

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JÚLIO DE MESQUITA FILHO – UNESP
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JULIANA SÁ LEAL DE FIGUEIREDO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COPOLÍMEROS DE POLIETILENOGLICOL
MONOMETIL ÉTER EM QUITOSANA CATIONIZADA PARA FUTURAS APLICAÇÕES
EM BIOTECNOLOGIA.**

Araraquara
2014

JULIANA SÁ LEAL DE FIGUEIREDO

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE COPOLÍMEROS DE POLIETILENOGLICOL
MONOMETIL ÉTER EM QUITOSANA CATIONIZADA PARA FUTURAS APLICAÇÕES
EM BIOTECNOLOGIA.**

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

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno

Araraquara

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

F475s	Figueiredo, Juliana Sá Leal de Síntese e caracterização de copolímeros de polietilenoglicol monometil éter em quitosana cationizada para futuras aplicações em biotecnologia / Juliana Sá Leal de Figueiredo. – Araraquara : [s.n], 2014 97 f. : il. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Paulo Roberto Bueno 1. Biotecnologia. 2. Quitosana. 3. Sais de amônio quaternário. 4. Polietilenoglicol. 5. Copolímeros. I. Título.
-------	--

JULIANA SÁ LEAL DE FIGUEIREDO

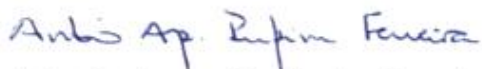
Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Doutora em Biotecnologia.

Araraquara, 29 de agosto de 2014

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



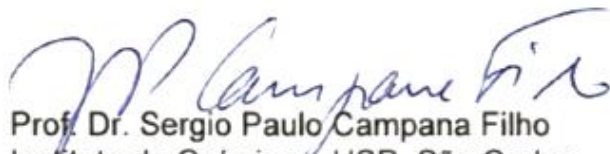
Dr. Antonio Aparecido Pupim Ferreira
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Maria Palmira Daflon Gremião
Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho
Instituto de Química – USP, São Carlos

Aos meus pais, Juvenal Ferreira Leal de Figueiredo e Yara Sá de Figueiredo;

Aos meus irmãos, Ottoni Sá Leal de Figueiredo e Eduardo José Sá de Figueiredo;

Ao meu amado Thomas Beltrame.

AGRADECIMENTOS

Ao orientador, Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, por ter me acolhido em seu laboratório, por ter me conduzido nessa jornada e também pelas excelentes oportunidades acadêmicas que tem me oferecido.

Ao coorientador, Prof. Dr. Michael Tam, por me permitir a realização de parte deste trabalho em seu laboratório, na Universidade de Waterloo.

Ao grupo do Prof. Michael Tam, pelo acolhimento e pelos ensinamentos e discussões que foram fundamentais para a realização desta tese. Um agradecimento especial ao Msc. Micky Lee e ao Dr. Zengqian Shi, que tiveram uma grande colaboração neste trabalho.

Ao grupo de Materiais Magnéticos e Colóides do IQ-UNESP, supervisionado pelo Prof. Miguel Jafelicci, pela infraestrutura e suporte técnico oferecidos para a realização das medidas de espalhamento de luz, potencial zeta e viscosidade. Agradecimento especial à Eloiza, ao Wesley e ao Jaime.

Ao grupo de Físico-química de Soluções de Polímeros e Surfactantes da UNICAMP, liderado pelo Prof. Watson Loh, pelo suporte técnico oferecidos para a realização das medidas de incremento do índice de refração.

Ao nosso grupo de pesquisa, Nanobionics, pela infraestrutura, suporte técnico, discussões e amizade.

Aos queridos colegas do Departamento de Físico-química, pela amizade e momentos memoráveis.

A todos os colegas do LIEC, pela amizade e pela agradável convivência durante estes anos.

À CAPES pelo suporte financeiro na realização do estágio de Doutorado Sanduíche na Universidade de Waterloo – Canadá – e pela bolsa de doutorado.

Ao Instituto de Química e a UNESP por me fornecer infraestrutura adequada para o desenvolvimento de minha tese e a oportunidade de realizar o doutorado.

RESUMO

Derivados da quitosana (M_w 80-120) foram preparados pela introdução de polietilenoglicol monometil éter (mPEG, M_w 5000 Da) em quitosana previamente cationizada com o objetivo de melhorar a solubilidade e a densidade de cargas da quitosana em meio aquoso, de pH neutro e alcalino, nos quais a quitosana é insolúvel e seus grupos amina encontram-se desprotonados. A quitosana cationizada foi preparada pela reação da quitosana com o cloreto de glicidil trimetilamônio (CGTMA) em meio aquoso, em uma taxa molar de CGTMA para unidades *D*-glicosamina de 2;1. *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO). Com o objetivo de conjugar o mPEG à QC via ligação amida, os grupos hidroxila terminais do mPEG comercial foram oxidados utilizando *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) na presença de NaBr e NaClO. Copolímeros de enxerto de mPEG – COOH e QC, mPEG – *g* – QC, foram preparados através da formação de ligações amidas na presença de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e *N*-hidroxisuccinimida (NHS), em diferentes taxas de massa de mPEG para QC (0,85:1, 1,65:1 e 2,5:1). A estrutura da quitosana, mPEG, QC e copolímeros mPEG – *g* – QC, assim como as modificações químicas realizadas na molécula de quitosana e de mPEG foram confirmadas por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e de ressonância magnética nuclear (^1H RMN). A partir dos espectros de ^1H RMN também foi possível determinar o grau de desacetilação da quitosana (GD=87%), o grau de cationização da QC (GC=37%) e o grau de substituição (GS) de mPEG – COOH nos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1 (GS=2,8%), mPEG – *g* – QC 1,65:1 (GS=5,6%) e mPEG – *g* – QC (2,8%), 2,5:1 (GS=8,3%). O potencial zeta da QC e dos copolímeros mPEG – *g* – QC mantiveram-se altos e positivos, com valores entre +30 e +65 mV, em todo o intervalo de pH estudado (2,5-10), enquanto a quitosana apresentou um potencial zeta alto e positivo (+40 a +50 mV) até pH 6, a partir do qual teve uma acentuada queda alcançando 0 mV em pH 10. Medidas de espalhamento de luz estático foram realizadas para a determinação da massa molecular da quitosana, QC e copolímeros mPEG – *g* – QC. A solubilidade da quitosana, QC e copolímeros mPEG – *g* – QC, em meio aquoso (1 mg/mL), foi avaliada de forma qualitativa em função do pH por espectroscopia UV/visível e os resultados mostraram que a transmitância da QC e dos copolímeros foi maior do que 97% em toda a faixa de estudada (pH 4 a 10) enquanto a transmitância da quitosana foi menor do que 20% em pH neutro e alcalino. A viscosidade das soluções de QC (1,6 cP) e dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1 (0,97 cP), mPEG – *g* – QC 1,65:1 (0,99 cP) e

mPEG – *g* – QC 2,5: 1 (0,99 cP) foram significativamente mais baixas quando comparados à quitosana (2,36 cP) e apresentaram valores próximos à viscosidade de mPEG (0,97 cP).

Palavras-chave: quitosana, cloreto de glicidil trimetilamônio, sais de amônio quaternário de quitosana, modificação com PEG.

ABSTRACT

Derivatives of chitosan (Mw 80-120) were prepared by grafting polyethylene glycol monomethyl ether (mPEG, MW 5000 Da) in previously cationized chitosan to improve the solubility and charge density of chitosan in aqueous solution of neutral and alkaline pH, in which chitosan is insoluble and their amino groups are deprotonated. The cationized chitosan (CC) was prepared by reaction of chitosan with glycidyl trimethylammonium chloride (GTMAC) in aqueous medium using a molar ratio of GTMAC and D-glucosamine units of 1:2. To react mPEG with QC via amide bond, the hydroxyl groups of the commercial mPEG were oxidized using N-oxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine (TEMPO), NaBr and NaClO. The graft copolymers of mPEG – COOH and CC (mPEG – g – CC) were prepared by forming amide bonds using of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and N -hydroxysuccinimide (NHS), in different rates of mass of QC to mPEG (0,85: 1, 1,65: 1 and 2,5: 1). The structure of chitosan, mPEG – COOH, CC and copolymers mPEG – g – QC, as well as theirs chemical modifications were confirmed by infrared spectroscopy (FTIR) and nuclear magnetic resonance (^1H NMR). From the ^1H NMR spectra was also determined the degree of deacetylation of chitosan (DD = 87%), the degree of cationization of CC (DC = 37%) and the degree of substitution (DS) of mPEG – COOH on copolymers mPEG – g – CC 0,85:1 (DS = 2,8%), mPEG – g – CC 1,65:1 (DS = 5,6%), and mPEG – g – CC 2,5:1 (DS = 8,3%). The zeta potential of CC and copolymers mPEG – g – CC remained high and positive with value between +30 and +65 mV, through the pH range studied (2,5-10), while chitosan showed a high and positive zeta potential (+40 to +50 mV) until pH 6, from which decreased sharply and reached 0 mV at pH 10. Static light scattering measurements were performed to determine the molecular weight of chitosan, CC and copolymers. The solubility of chitosan, CC and copolymers mPEG – g – CC in an aqueous medium (1 mg/ml) were evaluated qualitatively as a function of pH, by UV/VIS spectroscopy and the results showed that the transmittance of CC and copolymers was greater than 97% through the pH range studied (pH 4 to 10) while the transmittance of chitosan was lower than 20% in neutral and alkaline pH. The viscosity of CC (1,6 cP) and copolymers mPEG – g – CC 0,85: 1 (0,97 cP), mPEG – g – CC 1,65: 1 (0,99 cP) and mPEG – g – CC 2,5: 1 (0,99 cP) were significantly lower than chitosan viscosity (2,36 cP) and exhibited values close to mPEG viscosity (0,97 cP).

Keywords: chitosan, CGTMA,, quaternary chitosan salts, PEG modification.

SUMÁRIO

1	Introdução	13
1.1	Quitosana	13
1.1	Estrutura e propriedades	13
1.1.1	Efeito da quitosana no aumento do transporte paracelular	16
1.1.2	Biodegradabilidade da quitosana	16
1.1.3	Atividade antimicrobiana da quitosana	17
2	Modificações químicas na molécula de quitosana	18
2.1	Cationização da quitosana	19
2.2	Introdução de PEG na molécula de quitosana	25
3	Objetivos.....	32
4	Material e métodos	33
4.1	Material.....	33
4.2	Cationização da quitosana	33
4.3	Ativação de mPEG	34
4.4	Síntese dos copolímeros de enxerto mPEG – g – QQ	35
4.5	Desacetilação da quitosana	37
4.6	Caracterizações físico-químicas	37
4.6.1	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	37
4.6.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹ H RMN).....	37
4.6.3	Titulação potenciométrica-condutimétrica	39
4.6.3.1	Titulações ácido-base.....	40
4.6.3.2	Titulações de precipitação	40
4.6.4	Potencial zeta	41
4.6.5	Medidas de viscosidade	42
4.6.6	Massa molecular ponderal média (M_w).....	42
4.7	Avaliação qualitativa da solubilidade em solução aquosa.....	43
5	Resultados e discussão.....	45
5.1	Cationização da quitosana	45
5.2	Oxidação de mPEG a mPEG-COOH	59
5.3	Síntese e caracterização dos copolímeros de enxerto mPEG – g – QC	63
5.4	Desacetilação da quitosana	79
6	Conclusão	88

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Reação de desacetilação da quitina para a obtenção de quitosana por hidrólise alcalina, comumente realizada com solução aquosa de NaOH 40% (m/m) a uma temperatura de 60 a 100 °C por 4 h sob atmosfera de N₂. Os grupos acetilas da quitina (em vermelho) são hidrolisados gerando uma amina primária (em azul): (a) quitina; (b) quitosana.....13
- Figura 2- Em meio aquoso neutro e alcalino, meios nos quais o pH é maior que o pKa da quitosana, os grupos amina e hidroxila da molécula de quitosana interagem entre si por interações de hidrogênio intra e intermolecular de forma que as interações polímero-polímero são mais fortes do que as interações polímero-solvente, o que a torna insolúvel nestas condições. Em meio ácido, os grupos amina tornam-se protonados e a repulsão eletrostática entre as moléculas enfraquecem as interações de hidrogênio e as interações polímero-solvente são prevalecidas, tornando-as solúveis.14
- Figura 3 – Agentes cationizantes que apresentam um grupo funcional amônio quaternário. (a) grupo amônio quaternário, os grupos R correspondem a grupos alquila; (b) cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-N,N,N-trimetilamônio; (c) brometo de 3-bromo-N,N,N-trimetil-1-propanoamônio (d) cloreto de di-(2,3-epoxipropil)-N,N-dimetilamônio; (e) cloreto de 2,3-epoxipropil-N,N,N-trimetilamônio; (f) iodeto de N-(2-aminooxiethyl)-N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetilamônio (g) brometo de [3-(trimetilamônio)-propil] metanotiosulfonato (h) cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-N,N-dimetil dodecil amônio; (i) cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-N,N-dimetil estearil amônio.20
- Figura 4 – Reações de cationização da quitosana utilizando o cloreto de glicidil trimetilamônio (**CGTMA**) em meio aquoso neutro, ácido e alcalino. Em meio neutro e ácido, o anel epoxi do **CGTMA** é preferencialmente atacado pelo grupo NH₂ da quitosana, gerando a quitosana N-cationizada. Após a obtenção de um derivado N-cationizado solúvel, suas hidroxilas tornam-se acessíveis para reagir com o **CGTMA** e formar derivados substituídos em NH₂ e em OH (quitosana O,N- cationizada).21
- Figura 5 – Estrutura química do polietilenoglicol (PEG).25
- Figura 6 – Estrutura química do polietilenoglicol monometil éter (mPEG).26
- Figura 7 – Introdução de mPEG pelos grupos amina da quitosana via ligação amida (a) e pelos grupos OH via eterificação (b).26
- Figura 8 – Sequência de reações da conjugação de mPEG-COOH e quitosana via grupos amina utilizando a conjugação EDC/NHS, em meio aquoso, à uma temperatura de 25 °C durante aproximadamente 24h: (I) ativação de mPEG com EDC e a formação de um éster ativo instável; (II) formação do éster ativo estável de mPEG e NHS; (III) conjugação de mPEG-COOH ao grupo amina da quitosana formando uma ligação amida estável originando o copolímero mPEG-g-Quitosana para qualquer molécula de quitosana e derivado da quitosana que possuam grupos amina.27
- Figura 9 – Sequência de reações da conjugação de mPEG-COOH e quitosana via grupos OH: EDC/NHS: (I) reação de proteção do grupo amina da quitosana com o anidrido ftálico, em DMF à uma temperatura de 130 °C durante 5-7h; (II) reação de eterificação entre o mPEGI e a quitosana na presença de Ag₂O à uma temperatura de 60 °C durante 16h ; (III) remoção do anidrido ftálico do grupo amina da quitosana utilizando monohidrato de hidrazina, à 90 °C por 15h.29
- Figura 10 – Fluxograma da reação de oxidação do grupo hidroxila de mPEG via TEMPO/NaBr/NaClO, em meio aquoso, em pH 10-11.34
- Figura 11 – Espectros de FTIR: (a) quitosana; (b) quitosana cationizada em meio aquoso (**QQH2O**) com uma razão **CGTMA**:D-glicosamina igual a 2 (c) quitosana cationizada em DMSO (**QQDMSO**) com uma razão **CGTMA**:D-glicosamina igual a 3.....46
- Figura 12 – Curva de titulação condutimétrica da quitosana cationizada em água (**QCH2O**). A amostra foi dispersa em água purificada, em uma concentração de 1 mg/mL, e titulada

com AgNO_3 0,025 M. A intersecção entre as linhas vermelhas indica o ponto de transição da curva, calculado por regressão linear. A seta vermelha corresponde ao volume de AgNO_3 gasto ($V_1 - V_0$) para a titulação da quitosana cationizada.	47
Figura 13 – Curva de titulação condutimétrica da quitosana cationizada em DMSO (QCDMSO). A amostra foi dispersa em água purificada, utilizando uma concentração de 1 mg/mL e foi titulada com AgNO_3 0,01 M. As linhas pontilhadas delimitam a área de neutralização dos íons Cl^- , a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição da curva, calculado por regressão linear. A seta vermelha corresponde ao volume de AgNO_3 gasto ($V_1 - V_0$) para a titulação da quitosana cationizada.	49
Figura 14 – Espectro de ^1H RMN da quitosana em CDCl_3 em uma concentração de 5 mg/mL. Os hidrogênios estão representados por números de acordo com a posição do carbono ao qual encontram-se ligados nos monômeros desacetilado e monômero acetilado.	51
Figura 15 – Frequência com que os monômeros ocorrem na quitosana, em termos de porcentagem: (a) monômeros acetilados – 13%; (b) monômeros desacetilados – 87%.	51
Figura 16 – Espectro de ^1H RMN da quitosana cationizada (QC) em D_2O em uma concentração de 5 mg/mL. Os hidrogênios estão representados por números e letras de acordo com a posição do carbono ao qual se encontram ligados nos monômeros desacetilado, monômero acetilado e monômero cationizado.	53
Figura 17 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas na QC , em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) unidades desacetiladas – 49%; (c) unidades cationizadas – 38%.	53
Figura 18 – Gráfico de potencial zeta em função do pH: quitosana (curva em preto) e quitosana cationizada - QC (curva em azul). As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL, em HCl 0,1 M e tituladas com NaOH 0,1 M utilizando um titulador automático acoplado ao Zetasizer S.	56
Figura 19 – Curvas de transmitância da quitosana (curva em preto) e quitosana cationizada – QC (curva em azul) em solução aquosa ácida, neutra e alcalina. As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL, em água e ajustes de pH foram realizados utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.	57
Figura 20 – Representação esquemática da conversão de mPEG à mPEG – COOH via oxidação mediada por TEMPO- NaBr - NaClO	59
Figura 21 – Espectros de FTIR: (a) mPEG ; (b) mPEG – COOH	60
Figura 22 – Espectro de ^1H RMN de mPEG – COOH . Os hidrogênios estão representados por letras de acordo com a posição do carbono ao qual se encontram ligados.	61
Figura 23 – Curva de titulação condutimétrica do mPEG – COOH disperso em HCl , em uma concentração de 10 mg/mL e titulado com NaOH 0,05 M. As linhas pontilhadas delimitam a área de desprotonação do mPEG – COOH e a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição da curva (V_0 e V_1), que foram calculados por regressão linear.	62
Figura 24 – Espectro de FTIR dos copolímeros de enxerto. (a) mPEG – g – QC 0,85:1 ; (b) mPEG – g – QC 1,65:1 ; (c) mPEG – g – QC 2,5:1 ; (d) mPEG – COOH ; (e) QC	64
Figura 25 – Espectro de ^1H RMN do copolímero mPEG10 – g – QC 0,85:1 em D_2O em uma concentração de 5 mg/mL. A posição dos hidrogênios está representada, em cada unidade repetitiva, por números e letras de acordo com a localização do carbono ao qual se encontram ligados. Da esquerda para a direita encontram-se as unidades desacetiladas, unidades acetiladas, unidades cationizadas e unidades enxertadas com mPEG	66
Figura 26 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas no copolímero mPEG – g – QC 0,85:1 , em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) unidades desacetiladas – 46,2%; (c) unidades enxertadas com mPEG – 2,8%; (d) unidades cationizadas – 38%.	67

Figura 27 – Espectro de H^1 RMN do copolímero mPEG – g – QC 1,65:1 em D ₂ O em uma concentração de 5 mg/mL. A posição dos hidrogênios está representada, em cada unidade repetitiva, por números e letras de acordo com a localização do carbono ao qual se encontram ligados. Da esquerda para a direita encontram-se as unidades desacetiladas, unidades acetiladas, unidades cationizadas e unidades enxertadas com mPEG .	68
Figura 28 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas no copolímero mPEG10 – g – QC 1,65:1 , em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) c desacetiladas – 43,4%; (c) unidades enxertadas com mPEG – 5,6%; (d) unidades cationizadas – 38%.	69
Figura 29 – Espectro de H^1 RMN do copolímero mPEG – g – QC 2,5:1 em D ₂ O em uma concentração de 5 mg/mL. A posição dos hidrogênios está representada, em cada unidade repetitiva, por números e letras de acordo com a localização do carbono ao qual se encontram ligados. Da esquerda para a direita encontram-se as unidades desacetiladas, unidades acetiladas, unidades cationizadas e unidades enxertadas com mPEG .	70
Figura 30 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas no copolímero mPEG – g – QC 2,5:1 , em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) c desacetiladas – 40,7%; (c) unidades enxertadas com mPEG – 8,3% ; (d) unidades cationizadas – 38%.	71
Figura 31 – Gráfico de potencial zeta em função do pH: quitosana carionizada (QC - em vermelho); copolímero mPEG – QC 0,85:1 (em azul); copolímero mPEG – QC 1,65:1 (em verde); copolímero mPEG – QC 2,5:1 (em rosa). As amostras foram dispersas em HCl 0,1 M, pH 2,5, em uma concentração de 1 mg/mL, e foram tituladas com NaOH 0,1 M até atingir pH 10 utilizando um titulador automático acoplado ao Zetasizer S.	74
Figura 32 – Curvas de transmitância da quitosana (em preto) e quitosana cationizada (QC - em azul) em solução aquosa ácida, neutra e alcalina. As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL, em água e ajustes de pH foram realizados utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.	75
Figura 33 – Espectros de FTIR: (a) quitosana; (b) quitosana desacetilada.	81
Figura 34 – Curva de titulação potenciométrica-condutimétrica da quitosana dispersa em HCl 0,1 M, em uma concentração de 1 mg/mL, titulada com NaOH 0,1 M. A curva preta é de potenciometria e a azul de condutimetria. As linhas pontilhadas delimitam a área de desprotonação dos grupos amina da quitosana e a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição de ambas as curvas. O volume de NaOH 0,1 M gasto para neutralizar os grupos amina da quitosana está delimitado pelo volume inicial e final na curva de condutividade (V_0 e V_1) calculados por regressão linear.	82
Figura 35 – Primeira derivada da curva de potenciometria da quitosana, a partir da qual foi calculado o pKa da quitosana, que é o ponto médio entre os pontos de inflexão da curva de pH, indicado pela linha pontilhada central.	83
Figura 36 – Curva de titulação potenciométrica-condutimétrica da quitosana desacetilada (QD) dispersa em HCl 0,1 M, em uma concentração de 1 mg/mL, titulada com NaOH 0,1 M. A curva preta é de potenciometria e a azul de condutimetria. As linhas pontilhadas delimitam a área de desprotonação dos grupos amina da quitosana e a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição de ambas as curvas. O volume de NaOH 0,1 M gasto para neutralizar os grupos amina da quitosana está delimitado pelo volume inicial e final na curva de condutividade (V_0 e V_1) calculados por regressão linear.	84

Figura 37 – Primeira derivada da curva de potenciometria da quitosana desacetilada (QD) a partir da qual foi calculado o pKa da quitosana, que é o ponto médio entre os pontos de inflexão da curva de pH, indicado pela linha pontilhada central.	85
Figura 38 – Curvas de transmitância da quitosana (em preto) e quitosana desacetilada (QD - em vermelho).em solução aquosa ácida, neutra e alcalina. As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL em água ultra pura e ajustes de pH foram realizados utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas para a síntese dos copolímeros de enxerto mPEG – g – QC 0,85:1, mPEG – g – QC 1,65:1 e mPEG – g – QC 2,5:1. QC (g): quantidade de QC adicionada ao meio de reação (em g); NH₂ (mmol): conteúdo de NH₂ em QC (em mmol); mPEG – COOH (g): quantidade de mPEG – COOH adicionada ao meio de reação (em g); COOH (mmol): conteúdo de COOH em mPEG – QC (em de mmol); mPEG: QC (m/m): taxa de massa entre mPEG e QC ; EDC mmol (mg): quantidade de EDC adicionado ao meio de reação em mmol e em mg.	36
Tabela 2 – Valores de massa molecular ponderal média (M_w) determinada por espalhamento de luz estático e dn/dc para a quitosana e da quitosana cationizada (QC). As medidas foram realizadas a partir de dispersões poliméricas preparadas em tampão acetato pH 4,5 em concentrações de 0,25-1,25 mg/mL.	54
Tabela 3 – Comparação entre o grau de substituição em função da taxa de massa entre mPEG e QC , entre o presente trabalho e o trabalho de Zhang et al. (2014).	72
Tabela 4 – Valores de massa molecular ponderal média (M_w) determinada por espalhamento de luz estático e dn/dc para os copolímeros de enxerto mPEG-g-QC 0,85:1, mPEG-g-QC 1,65:1 e mPEG-g-QC 2,5:1. As medidas foram realizadas a partir de dispersões poliméricas preparadas em tampão acetato pH 4,5 em um intervalo de concentração de 0,25-1,25 mg/mL.	78

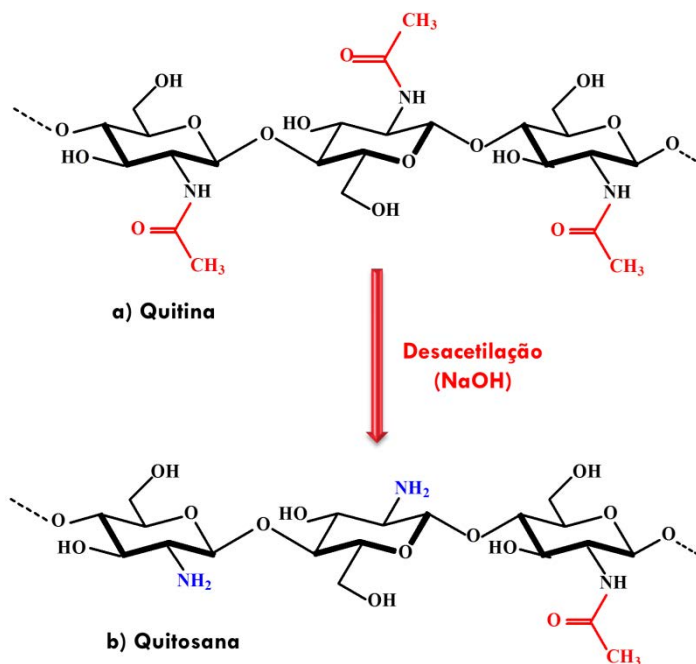
1 Introdução

1.1 Quitosana

1.1.1 Estrutura e propriedades

A quitosana é um polissacarídeo catiônico obtido pela desacetilação parcial da quitina (Figura 1) muito encontrado na natureza, principalmente no exoesqueleto de crustáceos. Ambas, quitina e quitosana são copolímeros formados por taxas variáveis de unidades de *D*-glicosamina, que contém um grupo amina, e de *N*-acetil-*D*-glicosamina, a unidade acetilada, ligadas entre si randomicamente por ligações glicosídicas do tipo β (1-4). Entretanto, na quitina há predominantemente unidades acetiladas e na quitosana unidades desacetiladas. O polímero deve ser considerado quitosana quando no mínimo 50 a 60% dos seus resíduos são desacetilados (WANG et al., 1991; AIBA, 1992).

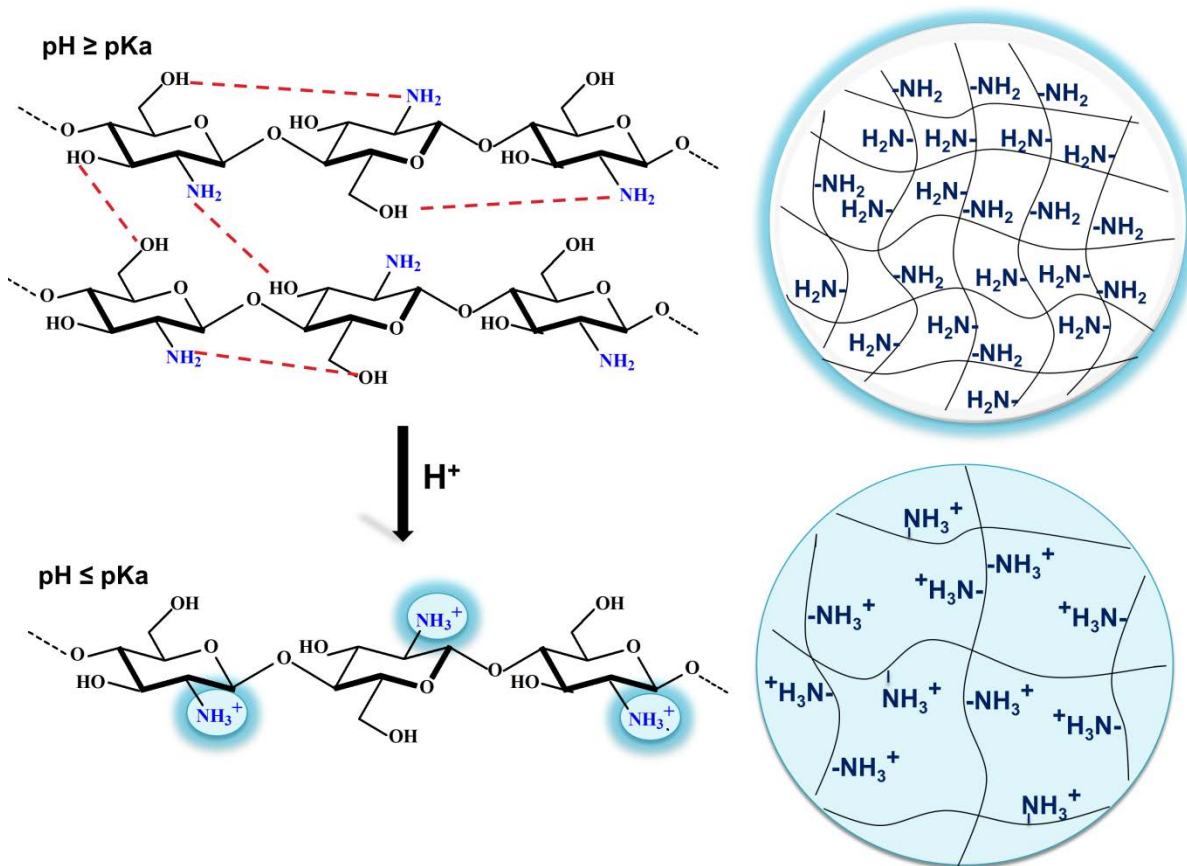
Figura 1 – Reação de desacetilação da quitina para a obtenção de quitosana por hidrólise alcalina, comumente realizada com solução aquosa de NaOH 40% (m/m) a uma temperatura de 60 a 100 °C por 4 h sob atmosfera de N₂. Os grupos acetilas da quitina (em vermelho) são hidrolisados gerando uma amina primária (em azul): (a) quitina; (b) quitosana.



Fonte: autor

Por ser uma base fraca, a quitosana é insolúvel em soluções aquosas ácidas e neutras mas prontamente solúvel em meio de pH abaixo do seu pKa, que varia de 5.5 a 6.5 (YUAN et al., 2011) pois nestas condições os grupos NH_2 tornam-se protonados (NH_3^+) e a repulsão eletrostática estabelecida entre as cargas positivas enfraquecem as fortes interações de hidrogênio intra e intermoleculares entre os grupos amina e hidroxilas. (Figura 2).

Figura 2- Em meio aquoso neutro e alcalino, meios nos quais o pH é maior do que o pKa da quitosana, os grupos amina e hidroxila da molécula de quitosana interagem entre si por interações de hidrogênio intra e intermolecular de forma que as interações polímero-polímero são mais fortes do que as interações polímero-solvente, o que a torna insolúvel nestas condições. Em meio ácido, os grupos amina tornam-se protonados e a repulsão eletrostática entre as moléculas enfraquecem as interações de hidrogênio e as interações polímero-solvente são prevalecidas, tornando-as solúveis.



Fonte: autor

A quitosana é um polímero semi-cristalino (YUAN et al., 2011), biodegradável, biocompatível, não-tóxico (RAO; SHARMA, 1997; RICHARDSON; KOLBE; DUNCAN, 1999; KIM et al., 2001; KEAN; THANOU, 2010), e apresenta uma estrutura bastante reativa quimicamente, atribuída principalmente às aminas primárias. Características estas, que somadas à sua habilidade de formar complexos iônicos com moléculas negativamente carregadas, tem recebido considerável notoriedade como biopolímero (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009) para aplicação como carreador de fármacos (BOONSONGRIT; MITREVEJ; MUELLER, 2006; MOUSTAFINE et al., 2008; TAVARES et al., 2012), carreador de genes (BOWMAN et al., 2008; BALLARÍN-GONZÁLEZ; EBBESEN; HOWARD, 2013), em engenharia de tecidos (POON et al., 2010), em curativos cicatrizantes (LEFLER; GHANEM, 2009), dentre outros.

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem, principalmente, do grau de desacetilação (GD) e da massa molecular (M_w) (WANG et al., 1991; REGE; BLOCK, 1999; ARANAZ et al., 2009). Quanto maior o GD, mais solúvel é a molécula de quitosana, uma vez que a sua solubilidade está diretamente relacionada aos grupos amina (MIMA et al., 1983). Já em relação a M_w a relação é inversa, já que quanto maior é a M_w , menos solúveis são as moléculas poliméricas. Isso se deve à organização das cadeias, pois, quanto maior a M_w , mais cristalina é a estrutura e, portanto, mais difícil é o acesso do solvente à superfície das moléculas (WU et al., 2007). Os oligossacarídeos da quitosana, que apresentam baixa massa molecular, são prontamente solúveis em água (KUMAR, 2000; RÚNARSSON et al., 2007).

A estrutura catiônica da quitosana e seus derivados também é responsável pelas suas propriedades antimicrobiana (SEONG; WHANG; KO, 2000; TAN et al., 2013), mucoadesiva (LEHR et al., 1992; PAN et al., 2002), antioxidante (PARK; JE; KIM, 2004) e facilitadora de transporte paracelular, especialmente de moléculas hidrofílicas grandes, tais como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos, pois a quitosana tem a habilidade de promover uma abertura transitória das junções apertadas ("tight junctions") encontradas entre células epiteliais (THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001; PAN et al., 2002; PORTERO; REMUNAN-LOPEZ; NIELSEN, 2002; DÜNNHAUPT et al., 2012). Considerando a sua aplicação como biomaterial, algumas destas características mais notáveis da quitosana serão abordadas mais detalhadamente a seguir.

1.1.2 Efeito da quitosana no aumento do transporte paracelular

A combinação das propriedades de facilitação de transporte paracelular e mucoadesão da quitosana e seus derivados exercem um importante papel no aumento da absorção de macromoléculas através de células epiteliais. A camada de muco e as junções intercelulares do epitélio estão entre as barreiras biológicas mais difíceis de serem ultrapassadas pelas macromoléculas até alcançarem a circulação sistêmica (PAN et al., 2002; CASETTARI et al., 2010). As junções intercelulares no seu estado normal limitam a permeabilidade de moléculas maiores do que 1000 Da (STOLNIK; SHAKESHEFF, 2009; CASETTARI et al., 2010). A estrutura catiônica da quitosana tem a habilidade de promover uma abertura transitória das junções apertadas (“tight junctions”) encontradas entre células epiteliais e por isso permitem a absorção de moléculas hidrofílicas grandes, tais como proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (THANOU; VERHOEF; JUNGINGER, 2001; PAN et al., 2002; PORTERO; REMUNAN-LOPEZ; NIELSEN, 2002; DÜNNHAUPT et al., 2012). A mucoadesão se deve à atração eletrostática entre a quitosana e componentes do muco, que permite a retenção prolongada da partícula polimérica e, dessa forma, aumenta as chances das moléculas carregadas serem liberadas e absorvidas no local.

Sistemas poliméricos de liberação de moléculas biológicas, tais como, peptídios, proteínas e ácidos nucleicos vem sendo desenvolvidos com os recentes avanços no campo de tecnologia farmacêutica. Novos materiais e novas vias de administração têm sido estudados para esta aplicação porque a absorção dessas moléculas biológicas tem se mostrado ineficiente quando a administração é efetuada via oral. Por isso, a quitosana e seus derivados têm sido estudados para o desenvolvimento de sistemas de liberação de moléculas biológicas grandes via epitélio nasal e intestinal devido ao efeito de facilitação do transporte paracelular promovido pela quitosana (CASETTARI et al., 2010).

1.1.3 Biodegradabilidade da quitosana

A influência da M_w e do GD sobre a biodegradabilidade da quitosana também foi reportada. ZHANG; NEAU (2002) avaliaram a susceptibilidade de diferentes

moléculas de quitosana à degradação enzimática por bactérias intestinais de rato, do cólon e ceco, e mostraram que quanto mais baixo é o GD da quitosana, maior era a taxa de degradação das moléculas. Isto ocorre porque as enzimas de degradação ligam-se à cadeia da quitosana através dos grupos acetila, portanto, moléculas de quitosana com baixo GD facilitam o processo de biodegradação. E como as enzimas requerem ligações a um certo número de diferentes unidades glicosídicas para que ocorra a reação, moléculas de baixa M_w facilitam a biodegradação porque seus grupos acetila são mais acessíveis às enzimas do que moléculas de alta M_w (ZHAN; NEAU, 2002). Alguns trabalhos reportaram a utilização de quitosana com alto GD ou até 100% desacetiladas (MIMA et al., 1983) com o objetivo de aumentar o número de grupos amina e torná-las mais reativas. Entretanto, se a aplicação é biomédica, moléculas de quitosana com baixa densidade de grupos acetila ou totalmente desacetiladas não são desejáveis, pois os grupos acetilas são fundamentais para o processo de biodegradação e subsequente eliminação da quitosana a partir do organismo.

1.1.4 Atividade antimicrobiana da quitosana

A atividade antibacteriana e antifúngica da quitosana e seus derivados vêm sendo estudada e discutida no intuito de utilizá-los como biomaterial antimicrobiano (CUERO; OSUJI; WASHINGTON, 1991; LIU et al., 2013). Embora o exato mecanismo ainda seja desconhecido, sabe-se que as cargas positivas são indispensáveis e que a estrutura policatiónica da quitosana e seus derivados estabelecem interações eletrostáticas com os componentes aniônicos da superfície de fungos e bactérias, tais como lipopolissacarídeos e polissacarídeos capsulares (MUZZARELLI et al., 1990; SAJOMSANG et al., 2012). A quitosana pode formar um filme ao redor do microorganismo, de modo que a permeabilidade da membrana celular é alterada (TAO; QIAN; XIE, 2011) e o fluxo de nutrientes para o interior da célula pode ser comprometido, causando distúrbios na célula (MUZZARELLI et al., 1990; TAN et al., 2013). Um segundo possível mecanismo de ação antimicrobiano é que moléculas de quitosana de baixa M_w podem atravessar a membrana celular do microorganismo e interagir com o DNA (Jarmila e Vavříková, 2011) e outros componentes intracelulares, como íons metálicos (CUERO; OSUJI; WASHINGTON,

1991), levando à inibição da síntese de RNA e proteínas e, conseqüentemente, interferindo no crescimento da célula.

A atividade antimicrobiana apresenta uma relação positiva com a M_w da quitosana. Oligossacarídeos da quitosana de baixa massa molecular ($M_w = 775$ Da), com diferentes GD (48 % e 82 %), não apresentaram nenhuma atividade contra *S. Aureus* (RÚNARSSON et al., 2007). No et al. (2002) estudaram o efeito inibitório de quitosana e de oligossacarídeos de quitosana de diferentes M_w sobre o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas e os resultados mostraram que as moléculas de quitosana apresentaram um efeito inibitório significativamente mais alto do que os oligossacarídeos na maioria das bactérias testadas, embora a atividade tenha sido um pouco diferente entre as moléculas de quitosana de diferentes M_w e entre alguns microorganismos específicos. Já quando o GD é considerado, não foram encontradas correlações claras com a atividade antimicrobiana porque os resultados mostraram ser dependentes não só da estrutura química da quitosana como também do tipo de microorganismo usado (ARANAZ et al., 2009).

2 Modificações químicas na molécula de quitosana

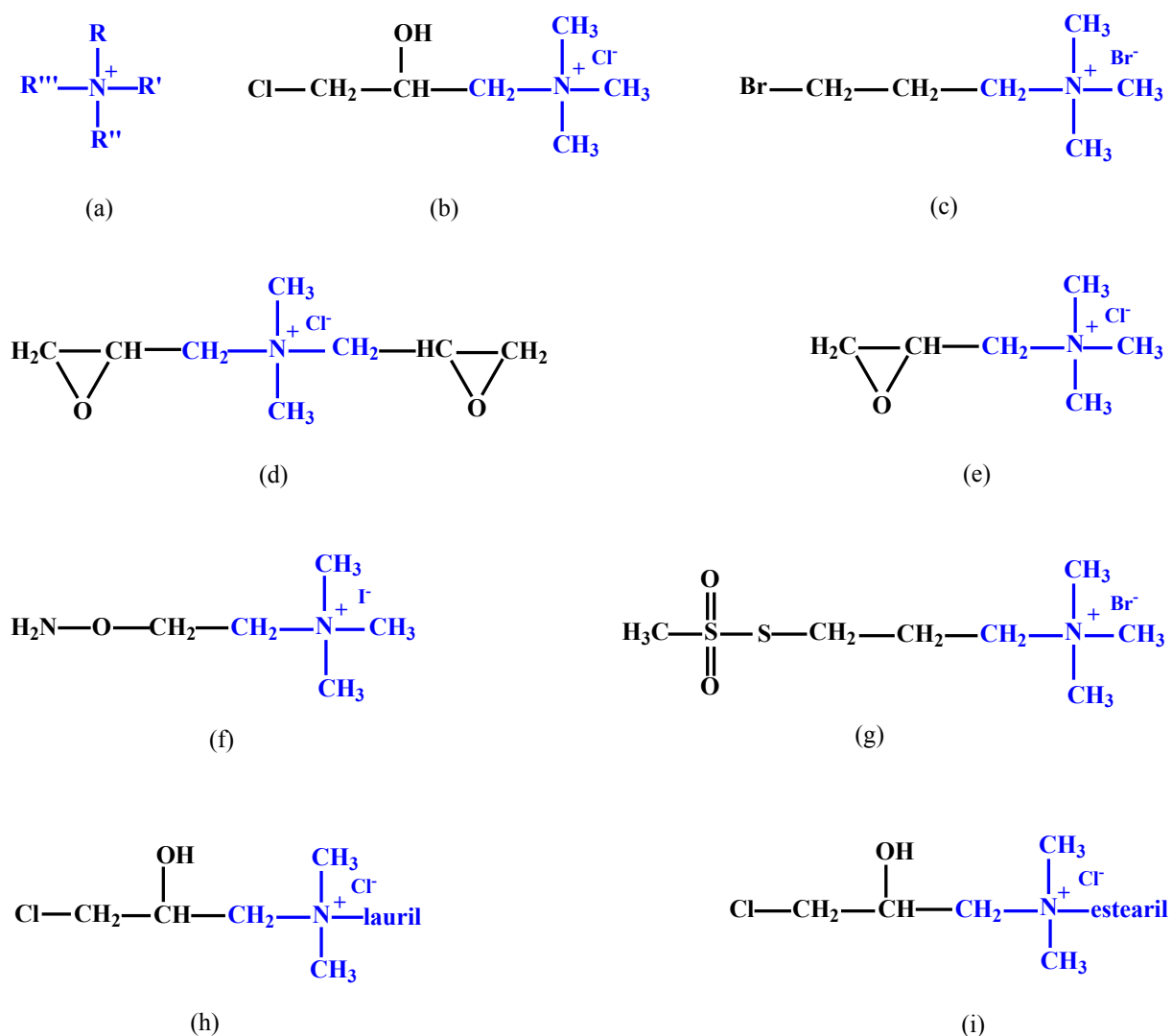
Apesar de todas as propriedades e vantagens apresentadas, a aplicação da quitosana é muitas vezes limitada pela sua baixa solubilidade em água, em pH neutro e alcalino. Portanto, modificações estruturais na molécula de quitosana no intuito de melhorar as suas propriedades, tais como, a solubilidade, a densidade de cargas e a biocompatibilidade, são de grande interesse devido às suas inúmeras aplicações em biotecnologia. Considerando a grande densidade de grupos reativos na quitosana, modificações químicas podem ser realizadas em OH (C_3 e C_6) e em NH_2 (C_2), permitindo a otimização de biomateriais derivados de quitosana. Dentre as modificações mais comumente realizadas na quitosana pode-se encontrar a quaternização (MUZZARELLI; TANFANI, 1985; BRITTO; ASSIS, 2007), a cationização (QIN et al., 2004; SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004; WU; SU; MA, 2006), a carboximetilação (ZHU; ZHANG; ZHANG, 2004; ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009), a sulfonação (CHANG; HUANG, 2012), a introdução de moléculas hidrofóbicas, tais como o palmitoil (Jiang et al., 2006) e a introdução de moléculas hidrofílicas, tais como o polietilenoglicol (PEG) (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA,

2004; JEONG et al., 2008; MALHOTRA et al., 2011). O objetivo do presente trabalho é a obtenção de derivados mais solúveis em meio aquoso, visto que a baixa solubilidade é o fator limitante para a utilização e aplicação da quitosana. A cationização, a quaternização e a introdução de PEG (JEONG et al., 2008) são as modificações mais utilizadas para aumentar a solubilidade da quitosana em condições semelhantes ao meio biológico (QIN et al., 2004; BRITTO; ASSIS, 2007; RÚNARSSON et al., 2007; WU et al., 2007; PENG et al., 2010; BRITTO et al., 2011).

2.1 Cationização da quitosana

Cationização de polímeros é a modificação da molécula polimérica com compostos catiônicos, dentre os quais, àqueles que apresentam um grupo funcional amônio quaternário ligado a um grupo alquila (Figura 3) tem sido bastante utilizados para a cationização de polissacarídeos (BISWAS et al., 2010; PRADO; MATULEWICZ, 2014). A introdução de compostos desta classe de moléculas dá origem a sais de amônio quaternário. Os grupos amônio quaternário (Figura 3a) são íons poliatômicos carregados positivamente, sendo que os radicais R são grupos alquila, que podem ser iguais ou distintos. Diferentemente do grupo amônio, amônio primário, amônio secundário e amônio terciário, o grupo amônio quaternário é permanentemente carregado positivamente. Polissacarídeos cationizados, tais como a quitosana (WU; SU; MA, 2006), a celulose (EL-SAKHAWY; MILICHOVSKY, 2000), a goma-guar e o amido (HAACK et al., 2002) têm sido amplamente aplicados tanto em áreas biotecnológicas, como tratamento de água, indústria de alimentos e indústria de cosméticos, como também em outras áreas, tais como fabricação de papel e indústrias de petróleo (PRADO; MATULEWICZ, 2014). Polissacarídeos cationizados podem ser preparados pela reação com vários reagentes cationizantes, tais como os apresentados na Figura 3, sendo que o mais comumente utilizado é o cloreto de 2,3-epoxipropil-N,N,N-trimetilamônio, também chamado de cloreto de glicidil trimetilamônio (CGTMA).

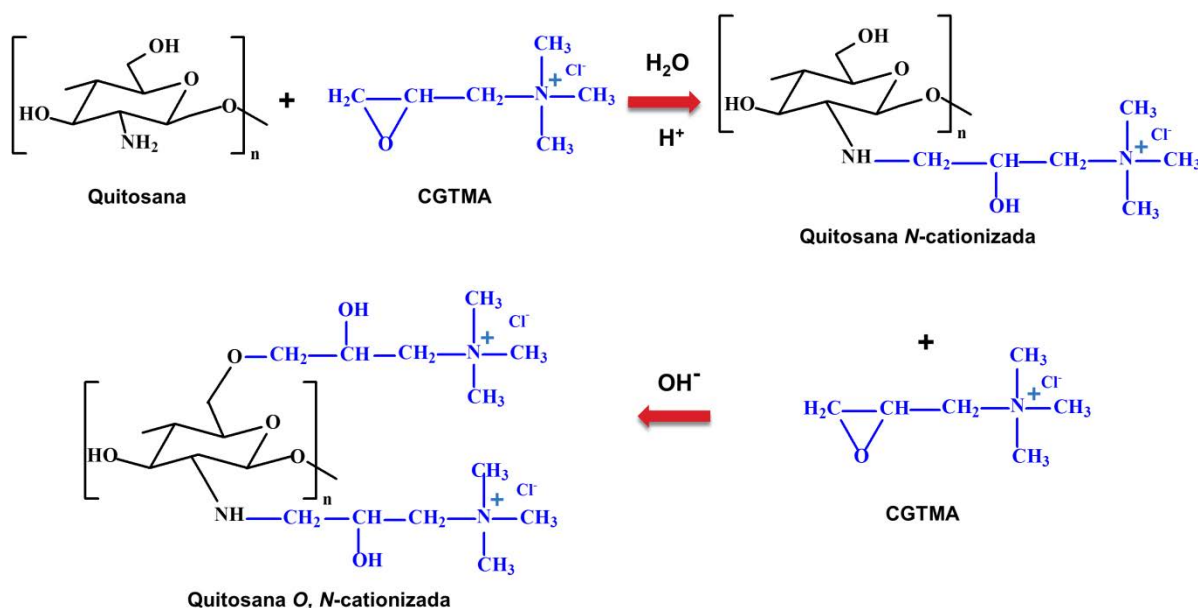
Figura 3 – Agentes cationizantes que apresentam um grupo funcional amônio quaternário. (a) grupo amônio quaternário, os grupos R correspondem a grupos alquila; (b) cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-N,N,N-trimetilamônio; (c) brometo de 3-bromo-N,N,N-trimetil-1-propanoamônio (d) cloreto de di-(2,3-epoxipropil)-N,N-dimetilamônio; (e) cloreto de 2,3-epoxipropil-N,N,N-trimetilamônio; (f) iodeto de N-(2-aminooxietil)-N-(2-hidroxiethyl)-N,N-dimetilamônio (g) brometo de [3-(trimetilamônio)-propil] metanotiosulfonato (h) cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-N,N-dimetil dodecil amônio; (i) cloreto de 3-cloro-2-hidroxipropil-N,N-dimetil estearil amônio.



Na molécula de quitosana, a reação de cationização pode ser realizada nos grupos amina (C_2), gerando derivados *N*-cationizados, e nas hidroxilas (em C_3 e C_6), gerando derivados *O*-cationizados, que são muito menos solúvel do que os *N*-cationizados (SIEVAL et al., 1998; CURTI; BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2003; JINTAPATTANAKIT et al., 2008). A cationização utilizando o CGTMA vem sendo bastante utilizada para aumentar a solubilidade da quitosana e foi a rota de escolha para este trabalho (Figura 4). A obtenção do derivado cationizado com CGTMA

ocorre por uma reação de substituição nucleofílica (S_N2) na qual os grupos amina e hidroxilas da quitosana podem atacar o epóxido do CGTMA e gerar uma amina secundária e/ou uma ligação éter, respectivamente (HERMANSON, 1996). Em meio aquoso neutro e ácido, o CGTMA reage preferencialmente com o grupo amina das unidades *D*-glicosamina da quitosana, que se comportam como nucleófilos suficientemente fortes para abrir o anel epóxido do CGTMA. Em contrapartida, a reação do epóxido com os grupos hidroxilas só ocorre em meio fortemente alcalino e o GQ obtido nessas condições é baixo devido ao fraco caráter nucleofílico das hidroxilas para atacar o anel epóxido (SEONG; WHANG; KO, 2000).

Figura 4 – Reações de cationização da quitosana utilizando o cloreto de glicidil trimetilamônio (CGTMA) em meio aquoso neutro, ácido e alcalino. Em meio neutro e ácido, o anel epoxi do CGTMA é preferencialmente atacado pelo grupo NH_2 da quitosana, gerando a quitosana *N*-cationizada. Após a obtenção de um derivado *N*-cationizado solúvel, suas hidroxilas tornam-se acessíveis para reagir com o CGTMA e formar derivados substituídos em NH_2 e em OH (quitosana *O,N*-cationizada).



Fonte: autor

Embora a cationização seja muitas vezes referida na literatura como quaternização, estes são processos distintos, ainda que o produto de ambas as reações sejam sais de amônio quaternário. Enquanto a cationização consiste da introdução de uma molécula que contenha um grupo amônio quaternário, a quaternização consiste na introdução de grupos alquil a um grupo amina, por

reações de substituição, formando um grupo amônio quaternário a partir desta amina primária. Tanto a cationização quanto a quaternização são mais comumente realizadas nos grupos amina da quitosana, no entanto, dependendo da rota e das condições de síntese, as hidroxilas também podem ser alquiladas ou cationizadas (em C₃ e C₆), gerando derivados O-quaternizados e O-cationizados, que são muito menos solúvel do que o respectivos derivados modificados em N (SIEVAL et al., 1998; CURTI; BRITTO; CAMPANA-FILHO, 2003; JINTAPATTANAKIT et al., 2008). Os agentes metilantes mais comumente utilizados para a quaternização da quitosana são o iodeto de metila (MUZZARELLI; TANFANI, 1985; DOMARD; RINAUDO; TERRASSIN, 1986; JIA; SHEN; XU, 2001; MOURYA; INAMDAR, 2009; BRITTO et al., 2011) e o dimetilsulfato (BRITTO; ASSIS, 2007). A desvantagem da quaternização quando comparada à cationização é que a metilação, na quaternização, é realizada em etapas para se obter o derivado trimetilado (*N,N,N*-trimetilquitosana), no entanto, derivados dimetilados (*N,N*-dimetilquitosana) e monometilados (*N*-monometilquitosana) também são gerados ao final do processo (RÚNARSSON et al., 2007; JINTAPATTANAKIT et al., 2008), a menos que muitas etapas de metilação sejam realizadas (Sieval et al., 1998). Além disso, efeitos indesejáveis como a degradação da cadeia da quitosana devido ao forte meio alcalino utilizado durante este tipo de reação (DOMARD; RINAUDO; TERRASSIN, 1986) e também a O-metilação ocorrem com frequência, gerando derivados menos solúveis (SIEVAL et al., 1998; RÚNARSSON et al., 2007; RÚNARSSON et al., 2008). Entretanto, essas rotas de síntese vêm sendo bastante modificadas e aprimoradas a fim de obter um melhor controle dos parâmetros da reação (BRITTO E ASSIS, 2007; JINTAPATTANAKIT et al., 2008; MOURYA; INAMDAR, 2009; DE BRITTO et al., 2011).

Dessa forma, a grande vantagem de utilizar a cationização para a obtenção de sais de amônio quaternário de quitosana é que se pode obter derivados cationizados seletivamente em NH₂ pelo ajuste do pH do meio de reação. Outra importante vantagem é a obtenção direta, em uma só etapa, do sal de amônio quaternário, evitando assim, derivados dimetilados ou monometilados como ocorre durante o processo de quaternização.

Os sais de amônio quaternário da quitosana tem despertado grande interesse e diversos estudos têm mostrado bons resultados em aplicações biotecnológicas, tais como carreador de genes (KEAN; ROTH; THANOU, 2005; BOWMAN et al.,

2008; GERMERSHAUS et al., 2008; KEAN; THANOU, 2010; TANG et al., 2014), liberação de fármacos (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; WU; SU; MA, 2006; SHI et al., 2011), liberação de proteínas (MAO. et al., 2005b) e em tratamento de água como adsorventes de metais tóxicos (SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004). Quando comparados à quitosana não-modificada, os sais de amônio quaternário, além de tornarem a quitosana solúvel em água (PENG et al., 2010) e reduzirem a tendência à agregação (GERMERSHAUS et al., 2008), mostram ainda uma atividade antimicrobiana mais intensa (JIA; SHEN; XU, 2001; RÚNARSSON et al., 2007; XU et al., 2010; BRITTO et al., 2011; WIARACHAI et al., 2012; TAN et al., 2013) e um aumento do transporte paracelular de macromoléculas hidrofílicas grandes através de células epiteliais (KOTZÉ et al., 1999; THANOU et al., 2000; GERMERSHAUS et al., 2008). A complexação de DNA à quitosana cationizada aumentou em 8,5 vezes a absorção de moléculas de DNA por uma linhagem de fibroblastos, resultando em um aumento de 678 vezes na eficiência de transfecção quando comparados à complexos com quitosana (GERMERSHAUS et al., 2008). Visto que todas essas propriedades da quitosana estão relacionadas à superfície catiônica da molécula, a cationização/quaternização são fundamentais para a existência destas propriedades em meio aquoso neutro e alcalino, nos quais a quitosana não-modificada não apresenta cargas e encontra-se insolúvel.

Rúnarsson et al. (2007) mostraram que a quaternização com iodeto de metila foi imprescindível para conferir atividade antibacteriana à quitosana em meio neutro (pH=7,2), meio no qual a quitosana não-modificada é geralmente insolúvel. Embora a quaternização seja fundamental para a atividade microbiana em meio aquoso neutro e alcalino, o efeito do pH é imprevisível. Diversos trabalhos reportam que, tanto a quitosana quanto seus sais de amônio quaternário são mais ativos contra bactérias em meio ácido do que em meio neutro, porque além das cargas permanentes dos grupos amônio quaternários há ainda a contribuição das cargas geradas pelos grupos amina, que se tornam protonados (NH_3^+) em meio ácido (JIA; SHEN; XU, 2001; RÚNARSSON et al., 2007; XU et al., 2010). Por outro lado, Qin et al. mostraram que a atividade antimicrobiana da quitosana *N*-cationizada com CGTMA foi muito mais intensa sob condições alcalinas do que em meio levemente ácido, o que pode ser atribuído ao alto GC do derivado quaternário, de 85%. Alguns autores afirmam que o grupo amina da quitosana tem um maior potencial eletrostático quando comparados aos grupos amônio quaternário, visto que a carga

deste grupo encontra-se blindada pelas metilas circundantes e por isso podem ser menos efetivos que os grupos amina para interagir com a superfície das bactérias. Mas ainda existem divergências a respeito da atividade dos sais de amônio quaternário da quitosana contra microorganismos, que são causadas provavelmente por fatores inerentes à própria quitosana, como massa molecular, grau de desacetilação, viscosidade, concentração, como também por fatores relacionados às condições ambientais utilizadas nos testes de atividade antimicrobiana, como o meio de cultura, pH, temperatura, força iônica, dentre outros (TAN et al., 2013).

O grau de cationização e o grau de quaternização é um dos fatores que mais influenciam nas propriedades dos sais de amônio quaternário da quitosana. De forma geral, quanto maior é este grau de modificação, maior é solubilidade em água mais intensa é a atividade antimicrobiana (PENG et al., 2010; SAJOMSANG et al., 2012), maior é o efeito mucoadesivo (CARDILE et al., 2008) e maior é a habilidade de aumentar o transporte celular de moléculas por esses derivados (THANOU et al., 2000; GERMERSHAUS et al., 2008), porém, a citotoxicidade também pode ser aumentada (PENG et al., 2010). Apesar de ser considerado como um polímero biocompatível e não tóxico há ainda controvérsias de que a quitosana e seus derivados possam apresentar alguma citotoxicidade (KEAN; THANOU, 2010). Uma vez que a citotoxicidade da quitosana parece estar diretamente relacionada ao contato das cargas positivas da molécula de quitosana e seus derivados com componentes aniônicos da superfície das células, o efeito tóxico depende diretamente da densidade destas cargas. Alguns trabalhos mostram que os sais de amônio quaternário da quitosana com alto grau de modificação podem ser mais citotóxicos do que a própria quitosana em meio biológico (meio aquoso de pH neutro) por possuírem uma maior densidade de cargas nestas condições (KEAN; ROTH; THANOU, 2005; MAO et al., 2005a; KEAN; THANOU, 2010). Verificou-se ainda que existe um limiar abaixo do qual existem muitos poucos pontos de contato entre a molécula de quitosana e componentes da superfície das células para que exista um efeito significativamente tóxico. E, como estes pontos de contato consistem em cargas positivas, na molécula de quitosana, seu número depende do grau de desacetilação e do grau de quaternização/cationização (KEAN; THANOU, 2010)

Peng e colaboradores estudaram a biocompatibilidade e os efeitos antibacterianos de derivados cationizados via CGTMA, com GC de 6%, 18% e 44%.

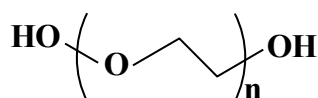
Os resultados mostraram que a atividade antibacteriana dos derivados com GC de 18% e 44% foi significativamente maior que o derivado de menor GC (6%) para todas as bactérias testadas, mas que o derivado com GC de 44 % mostrou-se citotóxico. Eles concluíram que o derivado com GC de 18% foi capaz de inibir o crescimento de todas as bactérias e ao mesmo tempo apresentou boa biocompatibilidade com células osteogênicas e o consideraram como um derivado com potencial farmacêutico (PENG et al., 2010). Independente da propriedade que se deseja obter com os sais de amônio quaternário, os estudos devem ser direcionados para a obtenção de um derivado com um grau de modificação que seja capaz de fornecer as propriedades requeridas sem comprometer significativamente a biocompatibilidade.

Apesar do número de trabalhos publicados a respeito da quitosana e seus derivados cationizados e quaternizados em aplicações biomédicas (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; KEAN; ROTH; THANOU, 2005; MAO et al., 2005b; WU; SU; MA, 2006; BOWMAN et al., 2008; RIVA et al., 2011; TANG et al., 2014) estes polímeros não são ainda liberados pelo FDA para uso farmacêutico (KEAN; THANOU, 2010). Porém, a introdução de moléculas hidrofílicas biocompatíveis à cadeia dos sais de amônio quaternário da quitosana, tais como o PEG, pode reduzir significativamente esta citotoxicidade e adicionalmente, também torná-la mais solúvel (MAO et al., 2005a; KEAN; THANOU, 2010).

2.2 Introdução de PEG na molécula de quitosana

O polietilenoglicol (PEG), ou óxido de polietileno (PEO) é um polímero não-iônico, de cadeia flexível, altamente hidrofílico, formado a partir da polimerização de unidades de etilenoglicol. A estrutura química do polietilenoglicol é composta por unidades repetitivas de oxietileno ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2$) e nas extremidades dois grupos hidroxilas (Figura 5).

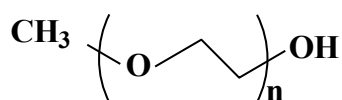
Figura 5 – Estrutura química do polietilenoglicol (PEG).



Fonte: autor.

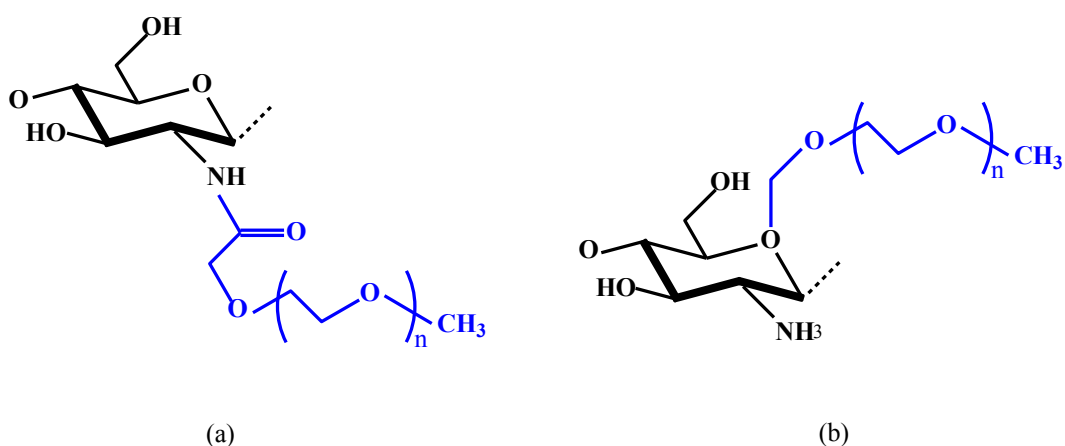
A partir da estrutura química básica do PEG, é possível obter uma ampla variedade de estruturas, com diversificados grupos funcionais e massas moleculares. No presente trabalho foi utilizado o polietilenoglicol monometil éter (mPEG), que em uma das extremidades apresenta uma hidroxila e na outra um grupo metoxil (Figura 6). O mPEG foi o derivado de escolha no presente trabalho para a preparação de copolímeros de enxerto de mPEG em quitosana para evitar a reticulação das cadeias de quitosana, visto que uma de suas extremidades apresenta um grupo metoxila. Moléculas de PEG apresentam grupos hidroxila nas duas extremidades, o que significa que uma extremidade pode se ligar a uma molécula de quitosana e a outra a uma segunda molécula de quitosana, formando um retículo.

Figura 6 – Estrutura química do polietilenoglicol monometil éter (mPEG).



Fonte: autor.

Figura 7 – Introdução de mPEG pelos grupos amina da quitosana via ligação amida (a) e pelos grupos OH via eterificação (b).

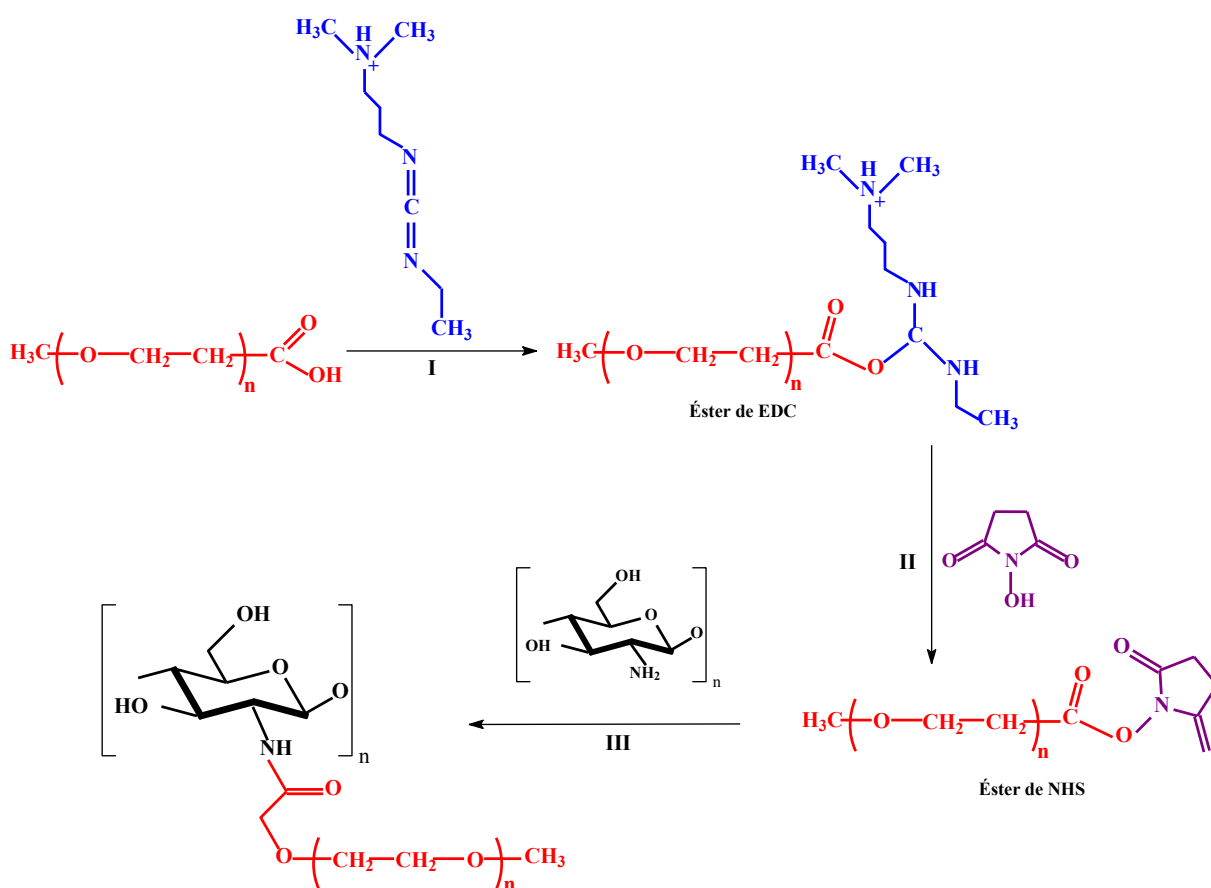


Fonte:autor

As moléculas de PEG podem ser covalentemente introduzidas à estrutura da quitosana pelos grupos NH_2 (em C_2), através da formação de uma amida gerando

derivados *N*-substituídos (Figura 7a) (JEONG et al., 2008; YANG et al., 2008; GRUŠKIENE; ČIUTA; MAKUŠKA, 2009; ZHANG et al., 2014) ou nos grupos OH (em C₃ ou C₆), através de uma reação de eterificação entre a quitosana e o PEG gerando derivados *O*-substituídos (Figura 7b) (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004; GRUŠKIENE; ČIUTA; MAKUŠKA, 2009; MALHOTRA et al., 2011).

Figura 8 – Sequência de reações da conjugação de mPEG-COOH e quitosana via grupos amina utilizando a conjugação EDC/NHS, em meio aquoso, à uma temperatura de 25 °C durante aproximadamente 24h: (I) ativação de mPEG com EDC e a formação de um éster ativo instável; (II) formação do éster ativo estável de mPEG e NHS; (III) conjugação de mPEG-COOH ao grupo amina da quitosana formando uma ligação amida estável originando o copolímero mPEG-*g*-Quitosana para qualquer molécula de quitosana e derivado da quitosana que possuam grupos amina.

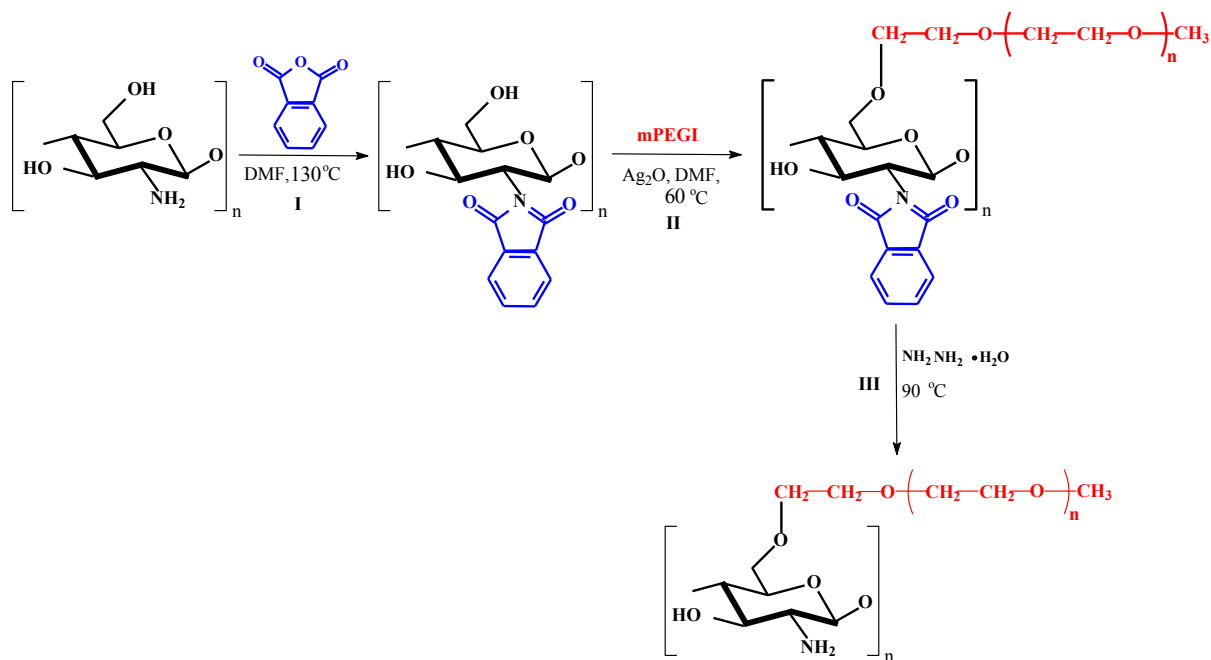


Fonte: autor

Em se tratando de substituição em NH_2 , os agentes “crosslinking” mais utilizado para intermediar a formação de ligações amidas entre grupos carboxila e amina são os compostos carbodiimida, dentre os quais, o mais comumente usado para reações em meio aquoso é o EDC (HERMANSON, 1996). Está é uma reação genérica, que pode ser aplicada para qualquer molécula de quitosana que possua

grupos amina (Figura 8). A primeira etapa (Figura 8-I) foi a ativação do mPEG por EDC. O EDC reage com o grupo carboxila de mPEG para formar um intermediário altamente reativo e instável, o O-acilisouréia, que é facilmente deslocado pelo ataque nucleofílico de uma amina primária para formar uma ligação amida estável com o grupo carboxila. Embora seja possível realizar o “crosslinking” somente na presença de EDC, o NHS é utilizado para melhorar a eficiência e o rendimento da reação porque gera um éster muito mais reativo e mais estável do que o éster formado pelo EDC (O-acilisouréia), que é rapidamente hidrolisado em meio aquoso. A formação do éster ativo de NHS pode estender a meia-vida do intermediário ativo por horas (HERMANSON, 1996). Portanto, o segundo passo (Figura 8-II) foi a reação da hidroxila do NHS com o éster ativo de EDC para formar o éster ativo de NHS. E por fim, o éster de NHS sofre um ataque nucleofílico da amina primária da quitosana, formando uma ligação amida estável, que origina o copolímero de enxerto mPEG – *g* – QC (Figura 8-III). Esta é uma reação simples, realizada em uma só etapa, em meio aquoso, com uma duração total de aproximadamente 24h, à uma temperatura de 25 °C. Este tipo de copolímero, no qual as cadeias de mPEG se organizam ao redor da cadeia central de quitosana como ramificações perpendiculares, são também chamados de copolímeros em escova (do inglês “brush copolymers”), fazendo uma analogia a base da escova como sendo a cadeia de quitosana e as cerdas da escova as longas moléculas de mPEG.

Figura 9 – Sequência de reações da conjugação de mPEG-COOH e quitosana via grupos OH. EDC/NHS: (I) reação de proteção do grupo amina da quitosana com o anidrido ftálico, em DMF à uma temperatura de 130 °C durante 5-7h; (II) reação de eterificação entre o mPEGI e a quitosana na presença de Ag₂O à uma temperatura de 60 °C durante 16h ; (III) remoção do anidrido ftálico do grupo amina da quitosana utilizando monohidrato de hidrazina, à 90 °C por 15h.



Fonte:autor

Como os grupos amina da molécula de quitosana são nucleófilos mais fortes do que os grupos hidroxila, quando se deseja obter derivados O-substituídos, os grupos amina são protegidos pela introdução de um grupo ftaloil do anidrido ftálico, em dimetilformamida (DMF) (NISHIMURA et al., 1991) (Figura 9-I). O mPEG é previamente ativado com iodeto de metila (mPEGI), na presença de trifetilfosfato em alta temperatura. Uma vez ativado, o mPEGI é introduzido à molécula de ftaloil quitosana, nos grupos OH, na presença de Ag₂O, por uma reação de eterificação, que é uma reação de substituição nucleofílica (S_N2) (Figura 9-II). Após o enxerto de mPEG, o anidrido ftálico é removido pelo monohidrato de hidrazina (Figura 9-III), a 90 °C por 15h, gerando o copolímero de quitosana e mPEG (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004). A vantagem deste método de introdução de mPEG em quitosana é a manutenção dos grupos amina livres e disponíveis para outras reações. Em contrapartida, as desvantagens são o tempo de duração, o número de etapas

(dentre as quais é necessário purificar os produtos), a utilização de altas temperaturas e o uso de reagentes tóxicos, como o Ag_2O .

A modificação com PEG, também conhecida como “peguilação” ou enxerto de PEG, tem sido frequentemente aplicada para diminuir a citotoxicidade da quitosana e seus derivados, especialmente dos derivados quaternários, e também para melhorar a solubilidade em água e em solventes orgânicos (MAO et al., 2005a; TESSMAR; GÖPFERICH, 2007; GERMERSHAUS et al., 2008; JEONG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010; ZHANG et al., 2014). Após o enxerto de PEG, a citotoxicidade da quitosana quaternizada para ambas as linhagens celulares testadas por Zhang et al. (2014) foi reduzida e quanto maior era o grau de substituição de PEG, menor era a citotoxicidade do copolímero. Visto que a citotoxicidade de polímeros carregados positivamente é baseada nas suas interações eletrostáticas com componentes da membrana celular carregados negativamente, a presença de longas cadeias de PEG representa uma barreira estérica entre o polímero catiônico e as células, diminuindo a interação eletrostática entre eles.

Ao mesmo tempo em que o PEG reduz a citotoxicidade da quitosana e seus derivados, algumas propriedades pré-existentes, como a mucoadesão, é mantida e o efeito de abrir as junções apertadas e aumentar o transporte paracelular de moléculas pode ser aumentado quando comparado à quitosana não-modificada por PEG (CASETTARI et al., 2010). Adicionalmente, as moléculas de PEG tem ainda a habilidade de reduzir o reconhecimento de partículas poliméricas pelas células do sistema imune. As moléculas de PEG são capazes de evitar a adesão de proteínas responsáveis pela sinalização da fagocitose, de modo que as partículas modificadas com PEG tornam-se “invisíveis” às células fagocíticas do sistema monócito fagocitário (DAL POZZO et al., 2000; QU et al., 2009). As cadeias altamente hidrofílicas e não-carregadas de PEG podem formar uma estrutura ao redor de partículas como se fosse uma “cabeleira espiral” altamente hidratada que tem a habilidade de repelir proteínas com eficácia. Quando as proteínas se aproximam da molécula de PEG a repulsão estérica é maior do que as atrações de van der Waals entre as espécies. A baixa hidrofobicidade das cadeias de PEG somada à sua densa camada de solvatação, não permitem interações hidrofóbicas com as proteínas (JEON et al., 1991).

Visto que o PEG confere uma redução da citotoxicidade à molécula de quitosana, sua aplicação é bastante adequada para a área biomédica, que requer materiais biocompatíveis. Copolímeros de enxerto de PEG em quitosana cationizada são comprovadamente mais biocompatíveis e têm sido frequentemente investigados para a aplicação como carreadores para a liberação de fármacos (LIANG et al., 2012), de genes (GERMERSHAUS et al., 2008; ZHANG et al., 2014) e de proteínas (MAO. et al., 2005b). Particularmente para a área de liberação controlada de moléculas grandes como proteínas, peptídios e ácidos nucleicos, a introdução de PEG pode favorecer não só o processo de encapsulação, como também a absorção celular e a biodisponibilidade (GERMERSHAUS et al., 2008; CASETTARI et al., 2010) visto que o PEG pode evitar a destruição da partícula carreadora pelas células do sistema retículo endotelial, prolongando assim, o tempo de circulação da partícula polimérica na corrente sanguínea (QU et al., 2009).

3 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho é a obtenção de copolímeros de quitosana mais solúveis e com maior potencial catiônico em meio neutro e alcalino quando comparados à quitosana, para a aplicação futura em sistemas de liberação de fármaco.

Objetivos específicos:

- Obtenção, caracterização e determinação do grau de cationização da quitosana cationizada (QC) com CGTMA;
- Conversão de mPEG a mPEG – COOH e determinação do conteúdo de grupos carboxila após a reação de oxidação;
- Obtenção, caracterização e determinação do grau de substituição de copolímeros de enxerto de mPEG – COOH e QC com diferentes taxas de massa.

4 Material e métodos

4.1 Material

Os seguintes reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich: quitosana de baixo peso molecular, grau de desacetilação de 75-85%, M_w 80-120 kDa; cloreto de glicidil trimetilamônio $\geq 90\%$ (CGTMA); mPEG (polietilenoglicol monometil éter) M_w 5000 Da; *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina 98 % (TEMPO); solução de hipoclorito de sódio 10–15 % de cloro (NaClO); brometo de sódio e 99% (NaBr); hidróxido de sódio (NaOH); ácido clorídrico (HCl); 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC); *N*-hidroxisuccinimida (NHS); MES (ácido 2-morfolino etano sulfônico monohidratado). Todos os solventes orgânicos utilizados (etanol, acetona e diclorometano) foram de alta pureza.

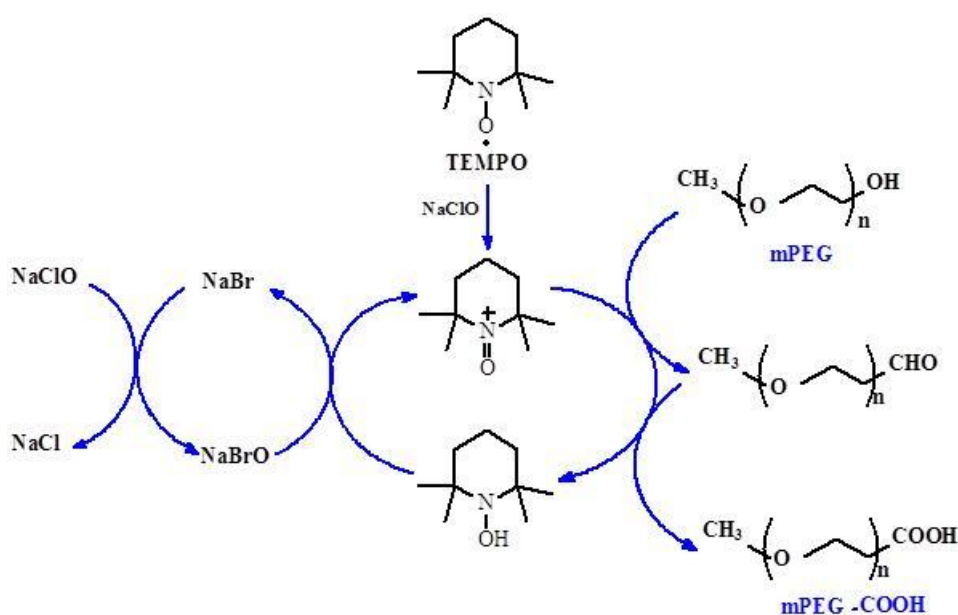
4.2 Cationização da quitosana

A quitosana foi cationizada com CGTMA, de acordo com o que tem sido feito e descrito na literatura (SEONG; WHANG; KO, 2000; SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004; WU; SU; MA, 2006) para a obtenção do sal de amônio quaternário de quitosana, o cloreto de *N*-(2-hidroxil)-propil-3-trimetilamônio quitosana, que será referido neste trabalho como quitosana cationizada (QC). Primeiramente a quitosana foi dispersa em água ultra-pura e em DMSO em uma taxa de 10 % em massa (m/m). Dessa forma, 5 g de quitosana de baixo peso molecular foram dispersos em 50 mL de água ultra pura ou DMSO e a solução de CGTMA foi adicionada em uma taxa molar de CGTMA para unidades D-glicosamina igual a 2:1 (m/m) para a QC_{H₂O} e 3:1 (m/m) para a QC_{DMSO}. A reação ocorreu sob agitação magnética a 60 °C durante 18 h. Com o intuito de remover o CGTMA que não reagiu, o produto da reação foi precipitado em acetona, filtrado, ressuspendido em água e esses passos foram repetidos três vezes. O precipitado resultante foi então dissolvido em água e dialisado por sete dias utilizando-se uma membrana com um *cutt off* de 12.000-14.000 Da. O produto final foi concentrado em um rota-evaporador à 40 °C e liofilizado. Foi obtido um material claro, com uma textura leve e porosa. O grau de cationização da QC (GC) foi determinado por titulação condutimétrica e através de espectros de ¹H RMN.

4.3 Ativação de mPEG

Com o objetivo de conjugar o mPEG à QC via ligação amida, os grupos OH terminais do mPEG comercial foram previamente oxidados à COOH pelo radical *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) na presença de NaBr e NaClO como catalisadores, de acordo com Isogai e Kato (1998) e modificado por Araki et al. (2005). Este método de oxidação foi escolhido por ser um procedimento simples, rápido, não requer instrumentos especiais, não utiliza solventes orgânicos, os agentes oxidantes são de baixo custo e apresenta um alto rendimento de reação. De acordo com o esquema apresentado na Figura 10, o NaClO inicia o ciclo de oxidação. O radical TEMPO é primeiramente oxidado pelo NaClO e então oxida o grupo hidroxila de mPEG à aldeído. Uma vez reduzido, o TEMPO é reoxidado pelo NaBrO, ficando disponível novamente para reagir. O NaBrO, por sua vez, é reduzido a NaBr, e o NaBr é oxidado novamente pelo NaClO, regenerando o NaBr, de forma que esse ciclo catalítico se repete indefinidamente até que a reação seja cessada por um agente externo. Desse modo, os grupos hidroxilas são convertidos à grupos carboxilas via um estágio aldeídico, que normalmente não é detectado porque é rapidamente oxidado à carboxila.

Figura 10 – Fluxograma da reação de oxidação do grupo hidroxila de mPEG via TEMPO/NaBr/NaClO, em meio aquoso, em pH 10-11.



Fonte: modificado de Isogai et al. (2011).

O radical TEMPO (100 mg, 6.4×10^{-4} mol), o NaBr (100 mg, 9.72×10^{-4} mol) e 10 g de mPEG foram completamente dissolvidos em 100 mL de água pura. O pH do meio foi ajustado para 10-11 e 5 mL de NaClO 10-15% foram adicionados. A reação de oxidação de mPEG foi agitada por 30 min a 25 °C e então o processo de oxidação foi parado adicionando-se 10 mL de etanol, que é convertido a ácido acético pelo hipoclorito de sódio remanescente. O meio é acidificado com HCl 1,0 M até atingir pH < 2 e 10 mL de etanol é adicionado. O mPEG – COOH foi extraído com alíquotas de 100 mL de diclorometano, três vezes. Os extratos foram concentrados em um rotaevaporador a 40 °C e o produto foi dissolvido em 250 mL de etanol quente (60 °C) e, em seguida deixou-se resfriar por 12 h em um freezer para a cristalização do mPEG – COOH. O precipitado foi filtrado a frio e o processo de cristalização foi repetido. O produto final foi filtrado a frio novamente, liofilizado e obteve-se mPEG – COOH com um rendimento de 90%. A densidade de grupos COOH presentes em mPEG – COOH foi determinada por titulação condutimétrica.

4.4 Síntese dos copolímeros de enxerto *mPEG – g – QQ*

A introdução, ou enxerto, de mPEG – COOH em quitosana cationizada (QC) foi realizada pelo método de conjugação via EDC/NHS. A solução tampão MES foi utilizado para a manutenção do pH do meio durante a reação. A quitosana cationizada (300 mg) foi dispersa em uma solução aquosa de HCl pH~6, a solução tampão MES 0,05 M foi adicionada e o pH do meio foi ajustado para 6. Para a ativação do mPEG – COOH, o EDC previamente solubilizado em 50 mL de solução tampão MES 0,05 M, foi adicionado a 50 mL de uma solução contendo mPEG – COOH em tampão MES 0,05 M pH 6. Após 15 minutos, adicionou-se o NHS e deixou-se sob agitação por mais 15 min. Esta solução contendo o mPEG – COOH ativado foi adicionada à solução de QC preparada previamente, o pH do meio foi ajustado para 6 com solução 0,1 M de HCl ou NaOH e a mistura foi mantida sob agitação por 16 h a 25 °C. O produto final foi purificado por diálise em água deionizada por 7 dias utilizando-se uma membrana com um “cutt off” de 12.000 Da e por fim concentrado em um rotaevaporador e então liofilizado.

A fim de obter copolímeros de enxerto com diferentes graus de substituição, as proporções em massa de mPEG – COOH para QC (m/m) foram variadas: 0,85:1, 1,65:1 e 2,5:1. Se 100% das moléculas de mPEG – COOH adicionadas ao meio de

reação fossem ligadas à QC o grau de substituição “teórico” seria de 3,25% (mPEG – *g* – QC 0,85:1), 6,5% (mPEG – *g* – QC 1,65:1) e 10% (mPEG – *g* – QC 2,5:1). Ou seja, baseado nas taxas molares de COOH e NH₂, estes valores significam que, teoricamente, a quantidade de mPEG – COOH adicionada seria capaz de reagir com 3,25, 6,5 e 10% do total de grupos NH₂ presentes na QC. No entanto, essas reações nunca alcançam um rendimento de 100% e o grau de substituição (GS) foi determinado por H¹ RMN. Os copolímeros foram definidos em função da taxa de massa de mPEG e QC utilizadas para a síntese. Na tabela 1, estão apresentadas as quantidades absolutas de mPEG e QC (em g) e seus respectivos conteúdos de grupos COOH e NH₂, respectivamente, em mmol, para cada um dos copolímeros. Assim, serão possíveis comparações diversas com dados de copolímeros encontrados na literatura, que são apresentados em termos de proporção em massa de porcentagem em massa e proporções molares entre mPEG e QC, e também na proporção molar dos grupos funcionais ligantes, NH₂ e COOH.

Tabela 1 – Condições experimentais utilizadas para a síntese dos copolímeros de enxerto mPEG – *g* – QC 0,85:1, mPEG – *g* – QC 1,65:1 e mPEG – *g* – QC 2,5:1. QC (g): quantidade de QC adicionada ao meio de reação (em g); NH₂ (mmol): conteúdo de NH₂ em QC (em mmol); mPEG – COOH (g): quantidade de mPEG – COOH adicionada ao meio de reação (em g); COOH (mmol): conteúdo de COOH em mPEG – QC (em de mmol); mPEG: QC (m/m): taxa de massa entre mPEG e QC; EDC mmol (mg): quantidade de EDC adicionado ao meio de reação em mmol e em mg.

Copolímeros	QC (g)	NH ₂ (mmol)	mPEG-COOH (g)	COOH (mmol)	mPEG:QC (m/m)	EDC mmol (mg)	NHS mmol (mg)
mPEG-QC 0,85:1	0,3	1,23	0,25	0,035	0,85	0,55 (105 mg)	0,55 (63 mg)
mPEG-QC 1,65:1	0,3	1,23	0,50	0,07	1,65	1,10 (210 mg)	1,10 (126 mg)
mPEG-QC 2,5:1	0,3	1,23	0,75	0,105	2,5	1,65 (315 mg)	1,65 (190 mg)

EDC e NHS foram adicionados, em relação aos grupos COOH de mPEG – COOH, em uma taxa molar de 15 para todos os copolímeros (Tabela 1). Isto é, foi definido um excesso de EDC e NHS, em relação aos grupos COOH de mPEG – COOH, de 15 vezes, para garantir a ativação efetiva de mPEG – COOH de forma que o enxerto possa ser realizado em uma boa taxa de rendimento.

4.5 Desacetilação da quitosana

Uma solução aquosa de NaOH 40% (m/m) foi utilizada para desacetilar a quitosana, em uma taxa de 10 mL/g de polímero, de acordo com Torii e colaboradores. A reação foi realizada sobre atmosfera de N₂ e agitação magnética por 4h em 110 °C, em um balão de três bocas acoplado a um condensador. O produto da reação foi lavado diversas vezes com água deionizada até atingir pH neutro e foi então filtrado. O filtrante, a quitosana desacetilada (QD), foi então dispersa em uma solução de ácido clorídrico 0,1 M e filtrado em membrana de filtração de PVDF poro 0,2 µm (Durapore®) para remover as impurezas. A QD presente no filtrado foi precipitada com NaOH 1 M, centrifugada e subsequentemente lavada com água deionizada para remover a base até atingir um pH neutro, sempre separada por centrifugação da água. O produto final foi liofilizado e o grau de desacetilação (GD) foi determinado por titulação condutimétrica, medindo a densidade de grupos NH₂ da quitosana e da quitosana desacetilada (QD).

4.6 Caracterizações físico-químicas

4.6.1 Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia no infravermelho detecta as frequências de vibração das ligações, possibilitando a identificação de substâncias em uma amostra. Todas as amostras foram analisadas por transmitância, a partir de pastilhas preparadas com KBr, em um espectrômetro Vertex 70 (Bruker) em uma resolução de 2 cm⁻¹, no intervalo de 4000 a 500 cm⁻¹ com 64 scans.

4.6.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (¹H RMN)

As estruturas químicas da quitosana, do mPEg e de seus derivados foram analisados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN) e de carbono (¹³C RMN). Foram determinados também, a partir dos espectros de ¹H RMN (integrando picos), o grau médio de desacetilação da quitosana, o grau médio de cationização da QC e o grau de substituição de mPEG nos copolímeros mPEG – g – QC. Para a preparação das amostras, aproximadamente 5 mg de amostra foram

dispersados em 1 mL de D₂O ou CDCl₃ e a solução foi mantida sob agitação até completa dissolução. Os parâmetros de aquisição dos dados foram (condições): supressão de água com sequência de pulsos de 3 segundos, acumulando 32 varreduras e o tempo de relaxação foi de 7 segundos. A janela espectral utilizada foi de 10.0 ppm e FID de 32 K.

Além de serem utilizados para a elucidação estrutural dos polímeros, os espectros de ¹H RMN foram usados para a determinação do GD da quitosana, do GC da QC e do GS dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1, mPEG – *g* – QC 1,65:1 e mPEG – *g* – QC 2,5:1. Estas determinações quantitativas são realizadas examinando a área dos picos referentes aos sinais de hidrogênio nos espectros. A área do pico, quando medida com exatidão, representa o número de hidrogênios que provocaram aquele sinal. Durante a realização da medida, os espectrômetros medem automaticamente as áreas dos picos do espectro e constroem curvas de integração sobre cada sinal (Solomons e Fryhle, 2004). O software utilizado para a análise dos espectros de ¹H RMN foi o ACD/NMR Processor Academic Edition.

O grau de desacetilação (GD) da quitosana comercial utilizada no presente trabalho foi determinado a partir do espectro de ¹H RMN da quitosana, através da integração da área do sinal atribuído aos prótons da metila do grupo acetila dos monômeros acetilados (*I*_{CH₃}) em 2.6 ppm e do hidrogênio ligado ao carbono 2 (C2) dos monômeros desacetilados (*I*_{H2}) em 3.77 ppm, a partir da equação x:

$$GD(\%) = 1 - \left(\frac{\frac{I_{CH_3}}{3}}{\frac{I_{CH_3}}{3} + I_{H2}} \right) \times 100 \quad (1)$$

em que *I*_{CH₃} é o valor da integral da área do pico referente aos hidrogênios da metila do grupo acetila; *I*_{H2} é o valor da integral da área do pico dos hidrogênios ligados ao C2 dos monômeros desacetilados.

O grau de cationização (GC), que é o grau de substituição de CGTMA em QC, foi determinado a partir de espectros de ¹H RMN, integrando o sinal do pico de hidrogênio das três metilas do grupo amônio quaternário (*I*_{(CH₃)₃}) em 3.05<*d*<3.3 e o sinal atribuído aos prótons da metila do grupo acetila dos monômeros acetilados (*I*_{CH₃}) posicionados em 2.6 ppm, de acordo com a seguinte equação:

$$GC(\%) = \frac{I_{(CH_3)_3}/9}{\left(\frac{I_{CH_3}/3}{GA}\right)} \times 100 \quad (2)$$

em que $I_{(CH_3)_3}$ é o valor da integral da área do pico referente aos hidrogênios das três metilas do grupo amônio quaternário do CGTMA; I_{CH_3} é o valor da integral da área do pico dos hidrogênios da metila do grupo acetila; GA é o grau de acetilação:

$$GA = 1 - GD \quad (3)$$

O grau de substituição (GS) de mPEG em QC dos copolímeros de enxerto mPEG – g – QC 0,85:1, mPEG – g – QC 1,65:1 e mPEG – g – QC 2,5:1 foi determinado por H^1 RMN, integrando o sinal do pico dos prótons das três metilas do grupo amônio quaternário da QC, em 2.5 ppm ($I_{(CH_3)_3}$), e o sinal dos hidrogênios da unidade repetitiva do mPEG, o oxietileno, posicionado em $3.0 < d < 3.25$ ppm ($I_{CH_2-CH_2}$), de acordo com a seguinte equação:

$$GS(\%) = \frac{(I_{CH_2-CH_2}/nH_{CH_2-CH_2})}{\left(\frac{I_{(CH_3)_3}/nH_{(CH_3)_3}}{GC}\right)} \times 100 \quad (4)$$

em que $I_{CH_2-CH_2}$ é o valor da integral do pico dos prótons dos grupos oxietileno de mPEG $nH_{CH_2-CH_2}$ é o número total de prótons das unidades de oxietileno de mPEG (454); $I_{(CH_3)_3}$ é o valor da integral do pico dos hidrogênios do grupos amônio quaternário do CGTMA; $nH_{(CH_3)_3}$ é o número de prótons do grupo amônio quaternário do CGTMA (9); GC é o grau de cationização.

4.6.3 Titulação potenciométrica-condutimétrica

As medidas de titulação potenciométrica-condutimétrica ácido-base para a quitosana, QD e mPEG – COOH e, titulações condutimétricas de precipitação para a a QC_{H_2O} e QC_{DMSO} , foram realizadas em um titulador automático 906 Titrando (Metrohm) equipado com um reator termostatizado com agitação magnética. Todas

as medidas foram realizadas em triplicata a 25 °C sob agitação magnética. Eram adicionados 50 mL de solução de amostra ao reator e os eletrodos de pH, de condutividade e o injetor automático de agente titulante eram imersos na solução. A concentração de amostra, a concentração do agente titulante, o volume de injeção de titulante e o intervalo de tempo entre as injeções foram padronizados para cada amostra. A cada injeção, medidas de condutividade e pH eram registrados pelo software Tiamo e estes valores são plotados em função do volume de titulante utilizado e a concentração de grupos funcionais era determinada.

4.6.3.1 *Titulações ácido-base*

Para a Q e QD o objetivo da titulação ácido-base era avaliar a densidade dos grupos funcionais NH_2 e para o mPEG – COOH a densidade de COOH . As amostras foram dispersas em solução de HCl (pH final da solução igual a 2,5) em uma concentração de 1 mg/mL para a Q e QD e de 10 mg/mL para o mPEG – COOH , e tituladas com solução de NaOH 0,1 e 0,05 M, respectivamente, até atingir o pH de 11. O volume de injeção foi de 25 μL e o intervalo entre as injeções de 20 segundos.

4.6.3.2 *Titulações de precipitação*

O objetivo da titulação de precipitação foi determinar o grau de cationização (GQ) dos derivados obtidos, a quitosana cationizada em meio aquoso ($\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$) e em dimetilsulfóxido (QC_{DMSO}). As amostras foram dispersas em água purificada e foram tituladas com solução de AgNO_3 até a saturação do meio com AgCl . O volume de injeção foi de 15 μL e intervalo entre as injeções de 20 seg. O grau de cationização (GC) da QC, que é a porcentagem de unidades *D*-glicosamina da quitosana que tiveram substituição de CGTMA, foi determinado com base no volume de AgNO_3 gasto para a titulação da QC conforme a seguinte equação:

$$\text{GC}(\%) = \frac{V.c/1000}{(V.c/1000) + \left(\frac{m - (V.c/1000).M_2}{M_1} \right)} \times \frac{1}{\text{GD}} \times 100 \quad (5)$$

em que, V é o volume de solução de AgNO_3 utilizado na titulação (em mL); C é a concentração da solução de AgNO_3 (em mol/L); GD é o grau de desacetilação; M_1 é a massa molar da unidades desacetilada (162 g/mol); M_2 é a massa molar da unidade monomérica cationizada, que corresponde à soma da massa molar da unidade desacetilada e da molécula de CGTMA (314 g/mol); m é a massa de QC utilizada para a medida.

4.6.4 Potencial zeta

As medidas de potencial zeta da quitosana, QC e dos copolímeros mPEG – g – QC 0,85:1, mPEG – g – QC 1,65:1 e mPEG – g – QC 2,5:1 foram realizadas em diferentes pH, a 25 °C, em um Zetasizer Nano ZS (Malvern), que utiliza espalhamento de luz para a quantificação de potencial zeta e mobilidade eletroforética, acoplado a um titulador automático. A concentração das amostras foi de 1 mg/mL dispersas em água ultrapura e soluções de HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M foram utilizadas para os ajustes de pH, para cima e para baixo a partir de pH neutro. Foram realizadas três medidas para cada amostra e os valores apresentados são a média e desvio padrão. O software de análise de dados Zetasizer calcula o potencial zeta pela determinação da mobilidade eletroforética aplicando a equação de Henry:

$$U_e = \frac{2 \varepsilon Z f(Ka)}{3 \eta} \quad (6)$$

em que, Z é o potencial zeta; U_e é mobilidade eletroforética; ε é a constante dielétrica, η é a viscosidade; $f(Ka)$ is a função de Henry. A mobilidade eletroforética e a velocidade da partícula no campo elétrico dependem da força do campo elétrico aplicado ou gradiente de voltagem e a constante dielétrica depende do solvente, da viscosidade do meio e do potencial zeta.

O potencial zeta é o potencial que existe no plano de cisalhamento localizado nos limites da camada difusa externa ao redor de partículas carregadas. Quando as partículas em suspensão apresentam um potencial zeta alto, seja negativo ou positivo, há uma tendência à repulsão eletrostática entre as partículas minimizando a agregação. Soluções com um potencial zeta maior do que +30 mV ou menor do que -30 mV são consideradas dispersões coloidais estáveis.

4.6.5 Medidas de viscosidade

A viscosidade das soluções poliméricas de quitosana, mPEG, QC e dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1, mPEG – *g* – QC 1,65:1 e mPEG – *g* – QC 2,5:1 de concentração 3 mg/mL em tampão acetato aquoso CH₃COOH 0,2 M/CH₃COONa 0,1 M, pH 4,5, foi medida a 25 °C, 24 h após a preparação das soluções utilizando um viscosímetro vibracional modelo SV-19 (A&D Weighing). A unidade de detecção do viscosímetro vibracional é composta por dois pratos circulares que quando acionados por uma força eletromagnética de frequência igual à frequência natural do sistema de medição (cerca de 30 Hz) eles entram em ressonância. Os pratos vibram na mesma amplitude e quando são imersos na amostra, a amplitude diminui e o aparelho produz uma corrente elétrica necessária para recuperar a amplitude inicial. Essa corrente é proporcional à viscosidade da amostra, que pode ser calculada por meio de uma correlação simples. Este equipamento opera com precisão de $\pm 1\%$ da leitura, na faixa de viscosidade de 0,3 cP a 10.000 cP.

4.6.6 Massa molecular ponderal média (M_w)

As medidas de massa molecular ponderal média (M_w) da quitosana, QC e dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1, mPEG – *g* – QC 1,65:1 e mPEG – *g* – QC 2,5:1 foram realizadas por espalhamento de luz estático utilizando um Zetasizer Nano S (Malvern). As amostras foram dispersas em tampão acetato CH₃COOH 0,2 M/CH₃COONa 0,1 M (pH 4,5) e foram medidas 24 h após a preparação para garantir a solvatação adequada das cadeias. A concentração das amostras variou de 0,25 a 1,25 mg/mL. As medidas de incremento do índice de refração (dn/dc) foram realizadas em um refratômetro diferencial BI-DNDCW (Brookhaven instruments Corporation), em 620 nm, nas mesmas condições das medidas de espalhamento de luz estático.

A relação entre a intensidade de luz espalhada e a massa molecular é dada pela equação de Rayleigh. A equação de Rayleigh utilizada para uma medida de espalhamento estático em um único ângulo pode ser escrita como:

$$\frac{KC}{R_\theta} = \left(\frac{1}{M_w} + 2A_2C \right) P(\theta) \quad (7)$$

onde $\overline{M_w}$ é a massa molecular média; R_θ é a taxa do espalhamento de Rayleigh em relação à intensidade de luz incidente; A_2 é o segundo coeficiente virial, C é a concentração da amostra; $P(\theta)$ é a dependência angular da intensidade de espalhamento da amostra; K é a constante óptica como definido pela seguinte equação:

$$K = \frac{4\pi^2}{\lambda_0^4 N_A} \left(n_0 \frac{dn}{dC} \right)^2 \quad (8)$$

onde, N_A é a constante de Avogadro; λ_0 é o comprimento de onda da luz incidente; n é o índice de refração do solvente; dn/dC é o incremento do índice de refração diferencial, que muda em função da concentração. O padrão utilizado como referência foi o tolueno.

A intensidade da luz espalhada foi medida para cada amostra e a massa molecular (M_w) e o segundo coeficiente virial (A_2) foram automaticamente calculados a partir do gráfico de Debye pelo software Zetasizer. O gráfico de Debye é a relação KC/R_θ versus C , que deve gerar uma curva linear com um intercepto igual a $1/M$ e um slope equivalente ao segundo coeficiente virial A_2 .

4.7 Avaliação qualitativa da solubilidade em solução aquosa

A solubilidade da quitosana, QC e dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1, mPEG – *g* – QC 1,65:1 e mPEG – *g* – QC 2,5:1 foi determinada qualitativamente por espectroscopia UV/Visível medindo a transmitância (T%) das soluções poliméricas em meio aquoso neutro, ácido e alcalino utilizando um espectrôfotômetro 8453E (Agilent Technologies) em 600 nm. Soluções de concentração 1 mg/mL foram preparadas em água e ajustes de pH foram realizados com soluções de HCl 0,1 M e

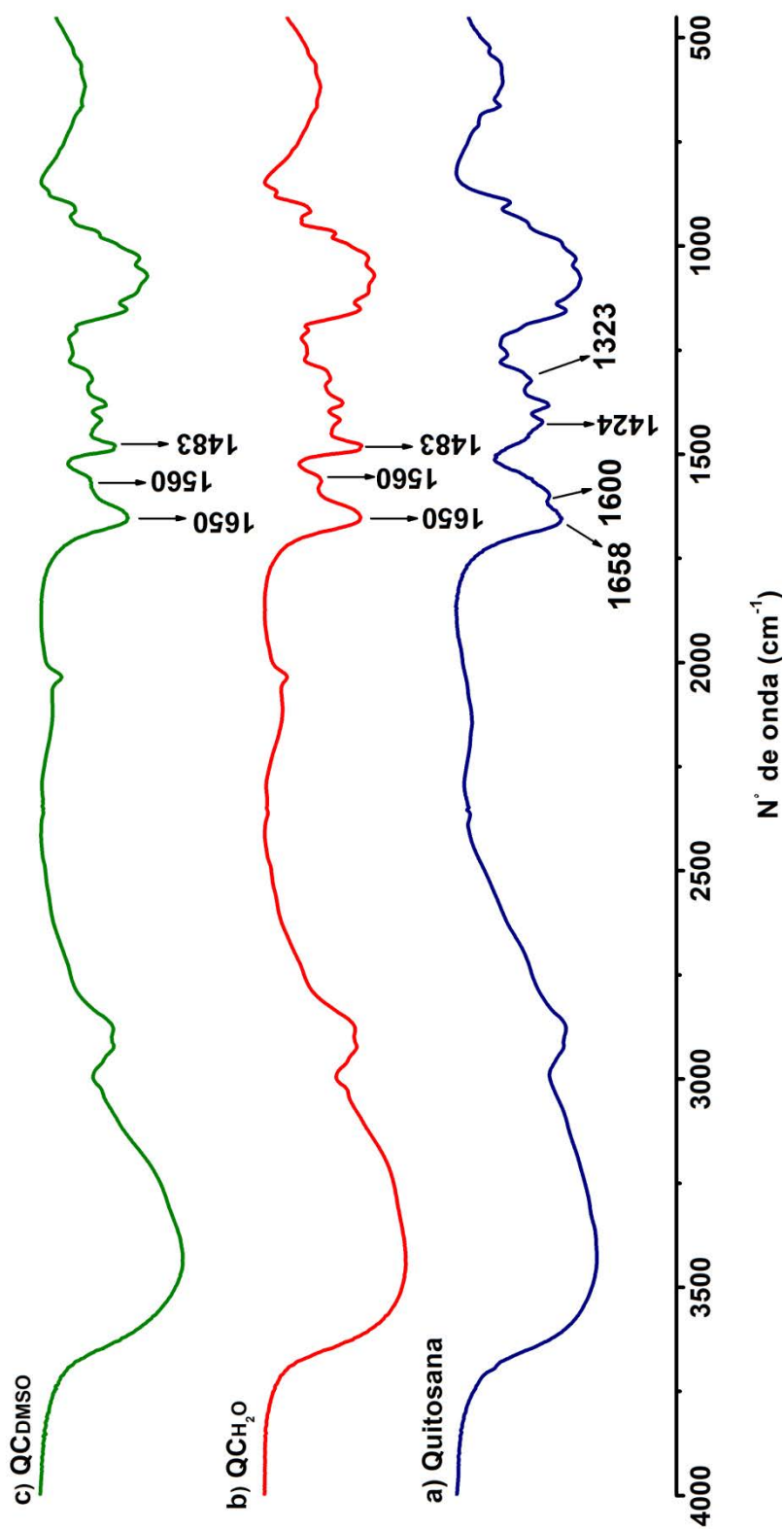
NaOH 0,1 M. A solubilidade era avaliada comparando a transmitância de cada amostra nos diferentes pH avaliados.

5 Resultados e discussão

5.1 Cationização da quitosana

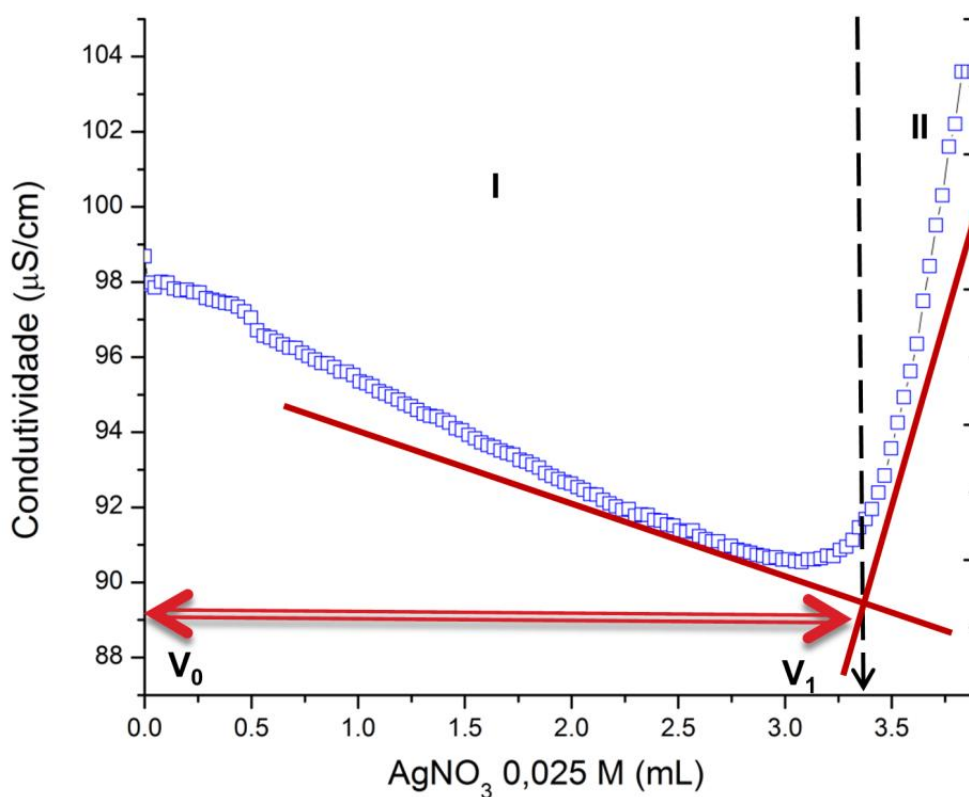
A cationização da quitosana foi realizada com o objetivo de aumentar a solubilidade e o potencial catiônico da quitosana em água, em meio neutro e alcalino, visto que nestas condições a quitosana é insolúvel. A reação de cationização foi realizada a partir da reação dos grupos amina da quitosana com o CGTMA (cloreto de glicidil trimetilamônio), em meio aquoso neutro gerando a quitosana cationizada em água (QC_{H_2O}) e em DMSO, gerando a quitosana cationizada em DMSO (QC_{DMSO}). A reação de cationização foi primeiramente confirmada por FTIR. No espectro da quitosana (Figura 9a) aparecem algumas bandas características de quitosana. A banda de amina primária, em 1600 cm^{-1} corresponde à deformação N-H. A banda de amida I (em 1658 cm^{-1}) e a banda de amida III (em 1323 cm^{-1}) são referentes à vibração de estiramento da ligação C=O da amida. Uma terceira banda referente aos grupamentos amida aparece em 1423 cm^{-1} , que corresponde à deformação axial de C-N. E a banda larga centrada em 3445 cm^{-1} é referente às vibrações de estiramento de N-H e O-H da quitosana. (Figura 11b e 11c) e a significativa redução da banda de amina primária da QC em 1560 cm^{-1} (Figura 11b e 11c), denota a reação dos grupos NH_2 da quitosana com o CGTMA. A banda de amida I, em 1650 cm^{-1} , presente na quitosana se mantém inalterada na QC (Figura 11a), uma vez que não houveram modificações nos grupos acetilas das unidades de N-acetil-glicosamina, e nem formação de novas ligações amida durante o processo de cationização. O aparecimento de uma nova banda em 1483 cm^{-1} referente à deformação angular assimétrica C-H das metilas presentes nos grupos amônio quaternário da QC.

Figura 11 – Espectros de FTIR: (a) quitosana; (b) quitosana cationizada em meio aquoso (QQ_{H_2O}) com uma razão CGTMA:*D*-glicosamina igual a 2 (c) quitosana cationizada em DMSO (QQ_{DMSO}) com uma razão CGTMA:*D*-glicosamina igual a 3.



O grau de cationização (GC) dos derivados quaternários foi determinado primeiramente por titulação condutimétrica, para comparação com o GC determinado posteriormente a partir dos resultados de ^1H RMN. A princípio, realizou-se a cationização da quitosana em meio aquoso e em DMSO para avaliar qual seria o solvente mais adequado, ou seja, o que resultasse em um maior GC. A taxa molar de CGTMA para unidades de *D*-glicosamina utilizada para a preparação da $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ foi de 2:1 (mol/mol) e para a QC_{DMSO} foi de 3:1 (mol/mol). Para a obtenção das curvas condutimétricas da $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ (Figura 12) e da QC_{DMSO} (Figura 13), soluções aquosas de ambos os polímeros, de concentração 1 mg/mL, foram tituladas com solução de AgNO_3 até o ponto de equivalência para se determinar a quantidade de CGTMA introduzido à quitosana, em ambas as amostras.

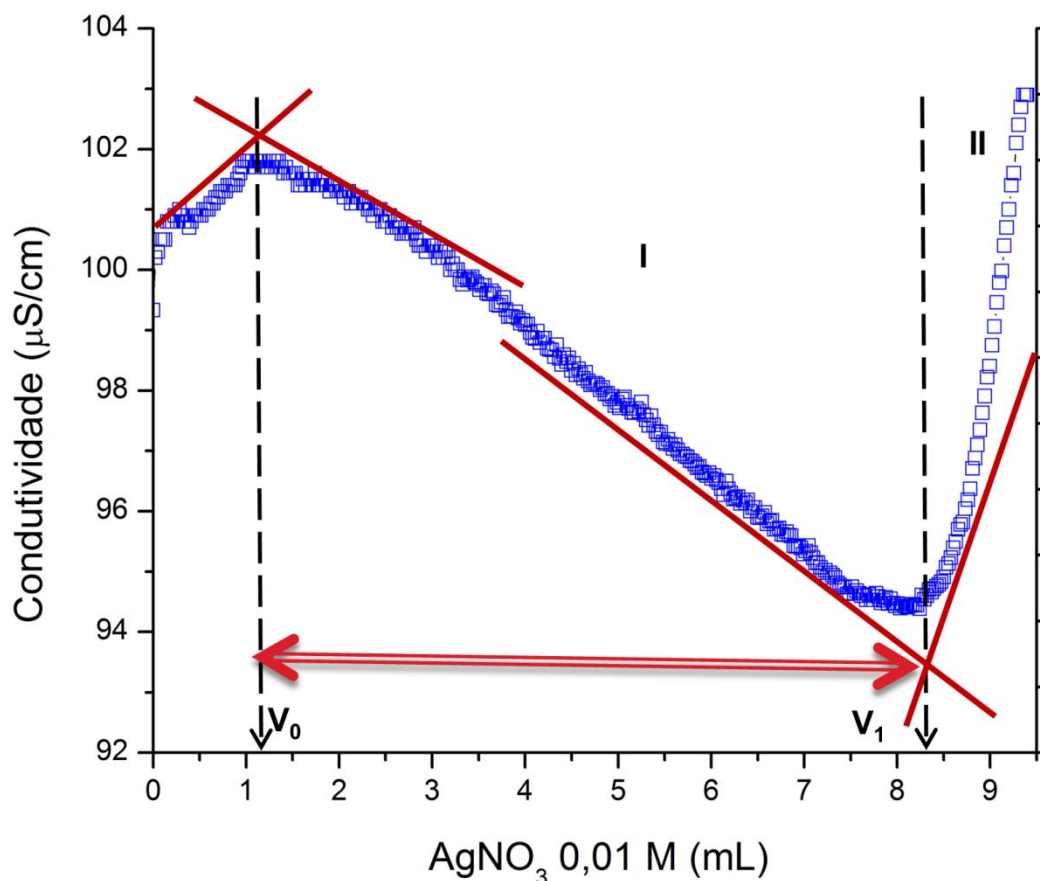
Figura 12 – Curva de titulação condutimétrica da quitosana cationizada em água ($\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$). A amostra foi dispersa em água purificada, em uma concentração de 1 mg/mL, e titulada com AgNO_3 0,025 M. A intersecção entre as linhas vermelhas indica o ponto de transição da curva, calculado por regressão linear. A seta vermelha corresponde ao volume de AgNO_3 gasto ($V_1 - V_0$) para a titulação da quitosana cationizada.



Fonte: autor

A determinação condutimétrica da quantidade de CGTMA introduzido na molécula de quitosana é baseada na reação de neutralização dos íons Cl^- do CGTMA pelo íon Ag^+ (do AgNO_3), formando um sal insolúvel que precipita, o AgCl . As curvas condutimétricas representadas nas Figuras 12 e 13 estão divididas em duas regiões distintas (I, e II) pelos pontos de transição das curvas, determinados pela intersecção entre as retas vermelhas. A primeira região (I) corresponde a neutralização dos íons Cl^- por Ag^+ , formando o sal insolúvel AgCl , e o volume de AgNO_3 gasto reflete a quantidade de mols de CGTMA que foram adicionados nos grupos amina da quitosana. A região II corresponde ao excesso de titulante, visto que todos os íons Cl^- foram neutralizados. Considerando os pontos de transição das curvas (Figura 12 e Figura 13), a neutralização dos íons Cl^- iniciou-se em $V_0=0$ e finalizou em $V_1=3,302$ mL para a $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ (Figura 12) e iniciou-se em $V_0=1,27$ mL e terminou em $V_1=8,55$ mL para a QC_{DMSO} (Figura 13). Assim, a densidade de CGTMA introduzido na quitosana foi de 1,62 mmol/g para a $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ e de 1,46 mmol/g para a QC_{DMSO} . Baseado no volume e na concentração de AgNO_3 gasto até o ponto de equivalência da titulação, foi determinado o grau de quaternização de ambas as amostras, utilizando a equação 5 da seção experimental. O GC determinado por titulação condutimétrica foi de 39 % para a $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ e de 35% para a QC_{DMSO} . Embora ambas as amostras tenham sido eficientemente modificadas por CGTMA, o GC da $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ foi mais alto do que o GC da QC_{DMSO} , mesmo utilizando uma taxa molar de CGTMA para *N*-glicosamina significativamente menor. Por isso, a $\text{QC}_{\text{H}_2\text{O}}$ foi escolhida para a conjugação com mPEG – COOH, que será chamada a partir de agora só de QC.

Figura 13 – Curva de titulação condutimétrica da quitosana cationizada em DMSO (QC_{DMSO}). A amostra foi dispersa em água purificada, utilizando uma concentração de 1 mg/mL e foi titulada com $AgNO_3$ 0,01 M. As linhas pontilhadas delimitam a área de neutralização dos íons Cl^- , a intersecção entre as linhas vermelhas indicam o pontos de transição da curva, calculado por regressão linear. A seta vermelha corresponde ao volume de $AgNO_3$ gasto ($V_1 - V_0$) para a titulação da quitosana cationizada.



Fonte: autor

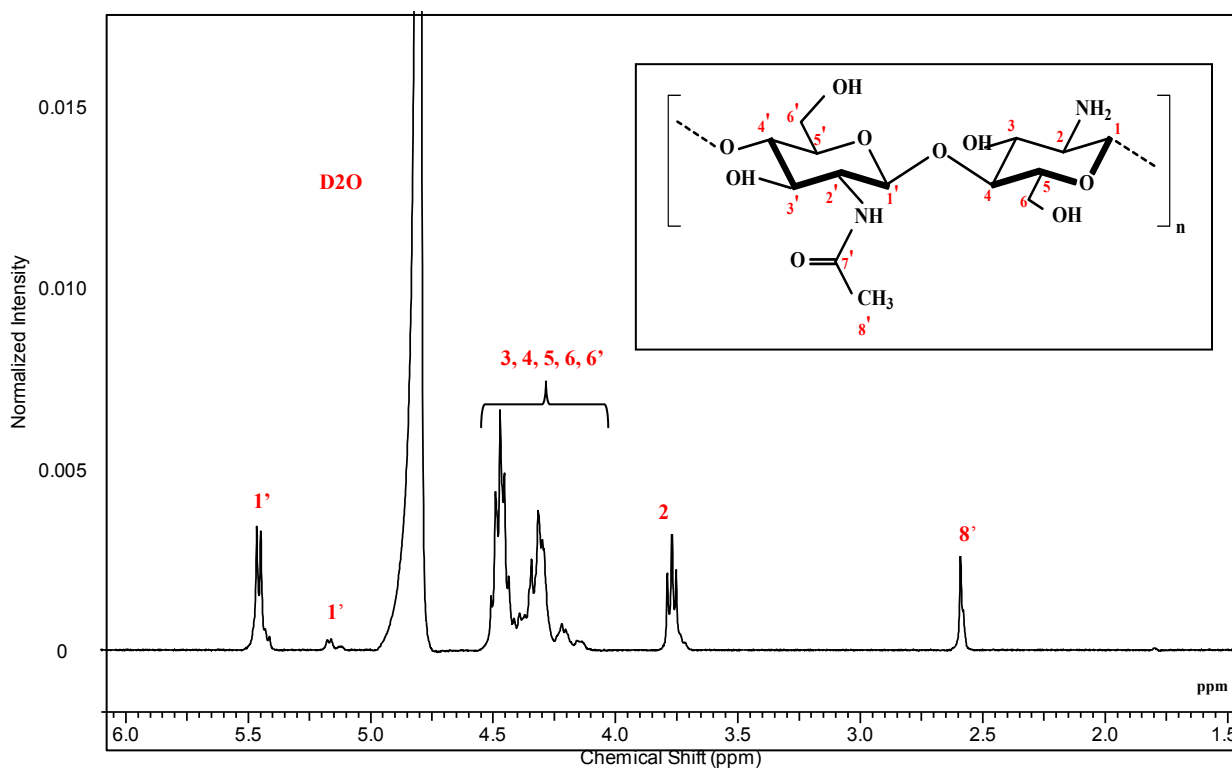
O GC da quitosana depende da temperatura e do tempo de reação, da taxa molar de CGTMA:*D*-glicosamina e do peso molecular da quitosana. A escolha das condições experimentais utilizadas no presente trabalho foi baseada no trabalho de Seong e colaboradores, que avaliaram a influência destes parâmetros no GC de oligossacarídeos da quitosana e obtiveram derivados quase 100% cationizados em meio ácido (SEONG; WHANG; KO, 2000). Spinelli e colaboradores obtiveram, em meio aquoso e em condições similares às do presente trabalho, um GC maior do que o obtido por nós, provavelmente, devido ao maior tempo de reação (24 h) utilizado (SPINELLI; LARANJEIRA; FÁVERE, 2004). Utilizando um tempo de reação de somente 4 h e uma temperatura de 80 °C, Wu e colaboradores obtiveram um GC de 52,58% com uma taxa molar de CGTMA para *D*-glicosamina de 1:6, que é uma taxa

três vezes maior do que a taxa utilizada neste trabalho (WU; SU; MA, 2006). Wu e colaboradores mostraram também que a quitosana de baixo peso molecular tem uma tendência maior a reagir com os grupos amônio quaternário devido à baixa cristalinidade da sua estrutura. Quanto maior a massa molecular da quitosana mais cristalina é a estrutura e mais difícil é a reação com reagentes cationizantes, gerando derivados com baixa solubilidade (WU et al., 2007).

A quitosana e a QC foram caracterizadas por ^1H RMN com o objetivo de confirmar as suas estruturas químicas e também determinar o grau de desacetilação (GD) da quitosana e GQ da QC, para comparação com o GC da quitosana cationizada em água, determinado anteriormente por titulação condutimétrica. O espectro de ^1H RMN da quitosana (Figura 14) apresenta picos característicos das unidades acetiladas e desacetiladas da quitosana. O sinal centrado em 2.6 ppm (8') é referente aos prótons da metila do grupo acetila. O tripleto centrado em 3.77 está relacionado ao próton H2, ligado ao C2 da unidade acetilada (2). Os picos localizados no intervalo $4.12 < \delta < 4.55$ ppm (3,4,5,6,6') foram atribuídos ao sinal dos prótons H3, H4, H5, H6 e H6'. Os sinais em 5.17 ppm (1') e no intervalo $5.4 < \delta < 5.5$ (1) estão relacionados aos prótons ligados a C1 das unidades acetiladas e a C1 das unidades desacetiladas, respectivamente.

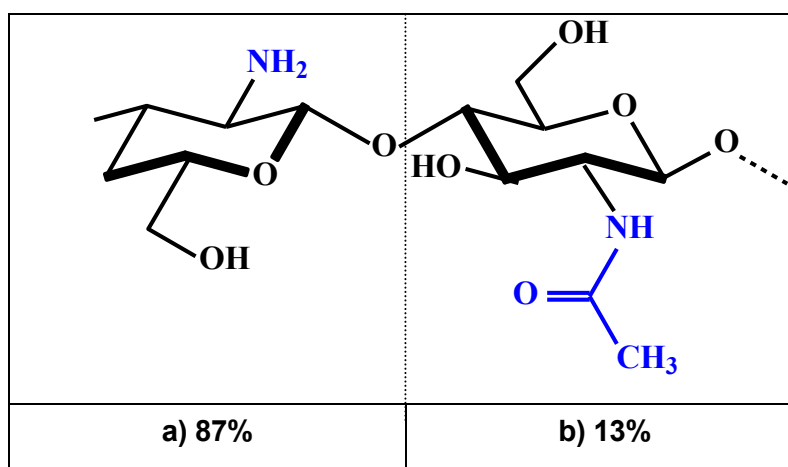
O grau de desacetilação (GD) da quitosana, determinado a partir do espectro de ^1H RMN da quitosana (Figura 14), utilizando a integral (área do sinal atribuído aos prótons da metila do grupo acetila dos monômeros acetilados (em 2.6 ppm) e do hidrogênio ligado ao carbono C2 dos monômeros desacetilados (em 3.77 ppm), foi de 87%. Isto é, 87% dos monômeros são desacetilados e 13% são acetilados (Figura 15). Segundo as informações técnicas oferecidas pela empresa Sigma-Aldrich, a quitosana comercial utilizada neste trabalho possui um GD de aproximadamente 75-85%. A determinação do grau de desacetilação ou grau de acetilação por RMN é recomendável para amostras de quitosana com alto grau de desacetilação e vem sendo o método mais utilizado nestes casos (HIRAI; ODANI; NAKAJIMA, 1991; LAVERTU et al., 2003; IMAZAKI et al., 2004).

Figura 14 – Espectro de H^1 RMN da quitosana em D_2O/HCl em uma concentração de 5 mg/mL. Os hidrogênios estão representados por números de acordo com a posição do carbono ao qual encontram-se ligados nos monômeros desacetilado e monômero acetilado.



Fonte: autor

Figura 15 – Frequência com que as unidades repetitivas ocorrem na quitosana, em termos de porcentagem: (a) unidades acetilados – 13%; (b) unidades desacetilados – 87%.

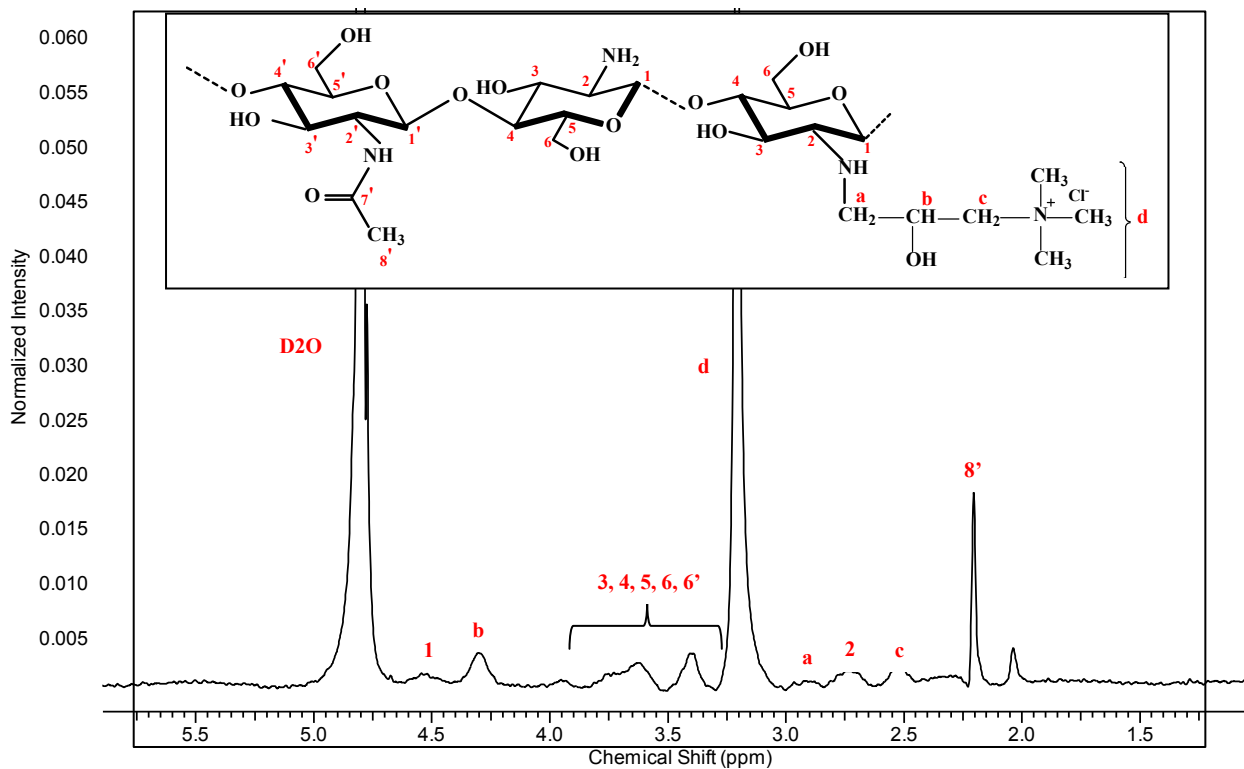


Fonte: autor

A partir do espectro de ^1H RMN da QC, mostrado na Figura 16, foi possível confirmar a obtenção do derivado cationizado e também determinar o grau de cationização (GC). O intenso pico posicionado em $3.05 < \delta < 3.3$ ppm (Figura 16 - d), que está relacionado aos hidrogênios presentes nas metilas do grupo amônio quaternário ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$), é o pico de referência para a confirmação da cationização da quitosana por CGTMA. Apareceram também novos picos referentes aos sinais dos hidrogênios dos outros carbonos da molécula de CGTMA em 2.53 ppm (Figura 16 - c), 2.92 ppm (Figura 16 - a) e 4.3 ppm (Figura 16 - b) (SEONG; WHANG; KO, 2000; PENG et al., 2010). O sinal dos hidrogênios H3, H4, H5, H6 e H6' em $3.3 < \delta < 4.1$ ppm (Figura.16 – 3,4,5,6,6') e o sinal do próton H1 em 4.54 ppm (Figura 16 - 1) também foram deslocados para a direita, antes posicionados entre $4.12 < \delta < 4.55$ ppm (Figura 16 – 3,4,5,6,6') e 5.45 ppm (Figura 16 - 1), respectivamente.

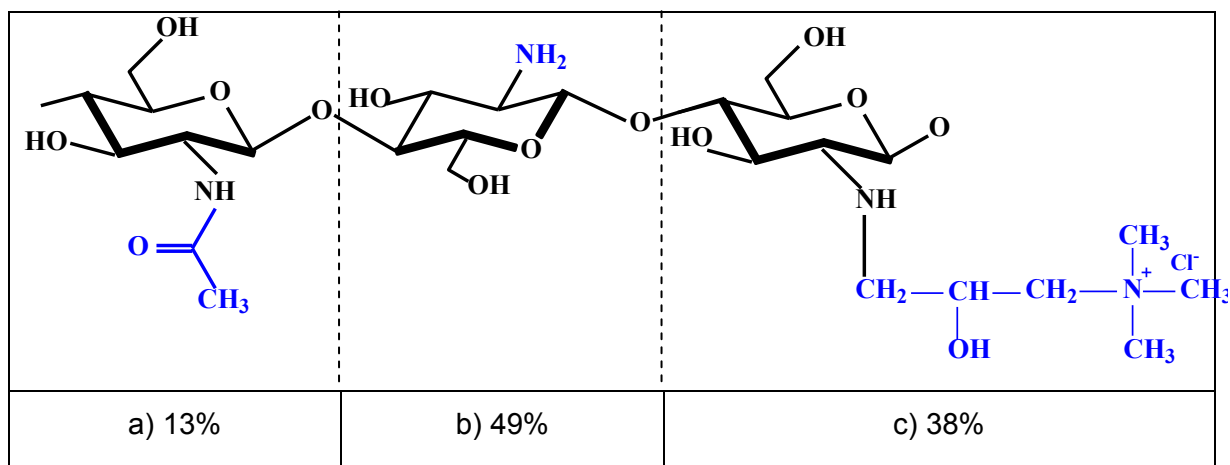
O grau de cationização (GC) da QC, determinado a partir de espectros de H^1 RMN, integrando o sinal do pico de hidrogênio das três metilas do grupo amônio quaternário, em $3.05 < \delta < 3.3$ ppm, e o sinal atribuído aos prótons da metila do grupo acetila das unidades acetilados (em 2.6 ppm), foi de 37%. Comparando com o valor de GQ obtido por titulação condutimétrica, de 39%, é possível dizer que os dois métodos estão em concordância e que ambos podem ser adequados para a determinação do GC. A média obtida entre os valores obtidos pelas duas técnicas foi de 38%, que será adotado como o GC médio da QC. Um GC de 38% significa que as moléculas de QC, composta por unidades acetiladas (a), unidades desacetiladas (b) e unidades cationizadas (c) ainda possuem 49% dos seus grupos amina (Figura 17).

Figura 16 – Espectro de H^1 RMN da quitosana cationizada (QC) em D₂O em uma concentração de 5 mg/mL. Os hidrogênios estão representados por números e letras de acordo com a posição do carbono ao qual se encontram ligados às unidades desacetiladas, unidades acetiladas e unidades cationizadas



Fonte: autor

Figura 17 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas na QC, em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) unidades desacetiladas – 49%; (c) unidades cationizadas – 38%.



Fonte: autor

A massa molecular ponderal média (M_w) da quitosana e da QC foi determinada por espalhamento estático de luz a partir de gráficos de Debye, utilizando o tolueno como padrão de espalhamento. Os valores de M_w (em KDa) e do incremento do índice de refração (dn/dc) estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Valores de massa molecular ponderal média (M_w) determinada por espalhamento de luz estático e dn/dc para a quitosana e da quitosana cationizada (QC). As medidas foram realizadas a partir de dispersões poliméricas preparadas em tampão acetato pH 4,5 em concentrações de 0,25-1,25 mg/mL.

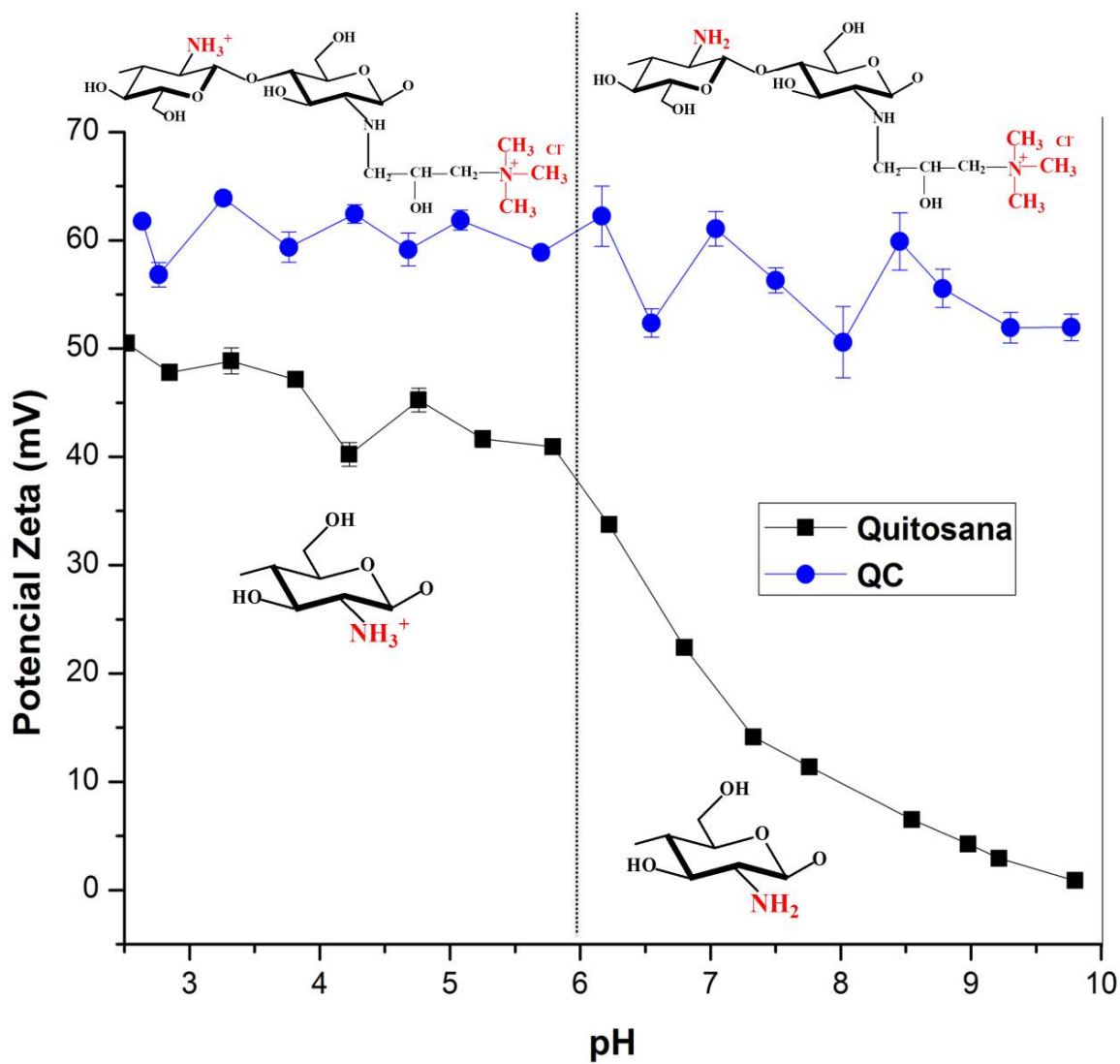
Polímeros	(M_w - KDa)	dn/dc
Quitosana	$92,6 \pm 7,6$ ($R^2=0,99$)	$0,175 \pm 6,7 \cdot 10^{-3}$
QC	$123 \pm 4,13$ ($R^2=0,99$)	$0,148 \pm 5,1 \cdot 10^{-3}$

Como já discutido na seção de métodos, a determinação da massa molecular requer o valor específico do dn/dc e no caso de polímeros modificados ou copolímeros, o valor de dn/dc depende da estrutura química e do grau de modificação. O valor de dn/dc depende também do solvente e da concentração da solução. Portanto, devido à variedade de fatores que influenciam o valor de dn/dc e a dificuldade de encontrar na literatura amostras com as mesmas características químicas e com determinações realizadas nas mesmas condições, é recomendado a determinação individual do dn/dc das amostras nas mesmas condições em que foram realizadas as medidas de espalhamento de luz.

Aplicando-se o valor de dn/dc , determinado experimentalmente para a quitosana e QC, à equação de Rayleigh (equação 7 da seção experimental), a M_w da quitosana foi de 92,6 KDa e da QC de 123 KDa. Considerando o grau de cationização obtido para a QC, determinado por condutimetria e 1H RMN (38% e 37%, respectivamente) foi possível estimar o aumento da massa molecular da quitosana após a introdução de CGTMA em 35 %. O aumento da M_w da quitosana após a introdução de CGTMA, determinado por espalhamento de luz, foi também de exatamente 35%, pois a M_w da quitosana passou de 92,6 KDa para 123 KDa. E o valor de M_w determinado para a quitosana está dentro do intervalo de M_w informado pelo fabricante, de 80 -120 KDa.

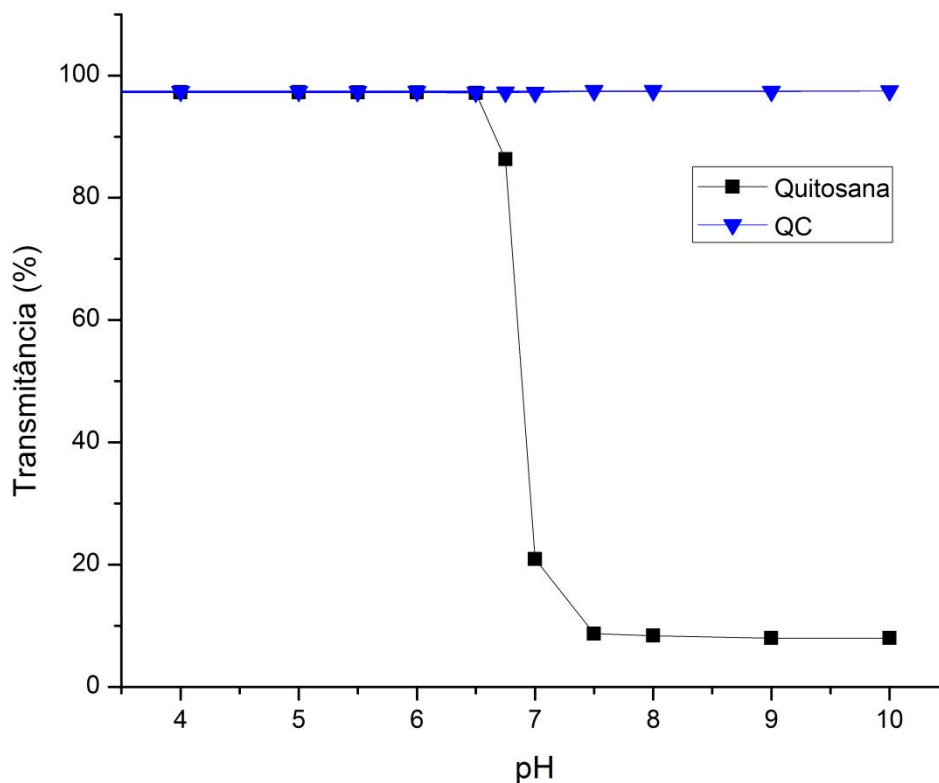
As medidas de potencial zeta foram realizadas com o objetivo de estudar a densidade de cargas dos derivados da quitosana devido à introdução de CGTMA, que apresenta uma carga permanente, independente do pH do meio. Uma vez que o potencial zeta indica a carga superficial efetiva, é possível avaliar a presença de grupos amônio quaternário presentes na QC. Observando a curva de potencial zeta da quitosana (Figura 18 – curva em preto), é possível notar que em meio ácido a quitosana apresenta um potencial alto e positivo ($\sim +50$ mV) devido aos grupos amina estarem protonados (NH_3^+). No entanto, quando o pH está próximo do pKa da quitosana (~ 6), os grupos amina começam a desprotonar (NH_2) e o potencial zeta começa a reduzir rapidamente e, em pH 10, é quase igual a 0 mV, o que significa que a carga de superfície da quitosana pode ser considerada nula. Em contrapartida, o potencial zeta da QC (entre +65 e +50 mV) permanece alto e positivo até em meio neutro e alcalino, devido ao fato das cargas dos grupos amônios quaternários ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$) não dependerem do pH. Entretanto, houve uma leve queda no potencial zeta da QC a partir do pH 6 porque nestas condições não há mais a contribuição das cargas dos grupos amina para o potencial zeta. Em conclusão, o potencial zeta confirmou o aumento do potencial catiônico da quitosana após a cationização, em meio aquoso neutro e alcalino. A presença de cargas, em meio neutro e alcalino, possibilita que a molécula de QC estabeleça interações eletrostáticas com moléculas carregadas negativamente, meios nos quais a quitosana não apresenta cargas.

Figura 18 – Curvas de potencial zeta em função do pH: quitosana (curva em preto) e quitosana cationizada - QC (curva em azul). As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL, em HCl 0,1 M e tituladas com NaOH 0,1 M utilizando um titulador automático acoplado ao Zetasizer S.



Fonte: autor

Figura 19 – Curvas de transmitância da quitosana (curva em preto) e quitosana cationizada – QC (curva em azul) em solução aquosa ácida, neutra e alcalina. As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL, em água e ajustes de pH foram realizados utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.



Fonte: autor

Visto que a cationização da quitosana com CGTMA foi realizada com o objetivo de melhorar a solubilidade da quitosana em meio aquoso neutro e alcalino, a solubilidade da QC foi avaliada de forma qualitativa, em comparação com a água pura, em termos de transparência/turbidez de soluções aquosas de concentração de 1mg/mL em um intervalo de pH de 4 a 10, utilizando um espectrofotômetro UV/Visível. Quanto mais alta a transparência, em termos de transmitância, maior é a solubilidade da solução, enquanto uma baixa transparência significa precipitação ou agregação. As amostras são consideradas insolúveis quando a transmitância da solução é menor que 90%. A figura 19 mostra as curvas de transmitância de soluções aquosas de quitosana e QC em um intervalo de pH de 4 a 10. É possível observar que a quitosana apresenta uma transmitância maior do que 97% até alcançar pH de aproximadamente 6,5, ponto a partir do qual a transmitância reduz bruscamente alcança valores abaixo de 10% a partir de pH 7.. Esta insolubilidade é devido a desprotonação dos grupos amina da quitosana nestas condições e,

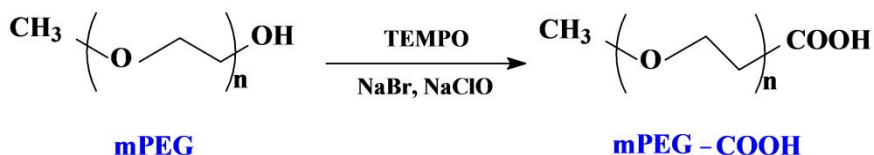
consequente a precipitação. A baixa solubilidade da quitosana em meio aquoso neutro e alcalino se deve às fortes interações de hidrogênio inter e intramoleculares entre grupos amina e hidroxilas, que não permite suficiente interação destas cadeias com o solvente.

Em contraste, a QC apresentou uma excelente solubilidade em água, como pode ser observado na Figura 19 (pontos em azul), na qual a transmitância das soluções permaneceu alta (quase 100 %) e constante em todo o intervalo de pH estudado. O aumento da solubilidade da quitosana em meio aquoso, neutro e alcalino, após a cationização é atribuído ao impedimento estérico causado pelo CGTMA e à repulsão eletrostática causada pelas cargas permanentes dos grupos amônio quaternário ($N^+(CH_3)_3$) presentes na QC (WU; SU; MA, 2006). Enquanto a força de repulsão entre as cadeias da QC em meio neutro e alcalino é dependente dos grupos $N^+(CH_3)_3$ introduzidos após a cationização, em meio ácido essas forças não são dominantes. Isso porque em meio ácido os grupos amina da QC também encontram-se protonados e a repulsão eletrostáticas entre os grupos NH_3^+ é maior do que entre os grupos $N^+(CH_3)_3$, pois a carga dos últimos são relativamente blindadas pelas metilas circundantes (XU et al., 2010). Resultados similares aos nossos foram reportados em diversos trabalhos, mostrando o significativo aumento da solubilidade da quitosana após a cationização (QIN et al., 2004; PENG et al., 2010) e, quanto maior o GC, mais solúvel é o derivado (PENG et al., 2010). Os mesmos fatores que permitem a solubilização da quitosana após a cationização, devido às cargas permanentes do grupo amônio quaternário introduzido, também fizeram com que a viscosidade da QC (1,6 cP) fosse significativamente mais baixa que a viscosidade da quitosana (2,36 cP). Resultados similares foram encontrados por Mao et al. (2005a). A alta viscosidade das soluções de quitosana não-modificada se deve às fortes interação de hidrogênio intermoleculares, que são enfraquecidas ou quebradas após a cationização devido ao impedimento estérico do CGTMA e também da repulsão eletrostática causada entre os grupos $N^+(CH_3)_3$ do CGTMA (MAO et al., 2005a).

5.2 Oxidação de mPEG a mPEG-COOH

O mPEG – COOH, essencial para a síntese dos copolímeros mPEG – *g* – QC, foi obtido pela oxidação de mPEG comercial mediada por TEMPO com um rendimento de 90% como ilustrado no esquema abaixo (Figura 20). O *N*-oxil-2,2,6,6-tetrametilpiperidina (TEMPO) é um composto heterocíclico bastante empregado como catalisador na oxidação de alcoóis primários e secundários a aldeídos, cetonas ou ácidos carboxílicos (POZZI et al., 2004). O sistema TEMPO-NaBr-NaClO tem sido bastante utilizado para a oxidação de hidroxilas terminais de polietilenoglicóis (PEG) (ISOGAI; KATO, 1998; ARAKI; ZHAO; ITO, 2005) e de hidroxilas de grupos álcool primário de polissacarídeos hidrossolúveis como amido, quitosana e amilodextrina (DE NOOY; BESEMER; VAN BEKKUM, 1994) e também de polissacarídeos insolúveis em água como a celulose (ISOGAI; KATO, 1998; PEREZ; MONTANARI; VIGNON, 2003), a quitina e a agarose (YIXUE et al., 2013). O TEMPO é um composto volátil solúvel em água e solventes orgânicos.

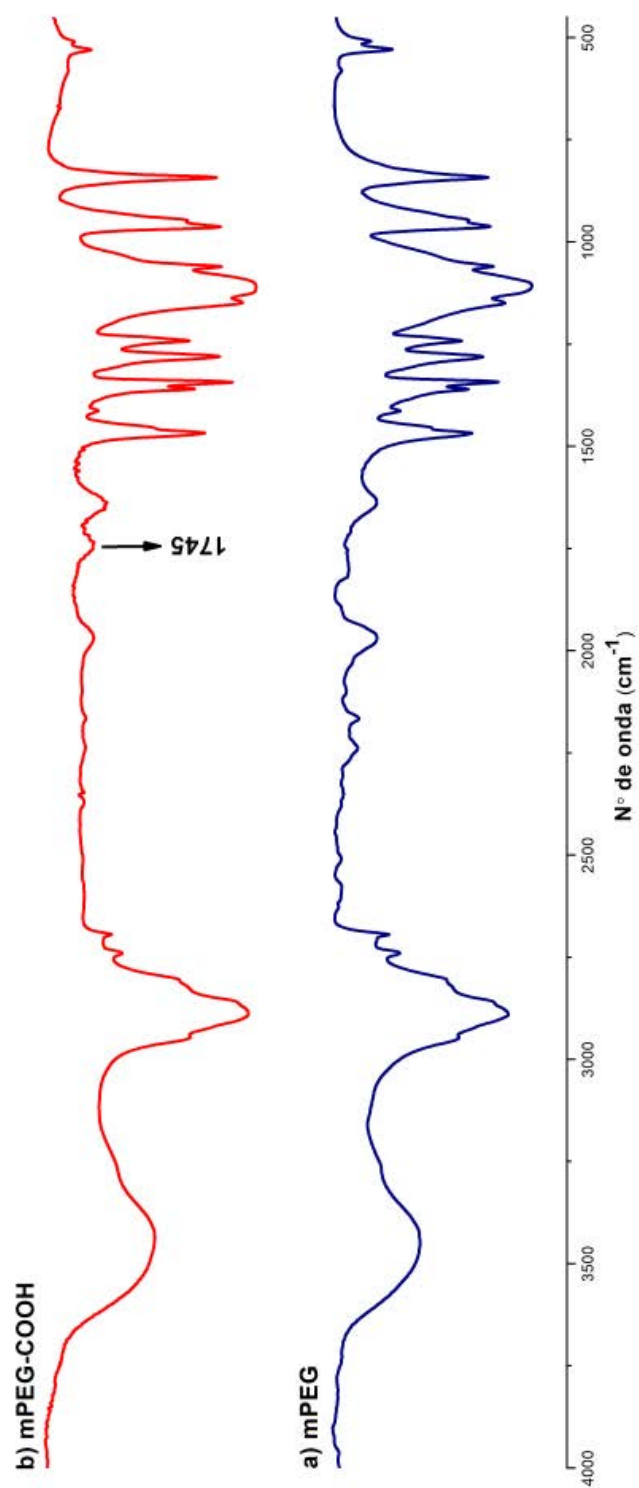
Figura 20 – Representação esquemática da conversão de mPEG à mPEG – COOH via oxidação mediada por TEMPO-NaBr-NaClO.



Fonte: autor

De acordo com os espectros de FTIR, a oxidação das hidroxilas terminais do mPEG a COOH foi confirmada pelo aparecimento de uma nova banda de absorção em 1745 cm^{-1} no espectro do mPEG – COOH (Figura. 21b), referente a vibração C=O da carboxila, (JEONG et al., 2008; LIANG et al., 2012). Ainda que seja uma banda de baixa intensidade, é um resultado que confirma a oxidação dos grupos hidroxila de mPEG, considerando a baixa densidade de grupos OH presentes nas moléculas de mPEG, de somente um grupo OH ou COOH terminal por molécula de PEG.

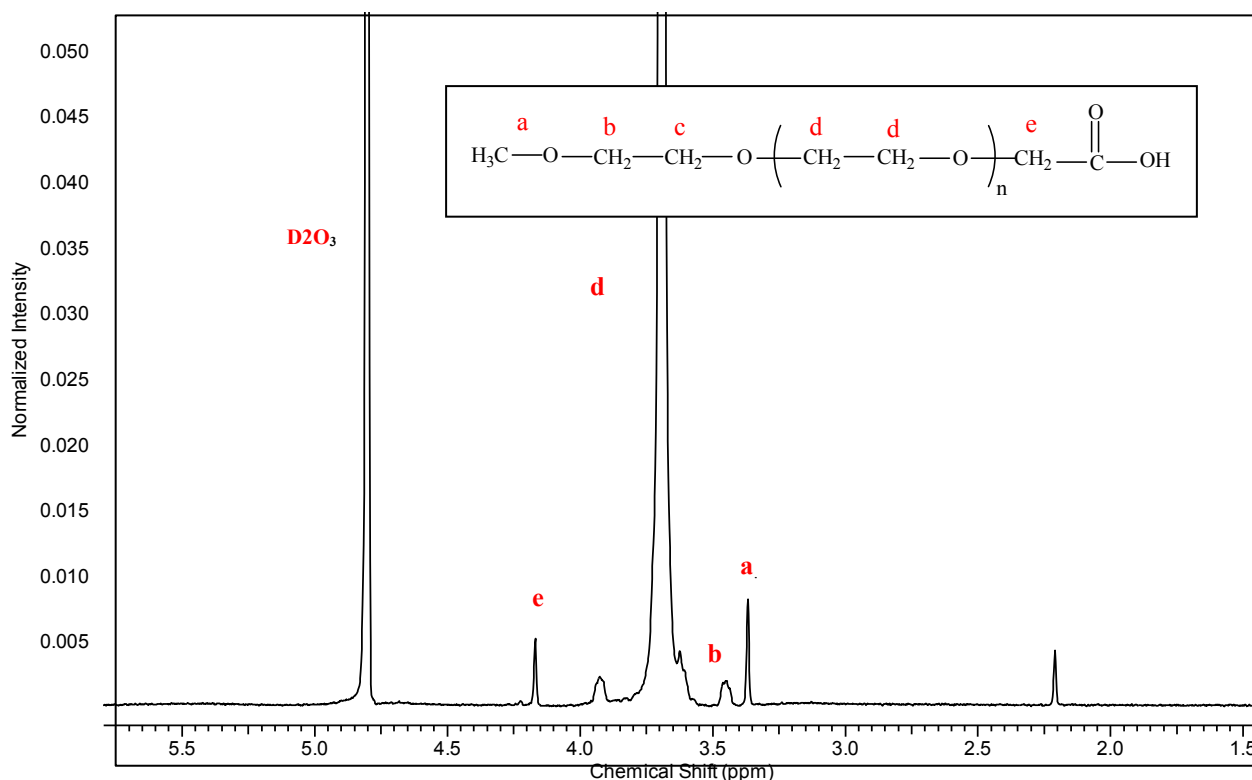
Figura 21 – Espectros de FTIR: (a) mPEG; (b) mPEG – COOH.



Fonte: autor

No espectro de ^1H RMN de mPEG – COOH, apresentado na Figura 22, aparecem sinais de hidrogênios referentes ao grupo metoxil ($-\text{OCH}_3$) em 3.37 ppm (a) e de hidrogênios do grupo oxietileno, a unidade repetitiva do PEG ($-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) em $3.55 < d < 3.8$ ppm (d).

Figura 22 – Espectro de ^1H RMN de mPEG – COOH. Os hidrogênios estão representados por letras de acordo com a posição do carbono ao qual se encontram ligados.

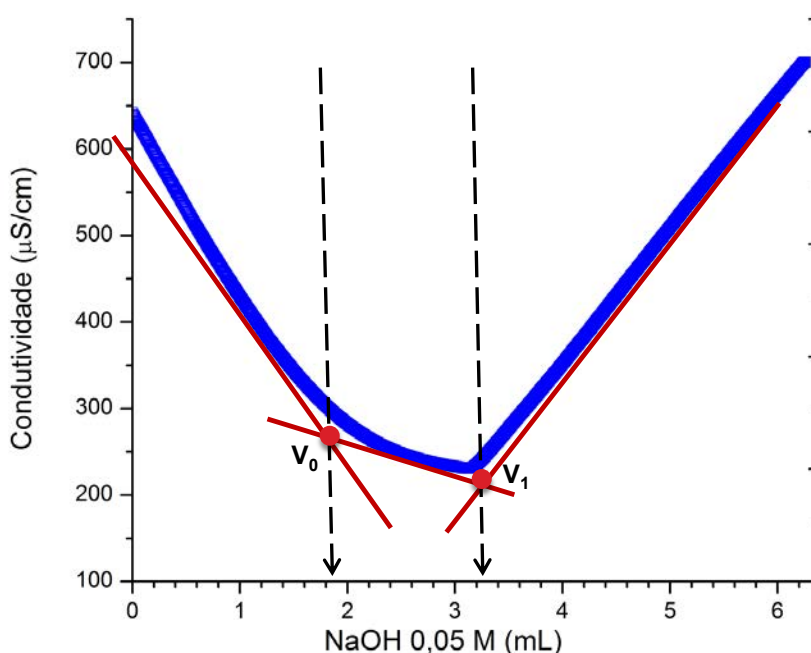


Fonte: autor

Não foi possível avaliar a taxa de oxidação dos grupos OH de mPEG a partir do espectro de ^1H RMN porque não apareceram sinais de hidrogênios ligados às hidroxilas nem sinais de hidrogênios carboxílicos no espectro de mPEG – COOH, que pode ser devido à baixa densidade destes grupos, de apenas um grupo funcional na extremidade de uma longa cadeia. Também não apareceram sinais de hidrogênios aldeídicos no espectro de mPEG – COOH no presente trabalho. Uma vez que o grupo aldeído é o grupo intermediário durante o processo de oxidação de grupos OH de mPEG a COOH, a presença destes sinais poderia indicar que o processo de oxidação não foi completo. Após o processo de oxidação dos grupos hidroxila de mPEG a grupos aldeído, Chang e colaboradores (2007) encontraram sinais de

prótons de aldeído no espectro de ^1H RMN de mPEG – COOH, em um deslocamento posicionado em 7.3 ppm (CHANG et al., 2007). No presente trabalho, o espectro de ^1H RMN do mPEG – COOH não apresentou sinais de prótons de aldeídos, o que sugere que os grupos hidroxila convertidos à aldeído foram oxidados à grupos carboxila.

Figura 23 – Curva de titulação condutimétrica do mPEG – COOH disperso em HCl, em uma concentração de 10 mg/mL e titulado com NaOH 0,05 M. As linhas pontilhadas delimitam a área de desprotonação do mPEG – COOH e a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição da curva (V_0 e V_1), que foram calculados por regressão linear.



Fonte: autor

A densidade de grupos carboxila presentes no mPEG – COOH foi calculada a partir dos pontos de transição da curva de titulação condutimétrica ácido-base (Figura 23). A primeira região da curva, o ramo descendente, corresponde a neutralização do HCl livre presente na solução. Neste caso, a condutividade diminui porque os íons H^+ , de maior mobilidade iônica, são neutralizados pelo NaOH e permanecem na solução os íons Na^+ , de baixa mobilidade iônica. A segunda região corresponde à desprotonação dos grupos carboxila presentes no mPEG – COOH. A condutividade é mantida relativamente constante, uma vez que os íons carboxilato de mPEG – COOH não contribuem significativamente para a condutividade do sistema. O início da última região da curva representa o fim da titulação de mPEG –

COOH e a condutividade aumente rapidamente devido ao excesso de agente titulante (íons Na^+ e OH^- à solução).

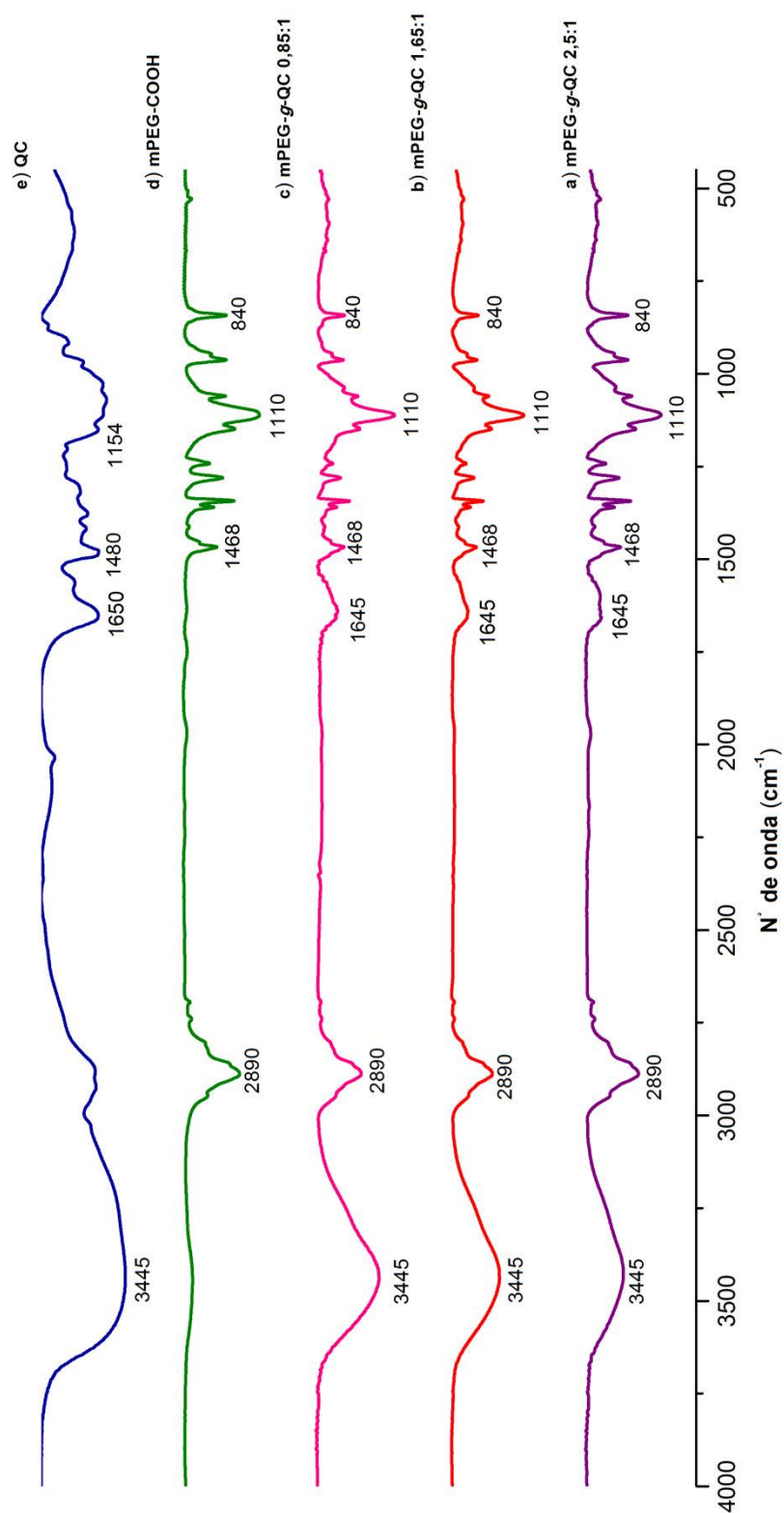
Considerando os pontos de transição da curva, a desprotonação dos íons COOH iniciou-se em $V_0=1,8$ mL e finalizou-se $V_1=3,2$ mL. Baseado no volume de NaOH 0,05 M gasto (1,4 mL), a densidade de grupos carboxila foi de 0,14 mmol /g de polímero. O grau de oxidação não foi determinado, porém, comparando a densidade de grupos carboxila obtido, sugere-se que o grau de oxidação obtido esteja próximo de valores reportados previamente. A densidade de grupos carboxila, também determinada por titulação condutimétrica, obtida por Araki e colaboradores (2005) após a oxidação de PEG 30000 via TEMPO foi de 0,0688 mmol/g (LAPIENIS; PENCZEK, 2001; ARAKI; ZHAO; ITO, 2005). Sant e Nagarsenker (2011) utilizaram o reagente de Jones para oxidar mPEG 5000 e obtiveram uma densidade de grupos carboxila de 0,167 mmol/g.

5.3 Síntese e caracterização dos copolímeros de enxerto mPEG – *g* – QC

A introdução de mPEG em QC quitosana via EDC/NHS foi realizada em pH 6, que é um pH baixo o suficiente para garantir a completa solubilização da QC, mas também suficientemente alto para que aproximadamente a metade dos grupos amina da QC estejam desprotonados e, portanto, se comportem como nucleófilos capazes de atacar o éster de mPEG e NHS e formar os copolímeros. Há também evidências de que os grupos carboxila devem estar no seu estado ionizado (COO^-) para reagir com o EDC (NAKAJIMA, IKADA, 1995). Portanto seria recomendável estudar previamente o comportamento de ionização do grupo carboxila da molécula de interesse em função do pH para determinar a faixa de pH no qual estes grupos estejam no seu estado ionizado.

Com o intuito de avaliar o grau de substituição e a solubilidade em função da taxa de massa de mPEG para QC, foram preparados copolímeros com diferentes taxas de massa. A formação dos copolímeros foram primeiramente confirmados por FTIR. Os espectros de FTIR dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85: 1, mPEG – *g* – QC 1,65: 1 e mPEG – *g* – QC 2,5: 1, mPEG – COOH e QC estão apresentados na Figura 24.

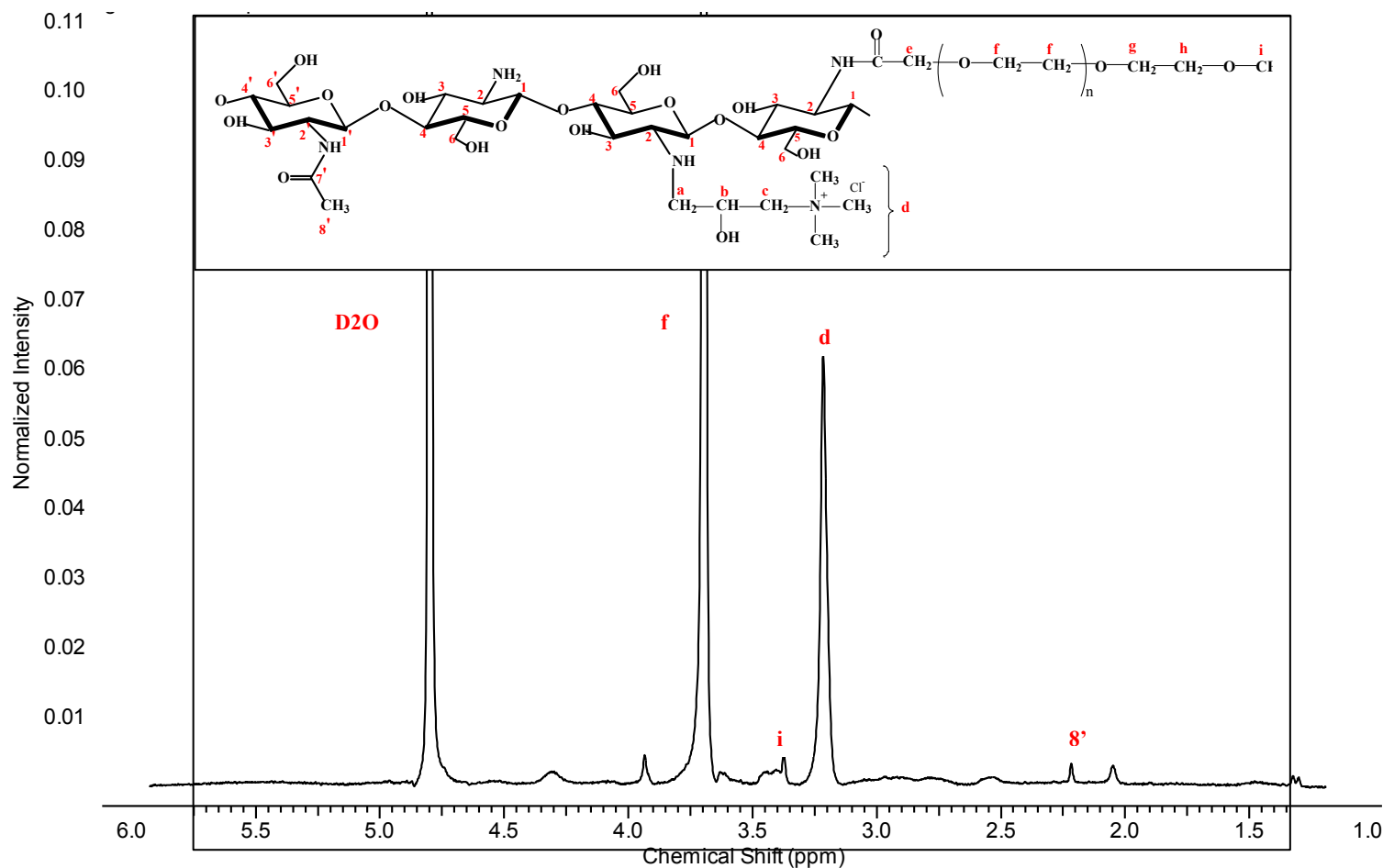
Figura 24 – Espectro de FTIR dos copolímeros de enxerto. (a) mPEG – g – QC 0,85: 1; (b) mPEG – g – QC 1,65: 1; (c) mPEG – g – QC 2,5: 1; (d) mPEG – COOH; (e) QC.



Após o enxerto de mPEG em QC, novas bandas referentes ao mPEG – COOH são observadas nos espectros dos copolímeros. Comparando os espectros dos copolímeros (Figuras 24a, 24b e 24c) com o espectro da QC, é possível observar que a pequena banda de vibração de N-H da amina primária que aparece na QC, em 1565 cm^{-1} , desapareceu nos copolímeros devido à formação de ligações amida entre os grupos NH_2 da QC e os grupos COOH de mPEG – COOH. Consequentemente, a banda de amida I nos espectros dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1 (Figura 24c), mPEG – *g* – QC 1,65:1 (Figura 24b) e mPEG – *g* – QC 2,5:1 (Figura 22a) foi alargada e está centralizada em 1645 cm^{-1} . A conjugação de mPEG – COOH aos grupos NH_2 da QC foi confirmada pelo aparecimento de novas bandas nos espectros dos copolímeros (Figura 24a, Figura 24b e Figura 24c) referentes à absorções da molécula de mPEG – COOH. Houve um aumento na intensidade da banda centrada em 2890 cm^{-1} e da banda em 1110 cm^{-1} , que podem ser atribuídas à vibração de estiramento C-H unidades repetitivas da molécula de mPEG ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$) e à vibração C-O-C, respectivamente.

Os espectros de ^1H RMN dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1 (Figura 25), mPEG – *g* – QC 1,65:1 (Figura 25) e mPEG – *g* – QC 2,5:1 (Figura 25) também confirmam a conjugação de mPEG QC devido ao aparecimento de um pico de sinal intenso referente aos hidrogênios da unidade repetitiva do PEG, o oxietileno, em 3.7 ppm (f) e um pico em 3.35 ppm (i) que foi atribuído aos hidrogênios do grupo metoxil. O pico posicionado em $3.5 < \delta < 3.85$ ppm (d), está relacionado aos hidrogênios presentes nas metilas do grupo amônio quaternário ($\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$). Picos característicos de quitosana também apareceram nos espectros dos copolímeros. O sinal em 2.2 ppm (8') está relacionado aos prótons do grupo metil do grupo acetila.

Figura 25 – Espectro de H^1 RMN do copolímero $mPEG_{10} - g - QC$ 0,85:1 em D_2O em uma concentração de 5 mg/mL. A posição dos hidrogênios está representada, em cada unidade repetitiva, por números e letras de acordo com a localização do carbono ao qual se encontram ligados. Da esquerda para a direita encontram-se as unidades desacetiladas, unidades acetiladas, unidades cationizadas e unidades enxertadas com $mPEG$.



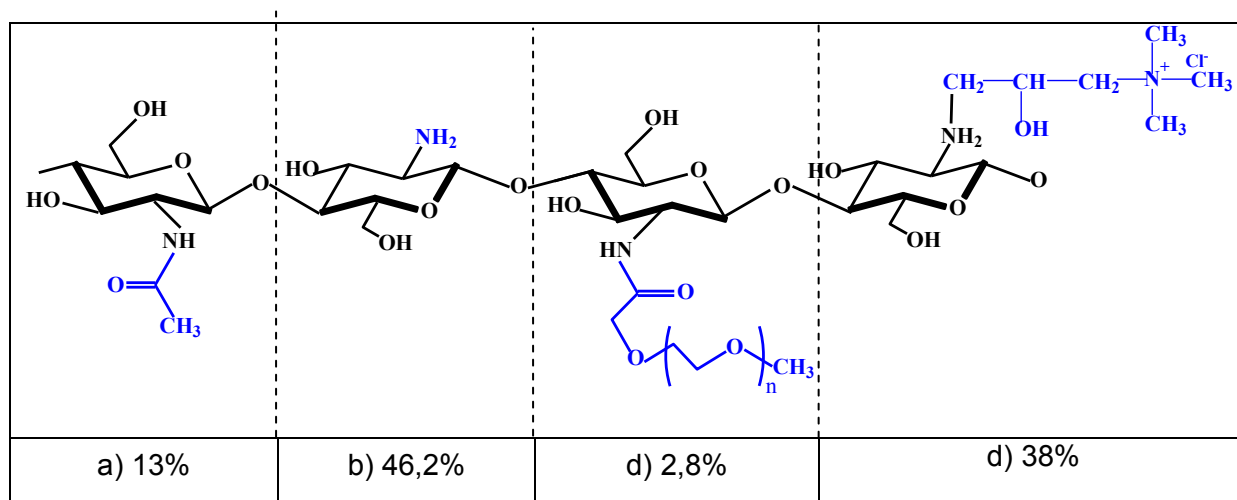
Fonte: autor

Considerando que 100 % das moléculas de $mPEG - COOH$ adicionadas ao meio de reação tivessem sido introduzidas à QC , o grau de substituição “teórico” dos copolímeros seria de 3,25% para o $mPEG - g - QC$ 0,85:1, de 6,5% para o $mPEG - g - QC$ 1,65:1 e 10% para o $mPEG - g - QC$ 2,5:1. O grau de substituição (GS) de $mPEG - COOH$ em QC , foi determinado por H^1 RMN, integrando o sinal do pico dos prótons das três metilas do grupo amônio quaternário da QC , em 2.5 ppm, e o sinal dos hidrogênios da unidade repetitiva do $mPEG$, o oxietileno, posicionado em $3.0 < \delta < 3.25$ ppm, de acordo com equação 4 da seção experimental. Assim, o GS do copolímero $mPEG - g - QC$ 0,85:1 foi de 2,8%, do $mPEG - g - QC$ 1,65:1 de 5,6% e

mPEG – g – QC 2,5:1 foi de 8,3%, que foram valores ligeiramente menores do que os valores estimados caso o rendimento de ligação fosse de 100% das moléculas de **mPEG – COOH** . Dessa forma, calculou-se que para as taxas de massa utilizadas 0,85:1, 1,65:1 e 2,5:1, o rendimento da conjugação de **mPEG** em **QC** foi de 87,4 %, 86% e 83%, respectivamente.

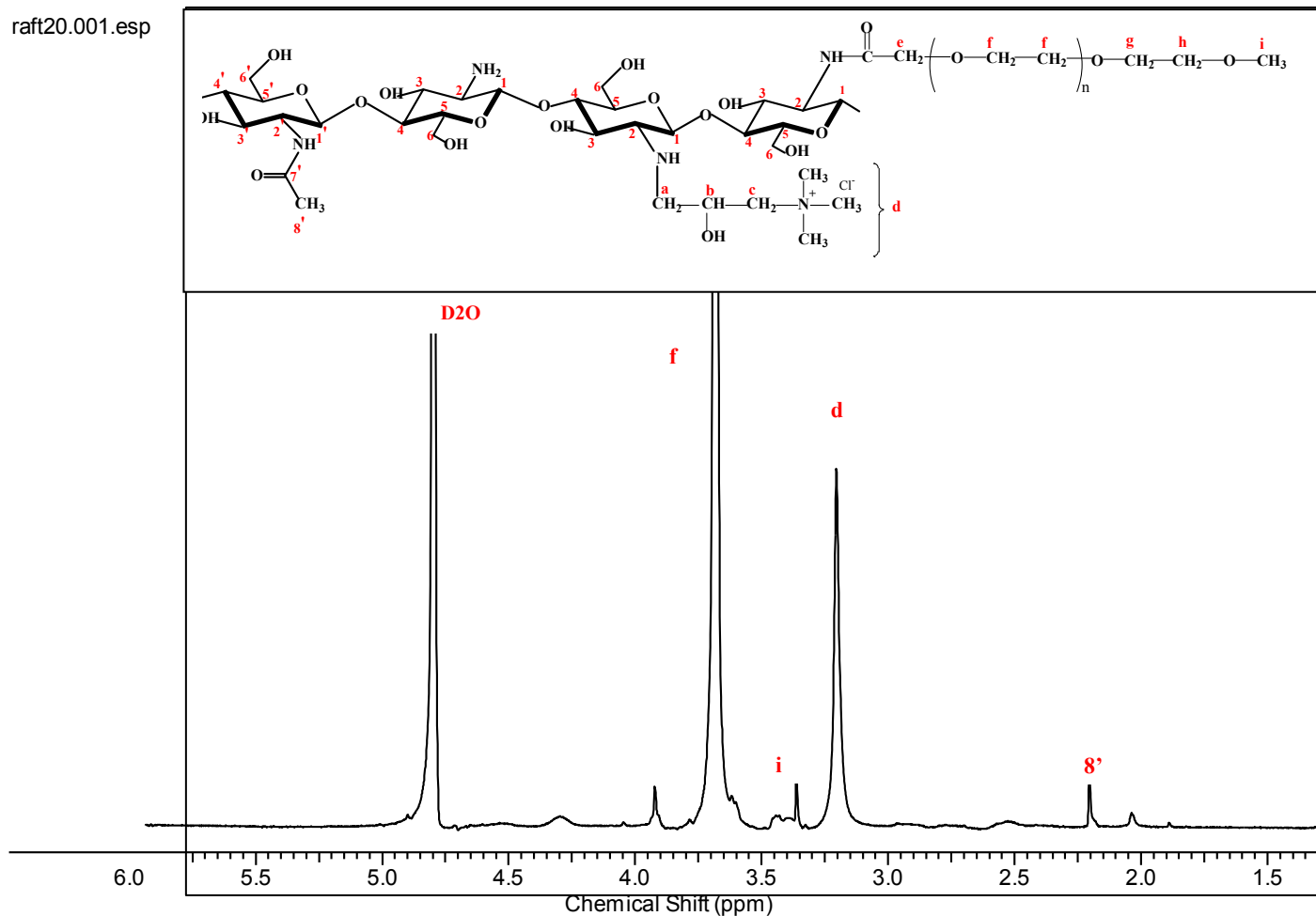
Na figura 26 estão representadas as porcentagens das unidades repetitivas do copolímero **mPEG – g – QC 0,85:1**.

Figura 26 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas no copolímero mPEG – g – QC 0,85:1, em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) unidades desacetiladas – 46,2%; (c) unidades enxertadas com mPEG – 2,8%; (d) unidades cationizadas – 38%.



Fonte: autor

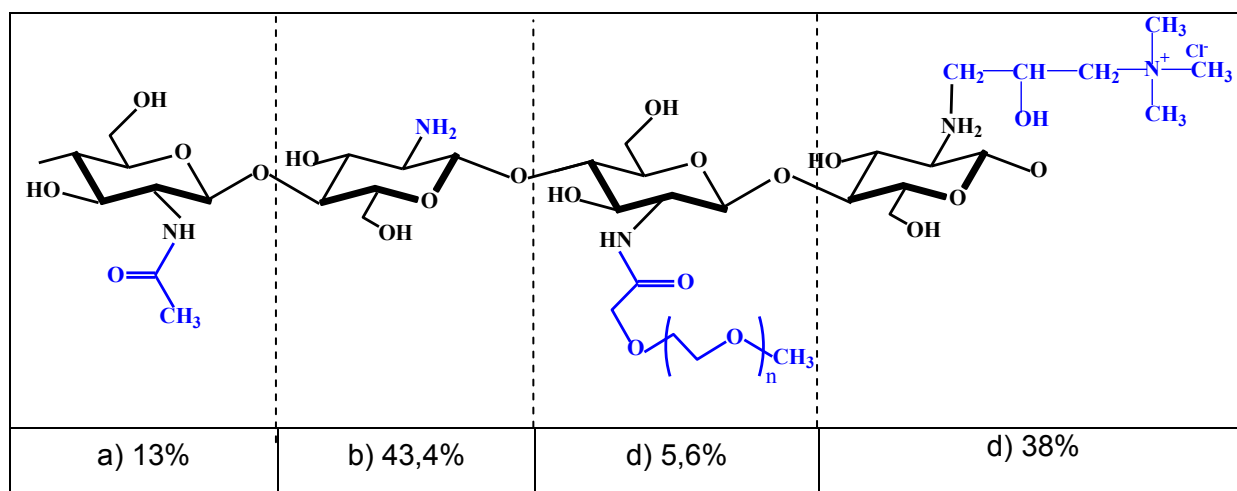
Figura 27 – Espectro de H^1 RMN do copolímero mPEG – g – QC 1,65:1 em D₂O em uma concentração de 5 mg/mL. A posição dos hidrogênios está representada, em cada unidade repetitiva, por números e letras de acordo com a localização do carbono ao qual se encontram ligados. Da esquerda para a direita encontram-se as unidades desacetiladas, unidades acetiladas, unidades cationizadas e unidades enxertadas com mPEG.



Fonte: autor

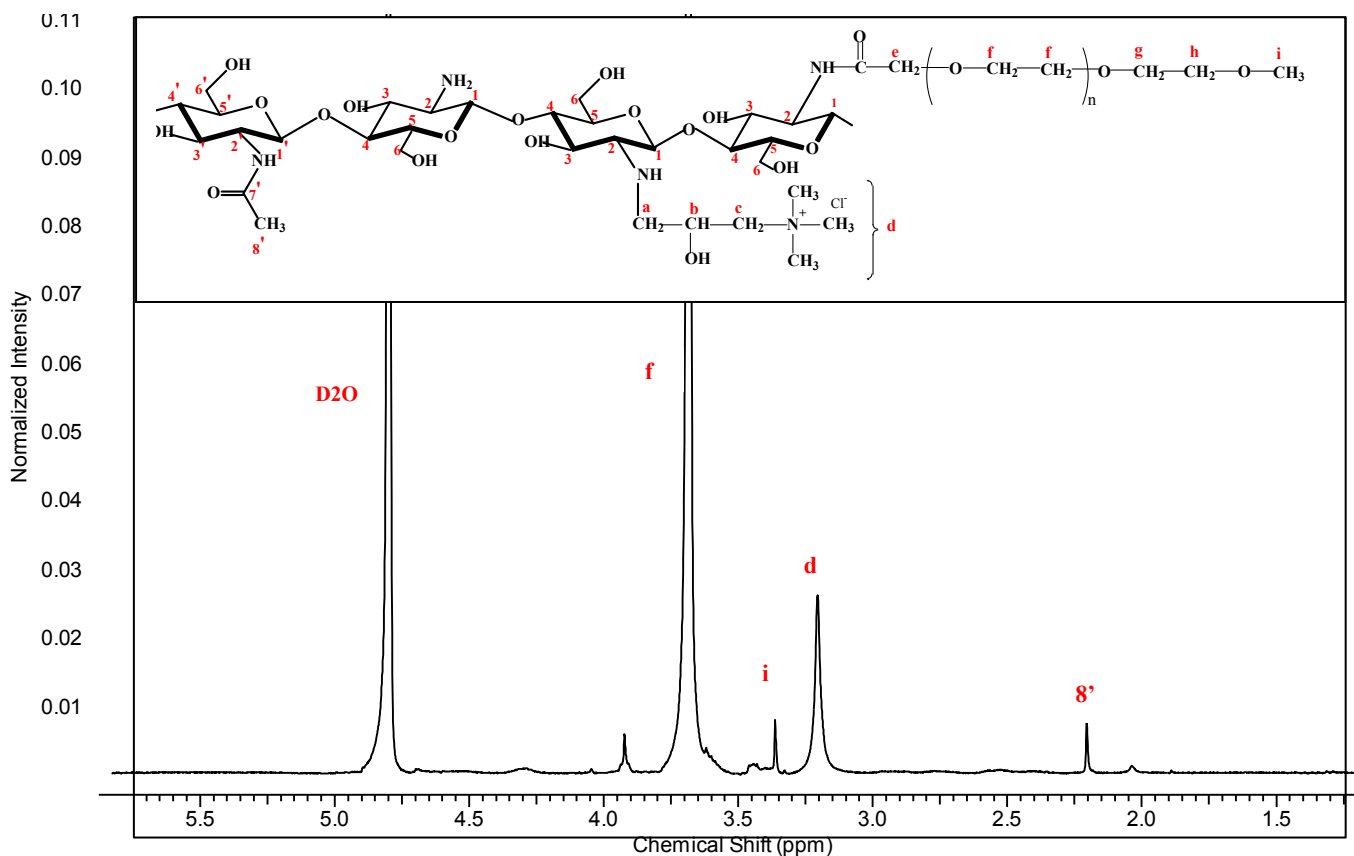
Na figura 28 estão representadas as porcentagens das unidades repetitivas do copolímero mPEG – g – QC 1,65:1.

Figura 28 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas no copolímero mPEG – g – QC 1,65: 1, em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) c desacetiladas – 43,4%; (c) unidades enxertadas com mPEG – 5,6%; (d) unidades cationizadas – 38%.



Fonte:autor

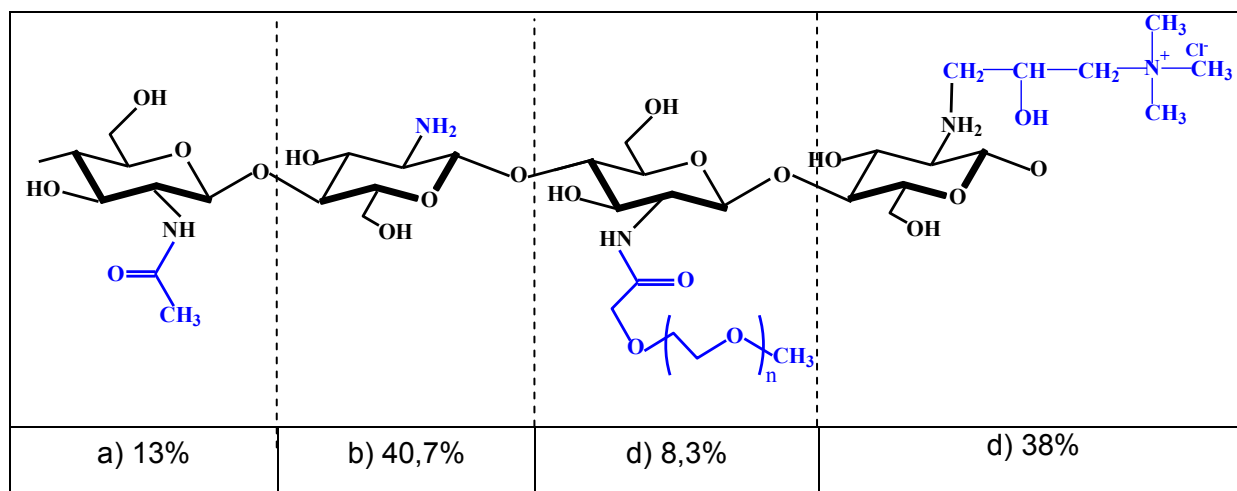
Figura 29 – Espectro de ^1H RMN do copolímero mPEG – g – QC 2,5:1 em D_2O em uma concentração de 5 mg/mL. A posição dos hidrogênios está representada, em cada unidade repetitiva, por números e letras de acordo com a localização do carbono ao qual se encontram ligados. Da esquerda para a direita encontram-se as unidades desacetiladas, unidades acetiladas, unidades cationizadas e unidades enxertadas com mPEG.



Fonte: autor

Na figura 30 estão representadas as porcentagens das unidades repetitivas do copolímero mPEG – g – QC 2,5:1.

Figura 30 – Frequência com que ocorrem as unidades repetitivas no copolímero mPEG – g – QC 2,5:1, em termos de porcentagem: (a) unidades acetiladas – 13%; (b) c desacetiladas – 40,7%; (c) unidades enxertadas com mPEG – 8,3% ; (d) unidades cationizadas – 38%.



Fonte:autor

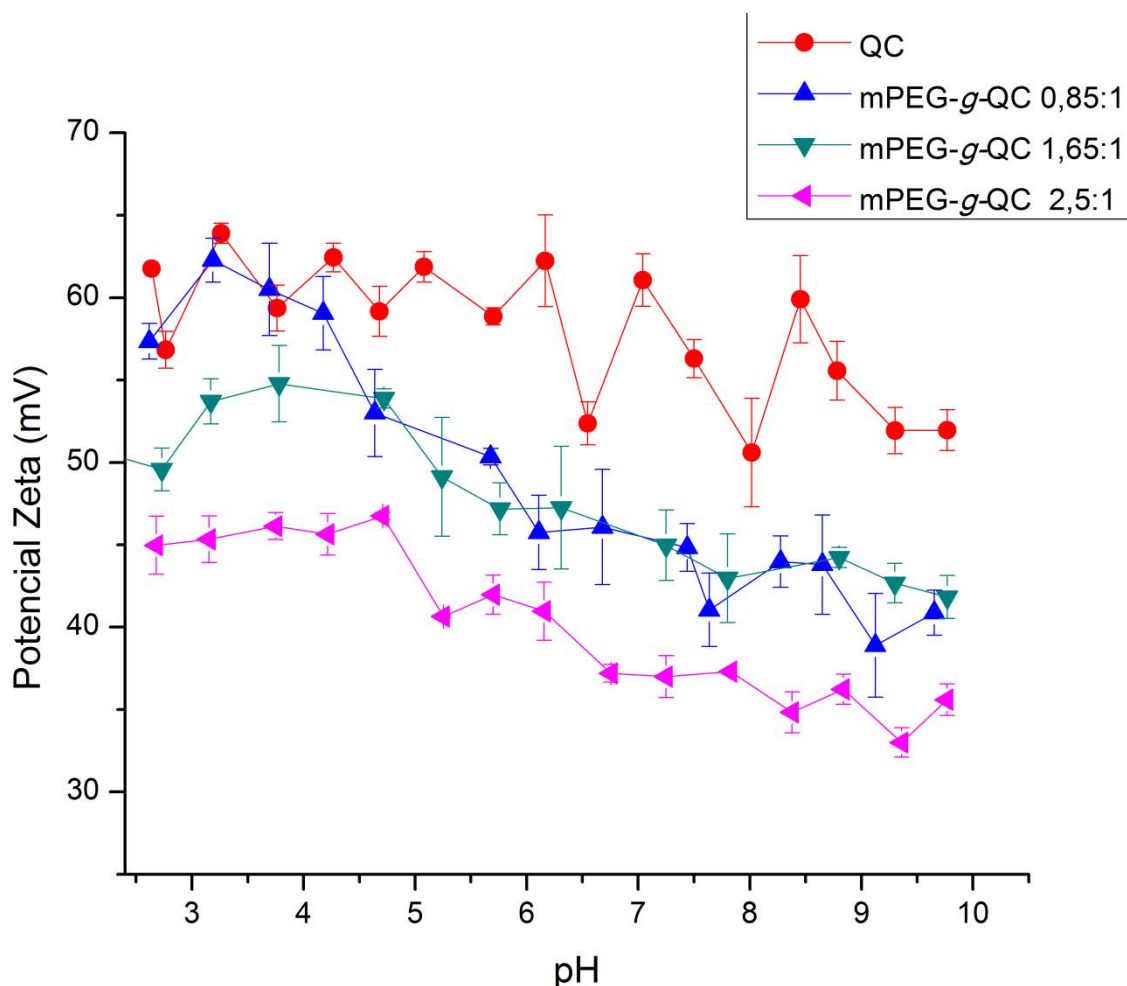
Outro aspecto importante observado foi a linearidade com que o GS aumentou em função da taxa de massa entre mPEG – COOH e QC. Quando a taxa de massa foi aumentada de 0,85:1 para 1,65:1, (1,94 vezes), o GS teve um aumento de 2 vezes e quando a taxa de massa foi aumentada de 1,65:1 para 2,5:1 (1,51 vezes), o GS teve um aumento de 1,48 vezes. Zhang et al. (2014) prepararam copolímeros de mPEG em quitosana cationizada com CGTMA, em condições bastante similares às utilizadas no presente trabalho, mas com um intervalo de taxas de massa maior, apresentadas na Tabela 4 (ZHANG et al., 2014). Com uma taxa molar de 2,5:1 eles obtiveram um GS de 9%, valor bem próximo ao obtido nesta tese, de 8,3%; Nas outras proporções estes autores também obtiveram boa relação entre a taxa de massa mPEG: QC e o GS (Tabela 4), o que sugere que a técnica de preparação dos copolímeros utilizada no presente trabalho apresenta um bom rendimento de conjugação, ou seja, uma boa relação entre a taxa de massa e o GS e boa reprodutibilidade, visto que obtivemos resultados bastante similares aos obtidos por Zhang et al. (2014) quando utilizamos a mesma taxa de massa entre mPEG e QC.

Tabela 3 – Comparação entre o grau de substituição em função da taxa de massa entre mPEG e QC, entre o presente trabalho (autor) e o trabalho de Zhang et al. (2014).

Autor		Zhang et al. (2014)	
mPEG:QC (m/m)	GS (%)	mPEG:QC (m/m)	GS (%)
0,85:1	2,8	2,5:1	9
1,65:1	5,6	5,0:1	13
2,5:1	8,3	7,5:1	27

Medidas de potencial zeta foram realizadas com o intuito de avaliar a densidade de cargas dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85: 1, mPEG – *g* – QC 1,65: 1 e mPEG – *g* – QC 2,5: 1 em um intervalo de pH de 2,5 a 10 (Figura 31). O potencial zeta dos copolímeros, assim como a QC, manteve-se alto e positivo até em meio neutro e alcalino (Figura 31), porém um pouco menor do que o potencial zeta da QC. Esta diminuição é provavelmente atribuída à redução da densidade eletrônica das moléculas de QC, pois quando o mPEG é enxertado, a quantidade de cargas da QC permanece constante mas o tamanho da molécula aumenta. Em outras palavras, a quantidade de carga por volume diminui após a introdução de mPEG. O potencial zeta dos copolímeros diminuiu em função do GS. O copolímero que possui o maior GS (mPEG – *g* – QC 2,5: 1) e, portanto, a menor densidade eletrônica, apresentou também o menor potencial zeta. Tanto a QC quanto os copolímeros tiveram um potencial zeta ligeiramente maior em meio ácido do que em meio neutro e alcalino devido à contribuição dos grupos amina estarem carregados positivamente nestas condições. Resultados similares foram encontrados por Germershaus et al. (2008), que mostraram que o enxerto de mPEG em quitosana cationizada levou a uma redução do potencial zeta dos complexos entre copolímeros e DNA. Estes autores atribuem esta redução do potencial zeta à blindagem estérica das cargas de superfície da quitosana cationizada pelas moléculas de mPEG (GERMERSHAUS et al., 2008).

Figura 31 – Curvas de potencial zeta em função do pH: quitosana cationizada (QC – curva em vermelho); copolímero mPEG – QC 0,85:1 (curva em azul); copolímero mPEG – QC 1,65:1 (curva em verde); copolímero mPEG – QC 2,5:1 (curva em rosa). As amostras foram dispersas em HCl 0,1 M, pH 2,5, em uma concentração de 1 mg/mL, e foram tituladas com NaOH 0,1 M até atingir pH 10 utilizando um titulador automático acoplado ao Zetasizer S.

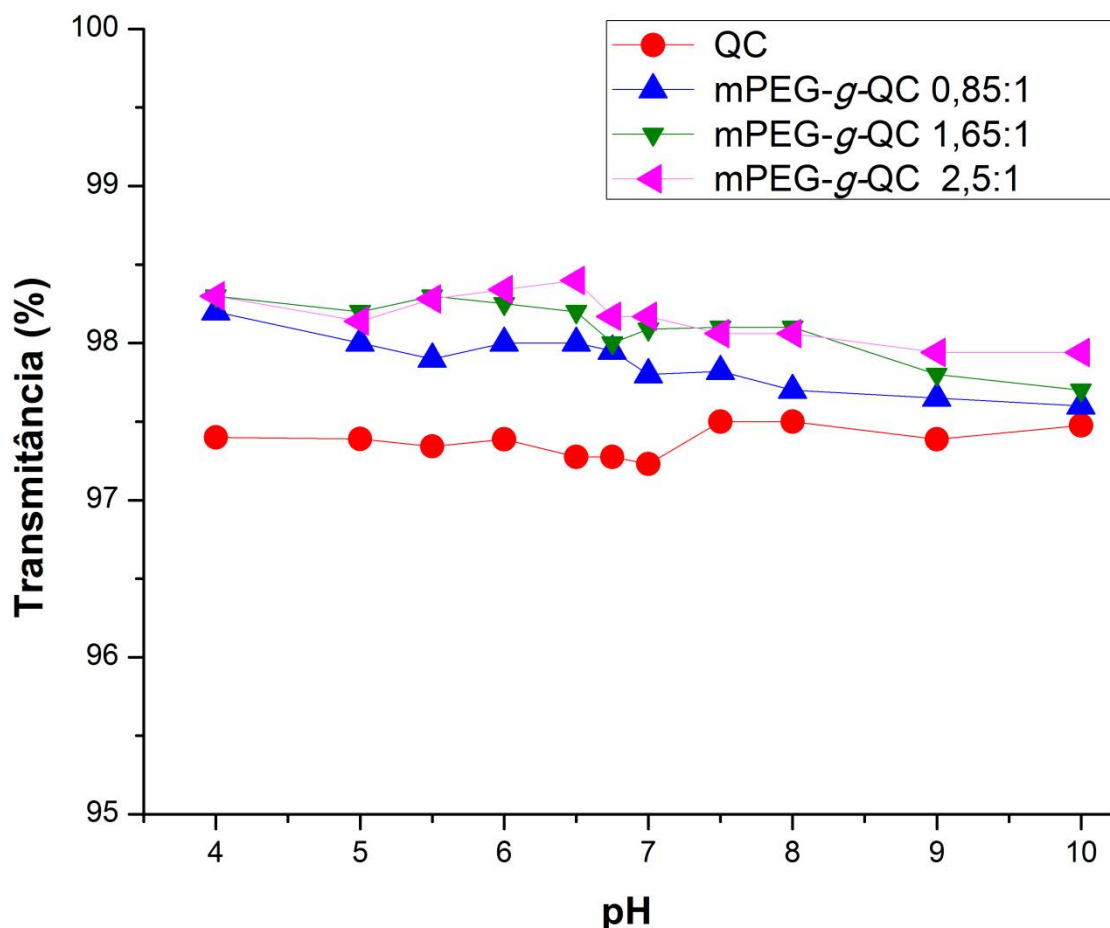


Fonte: autor

A solubilidade dos copolímeros mPEG – *g* – QC foi avaliada de forma qualitativa, em termos de transparência/turbidez de soluções aquosas de concentração de 1 mg/mL em um intervalo de pH de 4 a 10, utilizando um espectrofotômetro UV. Quanto mais alta é a transparência, em termos de transmitância, maior é a solubilidade da solução, enquanto uma baixa transparência significa precipitação ou agregação. Foi considerado, no presente trabalho, uma amostra solúvel quando a transmitância da solução for maior do que 90% quando comparadas à água pura. As curvas de transmitância das soluções dos copolímeros em função do pH está apresentado em um intervalo de transmitância de 95% a 100%, para que as curvas possam ser melhor visualizadas, visto que a transmitância

das amostras é alta e as curvas se sobreporiam se o intervalo de transmitância fosse de 0 a 100%. (Figura 32).

Figura 32 – Curvas de transmitância da quitosana (curva em preto) e quitosana cationizada (QC – curva em azul) em solução aquosa ácida, neutra e alcalina. As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL, em água e ajustes de pH foram realizados utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.



Fonte: autor

Comparando a transmitância das soluções poliméricas com a transmitância da água pura, foi possível observar que tanto a QC quanto os copolímeros mPEG – g – QC 0,85: 1, mPEG – g – QC 1,65: 1 e mPEG – g – QC 2,5: 1 são bastante solúveis em todo o intervalo de pH estudado e que os copolímeros apresentaram uma solubilidade ligeiramente maior que da QC. Apesar de a QC tenha apresentado uma excelente solubilidade, apenas ligeiramente menor que dos copolímeros, era possível observar partículas insolúveis em suspensão, em meio neutro e alcalino, que desapareceram após a introdução de mPEG. Portanto, conclui-se que os

copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85:1, mPEG – *g* – QC 1,65:1 e mPEG – *g* – QC 2,5:1 com graus de substituição de 2,85 %, 5,6 e 8,3%, respectivamente, foram completamente solúveis em meio ácido, neutro e alcalino em uma concentração de 1 mg/mL. A introdução de mPEG em quitosana vem sendo frequentemente aplicada para aumentar a solubilidade da quitosana em água e em solventes orgânicos e tem sido mostrado que a solubilidade dos copolímeros depende não só do grau de substituição de PEG, como também da massa molecular da quitosana e do PEG (MAO et al., 2005a; JEONG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010). Embora a citotoxicidade da QC e dos copolímeros não tenha sido avaliada no presente trabalho, foi uma propriedade considerada visto que estes copolímeros foram desenvolvidos para aplicação futura como um biomaterial.

Resultados similares aos do presente trabalho foram encontrados por Mao et. al (2005a), que prepararam copolímeros de mPEG e quitosana cationizada com iodeto de metila (GQ=40%) e também copolímeros de mPEG e quitosana não-modificada (400 KDa). As soluções aquosas (2 mg/mL) dos copolímeros de mPEG e quitosana cationizada permaneceram transparentes em todo o intervalo de pH estudado, independentemente da massa molecular do mPEG utilizada (500 Da e 5000 Da) e do grau de substituição, visto que até mesmo aqueles com grau de substituição menor do que 2% mantiveram-se transparentes. Em contrapartida, nenhum dos copolímeros de mPEG e quitosana não-modificada apresentaram soluções transparentes em pH 7, até mesmo aqueles com alta densidade de mPEG, o que foi atribuído pelos autores ao fato de as interações entre a quitosana e as moléculas de PEG serem mais fortes do que as que ocorrem entre as moléculas de PEG e da quitosana cationizada (MAO et al., 2005a). No entanto, neste caso, vale lembrar que Mao et al. (2005a) utilizaram uma quitosana de alta massa molecular (400 ~KDa), que apresenta inerentemente uma solubilidade muito baixa, portanto, só foi possível torná-la solúvel após a cationização e o enxerto de mPEG. Casettari et al conseguiram produzir copolímeros solúveis de quitosana não-modificada de baixa massa molecular com um GS de 20%. Apesar de a introdução de mPEG, por si só, ser capaz de tornar a quitosana solúvel utilizando altos GS, o mPEG não contribui para o aumento da densidade de cargas do copolímero, visto que os grupos amina continuarão desprotonados em meio neutro e alcalino. Ou seja, ainda que a molécula encontre-se completamente solúvel nestas condições devido às cadeias

hidrofílicas de mPEG, ela não terá cargas para estabelecer interações eletrostáticas com moléculas negativamente carregada, por isso a importância da cationização se o objetivo é estabelecer interações eletrostáticas em meio aquoso neutro e alcalino.

O aumento da solubilidade da quitosana e da quitosana cationizada em solventes orgânicos após introdução de mPEG também tem sido reportado. Jeong et al. (2005) preparam copolímeros de enxerto de mPEG (2000 Da) em quitosana de baixa massa molecular (10000 Da, GD=97%) solúvel em água (em pH de 4 a 11), mas insolúvel em solventes orgânicos, com o intuito de melhorar a solubilidade nestes solventes. A solubilidade dos copolímeros, com grau de substituição de 5 %, 10%, 15% e 20%, foi avaliada em solventes orgânicos em um intervalo de concentração de 1 a 5 mg/mL. Todos os copolímeros foram prontamente solúveis em DMSO, em todo o intervalo de concentração testado e apresentaram boa solubilidade em DMF, acetona e etanol, com exceção do copolímero com grau de substituição de 5%, que teve a transparência diminuída gradualmente com o aumento da concentração das soluções (JEONG et al., 2008). Embora a solubilidade e a biocompatibilidade de copolímeros de mPEG e quitosana sejam aumentados em função do grau de substituição (Casettari et al., 2010), quanto maior a densidade de mPEG menor é a densidade eletrônica e, portanto menor é o potencial catiônico do copolímero, como mostrado em nossos resultados de potencial zeta dos copolímeros quando comparados à QC (Figura 18). Em conclusão, estudos prévios poderiam ser realizados para que se possa obter derivados nos quais possa haver um balanço entre o GQ e o GS, ou seja, com um grau de cationização suficientemente grande para fornecer um bom potencial catiônico mas que seja suficientemente baixo para não causar um grande aumento da citotoxicidade do copolímero, e, paralelamente, um GS que seja suficientemente grande para inibir a citotoxicidade da QC mas que seja suficientemente baixo para não reduzir significativamente a densidade eletrônica do copolímero.

A introdução de PEG causa uma grande redução da viscosidade de soluções aquosas de quitosana. A viscosidade dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85: 1 (0,97 cP), mPEG – *g* – QC 1,65: 1 (0,99 cP) e mPEG – *g* – QC 2,5: 1 (0,99 cP) foram significativamente mais baixas que a viscosidade da quitosana (2,36 cP) e da QC (1,6 cP) e foram praticamente iguais à viscosidade de soluções de mPEG – COOH (0,97 cP). As longas cadeias carbônicas do PEG são altamente hidratadas e, essa

extensa camada de solvatação permite a livre movimentação das moléculas de PEG, evitando assim a aproximação entre as cadeias de quitosana e o estabelecimento de interações de hidrogênio intermoleculares (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004).

Tabela 4 – Valores de massa molecular ponderal média (M_w) determinada por espalhamento de luz estático e dn/dc para os copolímeros de enxerto mPEG-*g*-QC 0,85:1, mPEG-*g*-QC 1,65:1 e mPEG-*g*-QC 2,5:1. As medidas foram realizadas a partir de dispersões poliméricas preparadas em tampão acetato pH 4,5 em um intervalo de concentração de 0,25-1,25 mg/mL.

Copolímeros	GS (%)	(M_w - KDa)	dn/dc
mPEG- <i>g</i> -QC 0,85:1	2,8	$191 \pm 9,23$ ($R^2=0,99$)	$0,161 \pm 8,7 \cdot 10^{-3}$
mPEG- <i>g</i> -QC 1,65:1	5,6	$158 \pm 12,3$ ($R^2=0,84$)	$0,143 \pm 5,4 \cdot 10^{-3}$
mPEG- <i>g</i> -QC 2,5:1	8,3	$184 \pm 5,43$ ($R^2=0,83$)	$0,120 \pm 7,1 \cdot 10^{-3}$

A massa molecular ponderal média (M_w) dos copolímeros mPEG – *g* – QC 0,85: 1 , mPEG – *g* – QC 1,65: 1 e mPEG – *g* – QC 2,5: 1 foram determinadas por medidas de espalhamento de luz estático a partir de gráficos de Debye, utilizando o tolueno como padrão de espalhamento. Como já discutido anteriormente, a determinação da massa molecular requer o valor específico do dn/dc e no caso de polímeros modificados ou copolímeros, o valor de dn/dc depende da estrutura química e do grau de modificação, por isso foram determinados individualmente para cada copolímero nas mesmas condições das medidas de espalhamento. Os valores de M_w (em KDa) e do incremento do índice de refração (dn/dc) estão apresentados na tabela 4. Aplicando-se o valor de dn/dc , determinado experimentalmente para cada um dos copolímeros, à equação de Rayleigh (equação x da seção experimental), a M_w dos copolímeros foi de 191 KDa para o mPEG – *g* – QC 0,85: 1, 158 KDa para o mPEG – *g* – QC 1,65: 1 e 184 KDa para o mPEG – *g* – QC 2,5: 1. Considerando o GS dos copolímeros, que foi crescente em função das taxas de massa de mPEG:QC, os valores de M_w não correspondem aos valores de GS dos copolímeros. O copolímero de menor GS (2,8%) apresentou a menor M_w , 191 KDa. Em termos gerais é possível dizer que a medida de espalhamento de luz estático não foi sensível o suficiente para determinar com exatidão a M_w dos copolímeros. Há discussões na literatura a respeito das dificuldades para determinar a M_w de

copolímeros do tipo escova (“brush copolymers”) por técnicas que utilizam espalhamento de luz, pois apresentam estrutura complexa. Técnicas como GPC (Cromatografia de Permeação em Gel), espalhamento de luz e viscosidade são normalmente empregada para a determinação da M_w e conformação molecular de polímeros. Entretanto, estas técnicas são efetivas para polímeros de cadeia linear mas frequentemente limitadas quando aplicadas para a determinação da M_w de polímeros de estrutura complexa e de composição heterogênea que envolvem ramificações, como por exemplo de copolímeros em escova preparados no presente trabalho, devido à diversas fontes de erro envolvidas. Sheiko et. al (2008) recomendam uma combinação de técnicas de espalhamento e modelos macromoleculares para caracterizar a conformação da estrutura central do copolímero e das cadeias laterais em diferentes escalas de distância. E, complementarmente, também recomendam a utilização de AFM (Microscopia de Força Atômica), que permite a detalhada caracterização das ramificações laterais individualmente, e a técnica de Lungmuir-Blodgett, que fornece informações sobre a densidade de massa, ou seja, a relação entre a massa e área (SHEIKO; SUMERLIN; MATYJASZEWSKI, 2008). Em conclusão, a técnica de espalhamento de luz utilizada no presente trabalho, para a determinação de M_w dos copolímeros, não parece adequada para a caracterização de polímeros do tipo “escova” e os dados obtidos não parecem representar o valor real de M_w .

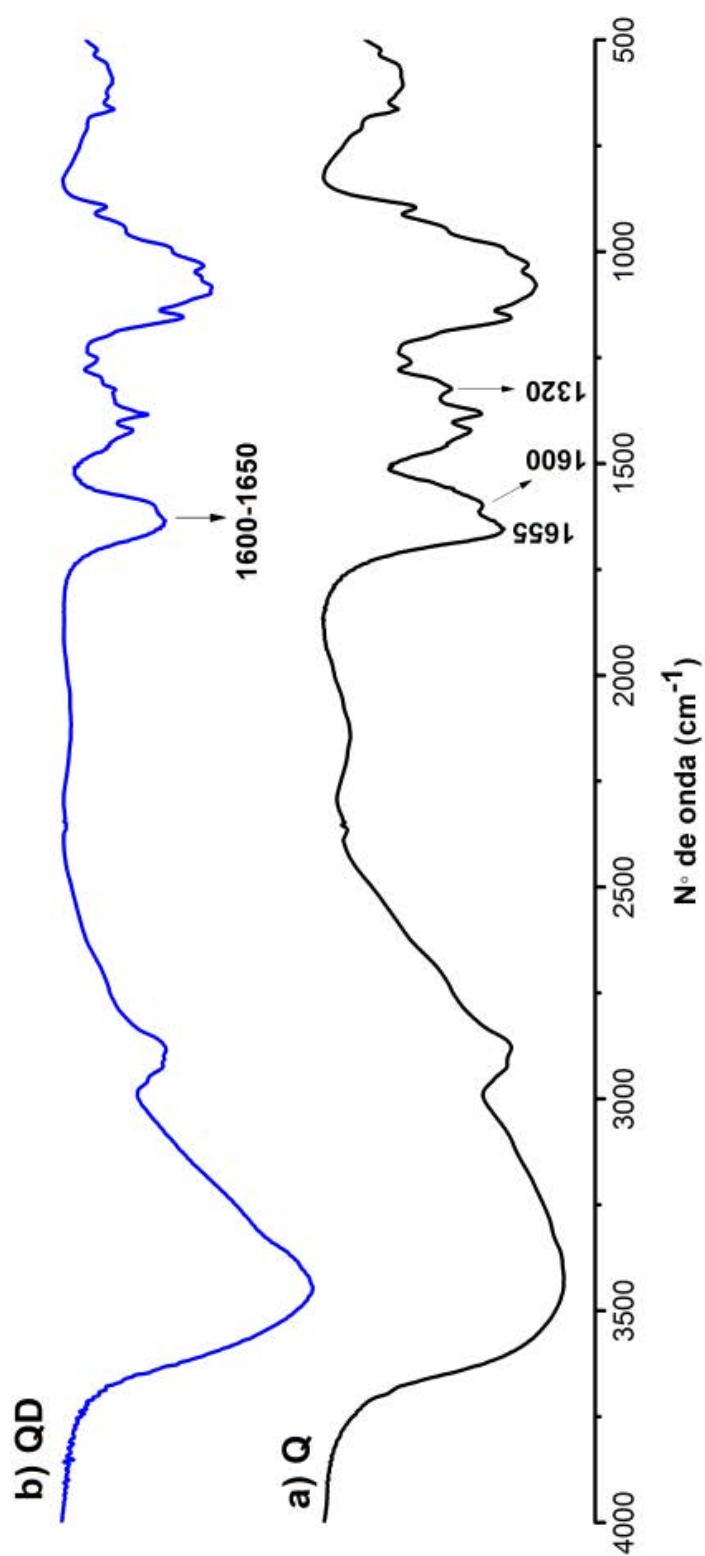
5.4 Desacetilação da quitosana

A desacetilação da quitosana foi realizada com o intuito de aumentar a densidade de grupos amina na quitosana e, portanto, torná-la mais reativa para modificações e interações eletrostáticas. Para isso algumas caracterizações foram realizadas, a fim de observar as mudanças ocorridas após o processo de desacetilação. Embora a quitosana comercial utilizada tenha um grau de desacetilação (GD) de aproximadamente 87%, após a desacetilação alcalina realizada no presente trabalho, será chamada de quitosana desacetilada (QD). A desacetilação alcalina da quitosana comercial, realizada em meio fortemente alcalino (NaOH 40%), foi primeiramente confirmada a partir dos espectros de FTIR, pelo desaparecimento de bandas de amida e pelo aparecimento de bandas de amina primária no espectro da QD (Figura 28b), absorções presentes anteriormente na

quitosana (Figura 28a). As principais bandas utilizadas como referência para a identificação do GD da quitosana estão relacionadas ao grupo amida presente nas unidades acetiladas (*N*-acetil-*D*-glicosamina), tais como amida I, amida II e amida III (DONG et al., 2001). Uma banda de amida I foi observada no espectro da quitosana, em 1655 cm^{-1} . A banda de amida I ocorre em todas as amidas devido à vibração de estiramento da ligação C=O do grupo amida. Em decorrência do efeito de ressonância, a absorção da carbonila das amidas ocorre em frequências menores quando comparado com a absorção da carbonila presente em outros grupos funcionais (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Observa-se que a banda de amida I em 1655 cm^{-1} , presente na quitosana, praticamente desaparece na QD, dando lugar a uma banda única e alargada centrada em 1635 cm^{-1} , referente à deformação N-H das aminas primárias adicionais que surgiram após a desacetilação. Uma estreita banda de amina já estava presente na quitosana, em 1600 cm^{-1} , referente a deformação N-H. Bandas de amida II, que originam-se da deformação angular de N-H e da deformação axial C-N do grupo C-N-H, ocorre geralmente entre 1570 cm^{-1} e 1515 cm^{-1} para amidas secundárias acíclicas. No entanto, não ocorreram bandas de amidas II em nenhum dos espectros, visto que normalmente estas absorções desaparecem em moléculas com um GD maior que 50% (DONG et al., 2001). Uma banda de amida III também aparece no espectro da quitosana, em 1320 cm^{-1} (Fig. 33a), que ainda aparece após a desacetilação, no espectro da QD, mas bem menor quando comparada à quitosana. A banda larga que aparece em ambos os espectros, na região de $3000\text{-}3600\text{ cm}^{-1}$, é referente à vibração de estiramento dos grupos OH e teve a sua largura e intensidade reduzidas e essa redução ocorre conforme aumenta o GD da quitosana devido à cristalização (MIMA et al., 1983). Em conclusão, a ausência das bandas de amida I e III na QD confirma o aumento do GD na QD após a hidrólise alcalina, corroborando os resultados de titulação potenciométrica, a partir do qual se determinou um aumento de 26% no GD da QD quando comparado a Q (dados mostrados logo abaixo).

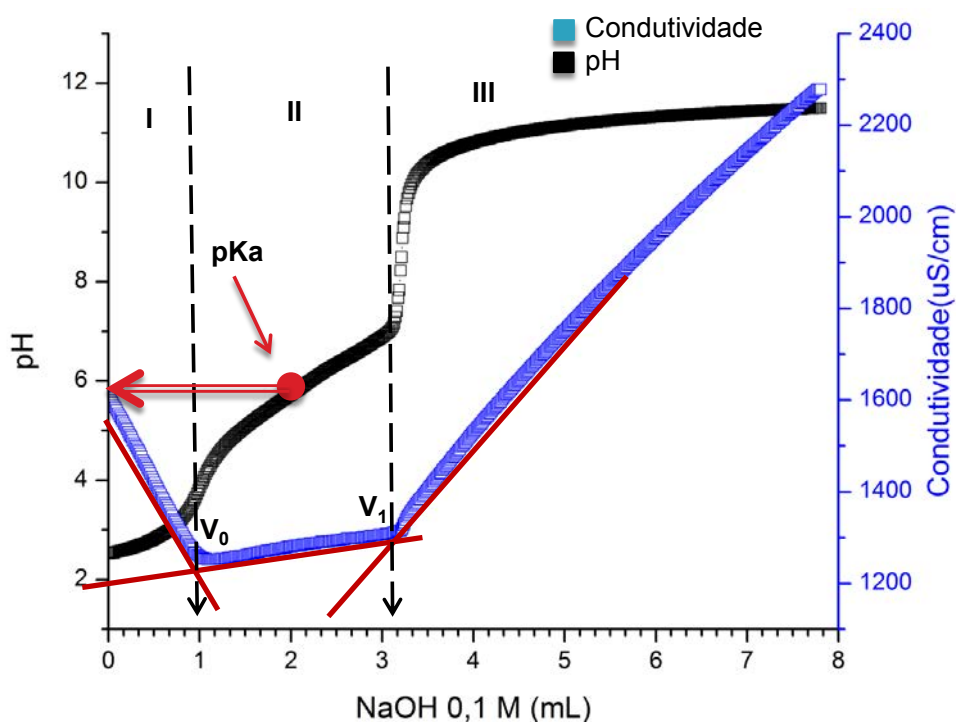
Figura 33 – Espectros de FTIR: (a) quitosana; (b) quitosana desacetilada.



Fonte: autor

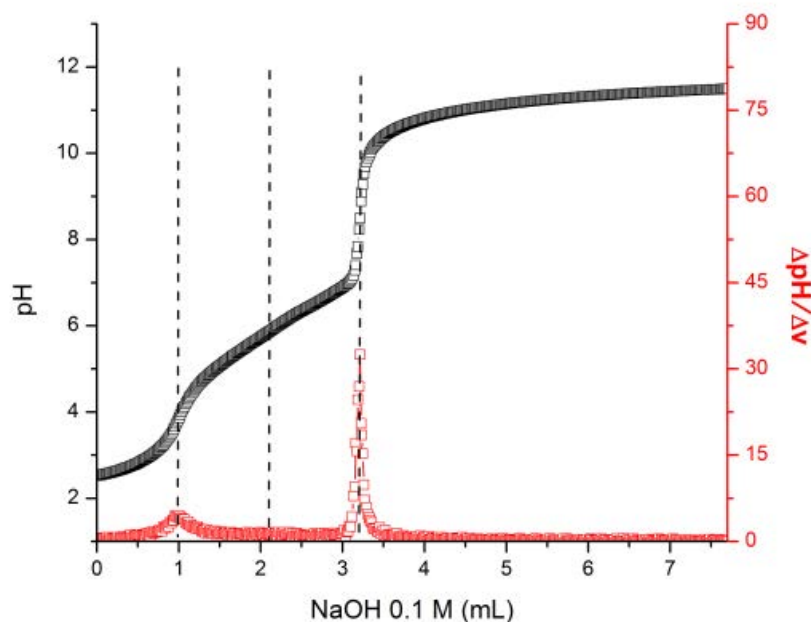
Para a determinação da densidade de grupos amina na quitosana antes e após a desacetilação, foram realizadas medidas condutimétricas a partir soluções aquosas ácidas de quitosana e QD, em uma concentração de 1 mg/mol. Assim, as soluções poliméricas (pH 2,5) foram tituladas com NaOH 0,1 M até atingir pH 11. Simultaneamente foram realizadas medidas de potenciometria, a partir das quais foi determinado o pKa da quitosana e da QD. Ainda que as curvas de potenciometria também são bastante utilizadas para a determinação da densidade de grupos funcionais, neste trabalho, adotamos a curva condutimétrica para estas determinações e a curva potenciométrica foi usada para o cálculo do pKa das amostras. As curvas de titulação condutimétrica-potenciométrica simultâneas da quitosana e QD estão apresentadas nas Figuras 34 e 36, respectivamente. Para a determinação precisa do pKa, foi calculada a primeira derivada da curva de potenciometria para a quitosana (Figura 35) e para a QD (Figura 37).

Figura 34 – Curva de titulação potenciométrica-condutimétrica da quitosana dispersa em HCl 0,1 M, em uma concentração de 1 mg/mL, titulada com NaOH 0,1 M. A curva preta é de potenciometria e a azul de condutimetria. As linhas pontilhadas delimitam a área de desprotonação dos grupos amina da quitosana e a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição de ambas as curvas. O volume de NaOH 0,1 M gasto para neutralizar os grupos amina da quitosana está delimitado pelo volume inicial e final na curva de condutividade (V_0 e V_1) calculados por regressão linear.



Observam-se nas curvas de condutimetria-potenciometria simultâneas, três regiões distintas (I, II e III) separadas por dois pontos de transição (V_0 e V_1). A primeira região (I) corresponde a neutralização do excesso de HCl presente na solução. A região II corresponde a desprotonação de NH_3^+ da quitosana e QD à NH_2 . O primeiro ponto de transição (V_0) determina, portanto, o fim da neutralização do excesso de HCl e o início da desprotonação de NH_3^+ . A terceira região (III) é referente ao excesso de titulante na solução (NaOH) e o segundo ponto de transição significa, portanto, o fim da desprotonação de NH_3^+ , o ponto de equivalência da titulação. Os pontos de transição foram determinados por regressão linear das curvas de condutimetria e calculando a primeira derivada para as curvas potenciométricas.

Figura 35 – Primeira derivada da curva de potenciometria da quitosana, a partir da qual foi calculado o pKa da quitosana, que é o ponto médio entre os pontos de inflexão da curva de pH, indicado pela linha pontilhada central.

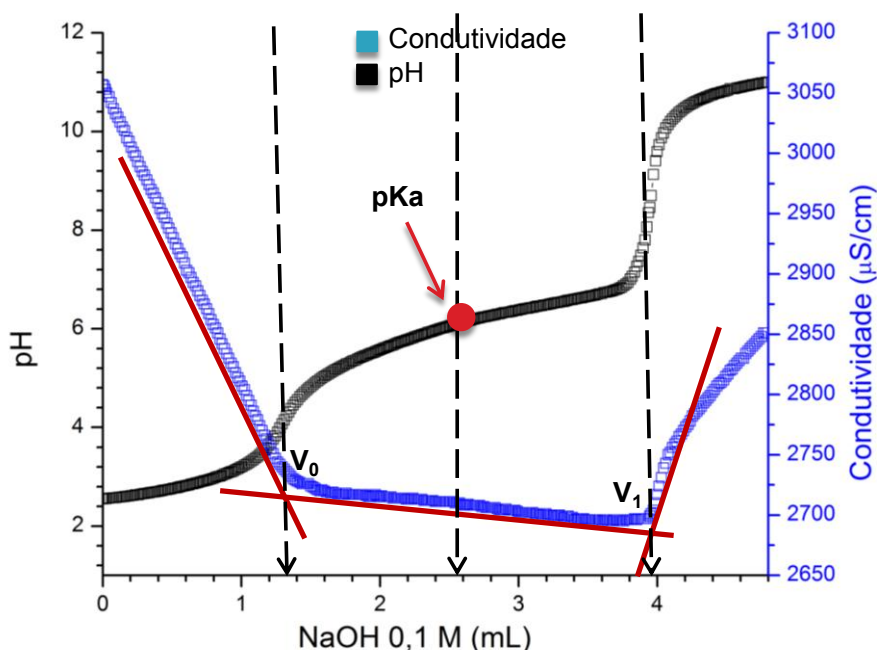


Fonte: autor

Considerando agora os pontos de transição em termos de condutimetria, a desprotonação de NH_3^+ da quitosana iniciou-se em $x=0,97$ (V_0) e finalizou-se em

$x=3,02$ (V_1) (Fig. 34) e para a QD iniciou-se em $x=1,34$ (V_0) e finalizou-se em $x=3,94$ (V_1) (Fig. 3). A diferença entre os dois pontos de transição ao longo do eixo x (V_1-V_0) é o volume de NaOH 0,1 M gasto para desprotonar os grupos amina da quitosana e da QD, portanto, refletem a quantidade de NH_2 presente em ambos os polímeros. A partir do volume de NaOH gasto para atingir o ponto de equivalência, é possível determinar a densidade de grupos NH_2 da quitosana e da QD, que foi 4,11 mmol/g e 5,2 mmol/g, respectivamente. Após o processo de desacetilação da quitosana comercial utilizada no presente trabalho (75-85%), o GD aumentou em aproximadamente 25%, o que significa um proeminente aumento no número de grupos NH_2 na molécula, deixando a quitosana praticamente 100% desacetilada.

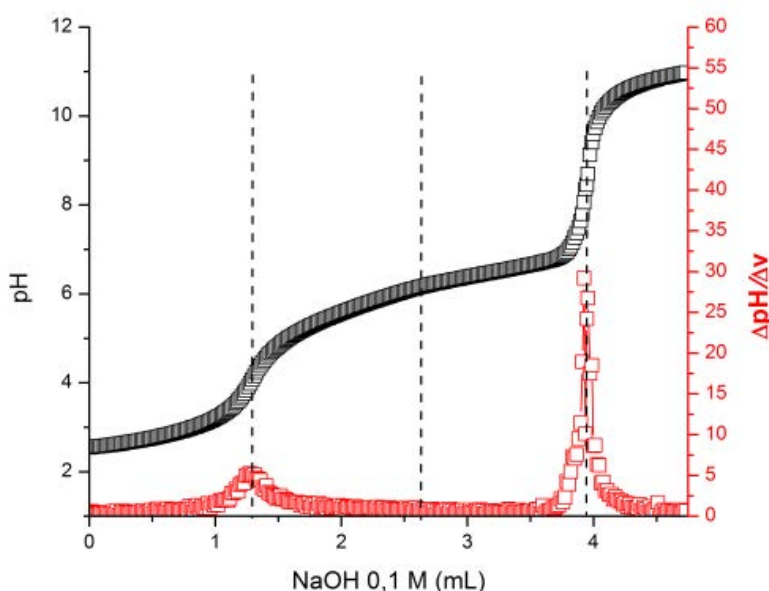
Figura 36 – Curva de titulação potenciométrica-condutimétrica da quitosana desacetilada (QD) dispersa em HCl 0,1 M, em uma concentração de 1 mg/mL, titulada com NaOH 0,1 M. A curva preta é de potenciometria e a azul de condutimetria. As linhas pontilhadas delimitam a área de desprotonação dos grupos amina da quitosana e a intersecção entre as linhas vermelhas indicam os pontos de transição de ambas as curvas. O volume de NaOH 0,1 M gasto para neutralizar os grupos amina da quitosana está delimitado pelo volume inicial e final na curva de condutividade (V_0 e V_1) calculados por regressão linear.



Fonte: autor

Considerando agora as curvas de potenciometria, a partir dos pontos de inflexão das curvas, é possível afirmar que a desprotonação de NH_3^+ iniciou-se em pH 3,73 e finalizou-se em pH 8,5 para a quitosana (Fig. 34) e iniciou-se em pH 3,99 e finalizou-se em pH 8,06 para a QD (Fig 36). Os pontos de inflexão das curvas de pH foi determinado pelo método da primeira derivada e o ponto médio entre esses pontos de inflexão da curva de pH é o pKa, ou seja, o pH no qual 50% dos grupos amina estão protonados (NH_3^+) e 50 % encontram-se desprotonados (NH_2). A primeira derivada da curva de potenciometria da quitosana e da QD estão apresentadas nas Figuras 35 e 37, respectivamente. Dessa forma, o pKa da quitosana foi determinado em 6,11 e o pKa da QD 6,02. Esses valores então dentro dos valores de referência reportados na literatura para a quitosana, de 5,5 a 6,5 (MOURYA; INAMDAR, 2009) e não foram significativamente alterados após a desacetilação.

Figura 37 – Primeira derivada da curva de potenciometria da quitosana desacetilada (QD) a partir da qual foi calculado o pKa da quitosana, que é o ponto médio entre os pontos de inflexão da curva de pH, indicado pela linha pontilhada central.

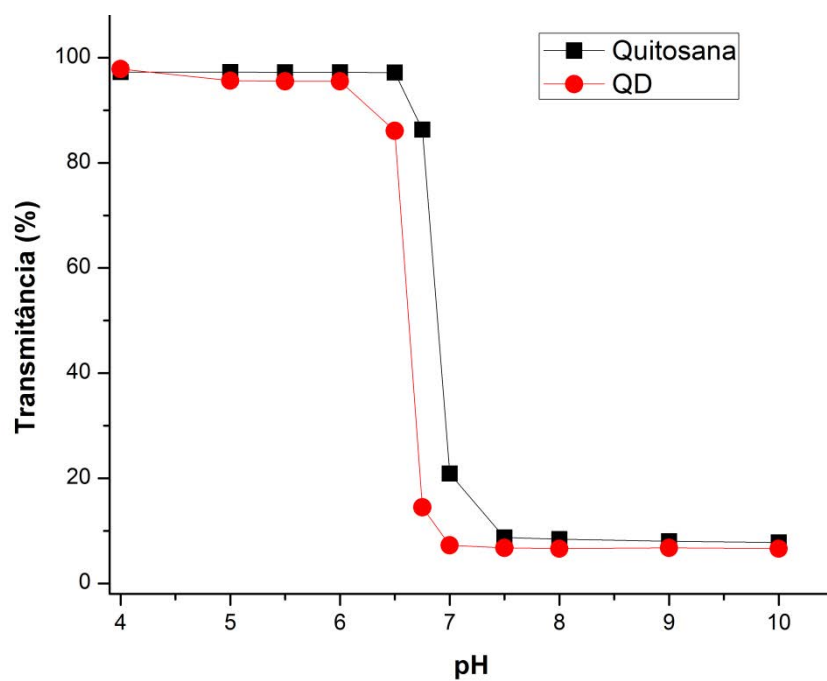


Fonte: autor

Baseado nos resultados de titulação condutimétrica, o GD foi de aproximadamente 100%. A desacetilação causa um aumento da solubilidade e uma redução na viscosidade de soluções de quitosana. Quanto maior o GD, mais solúvel e menos rígida é a molécula de quitosana e, portanto, mais baixa é a viscosidade da solução. A viscosidade da QD (2,1 cP), no presente trabalho, foi mais baixa que a viscosidade da quitosana (2,6 cP). Isto ocorre porque as ligações de hidrogênio intramolecular efetuadas entre os grupos acetil e as hidroxilas, somadas ao impedimento estérico desses grupos, limitam a rotação do grupo acetamida causando certa rigidez à molécula (WANG et al., 1991). Um outro fator que também pode ter contribuído para a redução da viscosidade é a hidrólise das cadeias de quitosana devido às condições da reação. A degradação das cadeias pode ocorrer durante o processo de desacetilação devido ao tratamento fortemente alcalino, o que causa uma redução do tamanho das cadeias poliméricas. Entretanto, pode-se minimizar ou evitar a degradação utilizando temperaturas mais baixas. Mima et al. (1983) utilizaram 60 e 110 °C e obtiveram, para amostras com um GD similares, uma massa molecular significativamente menor para as amostras desacetiladas a 110 °C (MIMA et al., 1983).

Visto que a desacetilação causa um aumento da solubilidade da molécula, como discutido anteriormente, foram realizados testes de solubilidade da quitosana e da QD para comparação. No gráfico de transmitância da quitosana e QD em função do pH (Figura 38) observa-se o contrário do que é reportado na literatura, pois, as soluções de QD apresentaram uma transmitância ligeiramente menor do que a solução de quitosana em todo o intervalo de pH estudado. O que é explicável devido à coloração escura apresentada pela solução de QD, que mesmo após realizar cinco vezes a precipitação em acetona e posteriormente purificar por diálise durante sete dias, a solução manteve-se escura. A coloração marrom escuro se deve, provavelmente, a subprodutos da reação de desacetilação não identificados. Devido à tentativas ineficientes de purificação da QD, este material não foi utilizado como fonte de quitosana para modificações. Mais estudos são necessários para a elucidação da reação de desacetilação e conclui-se que este material aqui obtido não é adequado para a preparação de quitosana cationizada e copolímeros..

Figura 38 – Curvas de transmitância da quitosana (em preto) e quitosana desacetilada (QD - em vermelho).em solução aquosa ácida, neutra e alcalina. As amostras foram dispersas, em uma concentração de 1 mg/mL em água ultra pura e ajustes de pH foram realizados utilizando HCl 0,1 M e NaOH 0,1 M.



Fonte: autor

6 Conclusão

A quitosana cationizada, preparada pela reação da quitosana (Mw 80-120 KDa) com o cloreto de glicidil trimetilamônio (CGTMA), foi obtida com sucesso, com um grau de cationização de 38%. Os copolímeros de enxerto de mPEG (5000 Da) e quitosana cationizada, preparados em diferentes taxas de massa de mPEG para QC, apresentaram uma relação linear entre a taxa de mPEG e o grau de substituição obtido e um rendimento de conjugação de mPEG de 87,4 % para o copolímero mPEG – *g* – QC 0,85:1, de 86% para o copolímero mPEG – *g* – QC 1,65:1 e 83% para o copolímero mPEG – *g* – QC 2,5%. A quitosana cationizada e os copolímeros foram completamente solúveis em meio aquoso, em todo o intervalo de pH avaliado (4-10) e apresentaram um potencial zeta alto e positivo (+30 a +65 mV) ao longo do intervalo de pH estudado (2,5-10). Portanto, conclui-se que as modificações químicas realizadas na molécula de quitosana foram realizadas com sucesso, de forma que a solubilidade dos derivados produzidos possibilita a sua aplicação em meio aquoso de pH neutro e alcalino, nos quais a quitosana é normalmente insolúvel.

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, Nov. 2004.
- AIBA, S.-I. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 4, p. 225-228, Aug. 1992.
- ARAKI, J.; ZHAO, C.; ITO, K. Efficient production of polyrotaxanes from α -cyclodextrin and poly(ethylene glycol). **Macromolecules**, v. 38, n. 17, p. 7524-7527, Aug. 2005.
- ARANAZ, I. et al. Functional characterization of chitin and chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, n. 2, p. 203-230, May 2009.
- BALLARÍN-GONZÁLEZ, B.; EBBESEN, M. F.; HOWARD, K. A. Polycation-based nanoparticles for RNAi-mediated cancer treatment. **Cancer Letters**, v. 352, n. 1, p. 66-80, Sept. 2013.
- BISWAS, S. et al. Nucleophilic cationization reagents. **Tetrahedron Letters**, v. 51, n. 13, p. 1727-1729, 2010.
- BOONSONGRIT, Y.; MITREVEJ, A.; MUELLER, B. W. Chitosan drug binding by ionic interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 62, n. 3, p. 267-274, Apr. 2006.
- BOWMAN, K. et al. Gene transfer to hemophilia A mice via oral delivery of FVIII–chitosan nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 132, n. 3, p. 252-259, Dec. 2008.
- CARDILE, V. et al. Improved adhesion to mucosal cells of water-soluble chitosan tetraalkylammonium salts. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 362, n. 1/2, p. 88-92, Oct. 2008.
- CASETTARI, L. et al. Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2854-2865, 2010.
- CHANG, S.-H.; HUANG, J.-J. Biodegradability and anticoagulant properties of chitosan and sulfonated chitosan films coated on TiNi alloys. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, n. 23, p. 4959-4963, July 2012.
- CHANG, S.-J. et al. Evaluation of chitosan-g-PEG copolymer for cell anti-adhesion application. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 27, n. 1, p. 41-46, 2007.
- CUERO, R. G.; OSUJI, G.; WASHINGTON, A. N-carboxymethylchitosan inhibition of aflatoxin production: role of zinc. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 6, p. 441-444, June 1991.

CURTI, E.; BRITTO, D. de; CAMPANA FILHO, S. P. Methylation of chitosan with iodomethane: effect of reaction conditions on chemoselectivity and degree of substitution. **Macromolecular Bioscience**, v. 3, n. 10, p. 571-576, Sept. 2003.

da SILVA PEREZ, D.; MONTANARI, S.; VIGNON, M. R. TEMPO-mediated oxidation of cellulose III. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1417-25, 2003.

DAL POZZO, A. et al. Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-crosslinked reacetylated chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, n. 2, p. 201-206, June 2000.

de BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A novel method for obtaining a quaternary salt of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 2, p. 305-310, June 2007.

de BRITTO, D. et al. Quaternary salts of chitosan: history, antimicrobial features, and prospects. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, 2011. doi:10.1155/2011/312539.

DE NOOY, A. E. J.; BESEMER, A. C.; VAN BEKKUM, H. Highly selective tempo mediated oxidation of primary alcohol groups in polysaccharides. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, v. 113, n. 3, p. 165-166, 1994.

DOMARD, A.; RINAUDO, M.; TERRASSIN, C. New method for the quaternization of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8, n. 2, p. 105-107, 1986.

DONG, Y. et al. Determination of degree of substitution for N-acylated chitosan using IR spectra. **Science in China Series B: Chemistry**, v. 44, n. 2, p. 216-224, Apr. 2001.

DÜNNHAUPT, S. et al. S-protected thiolated chitosan for oral delivery of hydrophilic macromolecules: evaluation of permeation enhancing and efflux pump inhibitory properties. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 5, p. 1331-1341, May 2012.

EL-SAKHAWY, M.; MILICHOVSKY, M. Oxycellulose modification. **Polymer International**, v. 49, n. 8, p. 839-844, 2000.

GERMERSHAUS, O. et al. Gene delivery using chitosan, trimethyl chitosan or polyethyleneglycol-graft-trimethyl chitosan block copolymers: establishment of structure-activity relationships in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 125, n. 2, p. 145-154, Jan. 2008.

GOROCHOVCEVA, N.; MAKUŠKA, R. Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly(ethylene glycol) graft copolymers. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 4, p. 685-691, Apr. 2004.

GRUŠKIENE, R.; ČIUTA, G.; MAKUŠKA, R. Grafting of poly(ethylene glycol) to chitosan at c(6) position of glucosamine units via "click chemistry" reactions. **Chemija**, v. 20, n. 4, p. 241-249, Jan. 2009.

HAACK, V. et al. Starch derivatives of high degree of functionalization, 8. Synthesis and flocculation behavior of cationic starch polyelectrolytes. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 287, n. 8, p. 495-502, 2002.

HERMANSON, G. T. **Bioconjugate techniques**. San Diego: Academic Press, 1996. 785 p.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 87-94, 1991.

IAMAZAKI, E. et al. Preparation of substituted ionic carbohydrate polymers and their interactions with ionic surfactants. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 1, p. 33-40, July 2004.

ISOGAI, A.; KATO, Y. Preparation of polyuronic acid from cellulose by tempo-mediated oxidation. **Cellulose**, v. 5, n. 3, p. 153-164, Sept. 1998.

ISOGAI, A.; SAITO, T.; FUKUZUMI, H. TEMPO-oxidized cellulose nanofibers. **Nanoscale**, v. 3, n. 1, p. 71-85, 2011.

JARMILA, V.; VAVRÍKOVÁ, E. Chitosan derivatives with antimicrobial, antitumour and antioxidant activities--a review. **Current Pharmaceutical Design**, v. 17, n. 32, p. 3596-3607, 2011.

JEON, S. I.; ANDRADE, J. D. Protein-surface interactions in the presence of polyethylene oxide: II. Effect of protein size. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 142, n. 1, p. 159-166, Mar. 1991.

JEONG, Y.-I. et al. Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted water-soluble chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 2, p. 282-289, Feb. 2008.

JIA, Z.; SHEN, D.; XU, W. Synthesis and antibacterial activities of quaternary ammonium salt of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 1, p. 1-6, June 2001.

JIANG, G. B. et al. Novel polymer micelles prepared from chitosan grafted hydrophobic palmitoyl groups for drug delivery. **Molecular Pharmacology**, v. 3, n. 2, p. 152-60, 2006.

JINTAPATTANAKIT, A. et al. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: effect of quaternization and dimethylation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 563-571, Oct. 2008.

KEAN, T.; ROTH, S.; THANOU, M. Trimethylated chitosans as non-viral gene delivery vectors: cytotoxicity and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 3, p. 643-653, Apr. 2005.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, Jan. 2010.

KIM, S. K. et al. Subacute toxicity of chitosan oligosaccharide in Sprague-Dawley rats. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 51, n. 9, p. 769-774, Sept. 2001.

KOTZÉ, A. F. et al. Effect of the degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride on the permeability of intestinal epithelial cells (Caco-2). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 47, n. 3, p. 269-274, May 1999.

KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, Nov. 2000.

LAPIENIS, G.; PENCZEK, S. Preparation of monomethyl ethers of poly(ethylene glycol)s free of the poly(ethylene glycol). **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 16, n. 3, p. 206-220, May 2001.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LAVERTU, M. et al. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, Aug. 2003.

LEFLER, A.; GHANEM, A. Development of bFGF-chitosan matrices and their interactions with human dermal fibroblast cells. **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, v. 20, n. 10, p. 1335-1351, Feb. 2009.

LEHR, C.-M. et al. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, n. 1/3, p. 43-48, Jan. 1992.

LIANG, X. et al. Synthesis and characterization of PEG-graft-quaternized chitosan and cationic polymeric liposomes for drug delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 125, n. 2, p. 1302-1309, Jan. 2012.

LIU, B. et al. Preparation and antimicrobial property of chitosan oligosaccharide derivative/rectorite nanocomposite. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 1078-1085, Feb. 2013.

MALHOTRA, M. et al. A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 485-494, Mar. 2011.

MAO, S. et al. Uptake and transport of PEG-graft-trimethyl-chitosan copolymer-insulin nanocomplexes by epithelial cells. **Pharmaceutical Research**, v. 22, n. 12, p. 2058-2068, Dec. 2005.

MIMA, S. et al. Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 28, n. 6, p. 1909-1917, Mar. 1983.

MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 5, p. 1057-1079, May 2009.

MOUSTAFINE, R. I. et al. Comparative evaluation of interpolyelectrolyte complexes of chitosan with Eudragit® L100 and Eudragit® L100-55 as potential carriers for oral controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 1, p. 215-225, Sept. 2008.

MUZZARELLI, R. et al. Antimicrobial properties of N-carboxybutyl chitosan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 34, n. 10, p. 2019-2023, Oct. 1990.

MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F. The N-permethylation of chitosan and the preparation of N-trimethyl chitosan iodide. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, n. 4, p. 297-307, 1985.

NAKAJIMA, N.; IKADA, Y. Mechanism of amide formation by carbodiimide for bioconjugation in aqueous media. **Bioconjugate Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 123-130, 1995.

NISHIMURA, S. et al. Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective chemical modifications. **Macromolecules**, v. 24, n. 17, p. 4745-4748, Jan. 1991.

NO, H. K. et al. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1/2, p. 65-72, Mar. 2002.

PAN, Y. et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 249, n. 1/2, p. 139-147, Dec. 2002.

PARK, P.-J.; JE, J.-Y.; KIM, S.-K. Free radical scavenging activities of differently deacetylated chitosans using an ESR spectrometer. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, n. 1, p. 17-22, May 2004.

PENG, Z.-X. et al. Adjustment of the antibacterial activity and biocompatibility of hydroxypropyltrimethyl ammonium chloride chitosan by varying the degree of substitution of quaternary ammonium. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 2, p. 275-283, June 2010.

POON, Y. F. et al. Hydrogels based on dual curable chitosan-graft-polyethylene glycol-graft-methacrylate: application to layer-by-layer cell encapsulation. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 7, p. 2012-2025, June 2010.

PORTERO, A.; REMUNAN-LOPEZ, C.; NIELSEN, H. M. The potential of chitosan in enhancing peptide and protein absorption across the TR146 cell culture model-an in vitro model of the buccal epithelium. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 2, p. 169-174, Feb. 2002.

POZZI, G. et al. Poly(ethylene glycol)-supported TEMPO: an efficient, recoverable metal-free catalyst for the selective oxidation of alcohols. **Organic Letters**, v. 6, n. 3, p. 441-443, Feb.2004.

PRADO, H. J.; MATULEWICZ, M. C. Cationization of polysaccharides: a path to greener derivatives with many industrial applications. **European Polymer Journal**, v. 52, n. 0, p. 53-75, Dec. 2014.

QIN, C. et al. Calorimetric studies of the action of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride on the growth of microorganisms. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 34, n. 1/2, p. 121-126, Apr. 2004.

QU, G. et al. PEG conjugated N-octyl-O-sulfate chitosan micelles for delivery of paclitaxel: in vitro characterization and in vivo evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, n. 2, p. 98-105, May 2009.

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

REGE, P. R.; BLOCK, L. H. Chitosan processing: influence of process parameters during acidic and alkaline hydrolysis and effect of the processing sequence on the resultant chitosan's properties. **Carbohydrate Research**, v. 321, n. 3/4, p. 235-245, Oct. 1999.

RICHARDSON, S. W.; KOLBE, H. J.; DUNCAN, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system: biocompatibility, body distribution and ability to complex and protect DNA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, n. 2, p. 231-243, Feb. 1999.

RIVA, R. et al. Chitosan and chitosan derivatives in drug delivery and tissue engineering. **Chitosan for Biomaterials II**, v. 244, p. 19-44, Aug. 2011.

RÚNARSSON, Ö. V. et al. Antibacterial activity of methylated chitosan and chitoooligomer derivatives: synthesis and structure activity relationships. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 6, p. 2660-2671, June 2007.

SAJOMSANG, W. et al. Antifungal property of quaternized chitosan and its derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 263-269, Jan. 2012.

SANT, V. P.; NAGARSENKER, M. S. Synthesis of monomethoxypolyethyleneglycol-cholesteryl ester and effect of its incorporation in liposomes. **AAPS PHARMSCITECH**, v. 12, n. 4, p. 1056-1063, Dec. 2011.

SEONG, H.-S.; WHANG, H. S.; KO, S.-W. Synthesis of a quaternary ammonium derivative of chito-oligosaccharide as antimicrobial agent for cellulosic fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 76, n. 14, p. 2009-2015, Apr. 2000.

SHEIKO, S. S.; SUMERLIN, B. S.; MATYJASZEWSKI, K. Cylindrical molecular brushes: synthesis, characterization, and properties. **Progress in Polymer Science**, v. 33, n. 7, p. 759-785, July 2008.

SHI, W. et al. Characterization of pH- and thermosensitive hydrogel as a vehicle for controlled protein delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 3, p. 886-895, Mar. 2011.

SIEVAL, A. B. et al. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2/3, p. 157-165, July 1998.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. 7th ed. New York: John Wiley & Sons, 2005. chap. 3, p. 45-68.

SPINELLI, V. A.; LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Preparation and characterization of quaternary chitosan salt: adsorption equilibrium of chromium(VI) ion. **Reactive and Functional Polymers**, v. 61, n. 3, p. 347-352, Nov. 2004.

STOLNIK, S.; SHAKESHEFF, K. Formulations for delivery of therapeutic proteins. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 1, p. 1-11, Jan. 2009.

TAN, H. et al. Quaternized chitosan as an antimicrobial agent: antimicrobial activity, mechanism of action and biomedical applications in orthopedics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1854-1869, Jan. 2013.

TANG, S. et al. Design and formulation of trimethylated chitosan-graft-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles used for gene delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 104-112, Jan. 2014.

TAO, Y.; QIAN, L.-H.; XIE, J. Effect of chitosan on membrane permeability and cell morphology of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, n. 2, p. 969-974, Aug. 2011.

TAVARES, I. S. et al. Surface charging and dimensions of chitosan coacervated nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 254-258, Feb. 2012.

TESSMAR, J. K.; GÖPFERICH, A. M. Customized PEG-derived copolymers for tissue-engineering applications. **Macromolecular Bioscience**, v. 7, n. 1, p. 23-39, Jan. 2007.

THANOOU, M.; VERHOEF, J. C.; JUNGINGER, H. E. Chitosan and its derivatives as intestinal absorption enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 50, n. 1, p. 91-101, Oct. 2001.

THANOOU, M. M. et al. Effect of degree of quaternization of N-trimethyl chitosan chloride for enhanced transport of hydrophilic compounds across intestinal Caco-2 cell monolayers. **Journal of Controlled Release**, v. 64, n. 1/3, p. 15-25, Feb. 2000.

TORII, Y. et al. Chemoselective protection of chitosan by dichlorophthaloylation: preparation of a key intermediate for chemical modifications. **Polymer Bulletin**, v. 62, n. 6, p. 749-759, June 2009.

WANG, W. et al. Determination of the Mark-Houwink equation for chitosans with different degrees of deacetylation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 5, p. 281-285, Oct. 1991.

WIARACHAI, O. et al. Surface-quaternized chitosan particles as an alternative and effective organic antibacterial material. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 121-129, Apr. 2012.

WU, J.; SU, Z.-G.; MA, G.-H. A thermo- and pH-sensitive hydrogel composed of quaternized chitosan/glycerophosphate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 315, n. 1/2, p. 1-11, June 2006.

WU, J. et al. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2220-2232, Jan. 2007.

XU, T. et al. Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 4, p. 931-936, July 2010.

YANG, X. et al. Self-aggregated nanoparticles from methoxy poly(ethylene glycol)-modified chitosan: synthesis; characterization; aggregation and methotrexate release in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 125-131, Feb. 2008.

YIXUE, S. et al. Modification of agarose with carboxylation and grafting dopamine for promotion of its cell-adhesiveness. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, n. 2, p. 2245-2251, Feb. 2013.

YUAN, Y. et al. Deacetylation of chitosan: material characterization and in vitro evaluation via albumin adsorption and pre-osteoblastic cell cultures. **Materials**, v. 4, p. 1399-1416, July 2011.

ZHANG, H.; NEAU, S. H. In vitro degradation of chitosan by bacterial enzymes from rat cecal and colonic contents. **Biomaterials**, v. 23, n. 13, p. 2761-2766, July 2002.

ZHANG, X. et al. Synthesis and characterization of PEG-conjugated quaternized chitosan and its application as a gene vector. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 566-572, Mar. 2014.

ZHU, A.; ZHANG, M.; ZHANG, Z. Surface modification of ePTFE vascular grafts with O-carboxymethylchitosan. **Polymer International**, v. 53, n. 1, p. 15-19, Nov. 2004.