 8, p. 4977-4985, 2002.

70 ZHAO, D.; MOORE, J. S. Nucleation-elongation: a mechanism for cooperative supramolecular polymerization. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v. 1, n. 20, p. 3471-3491, 2003.

71 CIFERRI, A. Growth of supramolecular structures In: -----. **Supramolecular Polymer**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 29-76.

72 BRUNSVELD, L.; FOLMER, B. J. B; MEIJER, E. W.; SIJBESMA, R. P. Supramolecular polymers. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 12, p. 4071-4098, 2001.

73 STADLER, R.; FREITAS, L. L.; Thermoplastic elastomers by hydrogen bonding 1. Rheological properties of modified polybutadiene. **Colloid and Polymer Science**, v. 264, n. 1 p. 773-778, 1986.

74 CORDIER, P; TOURNILHAC, F.; ZIAKOVIC, C. S; LEIBLER, L. Self-healing and thermoreversible rubber from supramolecular assembly. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 977-980, 2008.

75 JORGENSEN, W. L.; PRANATA, J. Importance of secondary interactions in triply hydrogen bonded complexes: guanine-cytosine vs uracil-2,6-diaminopyridine. **Journal of the American Chemical Society**, v. 112, n. 5, p. 2008-2010, 1990.

76 CORBIN, P. S.; ZIMMERMAN, S. C. Hydrogen-bonded supramolecular polymers: linear and network polymers and self-assembling discotic polymers. In: CIFERRI, A. **Supramolecular polymer**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 153-186.

77 NORO, A.; HAYASHI, M.; MATSUSHITA, Y. Design and properties of supramolecular polymer gels. **Soft Matter**, v. 8, n. 24, p. 6416-6429, 2012.

78 YU, G.; YAN, X.; HAN, C.; HUANG, F. Characterization of supramolecular gels. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n.16, p. 6697-722, 2013.

79 SCHOOT, P. V. D. Theory of supramolecular polymerization. In: CIFERRI, A. **Supramolecular polymer**. 2nd ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2005. p. 77-106.

80 GREEF, T. F. A.; MEIJER, E. W. Supramolecular polymers. **Nature**, v. 453, n. 7192, p. 171-173, 2008.

- 81 FOLMER, B. J. B.; SIJBESMA, R. P.; VERSTEEGEN, R. M.; VAN DER RIJT, J. A. J.; MEIJER, E. W. Supramolecular polymer materials: chain extension of telechelic polymers using a reactive hydrogen-bonding synthon. **Advanced Materials**, v. 12, n. 12, p. 874-878, 2000.
- 82 SZILLAT, F.; SCHMIDT, B. V. K.; HUBERT, A.; KOWOLLIK, C. B.; HELMUT, R. Redox-switchable supramolecular graft polymer formation via ferrocene-cyclodextrin assembly. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 35 n. 14, p. 1293-1300, 2014.
- 83 JI, X.; YAO, Y.; LI, J.; YAN, X.; HUANG, F. A supramolecular cross-linked conjugated polymer network for multiple fluorescent sensing. **Journal of The American Chemical Society**, v. 135, n. 1, p. 74-77, 2012.
- 84 BURNWORTH, M.; TANG, L.; JUSTIN, R.; KUMPFER, J. R.; DUNCAN, A. J.; BEYER, F. L.; FIORE, G. L.; ROWAN, S. J.; WEDER, C. Optically healable supramolecular polymers. **Nature**, v. 472, n. 743, p. 334-337, 2011.
- 85 TEXEIRA, E.; MALTA, M. M.; SANTOS, R. G. Medidas de tensão superficial pelo método de contagem de gotas: descrição do método e experimentos com tensoativos não-iônicos etoxilados. **Química Nova**, v. 32, n.1, p. 223-227, 2009.
- 86 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology**: an introduction. 10th ed. San Francisco: Pearson Benjamin Cummings, 2009. 960 p.
- 87 CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. In vitro growth and analysis of Candida biofilms. **Nature Protocols**, v. 3, n. 12, p. 1909-1924, 2008.
- 88 AKAY, G.; RAEISI, A. H.; TUNCABOYLU, D. C.; ORAKDOGEN, N.; ABDURRAHMANOGLU, S.; OPPERMAN, W.; OKAY, O. Self-healing hydrogels formed in cationic surfactant solutions. **Soft Matter**, v. 9, n. 7, p. 2254-2261, 2013.
- 89 ZHANG, X.; WANG, C. Supramolecular amphiphiles. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 94-101, 2011.
- 90 ADAMSON, A. W.; GAST, A. P. **Physical chemistry of surfaces**. 6th ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 808 p.
- 91 DYNAROWIKZ-LATKA, P.; DHANABALAN, A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Modern physicochemical research on Langmuir monolayers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 91, n. 2, p. 221-293, 2001.
- 92 DURAIRAJ, B.; BLUM, F. D. Micelle formation and terminal double bonds in sodium carboxylates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 106, n. 2, p. 561-564, 1985.
- 93 CASTELLAN, G. **Fundamentos de físico-química**. Rio de Janeiro: LTC, 1986. 530 p.

94 SKILLING, K. J.; CITOSI, F.; BRADSHAW, T. D.; ASHFORD, M.; KELLAM, B.; MARLOW, M. Insights into low molecular mass organic gelators: a focus on drug delivery and tissue engineering applications. **Soft Matter**, v. 10, n. 2, p. 237-256, 2014.

95 PUTNAM, C. D.; HAMMEL, M.; HURA, G. L.; TAINER, J. A. X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 40, n. 3, p. 191-285, 2007.

96 MACHADO, D. L. **Estudo do comportamento de sistemas hidrotropicos**. 2012. 101 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

97 SHOME, A.; DEBNATH, S.; DAS, P. K. Head group modulated pH-responsive hydrogel of amino acid-based amphiphiles: entrapment and release of cytochrome c and vitamin B12. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4280-4288, 2008.

98 ZETASIZER nanoseries user manual. Worcestershire: Malvern Instruments, 2005.