



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de São José do Rio Preto

HELLEN FRANCIANE GONÇALVES BARBOSA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO EM
SOLUÇÃO AQUOSA DE DERIVADOS ANFIFÍLICOS ZWITERIÔNICOS
DE QUITOSANA**

São José do Rio Preto - SP
2013

HELLEN FRANCIANE GONÇALVES BARBOSA

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E ESTUDO DA AUTO-ASSOCIAÇÃO EM
SOLUÇÃO AQUOSA DE DERIVADOS ANFIFÍLICOS ZWITERIÔNICOS
DE QUITOSANA**

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em Química, área de Química Ambiental junto ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio José Tiera
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Schmitt Cavalheiro
USP- São Carlos

Prof^a. Dr^a. Iêda Aparecida Pastre Ferttonani
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto, 23 de Outubro de 2013

Barbosa, Hellen Franciane Gonçalves.

Síntese, caracterização e estudo da auto-associação em solução aquosa de derivados anfífilos zwitteriônicos de quitosana / Hellen Franciane Gonçalves Barbosa. -- São José do Rio Preto, 2013
88 f. : il., gráfs., tabs.

Orientador: Marcio José Tiera

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Química. 2. Síntese orgânica. 3. Quitosana. 4. Polieletrólitos.
5. Nanopartículas. 6. Fármacos. I. Tiera, Marcio José. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 547.05

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Campus de São José do Rio Preto

AGRADECIMENTOS

A Deus por me oferecer a oportunidade de viver e evoluir a cada dia.

Muitas pessoas estiveram presentes e contribuíram muito para que essa etapa maravilhosa pudesse se concluída.

À minha família pela confiança, apoio e carinho oferecido em todos os momentos de minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Marcio Tiera, pelas oportunidades concedidas, pela atenção, paciência, incentivo, ensinamentos e dedicação desde o período de estágio básico, iniciação científica e agora nesse trabalho de mestrado.

Ao Rafael Pedro, pelo companheirismo, carinho, ajuda, paciência e apoio.

A todos os profissionais do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Ibilce pelos ensinamentos e auxílio.

À prof^ª. Dr^ª. Vera Tiera, pela amizade, carinho, incentivo e colaboração.

A todos os colegas do laboratório de Biomateriais e Nanotecnologia pela ajuda, conversas, discussões e agradável convivência, pois sem vocês esse trabalho teria sido muito menos prazeroso.

Ao prof. Dr. Luis Octávio Regasini, pela amizade e colaboração.

Aos docentes Prof. Dr. Fernando Luis Fertoni e Prof^ª. Dr^ª Iêda Ap. Pastre Fertoni e aos colegas do laboratório de Fotoquímica pela, ajuda, compreensão, paciência e colaboração.

Ao laboratório de Microscopia e Microanálise do Prof. Dr. Sebastião Roberto Taboga pela colaboração.

Ao laboratório de Polímeros do Prof. Dr. João Ruggiero Neto pela colaboração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes, pelo apoio financeiro.

A todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a execução desse trabalho.

Muito Obrigada!

"Se fiz descobertas valiosas, foi mais por ter paciência do que qualquer outro talento."

Isaac Newton

RESUMO

O presente trabalho apresenta a síntese, caracterização e estudo da auto-associação em solução aquosa de derivados anfílicos zwitteriônicos de quitosana com potencial para o transporte e a liberação controlada de fármacos. Derivados anfílicos foram obtidos a partir de quitosana previamente desacetilada e degradada, que foram submetidos à reação de adição de Michael com o monômero hidróxido de 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina (SPP). O derivado hidrofílico obtido foi posteriormente por modificado com o grupo dodecil aldeído (DD) por meio de reação de aminação redutiva. Os graus de substituições (GS) pelos grupos DD e SPP foram determinados utilizando as técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênios RMN de ^1H , espectroscopia no infravermelho IV e titulação potenciométrica essas técnicas foram utilizadas para caracterizar a quitosana e seus derivados. Os graus de substituição por SPP foram de 36 e 46% e com grupos dodecil variaram de 2 a 10%. A massa molar média foi determinada utilizando cromatografia de permeação em gel (GPC). E o estudo do comportamento associativo em meio aquoso foi realizado utilizando-se a espectroscopia de fluorescência, espectroscopia no UV-Vis, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Os derivados hidrofílicos permaneceram solúveis em toda a faixa de pH e os derivados anfílicos demonstraram um comportamento similar aos surfactantes convencionais. As concentrações de agregação crítica (CAC), foram determinadas com a sonda fluorescente o pireno, os valores variaram de 0,005 até 0,017 g L⁻¹ foi observado um decréscimo nos valores com o aumento do conteúdo hidrofóbico e pH. Medidas de DLS mostraram que os derivados formam agregados com diâmetros que variam de 100 a 1000 nm e o potencial zeta varia de acordo pH da solução. Imagens de TEM mostraram agregados esféricos de tamanhos variados concordando com as medidas de DLS. O estudo da incorporação de fármaco foi realizado utilizando como modelo a quercetina e os resultados mostraram que a capacidade de solubilização variou de 17 a 54% com o aumento da porcentagem de conteúdo do grupo hidrofóbico.

Palavras - chave: Quitosana. Polieletrólitos. Nanopartículas. Fármacos.

ABSTRACT

This work presents the synthesis, characterization and self-association study of amphiphilic zwitterionic derivatives of chitosan in aqueous solution as potential drug delivery systems. Amphiphilic derivatives were obtained from deacetylated and degraded chitosan, followed by Michael addition reaction with the monomer 1-(3-sulfopropyl)-2-vinylpyridine hydroxide (SPP). The hydrophilic derivative was further modified with dodecyl groups (DD) by reductive amination reaction. The degrees of substitution (DS) by DD and SPP groups were determined using H^1 -NMR, and FTIR and potentiometric titration techniques were used to characterize chitosan and its derivatives. The degrees of substitution by SPP were 36 and 46 % and by dodecyl groups varied from 2 to 10%. The average molecular weights were determined using the gel permeation chromatography (GPC). The study of the self-association in aqueous solution was performed by using fluorescence spectroscopy, UV-Vis, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (TEM) techniques. The hydrophilic derivatives were soluble in all pH range and the amphiphilic derivatives exhibited self-association behavior similar to conventional surfactants. The critical aggregation concentrations, determined from pyrene fluorescence, varied from 0.005 to 0.017 g l⁻¹ and were shown to decrease with both, the increasing hydrophobic content and pH. DLS measurements showed that self-association of the amphiphilic derivatives leads to formation of aggregates having diameters varying from 100 to 1000 nm and the zeta potential varied according with the pH. The TEM images showed spheroidal aggregates of varied sizes in accordance with DLS measurements. Quercetin was used as a model for drug loading study and the results showed that solubilizing capacity increased from 17 to 54% with the hydrophobic content of the derivatives.

Keywords: Chitosan. Polyelectrolytes. Nanoparticles. Drugs.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Representação das estruturas de quitosana e da quitina, quando NH_2 (Monômero X) $\geq 50\%$ o polímero é denominado quitosana, e se CH_3CONH_2 (Monômero Y) $\geq 50\%$ o polímero é denominado quitina.	17
Figura 2: Representação esquemática da auto-organização em meio aquoso de derivados zwitteriônicos anfifílicos e a incorporação de fármacos.....	18
Figura 3: Representação das diferenças anatômicas entre as células normais e tumorais e o comportamento de fármacos e nanocarreadores nos respectivos tecidos (Adaptado de Van Bustsele; Jérônimo, R.; Jérônimo, C., 2007).	20
Figura 4: Representação da estrutura do alcalóide camptotecina.	21
Figura 5: Representação da estrutura da bleomicina.	22
Figura 6: Representação da estrutura da doxorubicina.	23
Figura 7: Representação da estrutura da curcumina.	24
Figura 8: Representação da estrutura do flavonóide quercetina.	25
Figura 9: Representação das estruturas de quitina, quitosana e do processo de desacetilação da quitina para a formação de quitosana (Adaptado de Solomons; Fryhle, 2006).	29
Figura 10: Representação do esquema da reação.	31
Figura 11: Representação da estrutura do indicador.	32
Figura 12: Representação da reação do derivado zwitteriônico de quitosana com dodecil aldeído (Adaptado de Solomons; Fryhle, 2006).	33
Figura 13: Esquema ilustrativo da interação do pireno com a porção hidrofóbica dos derivados anfifílicos de quitosana.	38
Figura 14: Estrutura molecular do pireno.	39
Figura 15: Espectro de emissão de pireno na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tamponante acetato de sódio, pH 4,0 força iônica de 150mmol L^{-1} , com derivado hidrofóbico de quitosana Q-DD2,3% nas concentrações de 0,105 (vermelho) e 0g L^{-1} (Verde).	39
Figura 16: Representação esquemática do procedimento utilizado para determinar EE e DL.	43
Figura 17: Titulação potenciométrica de QC, para determinação do DG médio.	44
Figura 18: Titulação potenciométrica de Q, para determinação do GD médio.	45
Figura 19: Espectros RMN de ^1H (500 MHz) de QC e Q (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (1%) a 70°C : estrutura da quitosana com destaque (verde e laranja) para os hidrogênios utilizados na determinação o GD por RMN de ^1H	46

Figura 20: Espectro RMN de ^1H (500 MHz) do monômero 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina (SPP) (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (1%) a 70°C	47
Figura 21: Espectros de RMN de ^1H (500 MHz) dos derivados hidrofílicos: estrutura dos derivados zwitteriônicos e atribuição dos hidrogênios utilizados para determinar o GS-SPP. Os espectros foram realizados com (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (1%) a 70°C	48
Figura 22: Espectros RMN de ^1H (500 MHz) dos derivados anfílicos: estrutura dos derivados e identificação dos hidrogênios utilizados para determinar o GS-DD. Os espectros foram realizados com (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (1%) a 70°C	49
Figura 23: Estrutura química do polímero Q-SPP e varredura espectrofotométrica de absorção na região do UV-Vis dos polímeros Q, Q-SPP e SPP na concentração de $0,8\text{ mg L}^{-1}$ em solução tamponante pH 5,0.....	50
Figura 24: Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) do grupo SPP em solução tamponante pH 5,0.....	51
Figura 25: Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas QC e Q.	52
Figura 26: Espectros de IV para a quitosana Q e do derivado hidrofílico Q-SPP46%.....	53
Figura 27: Espectros de IV para a quitosana desacetilada Q e o derivado hidrofóbico Q-DD2%. E uma ampliação da região que permite observar as bandas características de DD. (A) Q-SPP46-DD2%, (B) QDG-SPP36-DD2%, (C) QDG-SPP36-DD5% e (D) QDG-SPP36-DD10%.	54
Figura 28: Espectros de absorção no infravermelho (IV) de Q, Q-SPP46-DD2 e QDG-SPP36-DD2 nos quais são destacadas as regiões que correspondem à presença de DD (C-H da metila e CH_2 metileno) e SPP ligações (S=O) das ligações sulfóxidos e região com ligações dos hidrogênios adjacentes ao anel aromático.....	54
Figura 29: Curva de calibração dos padrões.	55
Figura 30: Cromatogramas das quitosanas e seus derivados hidrofílicos (concentração de 5 gL^{-1}) em solução tamponante ácido acético $0,3\text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2\text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.	56
Figura 31: Gráfico da transmitância em (λ 566 nm) em função do pH para as quitosanas QDG-SPP36%, Q-SPP46%, Q e QDG (concentração de 1 g L^{-1}).	58
Figura 32: Transmitância em (λ 566 nm) em função do pH para os polímeros anfílicos Q-SPP46-DD2%; QDG-SPP36-DD2%; QDG-SPP36-DD5% e QDG-SPP36-DD10% (concentração de 1 g L^{-1}).	59
Figura 33: Determinação da CAC dos polímeros A) Q-SPP46%; B)QDG-SPP36%; C)Q-SPP46-DD2%; D)QDG-SPP36-DD2%; E)QDG-SPP36-DD5% e F)QDG-SPP36DD-10% nos gráficos de I_1/I_3 em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 5,0, 6,2 e 7,4.	62

Figura 34: Micrografias em microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos agregados de em solução tamponante de acetato 10 mmol L ⁻¹ , pH 5,0 e força iônica de 150 mmol L ⁻¹ . A) QDG-SPP36-DD2 % e B) Q-SPP46-DD2% na (concentração de 1 g L ⁻¹) e C) QDG-SPP36-DD10% (concentração de 0,01 g L ⁻¹).....	64
Figura 35: Diâmetro hidrodinâmico em função da concentração dos agregados formados pelos dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em solução tamponante de acetato pH 5,0 (concentração 50 mmol L ⁻¹ e força iônica 150 mmol L ⁻¹).	65
Figura 36: Diâmetro hidrodinâmico em função da concentração dos agregados formados pelos dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em solução tamponante de fosfato pH 7,4(concentração 50 mmol L ⁻¹ e força iônica 150 mmol L ⁻¹).	66
Figura 37: Potencial zeta dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% Q-SPP46-DD2% em função da concentração de polímero (g L ⁻¹) em solução tamponante pH 5,0 (concentração de 50 mmol L ⁻¹ e força iônica 150 mmol L ⁻¹).....	68
Figura 38: Potencial zeta dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em função da concentração de polímero (g L ⁻¹) em solução tamponante pH 7,4 (concentração de 50 mmol L ⁻¹ e força iônica 150mmol L ⁻¹).	68
Figura 39: Estrutura química e espectros de absorção da quercetina em DMF.	69
Figura 40: Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da quercetina em N-N-dimetilformamida (DMF).	70
Figura 41: Soluções de quercetina: A) Quercetina em água concentração 0,3 g L ⁻¹ , B) Polímero na concentração de 1 g L ⁻¹ e a quercetina 0,1 g L ⁻¹ em pH 5,0, C) Polímeros na concentração de 2 g L ⁻¹ e a quercetina 0,2 g L ⁻¹ em pH 5 e D) Polímeros na concentração de 1 g L ⁻¹ e a quercetina 0,1 g L ⁻¹ em pH 7,4.	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Reagentes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.....	27
Tabela 2 - Dados de Potenciometria e RMN de ^1H para as quitosanas QC e Q.....	46
Tabela 3 - Dados da determinação dos GS médio dos grupos SPP e DD utilizando RMN de ^1H	49
Tabela 4 - Dados obtidos da determinação dos GS médios dos grupos SPP utilizando espectrofotometria UV-Vis.....	51
Tabela 5 - Valores de MM, M_w , M_n e PD e composição das quitosanas e seus derivados.	57
Tabela 6 - Valores de CAC obtidos do estudo da fluorescência em diferentes pHs para os derivados de quitosana.....	62
Tabela 7 - Valores dos índices de polidispersividade dos derivados de quitosana em diferentes concentrações e em pH 5.....	67
Tabela 8 - Valores dos índices de polidispersividade dos derivados de quitosana em diferentes concentrações e em pH 7,4.....	67
Tabela 9 - Eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (DL) utilizando espectrofotometria UV-Vis em solução tamponante, pH 5,0.....	71
Tabela 10 - Eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (DL) utilizando espectrofotometria UV-Vis em em solução tamponante, pH 7,4.....	71
Tabela 11 - Medidas de diâmetro hidrodinâmico D_h , potencial zeta ζ e PDI dos agregados obtidos com o derivado QDG-SPP36-DD2% vazio e carregado com quercetina em diferentes forças iônicas.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ϵ	Coefficiente de Absortividade Molar
$[\eta]$	Viscosidade Intrínseca
ATR-FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier Obtida por meio de Reflectância Total Atenuada
CAC	Concentração de Agregação Crítica
DD	Dodecil
Dh	Diâmetro Hidrodinâmico
DL	Capacidade de Carreamento
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMF	<i>N-N</i> -Dimetilformamida
EE	Eficiência de Encapsulamento
GD	Grau de Desacetilação
GPC	Cromatografia de Permeação em Gel
GS	Grau de Substituição
PDI	Índice de Polidispersividade
IR	Índice de Refração
IV	Infravermelho
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MM	Massa Molecular Média das Unidades Monoméricas
MN	Massa Molar Numérica Média
MV	Massa Molar Viscosimétrica Média
MW	Massa Molar Ponderal Média
MWCO	Limite de Tamanho Molecular (<i>Molecular weight cut off</i>)
PCL	Policaprolactona
PD	Polidispersividade
Q	Quitosana Desacetilada
QC	Quitosana Comercial
QDG	Quitosana Desacetilada Degradada
QDG-SPP36	Quitosana Desacetilada Degradada-(sulfopropil)piridina 36%
QDG-SPP36-DD10	Quitosana Desacetilada Degradada-(sulfopropil)piridina 36% Dodecil 10%
QDG-SPP36-DD2	Quitosana Desacetilada Degradada-(sulfopropil)piridina 36% Dodecil 2%
QDG-SPP36-DD5	Quitosana Desacetilada Degradada-(sulfopropil)piridina 36% Dodecil 5%
Q-SPP46	Quitosana Desacetilada-(sulfopropil)piridina 46%
Q-SPP46-DD2	Quitosana Desacetilada-(sulfopropil)piridina 46%-Dodecil 2%
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SPP	Hidróxido de 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina
ζ	Zeta-Potencial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Considerações Gerais	15
1.2 Derivados Anfílicos de Quitosana	18
1.3 Quercetina	24
2 OBJETIVO GERAL	26
2.1 Objetivos Específicos	26
3 METODOLOGIA	27
3.1 Reagentes	27
3.2 Sínteses dos Derivados de Quitosana.....	28
3.2.1 Desacetilação da Quitosana	28
3.2.2 Degradação da Quitosana	30
3.2.3 Síntese do Derivado Zwitteriônico de Quitosana	30
3.2.4 Polimerização do Grupo Zwitteriônico.....	32
3.2.5 Síntese dos Derivados Zwitteriônicos Dodecilados de Quitosana.....	32
3.3 Caracterização dos Derivados	34
3.3.1 Titulação Potenciométrica	34
3.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios (RMN de ¹ H). 34	
3.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)	35
3.3.4 Determinação da Massa Molar Média por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detecção por Índice de Refração (IR)	36
3.3.5 Espectrofotometria UV-Vis para a Determinação do Grau de Substituição (GS) de Grupos Zwitteriônicos	36
3.4 Avaliação da Solubilidade e Estudo da Associação dos Anfílicos em Meio Aquoso ..	37
3.4.1 Análise da Transmitância em Função do pH por Espectrofotometria UV-Vis	37
3.4.2 Determinação da Concentração de Agregação Crítica por Fluorescência no Estado Estacionário	38
3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	40
3.4.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Determinação do Potencial Zeta(ζ)	41

3.4.5 Estudo da Incorporação de Fármacos Utilizando a Espectroscopia UV-Vis.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Caracterização da Quitosana e seus Derivados	44
4.1.1 Determinação do Grau de Desacetilação (GD) por Titulação Potenciométrica	44
4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ¹ H) para Determinar o Grau de Desacetilação (GD), o Grau de Substituição (GS) de SPP de DD.....	45
4.1.3 Espectrofotometria de Absorção para Determinação do Grau de Substituição (GS) de Grupos Zwitteriônicos (SPP)	50
4.1.4 Espectroscopia de Infravermelho (IV) para as Quitosanas (QC), (Q) e dos Derivados Anfílicos Degradados e Não Degradados.....	51
4.1.5 Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detector com Índice de Refração (IR).....	55
4.2 Estudos da Auto - Associação em Meio Aquoso	58
4.2.1 Análise de Transmitância em Função do pH	58
4.2.2 Espectrofotometria de Fluorescência Molecular	59
4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	63
4.2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Determinação do Potencial Zeta(ζ)	65
4.2.5 Estudo da Incorporação de Fármaco Utilizando a Espectroscopia UV-Vis	69
5 CONCLUSÃO.....	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Gerais

A síntese e caracterização de sistemas para a liberação controlada de fármacos vêm sendo estudada e investigada de forma intensa nos últimos anos visando, principalmente uma administração mais eficiente com maior segurança e com efeitos colaterais minimizados (STULZER et al., 2008). A não seletividade dos fármacos na administração convencional é uma limitação muito significativa, pois pode causar sérios danos aos tecidos saudáveis. Estes sistemas são em geral compostos de polímeros sintéticos e naturais, lipossomos, dendrímeros entre outros (VAN BUSTSELE; JÉRÔNIMO,R.; JÉRÔNIMO,C., 2007) e vem sendo continuamente melhorados, uma vez que, para serem eficazes devem garantir que o fármaco seja liberado a uma velocidade constante em local pré-determinado. A vantagem em utilizar esses sistemas encontra-se, sobretudo na necessidade de evitar a degradação dos fármacos, pois alguns agentes terapêuticos são instáveis e, dependendo das condições do meio, como pH e a presença de enzimas, ou até devido à incapacidade de atravessar barreiras biológicas, podem ter seus efeitos limitados (JANES; CALVO; ALONSO, 2001).

Em geral, o sistema de defesa natural dos organismos geralmente desenvolve uma sequência de obstáculos no caminho dos fármacos até que esses agentes terapêuticos possam atingir o seu destino final, como por exemplo, o rápido reconhecimento pelo sistema imune que ocorre especialmente quando são empregados os carreadores com baixa biocompatibilidade (VAN BUSTSELE; JÉRÔNIMO,R.; JÉRÔNIMO,C., 2007). Portanto, os polímeros sintéticos, ou seja, não biodegradáveis de natureza hidrofóbica quando utilizados na liberação sítio-dirigida de fármacos, são rapidamente removidos da corrente sanguínea devido à interação desses com o sistema fagócito mononuclear (macrófagos). Sendo assim, as propriedades físico-químicas dos nanocarreadores são de extrema importância, pois elas influenciam diretamente na interação com proteínas plasmáticas, membranas de células e também podem conferir uma maior seletividade na distribuição dos agentes terapêuticos (BROMBERG, 2008).

Sendo assim, a utilização dos derivados de polímeros biodegradáveis na síntese de nanocarreadores é uma alternativa promissora para a liberação controlada de agentes terapêuticos. As micro e nanopartículas poliméricas apresentam várias vantagens frente a outros sistemas, pois elas se caracterizam pelo tamanho reduzido, o que possibilita a

compartimentalização de fármacos e um melhor controle da liberação, pois a liberação controlada está diretamente relacionada com a área superficial dos carreadores (FREITAS; MARCHETTI, 2005). Um polímero deve ser biocompatível para ser considerado como um biomaterial, a biocompatibilidade foi definida (Williams, 1999) como a capacidade de um material desempenhar uma resposta apropriada em uma determinada aplicação com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com tecidos vivos ou fluidos orgânicos. Portanto, os polímeros biocompatíveis utilizados no transporte e na liberação sítio-dirigida de fármacos são em geral biodegradáveis, pois diferentemente dos polímeros sintéticos esse tipo de material promove a formação de subprodutos, que são compostos de baixa massa molecular, não oferecem riscos ao paciente e são facilmente eliminados do organismo. Devido a essas vantagens, os polímeros biodegradáveis em particular a quitosana, estão cada vez mais sendo utilizados na área biomédica-farmacêutica, sobretudo na busca do desenvolvimento de sistemas para a liberação sítio-dirigida de fármacos (AZEVEDO et al., 2007). A quitosana vem se destacando também em outras importantes aplicações, pois o biopolímero apresenta grande potencial para ser utilizado como vetor não viral para a terapia gênica, engenharia de tecidos, reconstituição óssea, implantes ortopédicos e periodontais entre outras (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009); (KUMAR, 2000). Além disso, a quitosana ainda vem sendo estudada para aplicações em outras áreas, como por exemplo, tratamento de efluentes (MILHOME et al., 2009), controle do colesterol (MALHOTRA; KAUSHIK, 2009), inibição do crescimento de fungos (GUO et al., 2008) e bactérias (SADEGHI et al., 2008) entre outras. A quitosana possui características interessantes, tais como sensibilidade ao pH, biocompatibilidade e baixa toxicidade (MUZZARELLI, 1997), além disso, o biopolímero é classificado como um material biodegradável tanto no meio ambiente quanto em sistemas biológicos. Em sistemas biológicos como, por exemplo, no corpo humano a quitosana é metabolizada por algumas enzimas humanas, especialmente a lisozima e a *N*-acetilglicosaminidase, dentre outras (MUZZARELLI, 1997). Devido a essas e outras importantes propriedades favoráveis, o desenvolvimento de sistemas de liberação baseados em quitosana e seus derivados vêm sendo intensamente estudados.

Em relação a sua origem, a quitosana é um polissacarídeo catiônico derivado do processo de desacetilação alcalina da quitina, que consiste na hidrólise heterogênea dos grupos acetamidas presentes na cadeia polimérica da quitina (Figura 1). A quitina é encontrada abundantemente na natureza, pois é o principal constituinte do exoesqueleto dos insetos, crustáceos e também da parede celular de alguns fungos (MARGUERITE, 2006).

A quitina pode ser obtida dos restos e subprodutos da indústria pesqueira, especialmente de camarões e lulas (PAVINATTO, 2009). Sendo assim, a utilização desses subprodutos é uma alternativa que pode e deve ser explorada, uma vez que, o acúmulo desses resíduos pode causar sérios problemas ambientais. Portanto, a quitina e seus derivados são reconhecidos especialmente por serem produtos naturais, abundantes na natureza, de baixo custo, renováveis, biodegradáveis e conseqüentemente de grande importância econômica e ambiental (AZEVEDO et al., 2007); (CAMPANA; SIGNINI, 2001a).

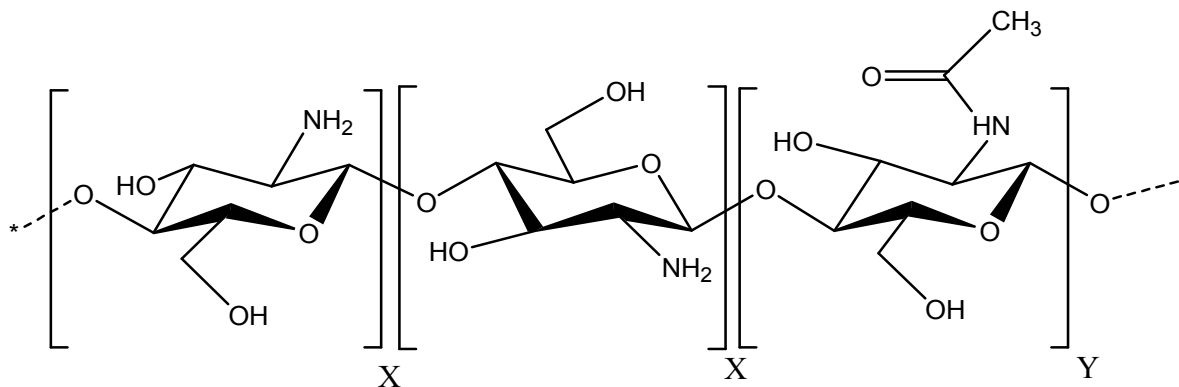


Figura 1: Representação das estruturas de quitosana e da quitina, quando NH_2 (Monômero X) ≥ 50 % o polímero é denominado quitosana, e se CH_3CONH_2 (Monômero Y) ≥ 50 % o polímero é denominado quitina.

Os polímeros de quitina e de quitosana são compostos respectivamente por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$ em porções variáveis (CAMPANA; SIGNINI, 2001a). A quitina é composta predominantemente por unidades acetamidas, ao passo que a quitosana possui predominantemente grupos amino. A quitina é insolúvel em soluções aquosas e na maioria dos solventes orgânicos convencionais, sendo esse, o principal fator limitante à sua utilização. Já a quitosana é moderadamente solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos minerais fracos, devido principalmente à protonação dos seus grupos aminos livres ($-\text{NH}_3^+$) presente nas unidades desacetiladas (VARNA; DESHPANDES; KENNEDY, 2003). Na estrutura da quitosana há dois grupos que apresentam grande susceptibilidade para reagir por meio de reações nucleofílicas, os grupos amino e os grupos hidroxila do anel glicopiranosídeo. Os grupos hidroxilas apresentam uma reatividade um pouco menor que a dos grupos aminos (MUZZARELLI, 1997). Devido à estrutura molecular, a quitosana é passível de inúmeras modificações químicas e essa grande versatilidade possibilita a síntese de diversos derivados com propriedades distintas.

Na literatura, é reportado que a velocidade de liberação de fármaco a partir de matrizes de quitosana é afetada pela mudança do pH (LARANJEIRA; FÁVERE, 2009). Entretanto, a quitosana é uma base fraca com um valor de pK_a para os resíduos de glucosamina variando de 6,2 a 6,4 (CAMPANA; SIGNINI, 2001b). Sendo assim, as modificações da quitosana são fundamentais para esse tipo de aplicação, pois o biopolímero é insolúvel em pH neutro ou alcalino, e portanto insolúvel em pH fisiológico 7,4, assim mudanças estruturais na quitosana podem alterar as propriedades do polímero, permitindo sua aplicação em meio aquoso neutro.

1.2 Derivados Anfílicos de Quitosana

Os polímeros denominados anfílicos são caracterizados por apresentarem em suas estruturas, grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Devido a essas características, os polímeros podem formar nanopartículas ou nanoagregados em solução aquosa por meio da auto-associação dos grupos hidrofóbicos. Portanto, a formação de agregados possibilita a solubilização de fármacos hidrofóbicos ou anfílicos (KATHMANN; WHITE; MCCORMICK, 1997). Na Figura 2 é apresentado, de forma esquemática, como os polímeros anfílicos se auto-organizam em meio aquoso, permitindo a solubilização dos fármacos. Devido ao efeito hidrofóbico, os grupos de baixa polaridade se orientam no sentido de minimizar contatos desfavoráveis com o meio polar, expondo os grupos hidrofílicos para o meio aquoso.

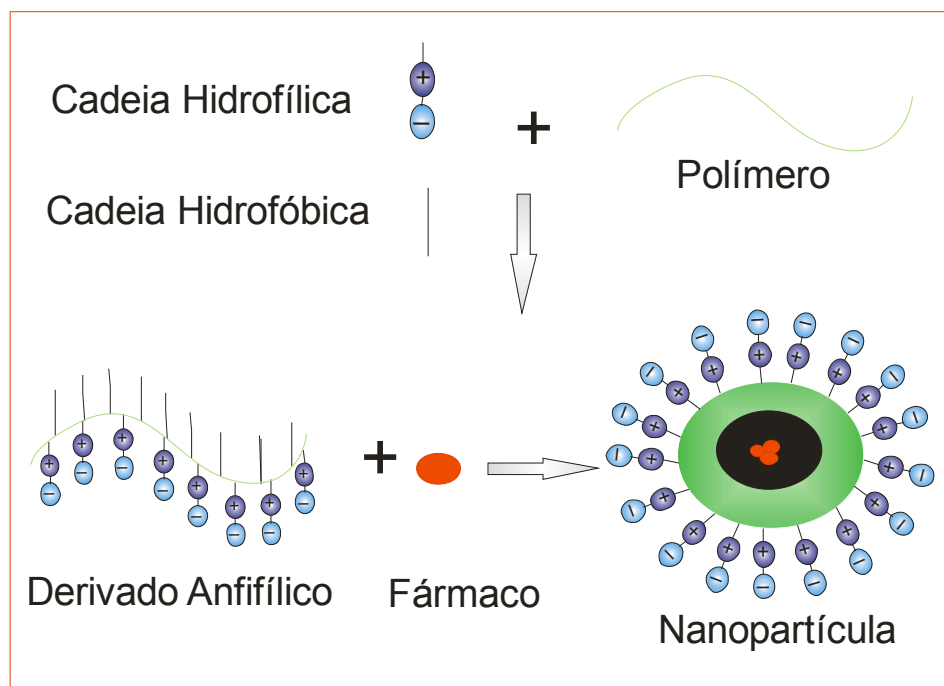


Figura 2: Representação esquemática da auto-organização em meio aquoso de derivados zwitteriônicos anfílicos e a incorporação de fármacos.

A estrutura dos polímeros anfífilicos pode ser controlada para aumentar a capacidade de solubilização de fármacos bem como responder a estímulos como pH, força iônica, temperatura, entre outros (QIU; KWAN; WU, 1997). O caráter hidrofóbico dos polímeros pode ser controlado por meio de ligações de grupos hidrofóbicos, os quais diminuem a polaridade das cadeias alterando o comportamento e propriedades das partículas em solução. No caso da quitosana várias modificações podem ser feitas para permitir a formação de agregados em solução aquosa (DU et al., 2009).

Uma das possibilidades é a utilização de grupos hidrofílicos zwitteriônicos, visto que muitos trabalhos na literatura buscam o desenvolvimento de carreadores com uma maior hemocompatibilidade (ZHU; ZHANG; SHEN, 2003). Os polímeros zwitteriônicos apresentam em sua estrutura tanto grupos catiônicos quanto grupos aniônicos na mesma unidade monomérica, e a principal função dos grupos zwitteriônicos é aumentar a solubilidade dos polímeros em água, mesmo em meios com elevada força iônica (LOWE; MCCORMICK, 2002). Além disso, a presença dos grupos zwitteriônicos mostra-se importante no transporte de fármacos devido à redução na adsorção de proteínas (YANG et al., 2009) e a diminuição da indução de respostas inflamatórias (GOREISH et al., 2003). No caso da quitosana, a modificação de sua estrutura com grupos hidrofílicos pode permitir a formação de uma camada protetora na superfície dos agregados, que impede a interação com proteínas e macrófagos e conseqüentemente prologam o tempo de circulação dos agregados, melhorando a distribuição dos agentes terapêuticos na corrente sanguínea (CARREÑO-GÓMEZ; DUNCAN, 1997).

Portanto, os derivados zwitteriônicos, se apropriadamente modificados podem ser utilizados para direcionar os fármacos para tecidos específicos dentro do corpo. A função dos grupos hidrofóbicos é promover a formação de um compartimento hidrofóbico que permita solubilizar os fármacos em seu interior. Portanto, além de aumentar a capacidade de solubilização dos fármacos, esses polímeros podem aumentar a biodisponibilidade em meio aquoso, protegendo-os do ambiente circundante dentre outras importantes vantagens (ZHANG et al., 2009), (QIU; KWAN; WU, 1997).

Uma das potenciais aplicações desses polímeros é sua utilização como sistemas de liberação para a terapia contra o câncer, pois são capazes de atingir tecidos específicos e controlar a biodistribuição dos agentes terapêuticos. As vantagens desses sistemas incluem uma maior eficiência do fármaco, a redução dos efeitos colaterais e a maior capacidade de atingir apenas os tecidos tumorais (FREITAS; MARCHETTI, 2005).

A capacidade de nanopartículas acumularem em tecidos tumorais está diretamente relacionada às diferenças anatômicas destes com os tecidos normais (Figura 3). Em tecidos normais a lâmina basal, estrutura que delimita o tecido epitelial do tecido conjuntivo, serve como suporte para a migração celular. A cobertura endotelial que recobre os vasos sanguíneos permite a entrada apenas de moléculas de baixa massa molecular, ou seja, o fármaco livre. Já para as nanopartículas carregadas de fármacos, a migração celular por difusão não ocorre nas células normais, apenas nas células tumorais devido à própria morfologia dos tecidos. Portanto, o fármaco transportado para o tecido tumoral pelas nanopartículas, não atinge o tecido normal e conseqüentemente diminui os efeitos colaterais. Nos tecidos tumorais, a lâmina basal e a cobertura endotelial dos vasos sanguíneos apresentam morfologia desorganizada que apresenta regiões de alargamento, o que permite a entrada dos agregados poliméricos que transportam o fármaco através das paredes dos vasos por difusão apenas nas regiões alargadas (CASSIDY; SCHÄTZLEIN, 2004).

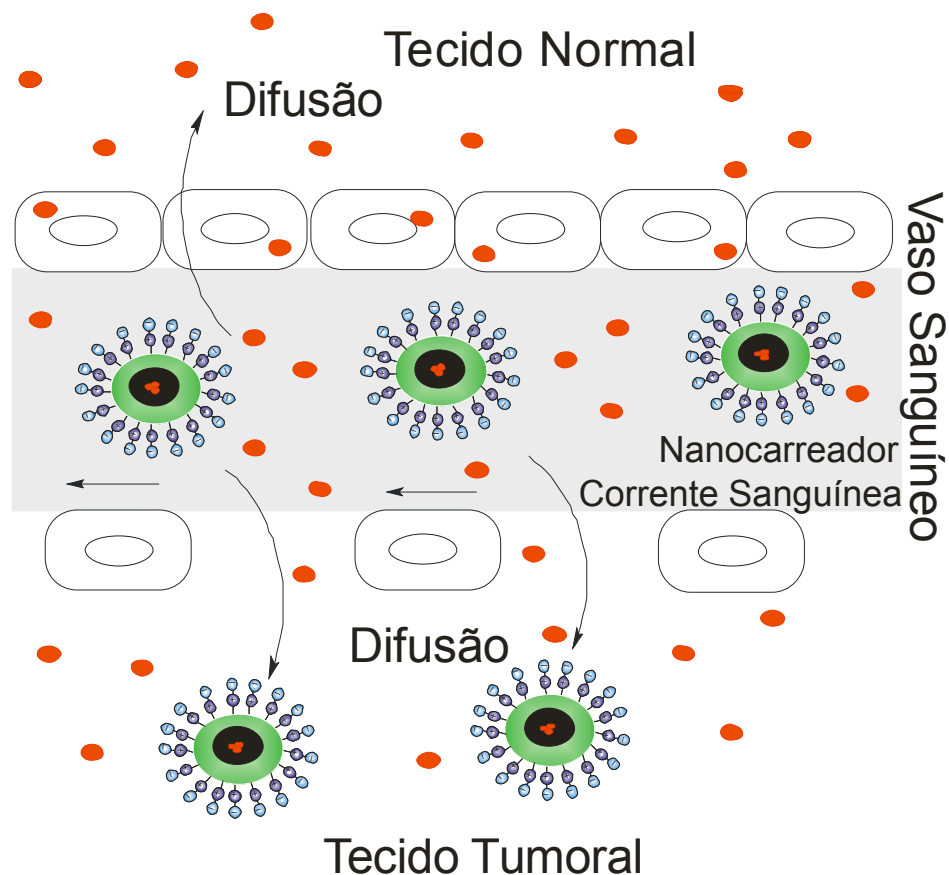


Figura 3: Representação das diferenças anatômicas entre as células normais e tumorais e o comportamento de fármacos e nanocarreadores nos respectivos tecidos (Adaptado de Van Bustsele; Jérônimo, R.; Jérônimo, C., 2007).

Na literatura, vários trabalhos recentes focalizam a utilização de derivados de quitosana como sistemas de liberação controlada de fármacos, sobretudo dirigidos à terapia contra diversos tipos de câncer. Segundo Duan e colaboradores (DUAN K. et al., 2010) quitosana substituída com policaprolactona (PCL) forma nanomicelas catiônicas cujo tamanho e potencial zeta variam de acordo com a porcentagem de substituição. Estas micelas foram capazes de entrar de forma passiva no tecido tumoral carreando fármacos antitumorais de baixa solubilidade em água como a camptotecina, um alcaloide de origem vegetal, que possui propriedades antiproliferativas de vários tipos de neoplasias, mas que apresenta elevada toxicidade (Figura 4). As nanomicelas derivadas da quitosana-PCL expressaram baixa citotoxicidade apresentando, portanto, potencial para utilização como sistemas de liberação.

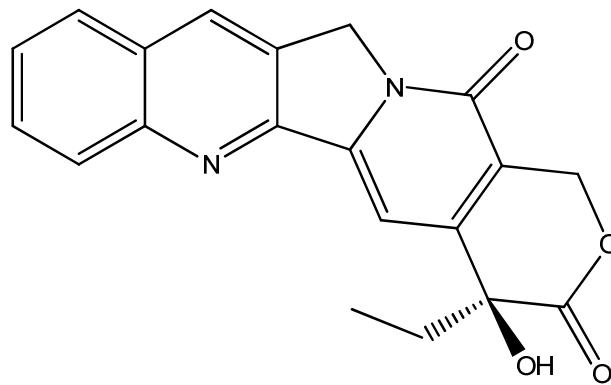


Figura 4: Representação da estrutura do alcaloide camptotecina.

Os derivados anfífilos de quitosana denominados carboximetil-quitosana-hexanoil que é um híbrido orgânico e inorgânico, são outro exemplo recente de compostos capazes de formar nanopartículas com potencial para serem utilizadas como nanocarreadores de fármacos (HSIAO et al., 2012). Segundo HSIAO e colaboradores os resultados experimentais indicam que esse híbrido apresenta um comportamento de auto-montagem capaz de formar nanopartículas estáveis, e que o tamanho dessas nanopartículas podem variar de acordo com a quantidade do grupo inorgânico. As nanopartículas derivadas de quitosana apresentam excelente capacidade de internalização e citocompatibilidade celular. A eficiência de encapsulação e os perfis de liberação obtidos com as nanopartículas foram satisfatórios para o fármaco camptotecina (Figura 4).

Derivados de quitosana, como por exemplo, o palmitoil-glicol-quitosana também é capaz de formar nanopartículas poliméricas em solução e vêm apresentando potencial para ser utilizado como sistema de liberação de fármaco. Esse derivado foi avaliado para a liberação

do fármaco bleomicina em camundongos por (SLUDDEN; UCHEGBU; SCHÄTZLEIN, 2000). Bleomicina é um agente terapêutico antitumoral, capaz de despolarizar o DNA e seu uso pode acarretar sérios efeitos colaterais, como por exemplo, toxicidade pulmonar, reações alérgicas dentre outros (Figura 5).

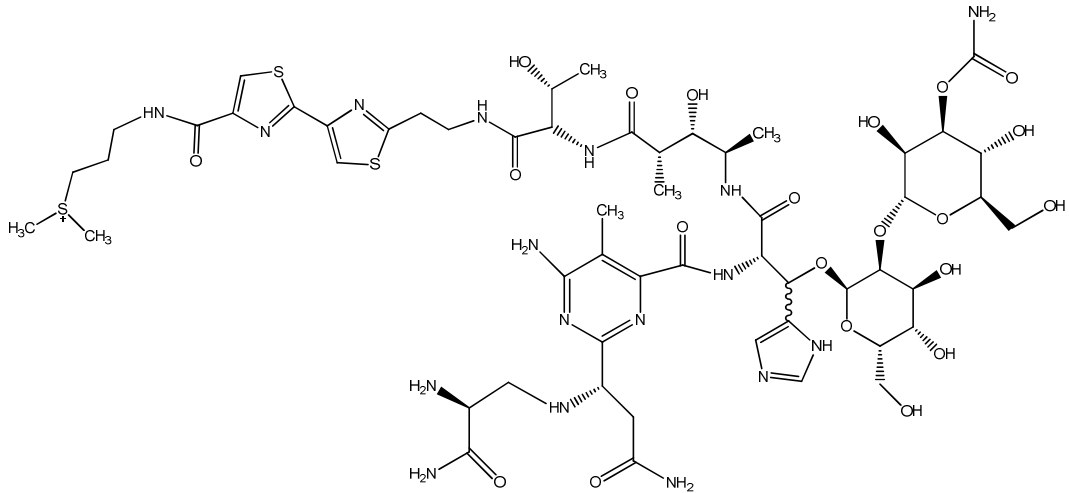


Figura 5: Representação da estrutura da bleomicina.

Quitosana modificada com o ácido glicirretínico e com o ácido esteárico ou com aldeído láurico formam micelas poliméricas, que foram encapsuladas com doxorubicina (WANG X.H. et al., 2012). A doxorubicina é um fármaco da família das antraciclina já amplamente utilizado para diversos tipos de câncer (Figura 6). No entanto, seus efeitos secundários são graves, portanto os lipossomos contendo doxorubicina já são amplamente investigados como sistemas capazes de modificar a farmacocinética e a biodistribuição e consequentemente promoverem uma redução significativa da toxicidade do fármaco. Além dos lipossomos inúmeros sistemas de liberação de fármacos como micelas, nanopartículas lipídicas, sólidas entre outros ainda são investigados para melhorar a biodistribuição da doxorubicina.

Em particular, as micelas poliméricas recebem especial atenção, devido as suas notáveis vantagens, tais como, apresentam baixos valores de concentração micelar crítica (CMC) o que promove a estabilidade do fármaco em ambiente aquoso, pois os polímeros anfífilos são solúveis em água mesmo apresentando substituintes hidrofóbicos. Segundo Wang e colaboradores (WANG X.H. et al., 2012) um dos principais parâmetros observados nos sistemas de micelas poliméricas é o grau de substituição dos grupos hidrofóbicos na

quitosana, pois foi verificado que a capacidade das micelas em solubilizar a doxorrubina está relacionada com a proporção de grupos adicionados á matriz polimérica. Segundo WANG X.H. e colaboradores a maior hidrofobicidade das micelas resultou em uma maior capacidade de encapsulação e estabilidade, bem como uma melhor absorção celular em estudos *in vitro*.

Um sistema de liberação de fármaco usando nanopartículas de folato-plurônicos-quitosana foi desenvolvido e avaliado para proporcionar liberação da doxorrubina (MANASPON; PASUWAT; PIMPHA, 2012). Segundo MANASPON e colaboradores a doxorrubina foi encapsulada em micelas na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), através de um método de auto-montagem para formar micelas do conjugado de quitosana-folato-ácido plurônico. A eficiência de encapsulação para esses sistemas foi de $58,1 \pm 4,7$ %. O tamanho médio das nanopartículas foi de $37,4 \pm 2,0$ nm, enquanto que o potencial zeta foi de $+12,9 \pm 2,3$ mV, indicando a presença de uma camada superficial estável. O estudo de liberação *in vitro*, mostrou uma liberação brusca inicial, seguido por uma liberação controlada, que foi observada em 24 horas.

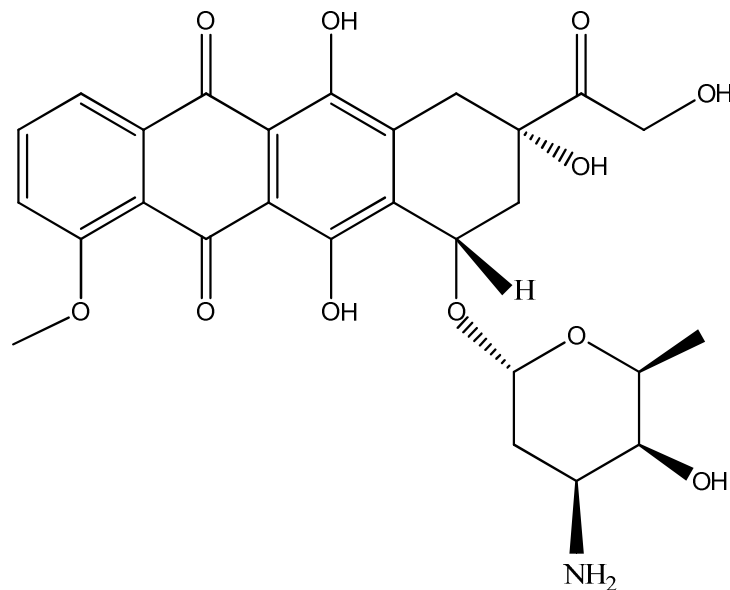


Figura 6: Representação da estrutura da doxorrubina.

O co-encapsulamento com fármacos de propriedades distintas como a doxorrubina e a curcumina foi investigado em nanopartículas anfifílicas derivadas de quitosana. A curcumina é um composto natural da classe dos curcuminóides que apresenta propriedades anti-inflamatórias e antitumorais (Figura 7).

A co-encapsulação em nanopartículas de poli(butilcianoacrilato) foram preparadas por emulsão e polimerização interfacial (DUAN J. et al., 2012). A eficiência de encapsulamento de doxorrubicina e curcumina foram $49,98 \pm 3,32 \%$ e $94,52 \pm 3,14 \%$ respectivamente.

O encapsulamento simultâneo promoveu alterações em diversos parâmetros das nanopartículas, tais como, tamanho, potencial zeta, capacidade de carreamento, eficiência de encapsulação. Entretanto, foi observado que o sistema resultou numa menor citotoxicidade, portanto a co-administração de dois agentes em uma única partícula carregada poderia melhorar a eficácia terapêutica de ambas (DUAN J. et al., 2012).

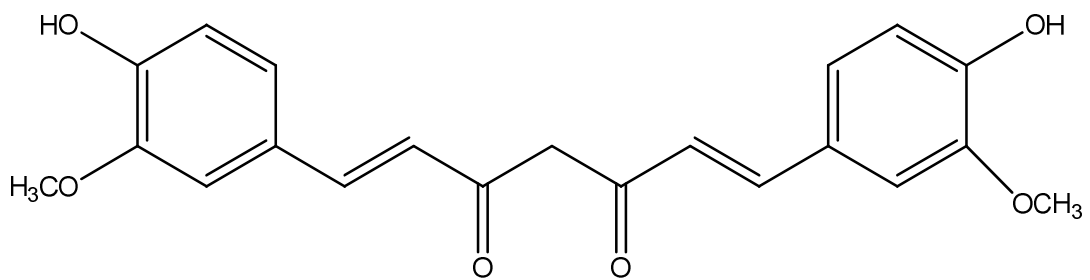


Figura 7: Representação da estrutura da curcumina.

1.3 Quercetina

Nesse trabalho será utilizado como fármaco modelo a quercetina (3,5,7,3'-4'-pentahidroxi flavona) que é um flavonóide natural que está presente em diferentes espécies de frutas e vegetais. Os flavonóides são uma classe de compostos naturais com estrutura fenólica variável de considerável interesse científico, pois em geral eles apresentam diversas propriedades terapêuticas responsáveis por diversos benefícios à saúde, as mais conhecidas são as antioxidantes e anti-inflamatórias (YANG C. et al., 2001). A capacidade antioxidante desses compostos é determinada, especificamente pela presença de hidroxilas que podem doar elétrons e suportar a deslocalização em torno do sistema aromático. A estrutura da quercetina está representada na Figura 8.

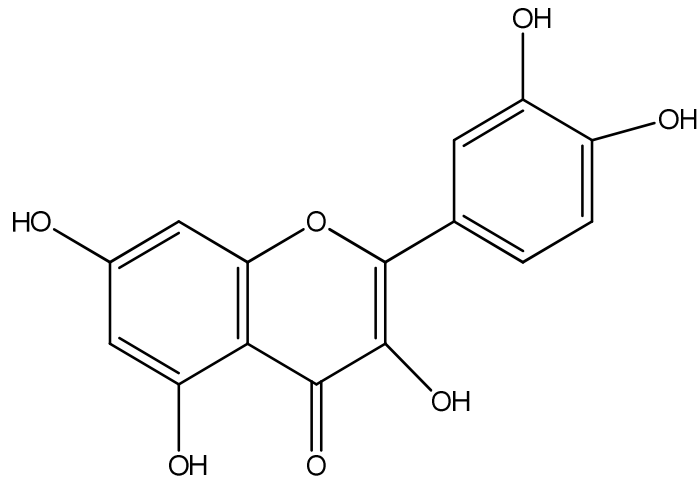


Figura 8: Representação da estrutura do flavonóide quercetina.

Na natureza a principal função da quercetina é proteger as espécies vegetais da radiação ultravioleta, além de ser capaz de eliminar bactérias e vírus. Já *in vitro*, as principais características que a quercetina apresenta são a potente atividade antioxidante (PLUMB; PRICE; WILLIAMSON, 1999) e elevada capacidade de atuar como antiproliferante de células tumorais, uma vez que apresenta propriedades antimutagênicas (RANELLETTI et al., 1992). A quercetina tem mostrado ter efeitos citotóxicos em células tumorais por meio de vários mecanismos, tais como indução a apoptose, ou seja, a morte celular programada (JAKUBOWICZ; PADUCH; PIERSIAK, 2005) e inibição de angiogênese (TAN et al., 2003). Apesar dessas atividades biológicas interessantes, a baixa solubilidade do flavonóide quercetina em solução aquosa dificulta a sua utilização como um agente terapêutico (TUNGJAI et al., 2008). Portanto, o emprego dos sistemas nanoestruturados como carreadores viabilizam a utilização de fármacos antitumorais hidrofóbicos como a quercetina de baixa solubilidade em solução aquosa, pois esses sistemas anfílicos apesar de serem hidrofobicamente modificados são solúveis em água (KHONKARN et al., 2011), (NABID et al., 2011). Portanto, os nanocarreadores permitem o estudo e conseqüentemente a ação desses quimioterápicos em sistemas fisiológico.

2 OBJETIVO GERAL

Síntese e caracterização de derivados anfífilos de quitosana e o estudo da auto-associação em solução aquosa, visando à obtenção de nanopartículas poliméricas com potencial para o transporte e a liberação controlada de fármacos com baixa solubilidade em solução aquosa.

2.1 Objetivos Específicos

- i) Síntese e caracterização de derivados anfífilos de quitosana contendo o grupo zwitteriônico hidróxido de 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina (SPP) e proporções crescentes do grupo hidrofóbico dodecil (DD).
- ii) Estudo do comportamento associativo em meio aquoso dos derivados sintetizados, procurando correlacionar o efeito da composição às propriedades em solução. Determinação da concentração de agregação crítica (CAC) empregando-se a espectroscopia de fluorescência utilizando-se pireno como sonda. Medidas de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) para análise do tamanho e morfologia dos agregados. Determinação da distribuição do tamanho e estabilidade dos agregados por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e potencial zeta (ζ).
- iii) Estudo da incorporação do fármaco quercetina, ou seja, determinação da capacidade de carregamento e eficiência de encapsulamento da quercetina por espectroscopia no UV-Vis.

3 METODOLOGIA

3.1 Reagentes

Os reagentes utilizados na elaboração do trabalho estão listados na (Tabela 1), a seguir bem como seus respectivos graus de pureza e marca. A água utilizada nos experimentos foi deionizada em um sistema de purificação de água da Gehaka com condutividade inferior a $1\mu\text{S}/\text{cm}$ a $25\text{ }^\circ\text{C}$.

Tabela 1 - Reagentes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Nome do reagente	Grau de Pureza (%)	Marca
<i>acetato de sódio</i>	99,0	<i>Synth</i>
<i>acetona</i>	99,5	<i>Synth</i>
<i>ácido acético glacial</i>	98,0	<i>Synth</i>
<i>ácido clorídrico</i>	37,0	<i>Vetec</i>
<i>cianoborohidreto de sódio</i>	95,0	<i>Aldrich Chemical Co</i>
<i>cloreto de deutério</i>	99,8	<i>Aldrich Chemical Co</i>
<i>cloreto de sódio</i>	99,0	<i>Synth</i>
<i>diidrogenofosfato de sódio monohidratato</i>	98,0	<i>Analyticals</i>
<i>dodecil aldeído</i>	95,0	<i>Aldrich Chemical Co</i>
<i>etanol</i>	99,5	<i>Synth</i>
<i>hidróxido de sódio</i>	98,7	<i>Dinâmica</i>
<i>hidróxido de 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina</i>	97,0	<i>Aldrich Chemical Co</i>
<i>N-N-dimetilformamida</i>	99,8	<i>Vetec</i>
<i>nitrito de sódio</i>	99,0	<i>Merck</i>
<i>óxido de deutério</i>	99,9	<i>Aldrich Chemical Co</i>
<i>quitosana comercial</i>	98,6	<i>Polymar Ind. Com. Exp. Ltda</i>
<i>quercetina</i>	95,0	<i>Aldrich Chemical Co</i>

3.2 Sínteses dos Derivados de Quitosana

3.2.1 Desacetilação da Quitosana

O processo de desacetilação da quitosana foi realizado por hidrólise básica do polímero (MURPHY et al., 2000). O processo está representado na Figura 9, trata-se de uma reação de hidrólise básica da amida. O íon hidroxila ataca o carbono da acila da amida, ou seja, ocorre a adição nucleofílica do íon hidróxido ao grupo carbonila. Como a reação ocorre em meio aquoso, há transferência de prótons H^+ do meio para a forma aniônica do intermediário tetraédrico. Em seguida, há a protonação do nitrogênio amino do intermediário tetraédrico e conseqüentemente a dissociação da forma N-protonada do intermediário tetraédrico clivando a ligação entre o carbono e o nitrogênio, formando assim a estrutura da quitosana com mais de 50% dos monômeros com grupos aminos livre, liberando íons acetato e água (SOLOMONS; FRYHLE, 2006). Para a síntese de uma quitosana com alto grau de desacetilação pesou-se 8 g de quitosana comercial Polymar®, em um béquer de 500 mL, adicionou-se 400 mL de água deionizada e colocou-se sob agitação magnética para promover a dispersão. Em seguida, foram adicionados 8 mL de ácido acético para obter uma solução (2 % em massa) o qual promoveu a solubilização do polímero. A solução foi mantida em agitação constante durante 12 horas para se obter a completa solubilização do polímero. Posteriormente, a quitosana foi transferida para um balão de fundo redondo de 1000 mL de três bocas equipado com termômetro, condensador de refluxo, nitrogênio e manta aquecedora. A temperatura foi elevada para 100 °C, a solução foi mantida sob agitação constante e em seguida foram adicionados lentamente 200 mL de solução de hidróxido de sódio (50 % em massa). A suspensão foi mantida na temperatura de 100 °C por 90 minutos em atmosfera de nitrogênio. Após esse tempo à reação foi interrompida e a suspensão foi vertida em um béquer de plástico contendo aproximadamente 4 litros de água deionizada pré-aquecida a 80 °C e essa suspensão foi mantida, sob agitação por 20 minutos. Após a decantação o precipitado foi lavado com água deionizada até a suspensão atingir o pH de aproximadamente 7, em seguida o precipitado foi separado por filtração a vácuo. O sólido formado foi dissolvido em 400 mL de uma solução de ácido acético (2 % em massa) e submetido novamente ao mesmo procedimento descrito acima para obtenção de um maior grau de desacetilação do polímero (TIERA et al., 2006). Após aproximadamente 10 lavagens por meio de sifonação com água deionizada, a suspensão obtida foi filtrada a vácuo, e o sólido foi lavado com água e também com acetona para facilitar a secagem, e foi seco na estufa aproximadamente 40 °C por 72

horas. Posteriormente triturou-se o polímero utilizando um pistilo e almofariz para homogeneizar a amostra.

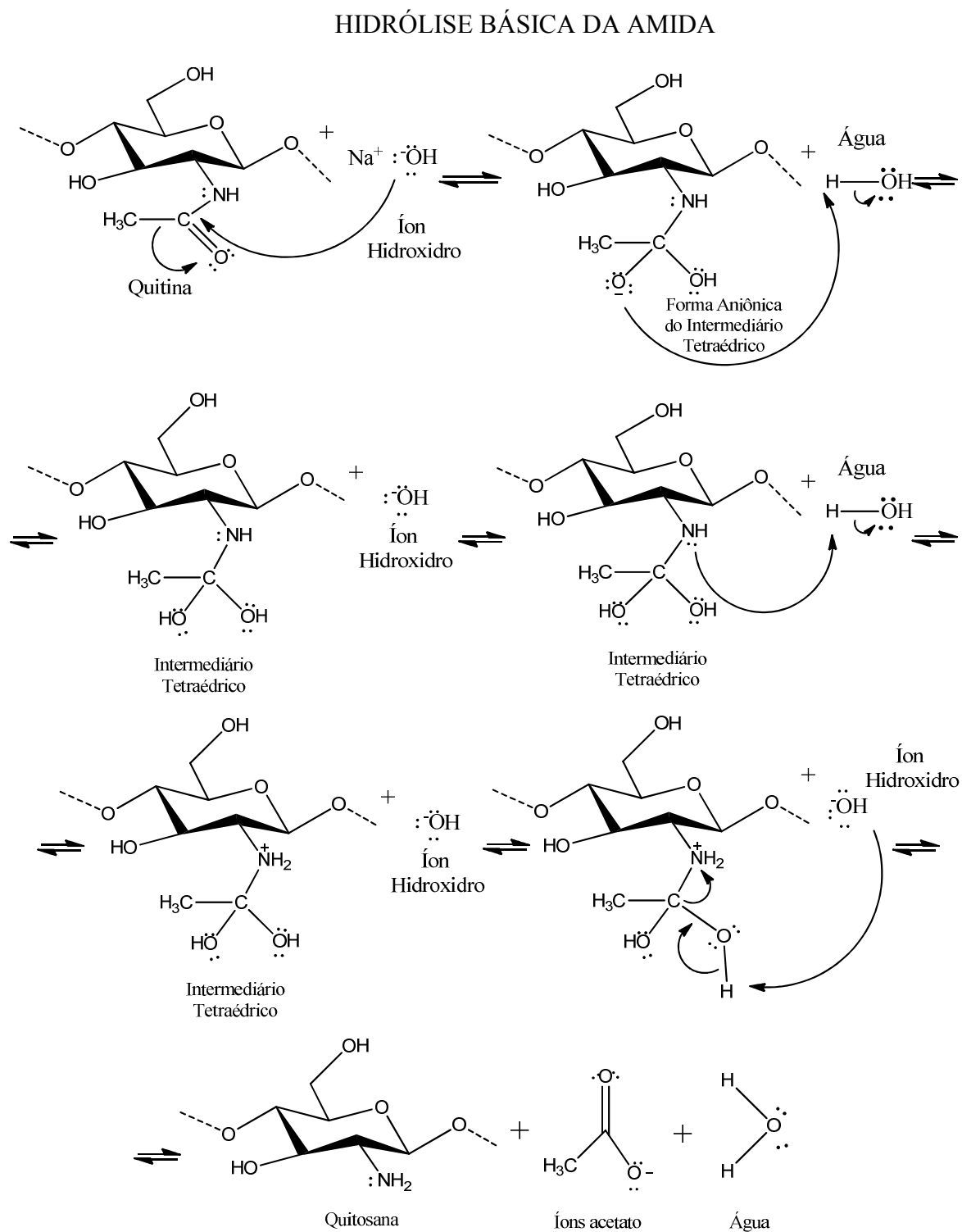


Figura 9: Representação das estruturas de quitina, quitosana e do processo de desacetilação da quitina para a formação de quitosana (Adaptado de Solomons; Fryhle, 2006).

3.2.2 Degradação da Quitosana

A reação de degradação da quitosana consiste em romper as ligações glicosídicas por meio de uma reação com um sal de sódio com o objetivo de reduzir o tamanho da cadeia polimérica, produzindo assim quitosana de menor massa molecular. A degradação da quitosana desacetilada foi realizada por oxidação com nitrito de sódio em meio ácido utilizando o procedimento descrito por (TOMMERAAS et al.,2001). Aproximadamente 6,0 gramas de quitosana desacetilada foram solubilizadas em 322 mL de solução de ácido acético 2 % (v/v). Em seguida a solução foi purgada com nitrogênio por 1 hora sob agitação constante, resfriada a 4 °C. A agitação foi interrompida e com o auxílio de uma seringa, adicionou-se 11 mL de uma solução contendo 0,1340 gramas de nitrito de sódio, e a reação foi mantida a 4 °C por 18 horas na ausência de luz. Após a reação a solução foi dialisada utilizando-se membrana Spectrapore (MWCO 2 kDa) por cinco dias trocando a água três vezes por dia. No primeiro dia a diálise foi realizada contra a água, no segundo dia contra hidróxido de sódio 0,01 mol L⁻¹ e nos três dias seguintes novamente contra a água e por fim o produto foi liofilizado utilizando um liofilizador Liobras modelo (L101).

3.2.3 Síntese do Derivado Zwitteriônico de Quitosana

A síntese do derivado zwitteriônico a partir da quitosana consiste em uma reação de adição. A reação de adição é o resultado da conversão de uma ligação pi e uma ligação sigma em duas ligações sigma, normalmente o resultado dessa conversão é uma troca favorável energeticamente. O calor liberado ao se fazer duas ligações sigmas excede o calor necessário para clivar uma ligação sigma e uma ligação pi, portanto as reações de adição são geralmente exotérmica (SOLOMONS; FRYHLE, 2006). O monômero zwitteriônico hidróxido de 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina (SPP) reage com a quitosana por meio de uma reação de adição nucleofílica conjugada, ou seja, ocorre a adição de um nucleófilo a uma ligação C=C do grupo vinil. O produto inicial da adição conjugada é um íon estabilizado por ressonância, o nitrogênio do grupo SPP atrai os elétrons do anel aromático e conseqüentemente promovem a deslocalização dos elétrons da ligação pi do grupo vinil C=C possibilitando assim a adição conjugada do nucleófilo ao carbono. Portanto, a ligação C=C é ativada pela presença do átomo de nitrogênio do grupo piridina que possibilita a reação de adição, como a reação ocorre em meio aquoso há a transferência de prótons H⁺ do meio para a forma aniônica do

intermediário, e em seguida a carga positiva do nitrogênio é regenerada. O esquema da reação está apresentado na Figura 10. A síntese do derivado zwitteriônico foi realizada utilizando o procedimento descrito por (SASHIWA et al., 2003), aproximadamente 3 gramas de quitosana (correspondente a 18,61 milimol de NH_2) foram solubilizadas em uma solução contendo 150 mL de água e 1,5 mL de ácido acético. Em seguida adicionou-se aproximadamente 8 gramas do reagente zwitteriônico SPP (2 equivalente/ NH_2). A solução foi mantida sob agitação constante à temperatura de 50 °C por 48 horas. Após esse período adicionou-se uma solução de bicarbonato de sódio concentrada que foi utilizada para ajustar o pH para 8 - 9, posteriormente a solução foi dialisada contra água utilizando-se uma membrana Spectrapore (MWCO 2 kDa) para purificação do produto. A diálise foi realizada contra água deionizada por dois dias, com troca três vezes por dia. O produto foi congelado e liofilizado em um liofilizador Liobras modelo (L101).

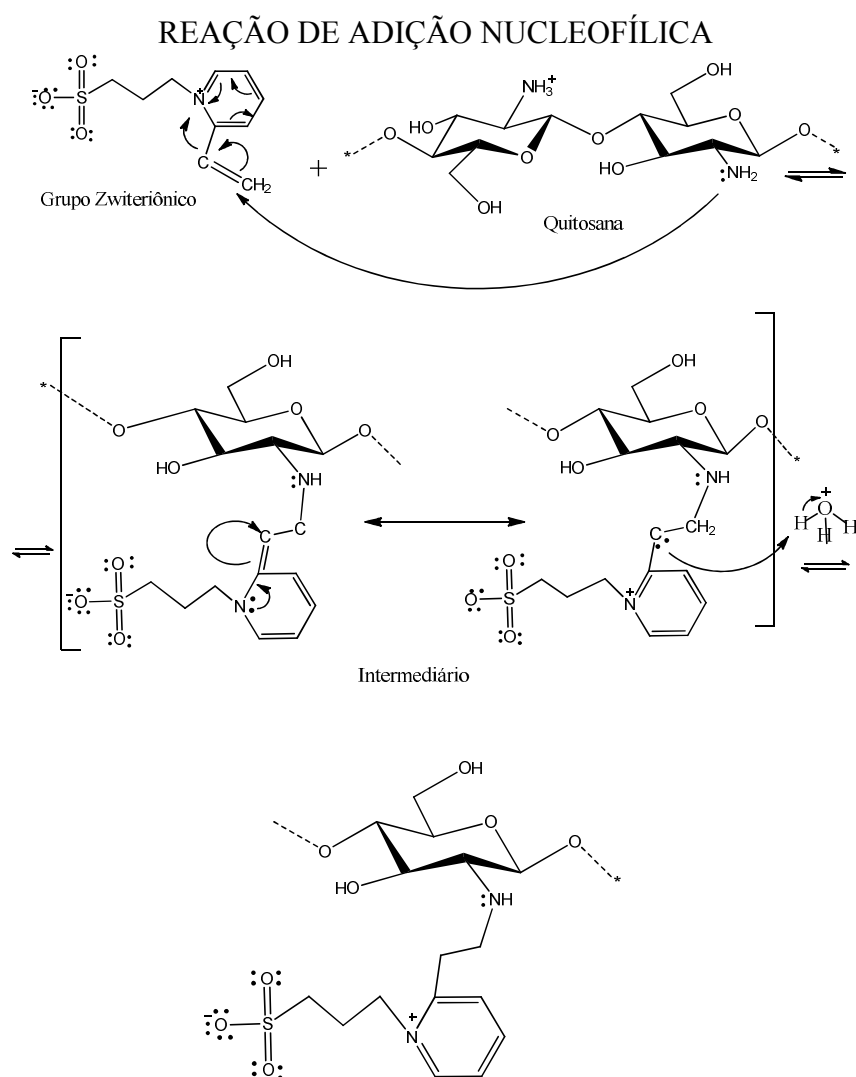


Figura 10: Representação do esquema da reação.

3.2.4 Polimerização do Grupo Zwitteriônico

O monômero do grupo zwitteriônico hidróxido de 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina foi polimerizado, para esse processo foi solubilizado 1 grama do grupo zwitteriônico em 50 mL de água deionizada em um balão de fundo redondo de duas bocas. No balão foram adicionadas 10 miligramas do iniciador 4,4'-azobis(4-ácido cianoaléico) Figura 11. Antes de iniciar o processo de polimerização borbulhou-se nitrogênio na solução durante 10 minutos para retirar o oxigênio. Essa solução foi colocada em banho de óleo e aquecida a 60 °C por 10 horas. Após esse período a solução foi retirada do aquecimento e o produto foi liofilizado utilizando um liofilizador Liobras modelo (L101).

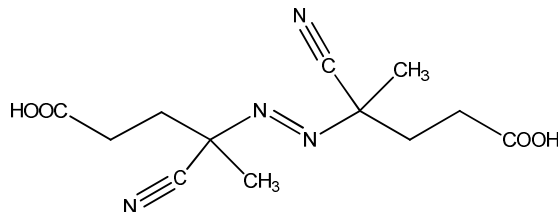


Figura 11: Representação da estrutura do indicador.

3.2.5 Síntese dos Derivados Zwitteriônicos Dodecilados de Quitosana

A reação de aminação redutiva foi utilizada para a modificação da quitosana com dodecil aldeído utilizando o procedimento descrito por (DESBRIÈRES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996). O polímero de quitosana apresenta aminas primárias, que são capazes de se adicionarem a aldeídos e cetonas formando iminas $R_2C=N$. As iminas são importantes intermediários em muitos caminhos metabólicos. A reação da quitosana com o dodecil aldeído corre em duas etapas distintas uma lenta e outra rápida. Na primeira etapa (lenta) ocorre o ataque nucleofílico no aldeído pelos elétrons do par não ligante do grupo amina da quitosana, forma-se então um intermediário tetraédrico. Um próton é então transferido a partir do nitrogênio a um oxigênio, promovendo a formação do intermediário de reação neutro que perde água gerando a imina. Na principal etapa da reação, ocorre a formação da imina ou da base de Schiff entre o nitrogênio do grupo amina da quitosana e o carbono da carbonila do aldeído do dodecil e na segunda etapa ocorre à redução da imina e essa é a etapa rápida da reação, o esquema da reação está apresentado na Figura 12. O procedimento para a obtenção de um derivado com 10 % de substituição é descrito a seguir. Solubilizou-se 0,8 gramas de quitosana em 91,7 mL de uma solução de ácido acético 2% (v/v) e adicionou-se 63,1 mL de

etanol. O pH foi ajustado para 5 com solução de hidróxido de sódio concentrada visto que o pH ideal para que ocorra a reação é entre 4-8. Em seguida adicionou-se 0,073 mL de dodecil aldeído (DD) sob agitação vigorosa. Após 1 hora sob agitação constante adicionou-se cianoborohidreto de sódio na razão 3:1 (3NaCNBH_3 : 1NH_2 mols). A solução foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. A purificação dos derivados alquilados foi realizada por meio de diálise utilizando uma membrana Spectrapore (MWCO 2 kDa). A diálise ocorreu contra água deionizada por 3 dias, trocando-se a água de diálise 3 vezes ao dia, sendo que a primeira água da diálise foi devidamente tratada com hipoclorito de sódio seguindo as normas de descarte de derivados de cianeto. Segundo (COSTA, 1992) no processo de degradação do cianeto por meio de hipoclorito de sódio os principais produtos de degradação formados são o gás carbônico, nitrogênio, água e cloreto de sódio.

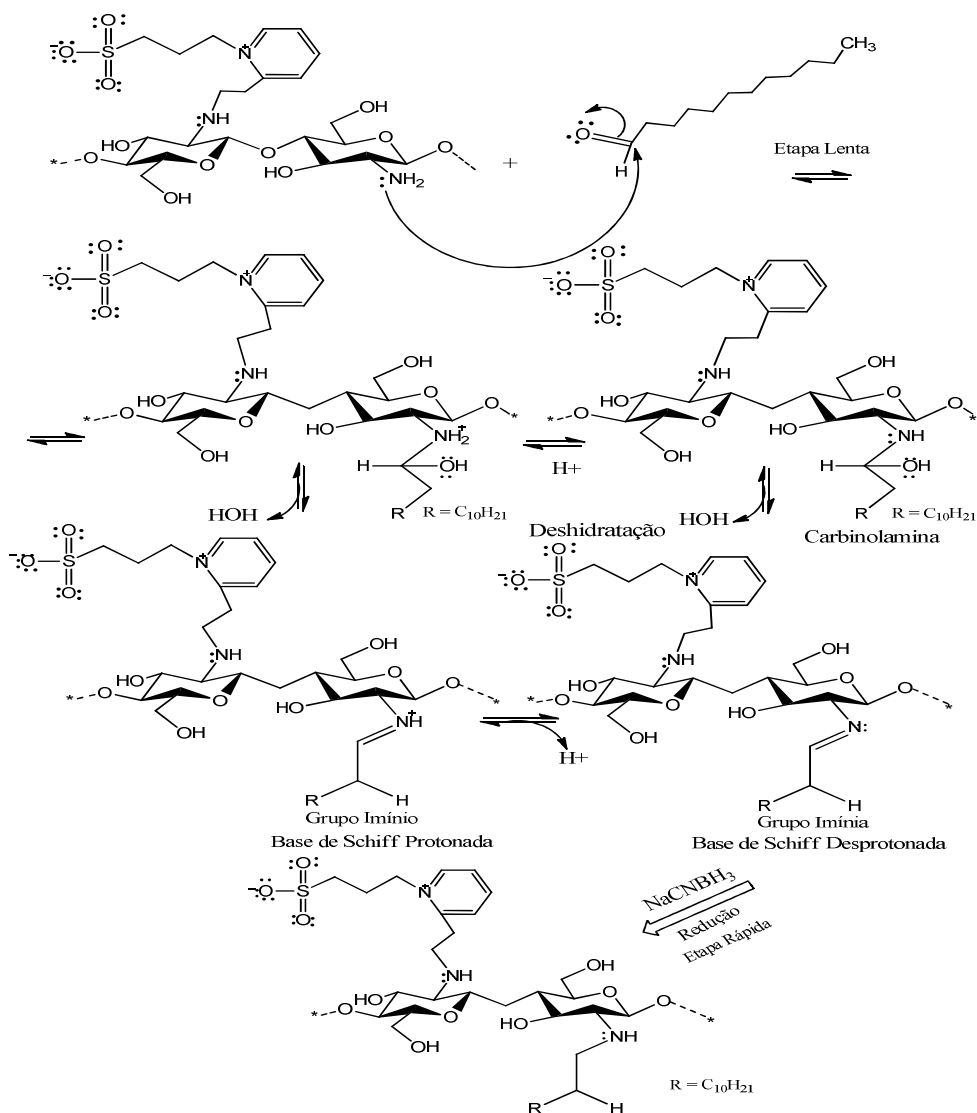


Figura 12: Representação da reação do derivado zwitteriônico de quitosana com dodecil aldeído (Adaptado de Solomons; Fryhle, 2006).

3.3 Caracterização dos Derivados

3.3.1 Titulação Potenciométrica

Titulação potenciométrica é uma técnica analítica que tem por objetivo a determinação do ponto de equivalência entre o número de moles de OH^- (ou H_3O^+) adicionados como titulante e o número de mols H_3O^+ (ou OH^-) inicialmente presentes no analito (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 1998). Os resultados obtidos foram colocados na forma de um gráfico de pH em função do volume de NaOH adicionado. Os dados foram utilizados para obtenção da derivada primeira da curva de titulação ($\Delta\text{pH}/\Delta V$ em função do volume da base) e o volume de base entre os picos da curva da primeira derivada foi determinado e utilizado para calcular o grau médio de desacetilação utilizando a Equação (1).

$$GD = \left[\frac{V_{\text{NaOH}} \cdot m_{\text{NaOH}}}{(V_{\text{NaOH}} \cdot m_{\text{NaOH}}) + \frac{(m_Q - (V_{\text{NaOH}} \cdot m_{\text{NaOH}} \cdot 161,22))}{203,22}} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: V_{NaOH} é o volume da base, m_{NaOH} é a concentração da base em mol L^{-1} , m_Q é a massa de quitosana utilizada na titulação, $161,22$ é a massa molar da unidade desacetilada e $203,22$ corresponde a massa molar da unidade acetilada.

A determinação do grau médio de desacetilação da quitosana foi realizada utilizando-se o método descrito por (TOLAIMATE et al., 2000). Pesou-se 40 mg de quitosana comercial e desacetilada, previamente secas em estufa à 50 °C, até massa constante. Em seguida, os polímeros foram solubilizados em aproximadamente 10 mL de solução de ácido clorídrico 0,0959 mol L^{-1} padronizado, sob agitação contínua, até total dissolução do sólido à temperatura ambiente. Em seguida, a solução foi titulada com solução de NaOH 0,0957 mol L^{-1} previamente padronizada. As variações de pH obtidas durante a titulação foram medidas com um pHmetro Analion modelo PM 608 e um eletrodo combinado de vidro Digmed DM 21.

3.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênios (RMN de ^1H)

Na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, um composto que possui átomos de hidrogênio é submetido a um forte campo magnético e a uma radiação de energia eletromagnética. Nessas condições, os núcleos dos átomos do composto absorvem a energia e essa absorção é quantizada produzindo assim, um espectro característico para o

composto. Em uma determinada molécula, os núcleos de hidrogênio podem estar em regiões de diferentes densidades eletrônicas, sendo assim, os átomos de hidrogênios absorvem energia de forma ligeiramente diferente. Portanto, os sinais para tais hidrogênios vão ocorrer com deslocamentos químicos diferentes no espectro de ressonância magnética. As áreas abaixo dos sinais são da mesma proporção que o número de átomos de hidrogênio responsáveis pelo sinal, e permitem a obtenção de informações referentes à estrutura da molécula de interesse (SOLOMONS; FRYHLE, 2006). A quitosana desacetilada e seus derivados foram caracterizados por RMN de ^1H . As amostras foram preparadas pela dissolução de, aproximadamente, 10 mg de polímero em 1,0 mL de óxido de deutério, seguida da adição de 10 μL de cloreto de deutério (JUNG et al., 1999). As amostras foram mantidas sob agitação magnética até completa solubilização e só posteriormente foram transferidas para os tubos de RMN. A medida foi realizada a 70 °C utilizando-se o espectrômetro Bruker (ARX-500) 500 MHz da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

3.3.3 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

As amostras sólidas de quitosana e seus derivados foram todas caracterizadas por ATR-FTIR (Infravermelho com Reflexão interna ou refletância total atenuada) com diamante como elemento interno de reflexão (IRE) que possibilita a obtenção de espectros qualitativos de sólidos, independentemente da espessura. Essa técnica é baseada na passagem de um feixe de radiação de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorrendo absorção. Quando a amostra absorve a radiação que a permeia, o feixe é atenuado a comprimentos de onda correspondentes às bandas de absorção no infravermelho, dando origem ao espectro (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2006). Aproximadamente 5 mg foram previamente secas em estufa a 60 °C por 24 horas para eliminar possível umidade das amostras. As medidas de infravermelho (IV) foram realizadas na faixa de 4000 a 600 cm^{-1} (região fundamental ou infravermelho médio). Os espectros de IV foram realizados no espectrofotômetro Perkin Elmer Spectrum 100 FT-IR de reflexão ATR do Laboratório de Sucroquímica e Química Analítica do Departamento de Química e Ciências Ambientais (IBILCE-UNESP).

3.3.4 Determinação da Massa Molar Média por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detecção por Índice de Refração (IR)

A cromatografia de permeação em gel (GPC) é uma técnica muito utilizada para determinar massa molar e distribuição de massa molar em polímeros naturais e sintéticos. O princípio da técnica está na separação de moléculas pelo seu raio hidrodinâmico. As massas moleculares média da quitosana e seus derivados hidrofílicos foram determinadas por GPC utilizando-se um detector por índice de refração (IR). A intensidade da banda observada com o detector IR é proporcional à concentração do analito. O detector de IR é menos sensível do que o UV, sendo esta a principal razão pela qual é menos utilizado, mas possui vantagens, como por exemplo, é adequado para a detecção de componentes que não absorvem no UV por isso o detector IR é frequentemente utilizado para detecção de açúcares e polímeros nas análises de GPC. As medidas foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu (LC-20), com detecção por índice de refração modelo RID-10^a do Laboratório de Fotoquímica, em colaboração com o Prof^a. Dr^a. Carla Cristina Schmitt Cavaleiro do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos (IQSC). Para a análise foi empregado como eluente a solução tamponante ácido acético 0,3 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,5), o fluxo foi de 0,8 mL/minuto, a temperatura de 35° C. A concentração das amostras injetadas no cromatógrafo foi 5 g L⁻¹ solubilizadas também em solução tamponante ácido acético 0,3 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,5). A curva de calibração das colunas foi construída a partir da injeção com soluções padrões monodispersos Pullulan de Mw 805.000 a 6200, em colunas com limites de exclusão de 10⁻⁵ e 10⁻⁶ com tamanhos de 8 mm x 300 mm. Pullulan é um polissacarídeo natural produzido a partir do amido, que apresenta monômeros de glicose unidos por ligações glicosídicas α (1→4) e α (1→6).

3.3.5 Espectrofotometria UV-Vis para a Determinação do Grau de Substituição (GS) de Grupos Zwitteriônicos

Para determinação do GS dos grupos SPP na quitosana utilizando a espectroscopia UV-Vis foram preparadas soluções na concentração de 0,8 mg L⁻¹ do grupo zwitteriônico polimerizado que foi sintetizado como descrito no item (3.2.4), quitosana desacetilada e quitosana desacetilada substituída com zwitteriônico em solução tamponante de acetato de sódio pH 5,0 (concentração de 50 mmol L⁻¹ e força iônica de 150 mmol L⁻¹). Essas soluções foram utilizadas para obtenção dos espectros de absorção na região do UV-Vis utilizando um espectrofotômetro Cary 100 Bio. Inicialmente determinou-se o comprimento de onda (λ)

máximo de absorção e o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para o zwitterion. O (ϵ) para o grupo zwitteriônico foi determinado em duplica a partir de diluições de uma solução estoque do composto hidrofílico zwitteriônico na concentração de 1 g L^{-1} . Os graus de substituição foram determinados a partir das absorvâncias das soluções dos polímeros no máximo de absorbância, comparando-se a massa pesada da amostra com a massa do zwitteriônico determinada indiretamente pela lei de Lambert-Beer utilizando as Equações (2) e (3).

$$C = \frac{A(\lambda)}{l\epsilon} \quad (2)$$

$$GS = \frac{n^\circ \text{ mols de SPP}}{n^\circ \text{ mols de Quitosana}} = \frac{C \cdot V}{(Mq - Mspp/160,22)} \cdot 100 \quad (3)$$

Onde: C é a concentração inicial em (mol L^{-1}) determinada a partir da Equação (2), V é o volume final da solução (mL), Mq (massa de quitosana utilizada), $Mspp$ (massa de grupos que absorvem no UV-Vis).

3.4 Avaliação da Solubilidade e Estudo da Associação dos Anfílicos em Meio Aquoso

3.4.1 Análise da Transmitância em Função do pH por Espectrofotometria UV-Vis

Para avaliação da solubilidade do derivado zwitteriônico em solução aquosa preparou-se uma solução estoque do derivado na concentração de 1 g L^{-1} com ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, 3 mL da solução do derivado foram transferidos para uma cubeta de quartzo, e o pH da solução foi variado sob agitação magnética por adições sequenciais de $25 \mu\text{L}$ de uma solução $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de hidróxido de sódio até pH 12. O pH e a transmitância em 566 nm (TIERA et al., 2006) foram medidos após 2 minutos de cada adição. As medidas de absorbância e pH foram realizadas respectivamente, em um espectrofotômetro Cary 100 e em pHmetro Analion modelo PM 608 com eletrodo Digmed DM 21 que foi calibrado conforme as instruções do manual do operador.

3.4.2 Determinação da Concentração de Agregação Crítica por Fluorescência no Estado Estacionário

As medidas de fluorescência vêm sendo amplamente utilizadas para avaliar o comportamento associativo de polímeros anfifílicos. Em geral, são empregadas as sondas fluorescentes cujos espectros e/ou rendimentos quânticos de fluorescência sofrem alterações dependendo da polaridade do meio circundante. Os polímeros anfifílicos podem exibir um comportamento similar aquele observado para surfactantes de baixa massa molecular, formam agregados acima de certa concentração denominada concentração de agregação crítica (CAC). Segundo (BRAND; GOHLKE, 1972), este comportamento é induzido pela presença de grupos hidrofóbicos na cadeia polimérica o que promove a alteração de propriedades como a polaridade e viscosidade do microambiente de solubilização das sondas (Figura 13).

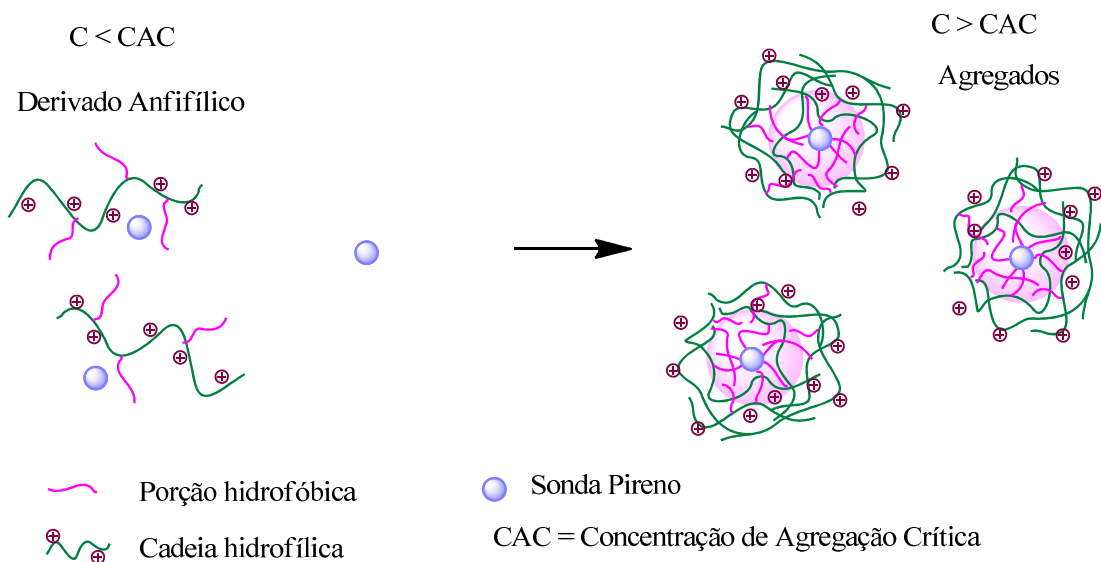


Figura 13: Esquema ilustrativo da interação do pireno com a porção hidrofóbica dos derivados anfifílicos de quitosana.

O estudo da auto-associação em meio aquoso foi realizado fazendo uso do pireno (Figura 14) que exibe um espectro de emissão com cinco bandas vibracionais (Figura 15). Devido à hidrofobicidade, o pireno é incorporado nos ambientes hidrofóbicos proporcionados pelos agregados, alterando a estrutura vibracional de seu espectro. A diminuição da polaridade do meio altera a intensidade das bandas I e III no espectro e consequentemente a razão (I/III) e isso indica alteração da polaridade do microambiente em que a sonda se encontra. Portanto, a diminuição da polaridade do meio resulta no decréscimo da

intensidade da banda I e um aumento da intensidade da banda III. Assim, a razão das intensidades de emissão das bandas I e III pode ser utilizada como medida quantitativa da polaridade, ou seja, permite a determinação da concentração de agregação crítica (CAC) (SILVA, 2002).

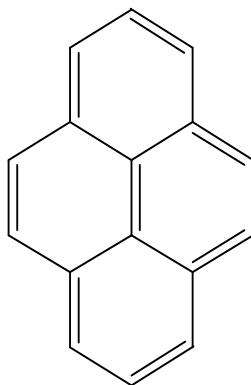


Figura 14: Estrutura molecular do pireno.

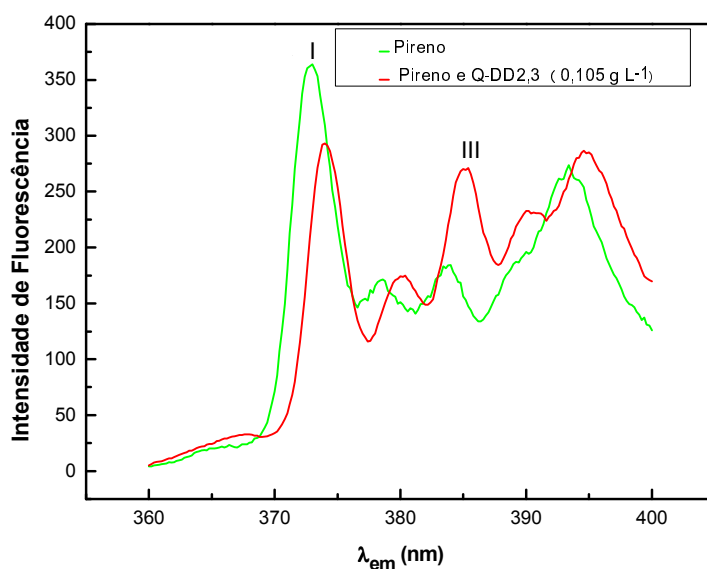


Figura 15: Espectro de emissão de pireno na concentração de $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ em solução tamponante acetato de sódio, pH 4,0 força iônica de 150 mmol L^{-1} , com derivado hidrofóbico de quitosana Q-DD2,3% nas concentrações de $0,105$ (vermelho) e 0 g L^{-1} (Verde).

Os experimentos de fluorescência utilizando pireno como sonda foram realizados a temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$ nos pHs 5, 6,2, e 7,4 utilizando-se soluções tamponantes de acetato e de fosfato de sódio (concentração de 50 mmol L^{-1} e força iônica de 150 mmol L^{-1}). Adicionou-se em uma cubeta de quartzo 2 mL de solução tamponante e $1,5 \mu\text{L}$ de uma solução de pireno em metanol (1 mmol L^{-1}). Em seguida, com auxílio de uma micro-seringa, a concentração foi variada pela adição consecutiva de alíquotas de $10 \mu\text{L}$ das soluções estoque dos derivados.

Para cada alíquota adicionada registrou-se a razão da intensidade de fluorescência das bandas I e III do espectro do pireno utilizando um Espectrofluorímetro Hitachi F4500 do Laboratório de Fotoquímica do Departamento de Química e Ciências Ambientais (IBILCE-UNESP). As intensidades das bandas I (373 nm) e III (348 nm) do espectro de fluorescência do pireno foram registradas. O comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) foi 310 nm e de emissão de 350 a 550 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata e com os resultados obtidos foi possível encontrar o valor aproximado de CAC utilizando como critério o início do decréscimo da razão I/III como descrito por (PHILIPPOVA et al., 2001); (TIERA et al., 2000).

3.4.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A microscopia eletrônica de transmissão consiste basicamente em um sistema de iluminação a vácuo que produz feixes de elétrons de alta energia, que ao incidir sobre uma amostra ultrafina, fornece imagens planas, imensamente ampliadas. A imagem é projetada, ampliada e focada em um anteparo fluorescente. A técnica permite a caracterização das partículas formadas por meio de análise de tamanho e morfologia (SALEMA; SANTOS 1992). Para as medidas de TEM foram preparadas soluções de quitosana na concentração de 0,01 g L⁻¹ para os derivados menos substituídos com DD e 1 g L⁻¹ para os derivados com maior GS-DD em solução tamponante pH 5,0 em concentração de 50 mmol L⁻¹ força iônica de 150 mmol L⁻¹. Dessas soluções retirou-se uma gota de 20 µL que foi misturada com uma gota de 20 µL da solução de acetato de uranila 2% (marcador de coloração negativa para contraste na TEM) essa mistura foi adicionada sobre uma grade de cobre, recoberta por um filme de carbono (FCF200-Cu, Formvar/Carbon film, Cu, 200 Mesh; E.M.S.: Electron Microscopy Sciences), e permaneceu em repouso por aproximadamente 6 horas. Após esse período, o excesso de acetato de uranila foi retirado utilizando papel-filtro e deixou-se a grade secar por 1 hora. As medidas de microscopia foram realizadas utilizando um Microscópio de Transmissão Zeiss EM 906 do Laboratório de Microscopia e Microanálise do Departamento de Biologia (IBILCE-UNESP).

3.4.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Determinação do Potencial Zeta(ζ)

Em geral, as técnicas empregadas no estudo de macromoléculas são fortemente influenciadas pelas interações macromoleculares, que provocam variações apreciáveis em parâmetros como o espalhamento de luz. Nas medidas de espalhamento de luz dinâmico faz uso da relação de Stokes-Einsten equação 4, que permite calcular o diâmetro hidrodinâmico médio das micelas ou agregados, mesmo em concentrações maiores que da CAC.

As partículas quando dispersas em um meio líquido movem-se ao acaso (movimento browniano), as menores movem-se mais rapidamente do que as maiores e, portanto, possuem maior coeficiente de difusão. Assim, em uma dispersão de partículas esféricas, com viscosidade conhecida à temperatura constante, o coeficiente de difusão é inversamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico (D_h) das partículas, como mostra a equação de Stokes-Einstein (4), onde κ é a constante de Boltzmann.

$$D = \frac{\kappa T}{3\pi\eta d_h} \quad (4)$$

Devido ao movimento Browniano, a intensidade da luz espalhada por um conjunto de partículas sofre variações ao longo do tempo, portanto a intensidade da luz que atinge o detector irá flutuar devido ao movimento das partículas. Esta flutuação ocorrerá com maior velocidade quando a dispersão for de partículas pequenas, e se caso a solução contenha mais partículas grandes a velocidade de flutuação será menor. Portanto, existe uma relação entre a velocidade de flutuação da luz espalhada e o coeficiente de difusão das partículas. Já o potencial zeta (ζ) ou potencial eletrocinético em sistemas coloidais se refere como a carga líquida na superfície de um material em contato com um líquido influencia diretamente a distribuição de íons na vizinhança, proporcionando um aumento da concentração de contra íons ligados à superfície. Sendo assim, o potencial da dupla camada elétrica que se forma na interface da partícula com o solvente é que se refere ao potencial eletrocinético (Manual do aparelho Zetasizer nano-ZS90).

O tamanho dos agregados bem como o potencial zeta são propriedades importantes para avaliar a estabilidade e a capacidade das partículas formadas em carrear fármacos. Esses parâmetros foram determinados por medidas de espalhamento de luz dinâmico utilizando o

instrumento Zetasizer nano-ZS90 da Malvern Instrument (Worcestershire, UK), equipado com laser He-Ne 10 mW operando em 633 nm à 25 °C em um ângulo de espalhamento de 90° do Laboratório de Polímeros com a colaboração do Prof. Dr. João Ruggiero Neto do Departamento de Física (IBILCE-UNESP). As medidas foram realizadas nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5 e 3,0 g L⁻¹ em solução tamponante de acetato pH 5,0 e fosfato de sódio pH 7,4 ambas na concentração de 50 mmol L⁻¹ e força iônica de 150 mmol L⁻¹. As medidas foram realizadas em duplicata com 3 acumulações para cada solução. Foram realizadas também medidas de tamanho e potencial zeta para os derivados poliméricos carregados com o fármaco quercetina em solução tamponante de acetato pH 5,0 em força iônica baixa de 50 mmol L⁻¹ e força iônica fisiológica de 150 mmol L⁻¹. As medidas foram realizadas com o polímero anfílico QDG-SPP36-DD2% que foi preparado na concentração de 0,2 g L⁻¹. A quercetina foi solubilizada em acetona e preparada na concentração 0,02 g L⁻¹, ou seja, dez vezes mais diluída que a solução do polímero.

3.4.5 Estudo da Incorporação de Fármacos Utilizando a Espectroscopia UV-Vis

O estudo da incorporação de fármacos pode ser realizado utilizando a espectroscopia UV-Vis, pois quando o fármaco livre apresenta comprimento de onda de absorção na faixa da região do visível. Uma vez conhecida a absorção do fármaco livre é possível inferir quanto do fármaco está absorvendo radiação e, portanto está associando aos derivados poliméricos ou nanopartículas (XIA et al., 2010). Neste trabalho foi empregada como fármaco modelo, a quercetina primeiramente foram preparadas soluções estoques de quercetina em solvente orgânico *N,N*-dimetilformamida (DMF). As soluções foram utilizadas para determinar o (ϵ) da quercetina em DMF. A quantidade de quercetina incorporada nos agregados foi determinada pela dissolução de uma alíquota em DMF, seguida da utilização da lei de Lambert-Beer (Equação 2) para determinação da eficiência de encapsulamento no agregados e a capacidade de carreamento. Os derivados poliméricos foram solubilizados em solução tamponante de acetato e de fosfato de sódio (concentração de 50 mmol L⁻¹ e força iônica de 150 mmol L⁻¹) em pHs 5 e 7,4, nas concentrações de 2 e 1 g L⁻¹. Uma solução estoque de quercetina foi preparada em acetona e alíquotas foram transferidas para tubos pequenos e submetidas à secagem com nitrogênio. As soluções dos derivados poliméricos foram misturas com o fármaco e mantidas sob agitação por aproximadamente 5 horas na ausência de luz. Em seguida, essas suspensões foram dialisadas por aproximadamente 15 horas em membranas Spectrapore (MWCO 2 kDa) contra solução tamponante na ausência de luz, esse

procedimento foi realizado para todos os derivados poliméricos em triplicata (Figura 16). Dessa forma foi possível separar a fração de fármaco livre da fração associada e assim determinar a eficiência de encapsulamento (Entrapment efficiency EE) média utilizando a equação (5) e a capacidade de carregamento (Drug Loading DL) média utilizando a equação (6) tanto em pH 5,0 quanto em pH 7,4 (YOO; PARK, 2001).

$$EE = \frac{\text{Massa de Fármaco Retida nas Nanopartículas (mg)}}{\text{Massa de Fármaco Inicial (mg)}} \times 100\% \quad (5)$$

$$DL = \frac{\text{Massa de Fármaco Retida nas nanopartículas (mg)}}{\text{Massa Total de Todos os Componentes da Nanopartícula}} \times 100\% \quad (6)$$



Figura 16: Representação esquemática do procedimento utilizado para determinar EE e DL.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da Quitosana e seus Derivados

4.1.1 Determinação do Grau de Desacetilação (GD) por Titulação Potenciométrica

A titulação potenciométrica foi realizada de acordo com o item (3.3.1) descrito na parte experimental. As Figuras 17 e 18 apresentam os gráficos das primeiras derivadas das titulações da quitosana comercial e desacetilada. A partir destas curvas foi possível determinar os pontos de inflexão que correspondem, respectivamente, ao início e término da desprotonação dos grupos aminos. O volume de base entre os dois pontos de inflexão permitem determinar o número de mols de NaOH consumido para desprotonar os grupos aminos e os valores dos GD obtidos para a quitosana comercial (QC) e a quitosana desacetilada (Q) foram respectivamente iguais a, 75,56 e 94,41 % e são apresentados na Tabela 2.

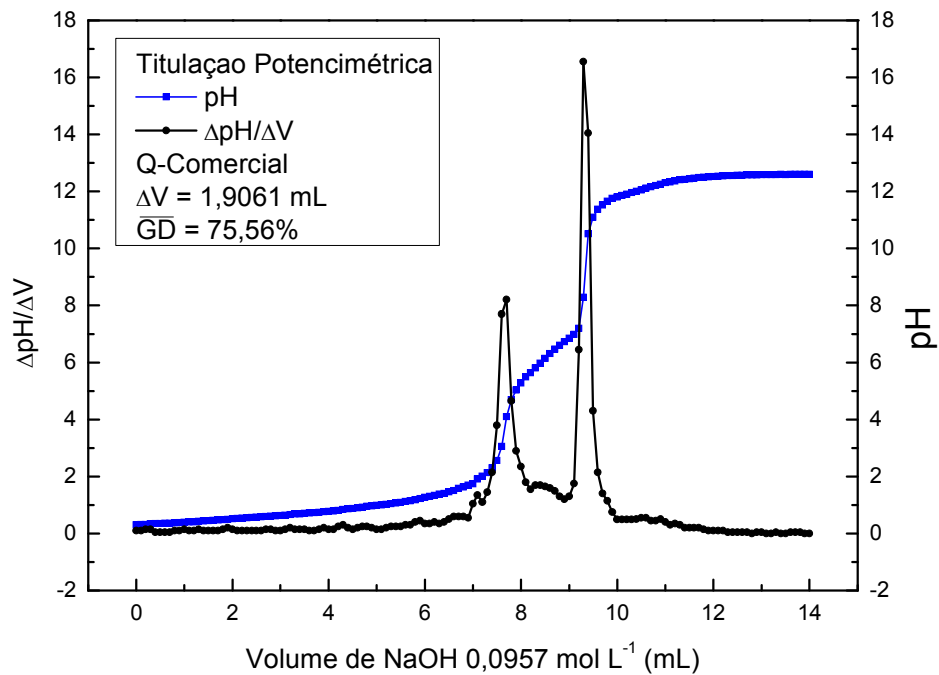


Figura 17: Titulação potenciométrica de QC, para determinação do DG médio.

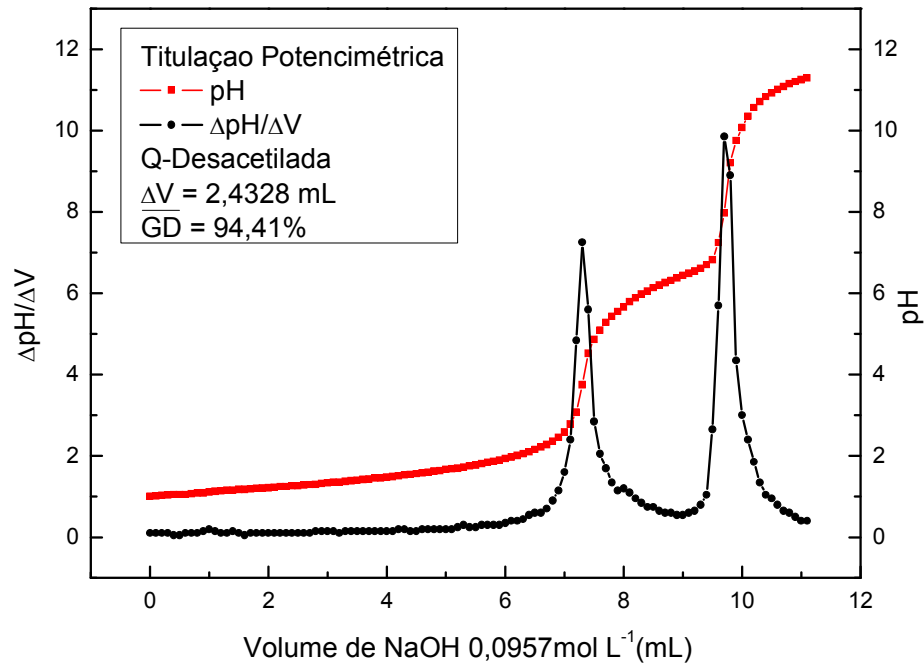


Figura 18: Titulação potenciométrica de Q, para determinação do GD médio.

4.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de ^1H) para Determinar o Grau de Desacetilação (GD), o Grau de Substituição (GS) de SPP de DD

Os polímeros sintetizados foram caracterizados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) e o grau de desacetilação GD da quitosana e o grau de substituição GS dos grupos SPP e DD dos derivados obtidos foram determinados utilizando as equações 7, 8 e 9, respectivamente. A Figura 19 apresenta os espectros de RMN de ^1H da QC e Q. O sinal do deslocamento químico dos hidrogênios correspondentes aos carbonos anoméricos dos monômeros desacetilados aparecem em aproximadamente 5,4 ppm (H^1), o sinal do hidrogênio dos monômeros acetilados corresponde a 5 ppm (H^4). A região de 4,2 a 4,5 ppm apresentam sinais correspondentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 da unidade polimérica, e o sinal localizado em 3,6 ppm (H^2) corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono 2 do anel glicopiranosídeo. Os hidrogênios pertencentes aos grupos acetamido apresentaram sinal na região de 2,5 ppm (H^3). O GD foi calculado utilizando a área referêntes aos sinais dos hidrogênios em 3,6 ppm (H^2) destacado em verde e 2,5 ppm (H^3) destacados em laranja utilizando a equação (7) (TIERA et al., 2006).

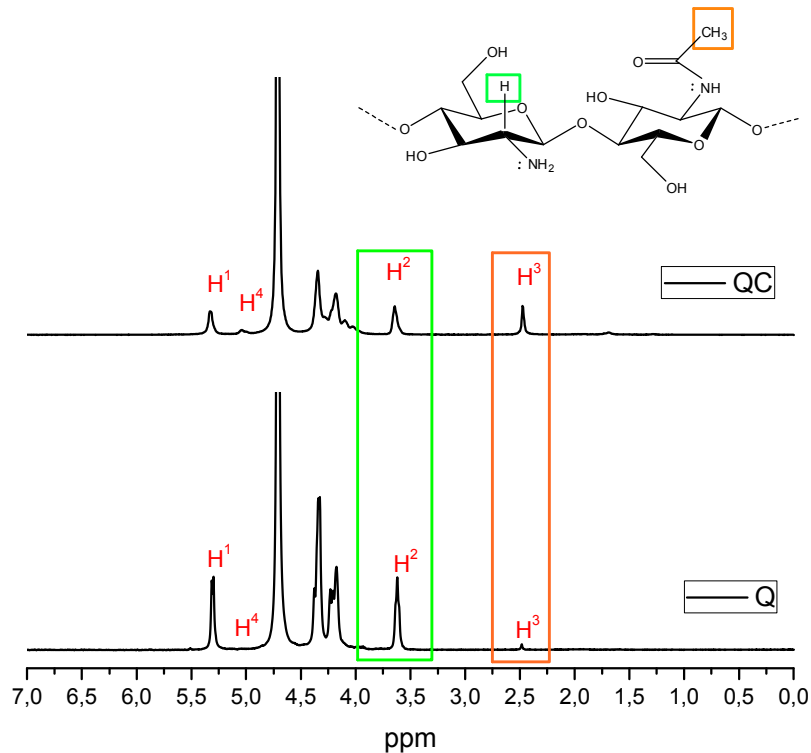


Figura 19: Espectros RMN de ^1H (500 MHz) de QC e Q (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCl}$ (1%) a $70\text{ }^\circ\text{C}$: estrutura da quitosana com destaque (verde e laranja) para os hidrogênios utilizados na determinação o GD por RMN de ^1H .

$$GD = 100 - \frac{H^3}{3xH^2} \times 100 \quad (7)$$

Os dados apresentados na Tabela 2 de titulação potenciométrica e RMN de ^1H mostram que as duas técnicas são eficientes para a determinação do GD, pois os valores obtidos apresentam apenas uma pequena variação no (GD) de 3,4 e 5,6 % para as quitosanas QC e Q, respectivamente quando se compara as técnicas. Portanto, é possível inferir que o processo de desacetilação da quitosana se mostrou eficiente, visto que foram obtidas quitosanas com GD de aproximadamente 100 %.

Tabela 2 - Dados de Potenciometria e RMN de ^1H para as quitosanas QC e Q.

Quitosanas	Grau de desacetilação (GD) (%)	
	Potenciometria	RMN de ^1H
QC	75,56	79,01
Q	94,41	99,99

A atribuição dos sinais foi feita baseada no RMN de ^1H do monômero (Figura 20). As porcentagens do grupo zwitteriônico SPP ligado à quitosana foram calculadas pela equação (8). Portanto, para a determinação do GS do grupo SPP foram utilizadas as áreas dos sinais relativos aos hidrogênios do grupo metileno de SPP ($A_{\text{H}^{\text{m}}}$) destacados em verde, que se encontram equidistantes do grupo sulfonado e do anel piridina e a área dos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos tanto dos hidrogênios ligados aos monômeros substituídos ($A_{\text{H}1\text{s}}$) destacado em azul marinho quanto dos hidrogênios ligados aos monômeros não substituídos ($A_{\text{H}1}$) destacado em laranja no espectro (Figura 21). Da análise dos espectros de RMN de ^1H , os graus de substituição para a quitosana não degradada Q-SPP e degradada QDG-SPP foram respectivamente 46 e 36 % (Tabela 3).

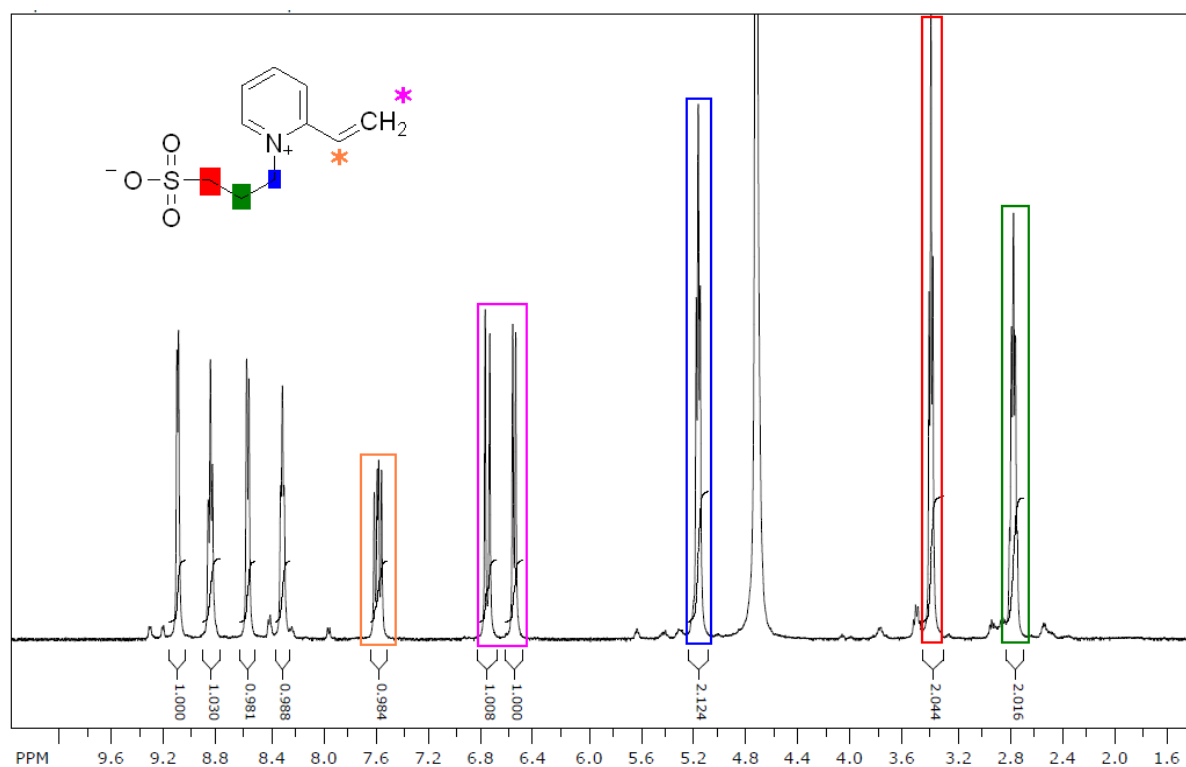


Figura 20: Espectro RMN de ^1H (500 MHz) do monômero 1-(3-sulfopropil)-2-vinilpiridina (SPP) (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (1%) a 70 °C.

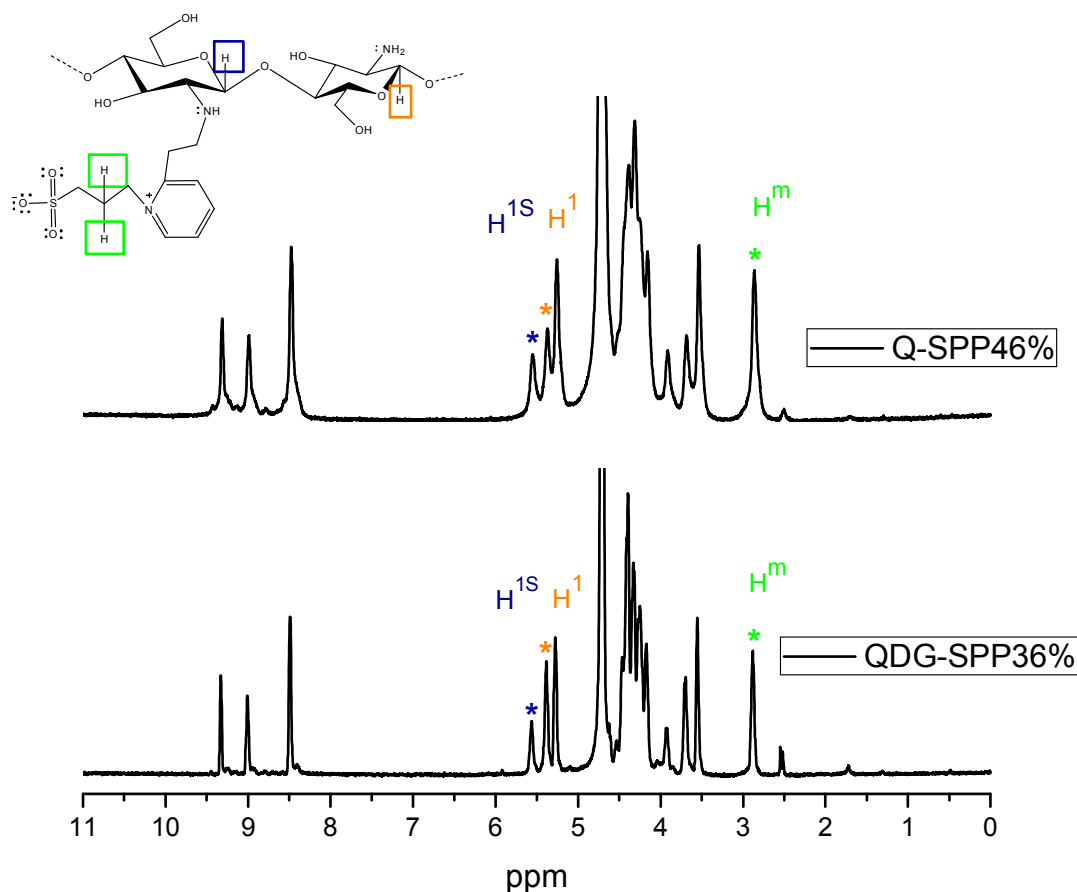


Figura 21: Espectros de RMN de ¹H (500 MHz) dos derivados hidrofílicos: estrutura dos derivados zwitteriônicos e atribuição dos hidrogênios utilizados para determinar o GS-SPP. Os espectros foram realizados com (10 mg) em D₂O/DCl (1%) a 70 °C.

$$GS = \left[\frac{AH^m / 2}{[(AH^1) + (AH^{1s})]} \right] \times 100 \quad (8)$$

Os graus de substituição por grupos dodecil GS-DD foram determinados utilizando-se as áreas dos sinais relativos aos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos tanto dos hidrogênios dos monômeros substituídos H^{1s}, destacados em azul quando dos monômeros não substituídos H¹ destacados em laranja no espectro. Foram utilizadas também as áreas dos hidrogênios do grupo metila CH₃ do dodecil destacadas em verde no espectro como H² (Figura 22). As porcentagens foram calculadas utilizando a equação (9). E o software Spinworks-3 foi empregado para obter os valores das áreas dos sinais dos hidrogênios utilizados tanto na determinação do GS-SPP quanto de GS-DD e os resultados são apresentados na Tabela 3.

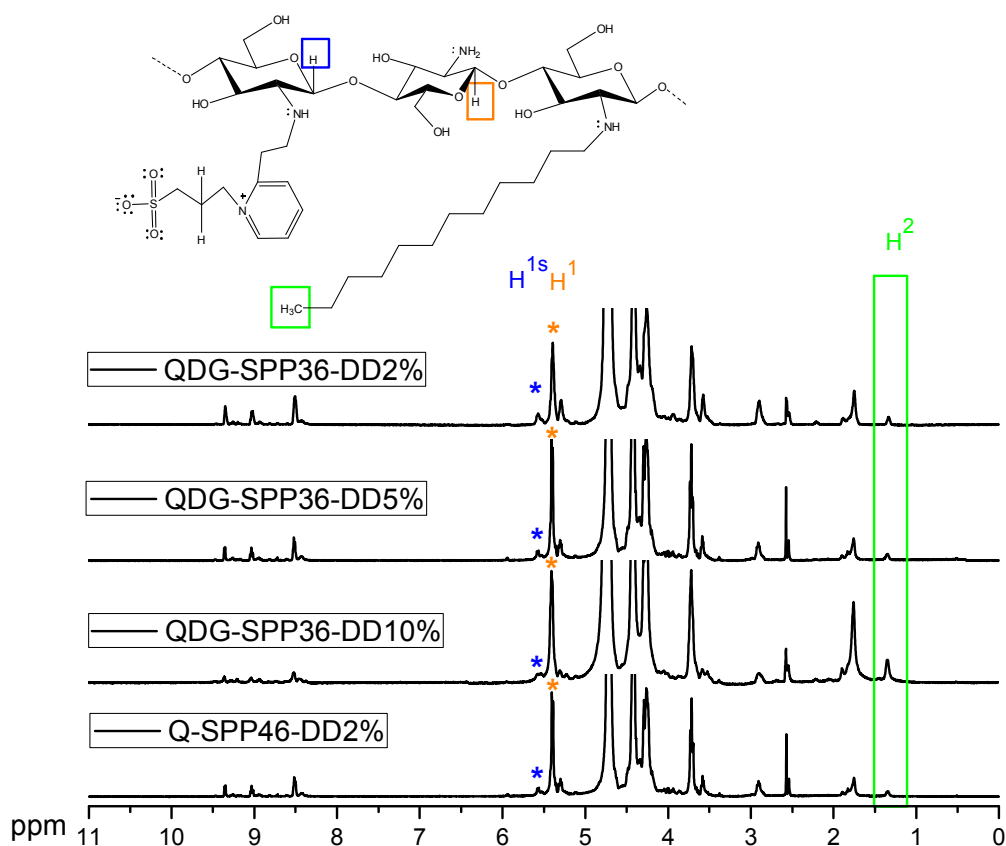


Figura 22: Espectros RMN de ^1H (500 MHz) dos derivados anfílicos: estrutura dos derivados e identificação dos hidrogênios utilizados para determinar o GS-DD. Os espectros foram realizados com (10 mg) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ (1%) a 70°C .

$$GS = \frac{AH^2/3}{(AH^{1s} + AH^1)} \times 100 \quad (9)$$

Tabela 3 - Dados da determinação dos GS médio dos grupos SPP e DD utilizando RMN de ^1H .

Polímero	GS-SPP (%)	GS-DD (%)
Q-SPP46%	45,75	-
QDG-SPP36%	36,00	-
Q-SPP46-DD2%	45,75	2,13
QDG-SPP36-DD2%	36,00	2,14
QDG-SPP36-DD5%	36,00	4,59
QDG-SPP36-DD10%	36,00	9,71

4.1.3 Espectrofotometria de Absorção para Determinação do Grau de Substituição (GS) de Grupos Zwitteriônicos (SPP)

O grau de substituição com zwitteriônico GS-SPP foi também estimado por espectrofotometria no UV-vis, pois o grupo hidrofílico apresenta absorção na região no visível. Utilizando-se da absorção do homopolímero de SPP (Figura 23) determinou-se que o comprimento de onda (λ) de absorção do grupo é em 276 nm e esse (λ) foi utilizado para determinar o coeficiente de absorvidade molar do grupo SPP.

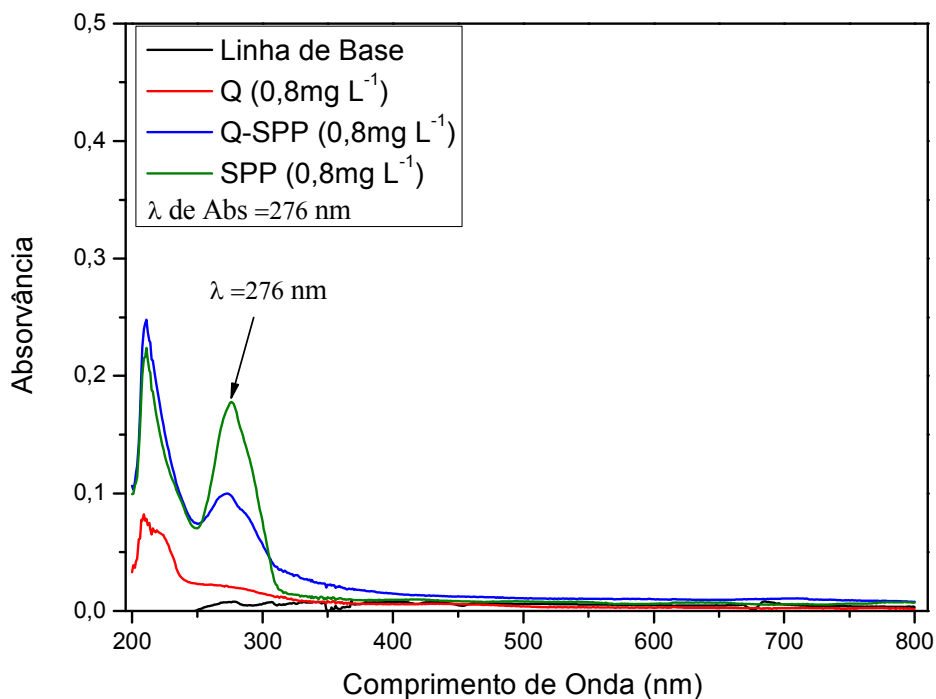


Figura 23: Estrutura química do polímero Q-SPP e varredura espectrofotométrica de absorção na região do UV-Vis dos polímeros Q, Q-SPP e SPP na concentração de $0,8 \text{ mg L}^{-1}$ em solução tamponante pH 5,0.

O coeficiente de absorvidade molar (ϵ) para o grupo zwitteriônico SPP foi de $4,95 \cdot 10^3 \text{ mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, e correlação linear foi de $r = 0,99939$, em solução tamponante pH 5,0 (concentração de 50 mmol L^{-1} e força iônica 150 mmol L^{-1}) Figura 24.

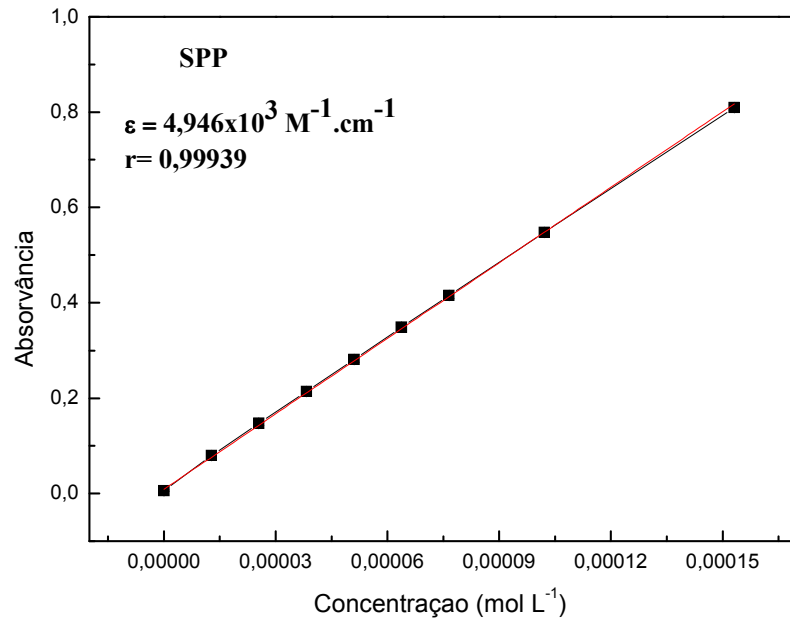


Figura 24: Determinação do coeficiente de absorvância molar (ϵ) do grupo SPP em solução tamponante pH 5,0.

Na Tabela 4 são apresentados os dados utilizados para calcular o GS por SPP e os valores médios para QDG-SPP36% e Q-SPP46% foram respectivamente de 33,00 e 38,13 %, portanto os valores obtidos por espectrofotometria são relativamente próximos dos valores obtidos por RMN de ¹H.

Tabela 4 - Dados obtidos da determinação dos GS médios dos grupos SPP utilizando espectrofotometria UV-Vis.

Polímero	Concentração (mmol L ⁻¹)	GS (%)	GS (%) Médio
QDG-SPP36%	0,442	32,78	33,00
	0,297	33,36	
	0,273	32,87	
Q-SPP46%	0,286	37,66	38,13
	0,267	38,50	
	0,245	38,24	

4.1.4 Espectroscopia de Infravermelho (IV) para as Quitosanas (QC), (Q) e dos Derivados Anfílicos Degradados e Não Degradados

Na Figura 25 estão apresentados os espectros de IV para as quitosanas QC e Q. Na região de 3500 cm⁻¹, é possível observar que ambas apresentam bandas características devido às vibrações de estiramento axial dos grupos OH presentes nos polímeros, estando

sobrepostas ao estiramento das ligações nitrogênio-hidrogênio (N-H). Entretanto, as bandas correspondentes a esses estiramentos são largas e não podem ser distinguidas.

Alguns trabalhos na literatura (BAXTER et al., 1992); (BRUGNEROTTO et al., 2001); (DOS SANTOS et al., 2003) citam bandas de vibrações de grupos amida que permitem diferenciar a quitosana comercial (com maior teor de grupos acetamidos) da quitosana desacetilada. A banda do grupo amida presente no substituinte acetamido apresenta uma banda característica e intensa em 1650 cm^{-1} (C=O) seguida de uma banda discreta em 1625 cm^{-1} o qual corresponde à deformação angular da ligação (N-H) que, segundo a literatura, ocorre em 1583 a 1594 cm^{-1} (DOS SANTOS et al., 2003). Observando a Figura 25, pode-se verificar que no espectro da quitosana comercial apresenta essas bandas bastante visíveis, devido a maior quantidade de grupos acetamidos, enquanto que, no espectro da quitosana desacetilada, essas bandas são quase imperceptíveis.

A região compreendida entre 1450 e 1300 cm^{-1} também é utilizada para diferenciar a QC de Q (DOS SANTOS et al., 2003). Por volta da região que vai de 1308 a 1385 cm^{-1} ocorre à deformação axial da ligação (C-N) do grupo amida que no espectro obtido encontra-se em aproximadamente 1375 cm^{-1} , enquanto a deformação da ligação (C-N) do grupo amina é observada por volta de 1425 cm^{-1} . Essas características diferentes, também demonstram a eficiência no processo de desacetilação.

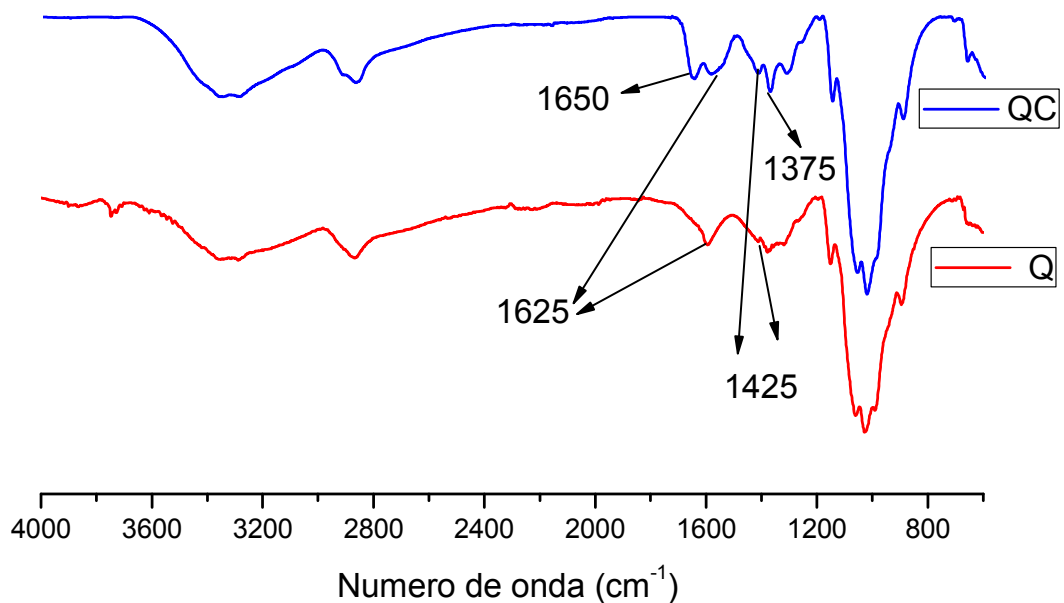


Figura 25: Espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para as quitosanas QC e Q.

Os espectros de IV da quitosana Q e do polímero modificado apenas com grupos SPP estão apresentados na Figura 26. A partir dos espectros é possível observar a presença de bandas nos espectros dos derivados Q-SPP46% que estão ausentes no espectro da Q. Na curva obtida para o derivado Q-SPP46% é observada a presença das bandas características oriundas das deformações axiais da ligação C-H por volta de 2950 cm^{-1} , além das bandas características presentes no intervalo de 1060 a 1040 cm^{-1} que correspondem às deformações axiais das ligações S=O (sufóxido) presentes na estrutura molecular do SPP. O intervalo de 1340 a 1250 cm^{-1} apresenta uma banda intensa que corresponde à ligação (C-N) de anéis aromáticos (ligação presente no grupo SPP devido à presença da piridina) e, no intervalo de 770 a 690 cm^{-1} , às deformações angulares que correspondem aos hidrogênios adjacentes do anel aromático (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2006). No espectro do polímero dodecilado Q-DD apresentado na Figura 27 pode-se observar a presença de bandas características próximo a 2950 cm^{-1} , resultado das deformações axiais da ligação C-H dos grupos metilenos, e CH_2 2850 cm^{-1} referentes às metilas do grupo dodecil (SILVERSTEIN; WEBSTER, 2006).

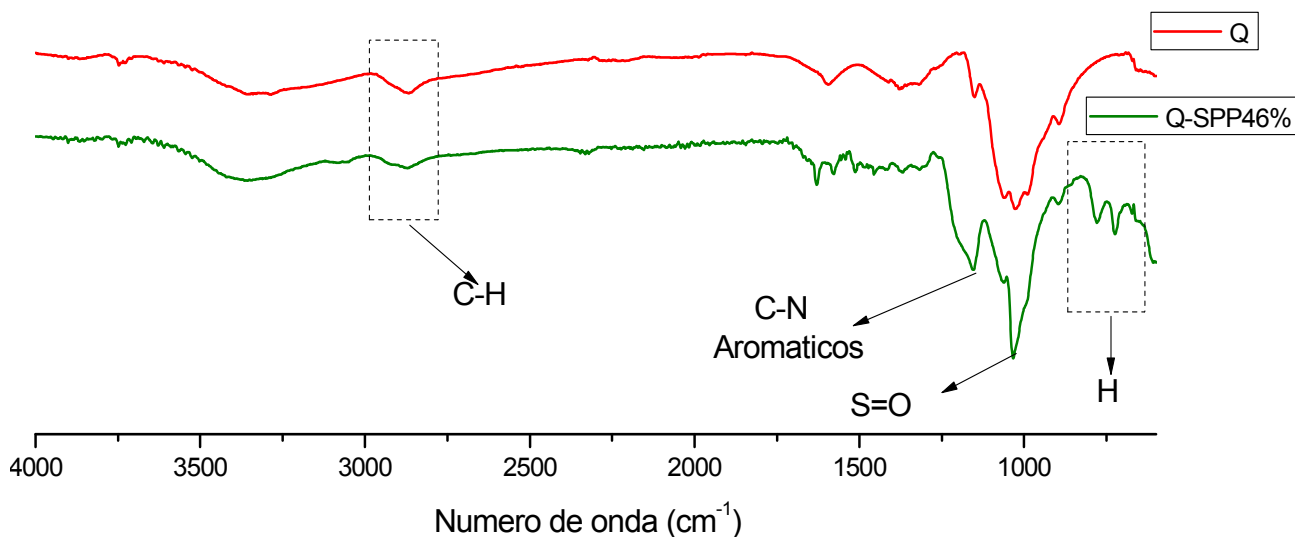


Figura 26: Espectros de IV para a quitosana Q e do derivado hidrofílico Q-SPP46%.

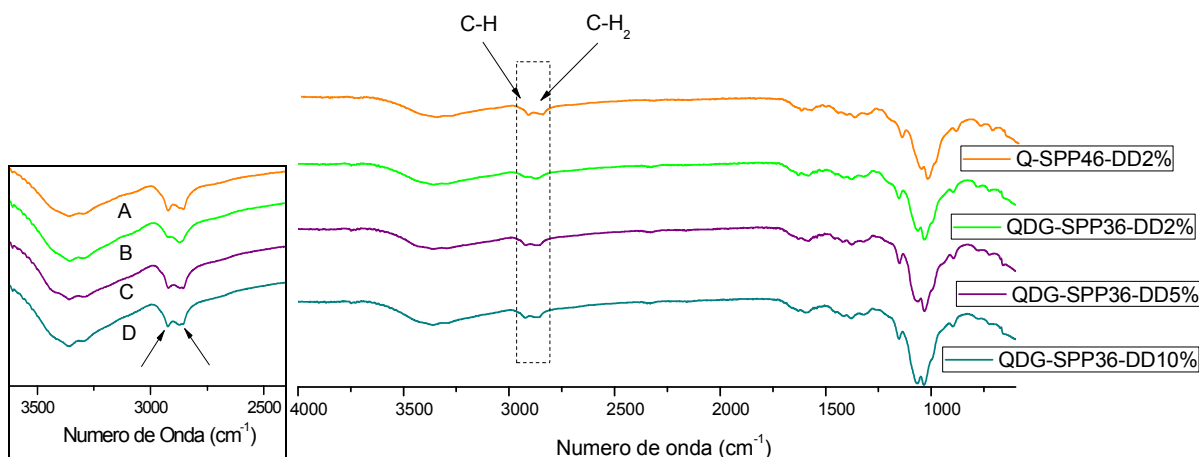


Figura 27: Espectros de IV para a quitosana desacetilada Q e o derivado hidrofóbico Q-DD2%. E uma ampliação da região que permite observar as bandas características de DD. (A) Q-SPP46-DD2%, (B) QDG-SPP36-DD2%, (C) QDG-SPP36-DD5% e (D) QDG-SPP36-DD10%.

A Figura 28 apresenta os espectros de absorção na região do infravermelho (IV) para a Q e a os derivados anfífilicos de diferentes massas molares Q-SPP46-DD2 e QDG-SPP36-DD2 nos quais se encontram destacadas as regiões correspondentes às substituições com DD e SPP. Na região que correspondem à presença de DD são observadas as bandas referentes às ligações (C-H da metila e CH₂ metileno). Nas regiões que caracterizam a presença do grupo SPP é possível observar tanto ligações (S=O) dos sulfóxidos quanto e a região com ligações dos hidrogênios adjacentes ao anel aromático (H), estas são bandas de absorção presentes nos espectros dos derivados anfífilicos que estão ausentes no espectro da Q. Com a análise dos espectros de RMN de ¹H e de IV conclui-se que e as sínteses dos derivados anfífilicos foram eficientes.

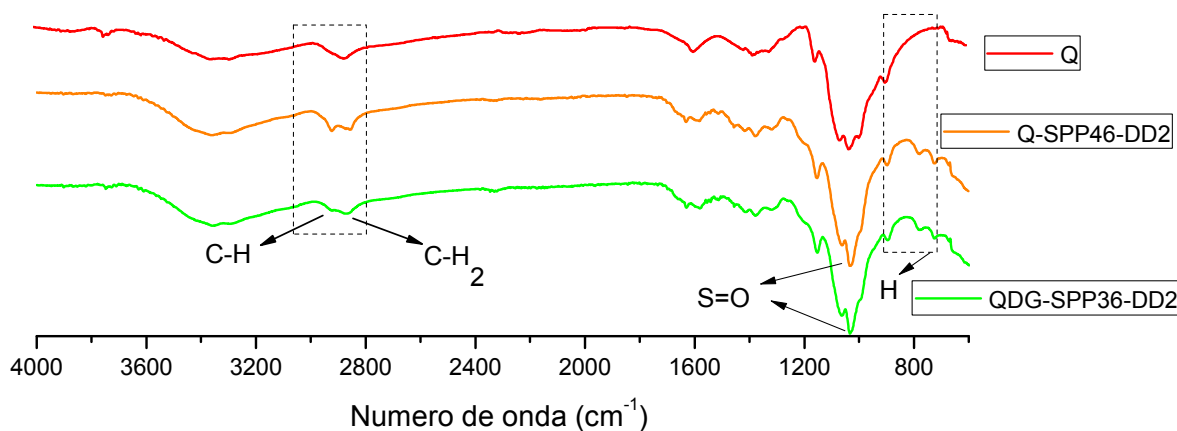


Figura 28: Espectros de absorção no infravermelho (IV) de Q, Q-SPP46-DD2 e QDG-SPP36-DD2 nos quais são destacadas as regiões que correspondem à presença de DD (C-H da metila e CH₂ metileno) e SPP ligações (S=O) das ligações sulfóxidos e região com ligações dos hidrogênios adjacentes ao anel aromático.

4.1.5 Determinação da Massa Molar por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) com Detector com Índice de Refração (IR)

As quitosanas QC, Q, QDG e as hidrofílicas substituídas com o grupo SPP foram caracterizadas por cromatografia de permeação em gel (GPC), com detecção por índice de refração. A técnica possibilitou a determinação da massa molar ponderal média \overline{M}_w e a massa molar numérica média \overline{M}_n , além da relação entre $\overline{M}_w/\overline{M}_n$, que é denominada polidispersividade (PD). Os dados sobre a polidispersividade proporcionam avaliar a aptidão da distribuição das massas molares dos polímeros. A curva de calibração obtida está apresentada na Figura 29 e os cromatogramas das quitosanas Q, QDG, QDG-SPP36 e Q-SPP46% estão apresentados na Figura 30.

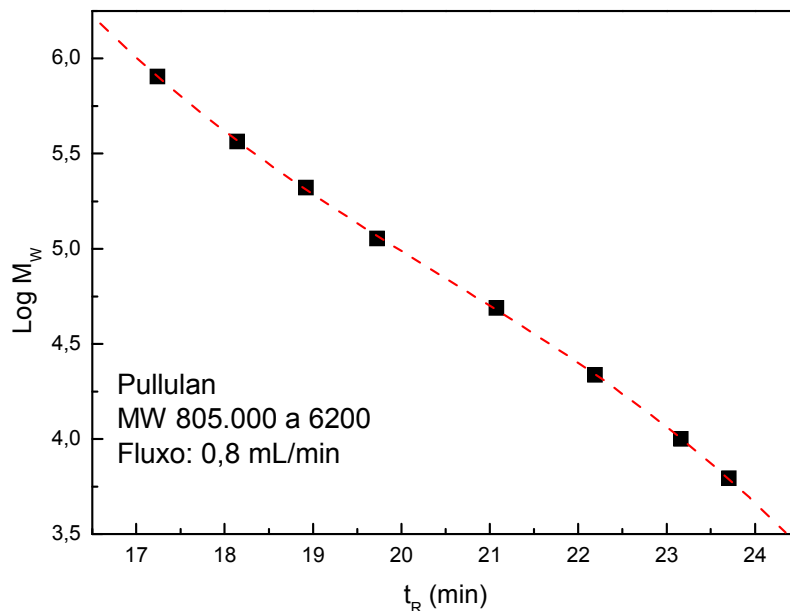


Figura 29: Curva de calibração dos padrões.

Os experimentos de GPC empregam o conceito de calibração convencional usando somente um detector de concentração o IR. Sendo assim, o procedimento de calibração consiste na injeção de um polímero padrão conhecido que gera uma curva de calibração convencional baseado no tempo de retenção. Portanto, a massa molar média obtida é relativa a um determinado padrão. Para as medidas realizadas de massa molar relativa das quitosanas e de seus derivados hidrofílicos foram realizadas utilizando padrões Pullulan.

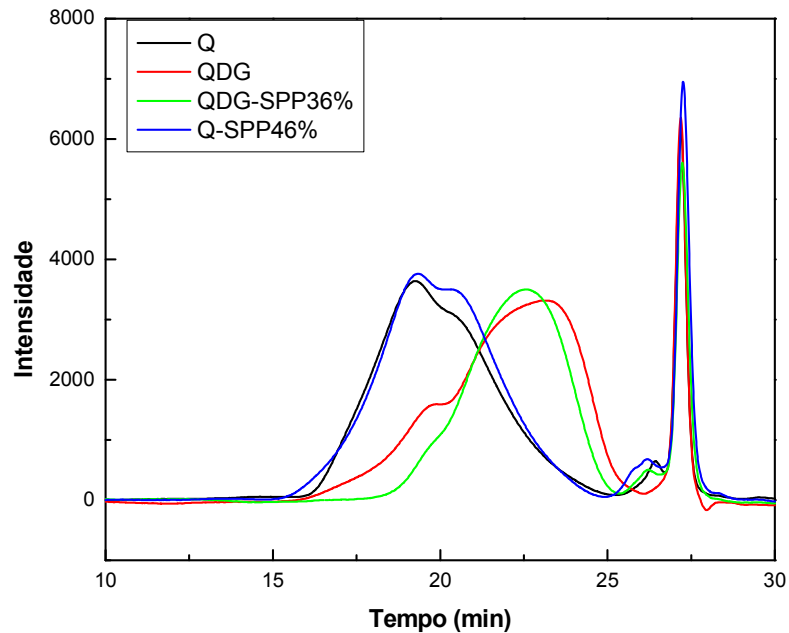


Figura 30: Cromatogramas das quitosanas e seus derivados hidrofílicos (concentração de 5 g L^{-1}) em solução tampão ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ e acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,5.

A partir dos cromatogramas das quitosanas Q e QDG e seus derivados hidrofílicos Q-SPP46% e QDG-SPP36% todos na concentração de 5 g L^{-1} (Figura 30). É possível observar que as quitosanas Q (curva preta) e Q-SPP46% (curva azul) apresentam tempos de retenção menores, portanto são polímeros de maiores massas molares, pois o processo de separação utiliza uma coluna de material poroso, o qual permite a eluição de moléculas maiores mais rapidamente que as moléculas menores. Já os polímeros QDG (curvas vermelha) e QDG-SPP36% (curva verde) apresentam maiores tempos de retenção, portanto são polímeros de menores massas molares. A concentração das amostras é um fator importante, especialmente para quitosanas de elevada massa molar que formam soluções viscosas. Quando a concentração é maior que 1 g L^{-1} , bandas largas de eluição podem ser obtidas como pode ser observado nos cromatogramas obtidos.

Os resultados da Tabela 5 mostram que o processo de desacetilação causa degradação da quitosana, pois para a QC e o M_w foi de 441,08 kDa e para Q o M_w diminuiu quase duas vezes, passou a ser 205,58 kDa. A massa molecular da quitosana degradada QDG foi de 41,64 kDa e a polidispersividade duplicou comparada à quitosana de partida Q de 205,58 kDa. Essa elevada polidispersividade é o que provavelmente promoveu um aumento no tempo de retenção do polímero QDG (curva verde) quando se compara com o polímero QDG-SPP36%

(curva vermelha). No caso das quitosanas hidrofílicas Q-SPP46% e QDG-SPP36% foi observadas diferenças significativas nas massas molares, pois as quitosanas de partida foram de massas molares diferente. Analisando os valores de M_w médios obtidos é possível verificar que a massa molecular de QDG-SPP36% diminuiu quando se compara com a da quitosana de partida QDG, enquanto que a massa molar do derivado Q-SPP46% variou pouco. A elevada PD indica que a amostra é muito heterogênea no que diz respeito ao tamanho das cadeias dos polímeros, e esse fato provavelmente está relacionado com as condições das sínteses, foi observado que a polidispersividade PD não variou muito para os derivados não degradados passou de 3,55% (Q) para 4,96% (Q-SPP46%), mas diminuiu muito para os derivados degradados passou de 7,00% (QDG) para 2,55% (QDG-SPP36%) essa diminuição é devido provavelmente devido ao próprio processo de diálise, além disso, a reação com o grupo SPP é conduzida em pH alcalino e devido à própria ligação dos grupos zwitteriônicos, é esperado uma degradação parcial, já que a temperatura de reação foi de 50 °C.

A determinação dos graus médios de desacetilação e de substituição obtidos por RMN de 1H permitiram estimar a massa molar média das unidades monoméricas (\overline{MM}). Para esse cálculo foi empregada a (Equação 10) e os valores obtidos estão apresentados na Tabela 5 juntamente com os valores de M_n e de M_w médios obtidos por GPC e os valores de GD, GA, GS-SPP e GS-DD obtidos para todo os derivados sintetizados.

$$\overline{MM} = \frac{[(GD(\%) \times 161,22) + (GA(\%) \times 203,22) + (GS_SPP(\%) \times 388,5) + (GS_DD(\%) \times 345,76)]}{100} \quad (10)$$

Tabela 5 - Valores de \overline{MM} , M_w , M_n e PD e composição das quitosanas e seus derivados.

Polímero	\overline{MM}^* (g mol ⁻¹)	M_w (kDa)	M_n (kDa)	PD (%)	GS-SPP (%)	GS-DD (%)
QC ^a	170,04	441,08	85,52	5,15	-	-
Q ^b	161,22	205,58	51,30	3,55	-	-
QDG	161,22	41,64	9,98	7,00	-	-
Q-SPP46%	338,96	216,03	44,64	4,96	45,75	-
QDG-SPP36%	301,08	32,28	12,69	2,55	36,00	-
Q-SPP46-DD2%	346,33	-	-		45,75	2,13
QDG-SPP36-DD2%	308,48	-	-		36,00	2,14
QDG-SPP36-DD5%	316,95	-	-		36,00	4,59
QDG-SPP36-DD10%	334,66	-	-		36,00	9,71

^a GD = 79,0; ^b GD = 99,9 *Massa Molar média da unidade monomérica estimada utilizando os graus de substituição determinados por RMN de 1H .

4.2 Estudos da Auto - Associação em Meio Aquoso

4.2.1 Análise de Transmitância em Função do pH

Um dos objetivos da síntese dos derivados de quitosana substituídos com SPP é aumentar a solubilidade da quitosana em pH mais elevados. Na Figura 31 estão apresentados os gráficos de transmitância no comprimento de onda (λ) de 566 nm em função do pH das quitosanas QDG, Q, QDG-SPP36% e Q-SPP46% todas na concentração de 1 g L^{-1} . Para Q e QDG a transmitância diminuiu abruptamente próximo de pH 6,5 devido à precipitação da quitosana da solução, ou seja, próximo do valor do pK_a dos grupos amina da quitosana ($pK_a \sim 6,3 - 6,4$). Entretanto, a transmitância para os derivados permanece próxima de 100 %, durante todo o curso da titulação, ou seja, o polímero é solúvel em toda a faixa de pH.

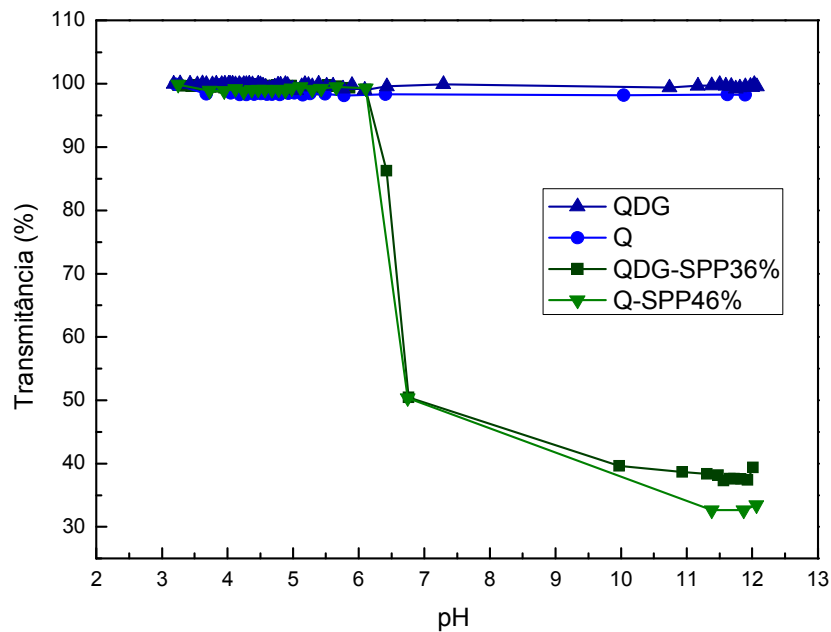


Figura 31: Gráfico da transmitância em (λ 566 nm) em função do pH para as quitosanas QDG-SPP36%, Q-SPP46%, Q e QDG (concentração de 1 g L^{-1}).

Na Figura 32 estão representadas as curvas de transmitância em função do pH para os derivados QDG-SPP36-DD2%, QDG-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2%. A transmitância diminuiu com o aumento do conteúdo de dodecil, entretanto, permaneceu constante em toda a faixa de pH estudada (curvas preta, vermelha e azul) que correspondem respectivamente, a 2, 5 e 10%. Portanto, os resultados indicam que o aumento de GS-DD induz a formação de agregados, os quais são responsáveis pelo espalhamento da luz e decréscimo na porcentagem de transmitância. É possível verificar também que a massa

molar do polímero influencia diretamente na transmitância. O polímero Q-SPP46-DD2% (curva verde) de massa molar média de 216,03 kDa, embora seja de mesmo GS-DD que o polímero QDG-SPP36-DD2% (curva preta) de massa molar média de 32,28 kDa é de maior massa molar e apresenta transmitância muito menor que o polímero degradado. E esse comportamento é observado, pois em derivados de maior massa molar ocorre à formação de agregados maiores que espalham mais eficientemente a luz diminuindo a transmitância da solução. Portanto, o aumento da massa molar média diminui a solubilidade dos derivados.

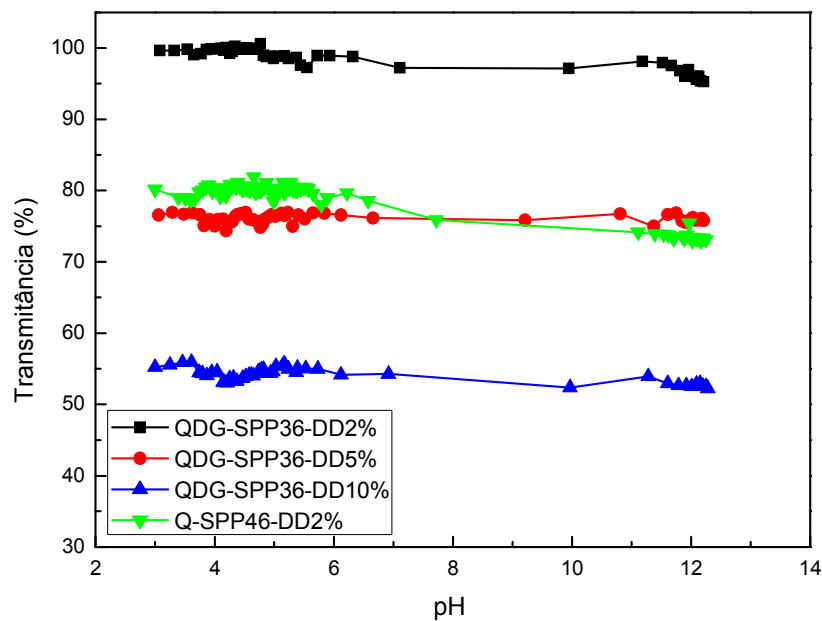
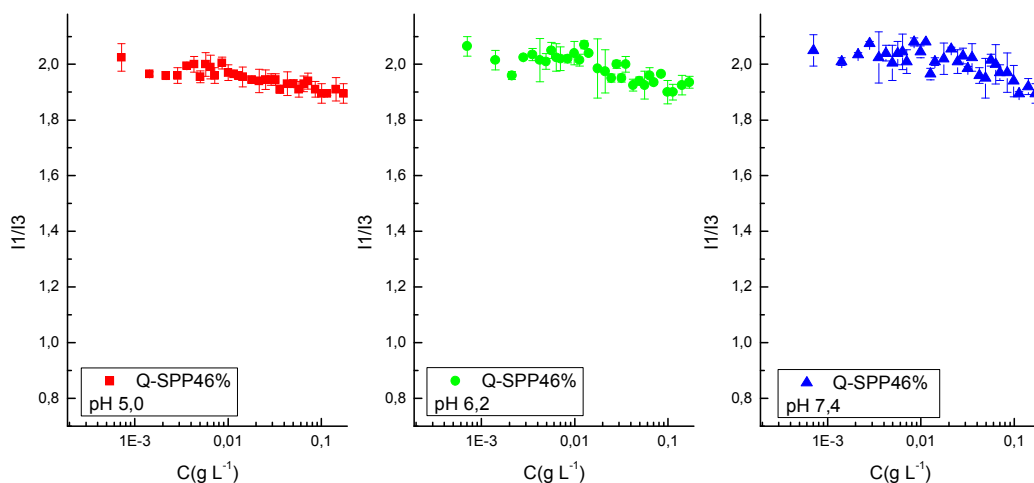


Figura 32: Transmitância em (λ 566 nm) em função do pH para os polímeros anfílicos Q-SPP46-DD2%; QDG-SPP36-DD2%; QDG-SPP36-DD5% e QDG-SPP36-DD10% (concentração de 1 g L^{-1}).

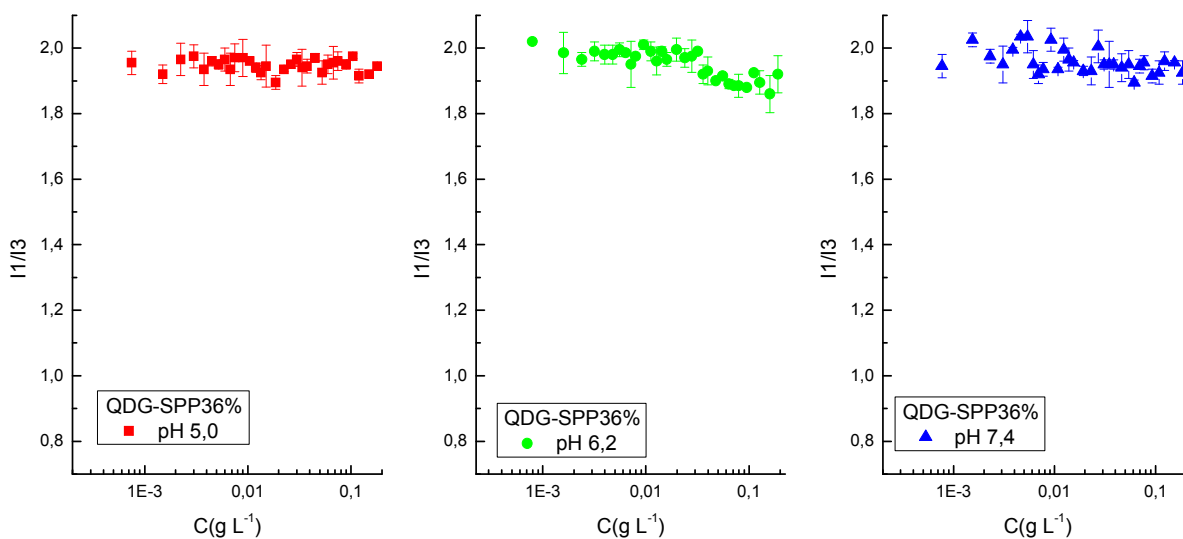
4.2.2 Espectrofotometria de Fluorescência Molecular

Estudos recentes mostram que quitosanas modificadas hidrofobicamente podem se auto-associar em solução aquosa levando a formação de agregados. A quitosana tem sido estudada e agregados foram observados quando a concentração é maior que $3,0 \text{ g L}^{-1}$ (PHILIPPOVA et al., 2001). Os valores de concentração de agregação crítica (CAC) foram determinados por intersecção das retas paralelas aos dois níveis de inclinação das curvas de fluorescência. Na Figura 33 são apresentados os gráficos da razão I/III dos espectros de emissão do pireno, em função da concentração (g L^{-1}) de todos os polímeros sintetizados em pH 5,0 6,2 e 7,4. Em baixas concentrações de quitosana, I/III permanece em torno 2, isso indica um meio de elevada polaridade, ou seja, a sonda encontra-se predominantemente em

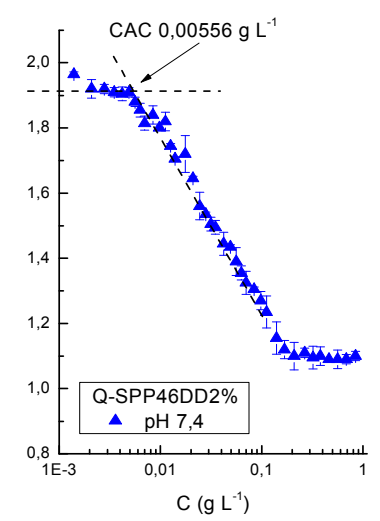
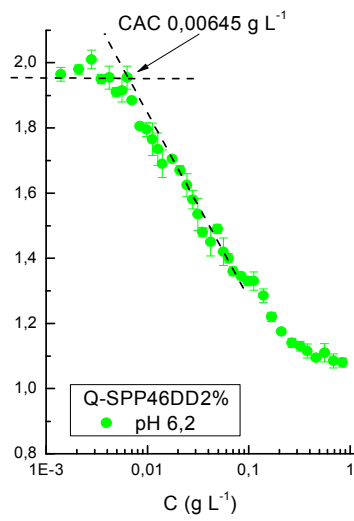
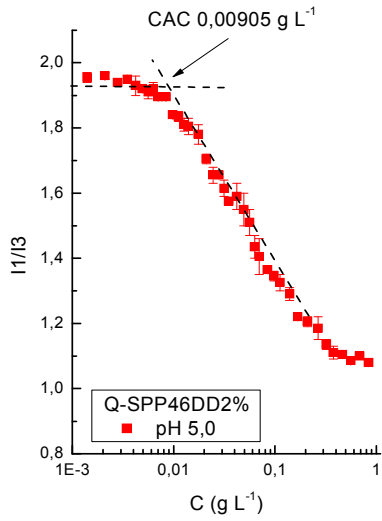
meio aquoso. O aumento da concentração de polímero provoca um decréscimo brusco da razão I/III (Figura 33 (C), (D) (E) e (F)) devido ao início da formação de agregados intermoleculares. Para os polímeros hidrofílicos que contêm somente o grupo zwitteriônico SPP (degradado e não degradado), I/III permanece constante, foi observado apenas um ligeiro decaimento nas concentrações mais elevadas de polímero (Figura 33A e 33B) para todos os pHs estudados, o que confirma um ambiente polar para sonda e, portanto, a ausência de agregados. A Tabela 6 apresenta os valores das CACs obtidas pela intersecção das retas mostradas nos gráficos.



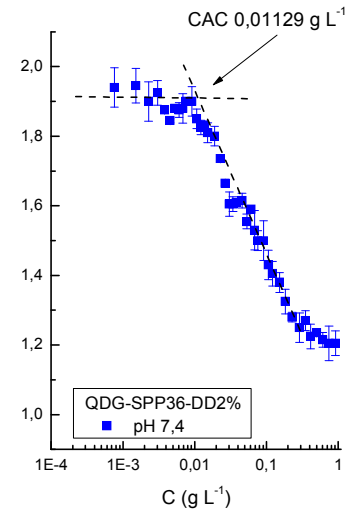
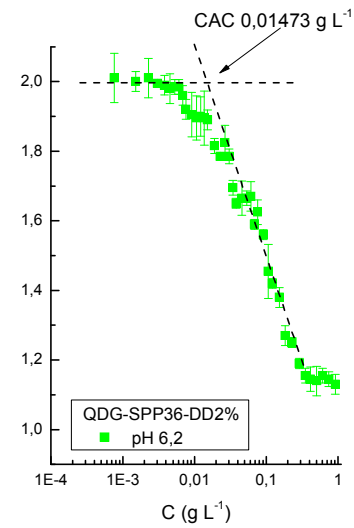
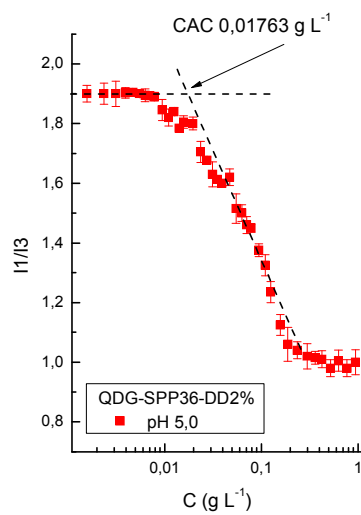
A) Q-SPP46%



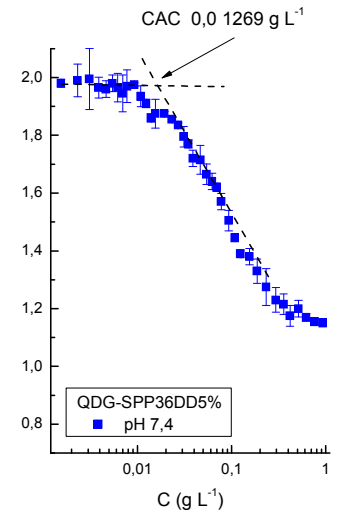
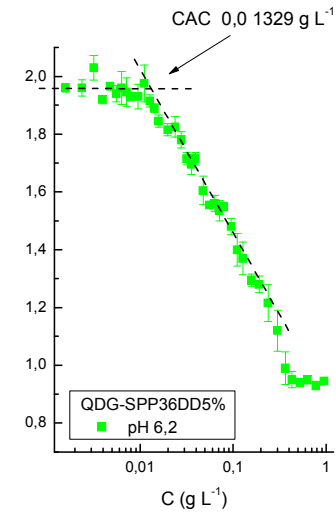
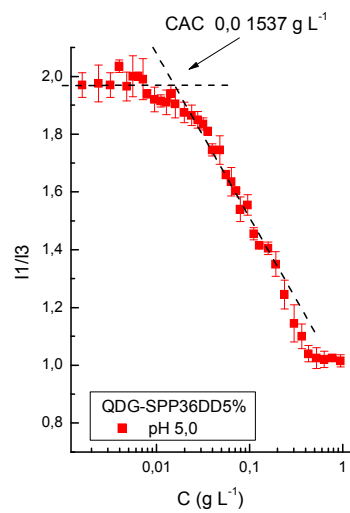
B) QDG-SPP36%



C) Q-SPP46DD2%



D) QDG-SPP36DD2%



E) QDG-SPP36DD5%

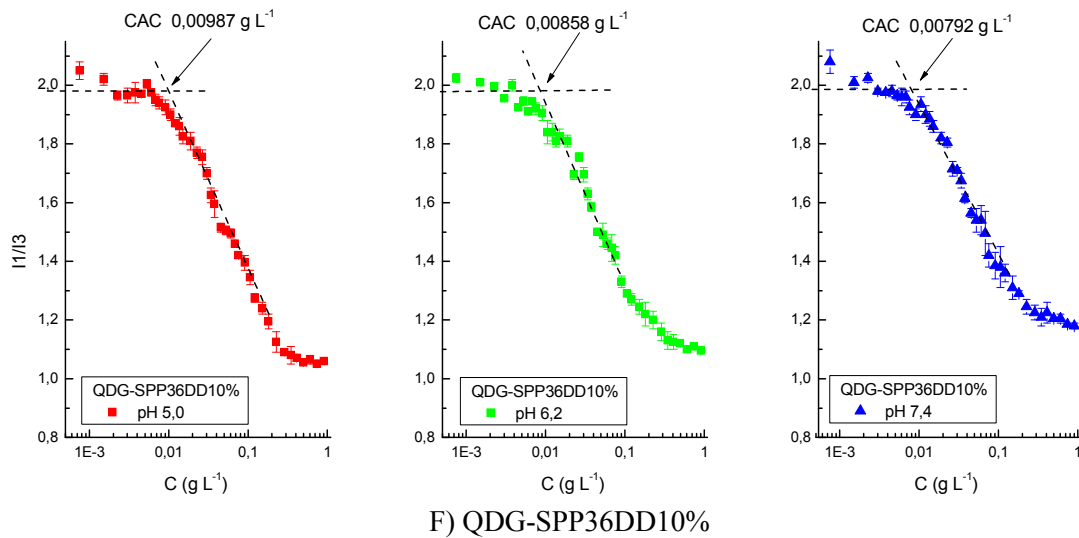


Figura 33: Determinação da CAC dos polímeros A) Q-SPP46%; B) QDG-SPP36%; C) Q-SPP46DD2%; D) QDG-SPP36DD2%; E) QDG-SPP36DD5% e F) QDG-SPP36DD-10%. Gráficos de I1/I3 em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 5,0, 6,2 e 7,4.

Tabela 6 - Valores de CACs obtido em diferentes pHs para os derivados de quitosana.

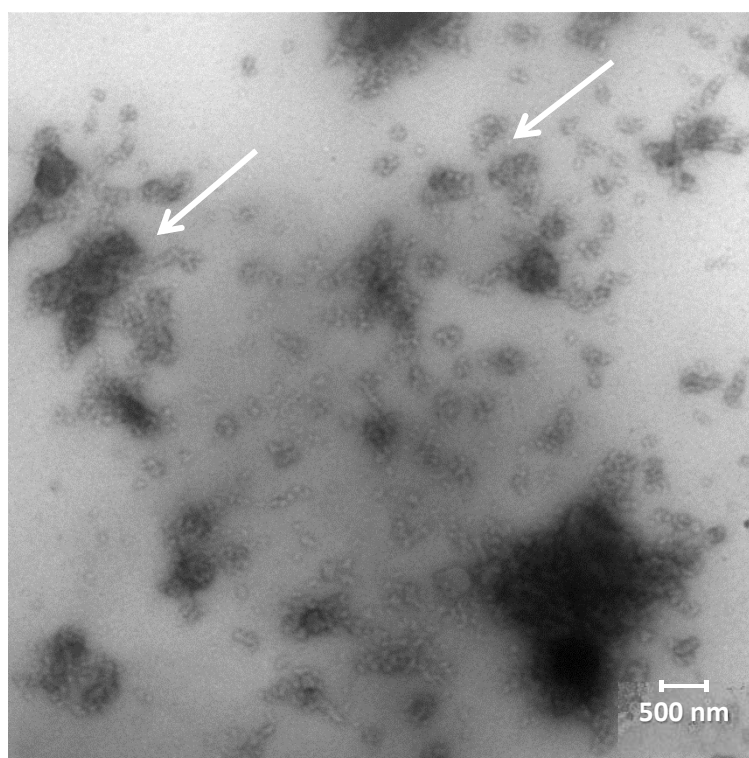
Polímero	GS SPP(%)	GS DD(%)	pH	CAC (g L ⁻¹) (x10 ⁻³)
Q-SPP46DD2%	45,75	2,13	5	9,1
			6,2	6,5
			7,4	5,6
QDG-SPP36DD2%	36,00	2,14	5	17,6
			6,2	14,7
			7,4	11,3
QDG-SPP36-DD5%	36,00	4,59	5	15,4
			6,2	13,3
			7,4	12,7
QGD-SPP36DD10%	36,00	9,71	5	9,9
			6,2	8,6
			7,4	7,9

Os dados da Tabela 6 mostram que o conteúdo de DD e a massa molecular dos polímeros afetam diretamente a CAC. O derivado de maior massa molecular Q-SPP46DD2% apresenta menores valores de CAC para os três pHs estudados. A CAC diminui com o aumento do pH, o derivado de maior conteúdo hidrofóbico QDG-SPP36DD10% apresenta os menores valores de CAC variando de 9,9 a 7,9 mg L⁻¹. Quando se compara com a quitosana de baixa massa molar e menos substituído QDG-SPP36DD2% os maiores valores de CACs foram obtidos para esse derivado os valores variam de 17,6 a 11,3 mg L⁻¹. Portanto, para os derivados mais substituídos o maior conteúdo de grupos dodecil induz a formação de agregados em concentrações mais baixas de menores CACs. Embora discreto, o efeito do pH

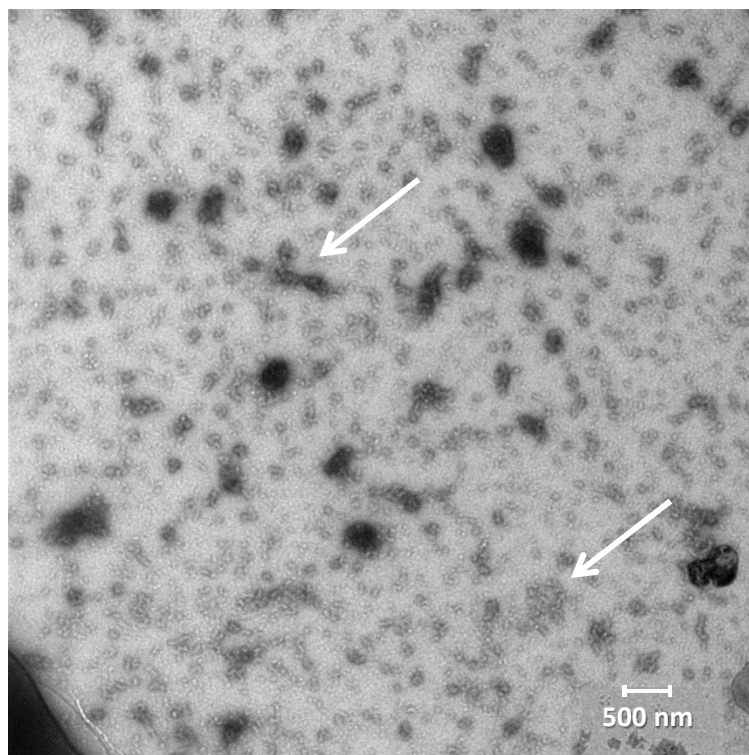
é claramente notado, ou seja, o aumento do pH de 5,0 para 7,4 tem como consequência a desprotonação parcial dos grupos amino conferindo, portanto, maior hidrofobicidade às cadeias, o que reforça as interações hidrofóbicas diminuindo as CACs. Os valores de CAC são similares aqueles obtidos por (HU et al., 2008) que trabalharam com derivados de quitosana contendo PEG como grupo hidrofílico e ácido esteárico como grupo hidrofóbico. Embora, o estudo de HU e colaboradores (2008) não tenham avaliado o efeito do pH os valores de CAC obtidos foram similares e variaram de 11,7 a 13,8 mg L⁻¹.

4.2.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

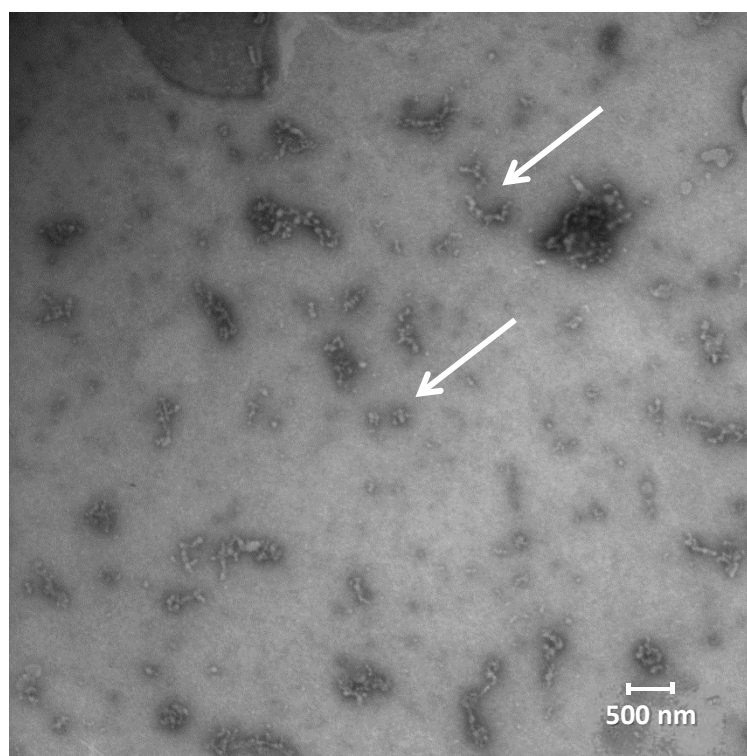
A morfologia das nanopartículas ou dos agregados obtidos a partir dos derivados de quitosana foi avaliada por meio da microscopia eletrônica de transmissão (TEM). As imagens dos derivados, A) QDG-SPP36-DD2%, B) Q-SPP46-DD2% na concentração de 1 g L⁻¹ e C) QDG-SPP36-DD10% na concentração e 0,01 g L⁻¹, estão apresentadas na Figura 34. As imagens mostram a formação de agregados esféricos para os polímeros menos substituídos com DD, na Figura 34 (A) e (B) estão destacadas regiões de agregados menores e maiores. Já na Figura 34 (C) estão destacadas regiões com agregados esféricos e agregados alongados, em geral os tamanhos dos agregados observados variaram de 100 nm a 1000 nm, o que denota a alta polidispersividade das amostras.



A) QDG-SPP36-DD2 %



B) Q-SPP46-DD2%



C) QDG-SPP36-DD10%

Figura 34: Micrografias em microscopia eletrônica de transmissão (TEM) dos agregados de em solução tamponante de acetato, pH 5,0 e força iônica de 150 mmol L⁻¹. A) QDG-SPP36-DD2 % e B) Q-SPP46-DD2% na (concentração de 1 g L⁻¹) e C) QDG-SPP36-DD10% (concentração de 0,01 g L⁻¹).

4.2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Determinação do Potencial Zeta(ζ)

As medidas de espalhamento de luz dinâmico possibilitaram determinar os valores de tamanho e o potencial zeta dos derivados anfífilicos de quitosana. Esses parâmetros são importantes para se avaliar a estabilidade e a capacidade dos polímeros de transportar diferentes fármacos. Os resultados obtidos de tamanho em pH 5,0 e 7,4 em diferentes concentrações de polímeros estão apresentados, respectivamente nas Figuras 35 e 36. Em pH 5,0, os polímeros QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5% apresentaram diâmetros médios variando de 800 a 1000 nm, e os polímeros QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% apresentaram valores de tamanho entre 1000 e 1900 nm. Portanto, o derivado mais substituído e o de maior massa molar apresentaram diâmetros maiores, o que pode ser atribuído a interações intermoleculares mais fortes e conseqüentemente, à formação de agregados maiores. Na concentração de 3,0 g L⁻¹, Q-SPP46-DD2% formou agregados com diâmetros maiores do que QDG-SPP36-DD2%, indicando que massas molares maiores influenciam o tamanho dos agregados. Em pH 7,4, o comportamento é similar e os diâmetros para os polímeros QDG-SPP36-DD2% e QDG-SPP36-DD5% variam de 600 nm a 1000 nm, na faixa de 0,1 a 3,0 g L⁻¹. O derivado mais substituído QDG-SPP-DD10% e o de maior massa molar Q-SPP46-DD2% formam agregados maiores, com diâmetros variando 600 a 5000 nm.

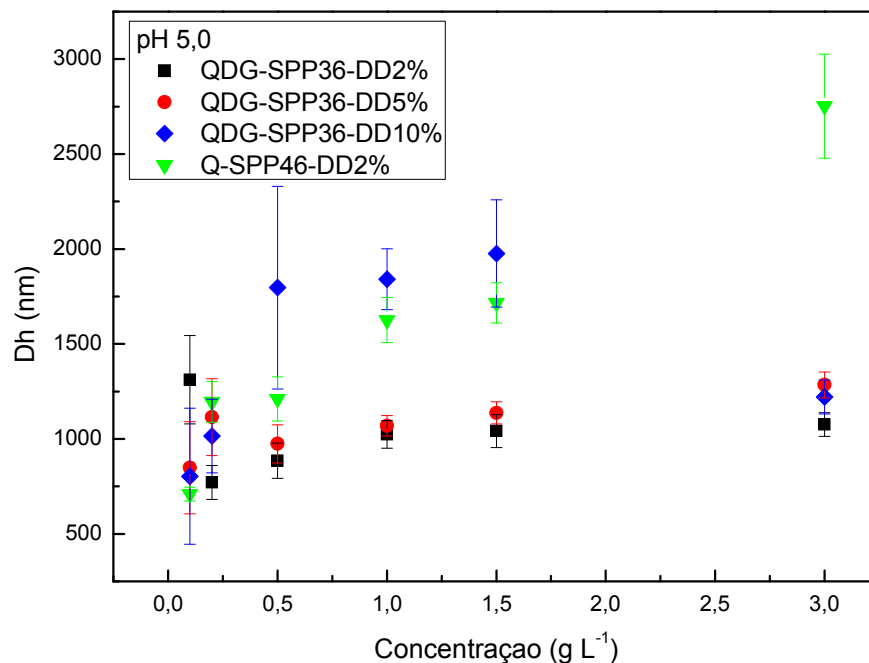


Figura 35: Diâmetro hidrodinâmico em função da concentração dos agregados formados pelos dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em solução tamponante de acetato pH 5,0 (concentração 50 mmol L⁻¹ e força iônica 150 mmol L⁻¹).

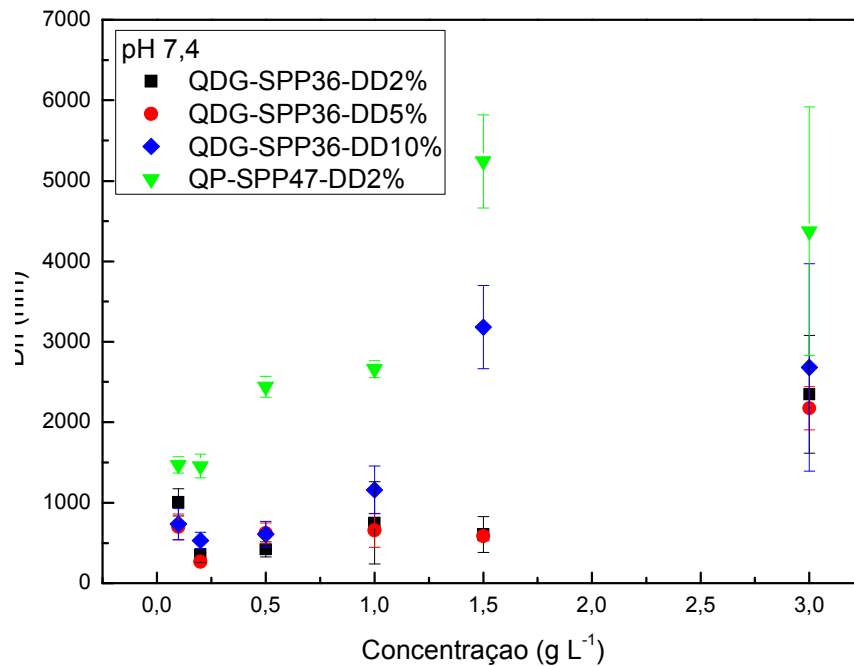


Figura 36: Diâmetro hidrodinâmico em função da concentração dos agregados formados pelos dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QDG-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em solução tamponante de fosfato pH 7,4 (concentração 50 mmol L^{-1} e força iônica 150 mmol L^{-1}).

De modo geral, pode-se observar que o diâmetro aumenta com a concentração de polímero e os agregados apresentam uma alta polidispersividade. Estes diâmetros são consideravelmente maiores do que aqueles encontrados na literatura para sistemas similares (HU et al., 2008), podendo ser atribuídos à força iônica de 150 mmol L^{-1} utilizada nos experimentos. A dissolução em água pode promover a formação de agregados menores, além disso, as soluções não passaram por filtração para eliminar os agregados maiores, o que pode diminuir o tamanho e as polidispersividades (WANG X.L. et al., 2012). Nas Tabelas 7 e 8 estão apresentados os valores dos índices de polidispersividade (PDI) dos agregados nos pHs 5,0 e 7,4 nas diferentes concentrações estudadas. De acordo com os dados da Tabela 7 em pH 5,0 é possível verificar que para o derivado mais substituído com DD os PDIs são elevados, que variam de 0,9 a 1 ou seja, os agregados apresentaram-se heterogêneos. Em pH 7,4 como pode ser observado na Tabela 8 os IPDs variaram de 0,2 a 0,8, indicando que em pH mais elevado os derivados também formaram agregados heterogêneos. Em geral os PDIs diminuem com o aumento da concentração de polímero. De acordo com as instruções do manual do aparelho, os IPDs elevados indicam amostras heterogêneas de elevada polidispersividade (Manual do aparelho Zetasizer nano- ZS90).

Tabela 7- Valores dos índices de polidispersividade dos derivados de quitosana em diferentes concentrações e em pH 5.

Polímero (g L ⁻¹)	Índices de Polidispersividade (PDI)*					
	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5	3,0
QDG-SPP36-DD2%	0,8±0,2	0,6±0,1	0,8±0,2	0,7±0,2	0,8±0,2	0,5±0,0
QDG-SPP36-DD5%	1,0±0,0	0,8±0,2	0,7±0,2	0,8±0,2	0,6±0,1	0,8±0,2
QDG-SPP36-DD10%	1,0±0,1	1,0±0,0	1,0±0,0	1,0±0,1	0,9±0,2	0,9±0,2
Q-SPP46-DD2%	0,7±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,0	0,6±0,0	0,6±0,1

*Média ± Desvio Padrão (n=6)

Tabela 8 – Valores dos índices de polidispersividade dos derivados de quitosana em diferentes concentrações e em pH 7,4.

Polímero (g L ⁻¹)	Índices de Polidispersividade (PDI)*					
	0,1	0,2	0,5	1,0	1,5	3,0
QDG-SPP36-DD2%	0,8±0,1	0,6±0,1	0,7±0,2	0,8±0,1	0,8±0,2	0,3±0,1
QDG-SPP36-DD5%	0,6±0,3	0,6±0,1	0,7±0,2	0,5±0,2	0,6±0,1	0,5±0,3
QDG-SPP36-DD10%	0,8±0,2	0,6±0,1	0,6±0,2	0,7±0,2	0,4±0,2	0,2±0,1
Q-SPP46-DD2%	0,6±0,2	0,6±0,1	0,5±0,1	0,3±0,1	0,4±0,2	0,6±0,4

*Média ± Desvio Padrão (n=6)

As medidas de potencial zeta (ζ) (Figuras 37 e 38) foram realizadas nas mesmas concentrações que as medidas de tamanho e foi observada uma relação entre as medidas de D_h e (ζ). Em pH 5,0, os valores de (ζ) permaneceram positivos em praticamente todas as concentrações para todos os derivados. Sendo praticamente constante em aproximadamente +20 mV. Nesse pH, a carga superficial positiva dos agregados é resultante da protonação dos grupos aminas livres da quitosana. Em pH 7,4, a desprotonação dos grupos aminas reduz o potencial os valores variaram de -1 a até no máximo +4 mV. Em geral, as concentrações utilizadas encontram-se muito acima da CAC e podem contribuir para a formação de agregados de tamanho elevado, sobretudo em pH 7,4 devido aos baixos valores de (ζ). Entretanto, observa-se que mesmo em pH 5,0, e ζ positivos partículas grandes são formadas, o que pode ser devido à natureza polidispersa dos polímeros, e blindagem parcial proporcionada pela força iônica elevada da solução tamponante que foi utilizada 150 mmol L⁻¹. Portanto, pode-se observar que o D_h aumento com o pH e ζ diminui, indicando que em pHs mais elevados a estabilidade dos agregados formados é menor, mas em pH mais baixo 5,0 os agregados são menores e mais estáveis.

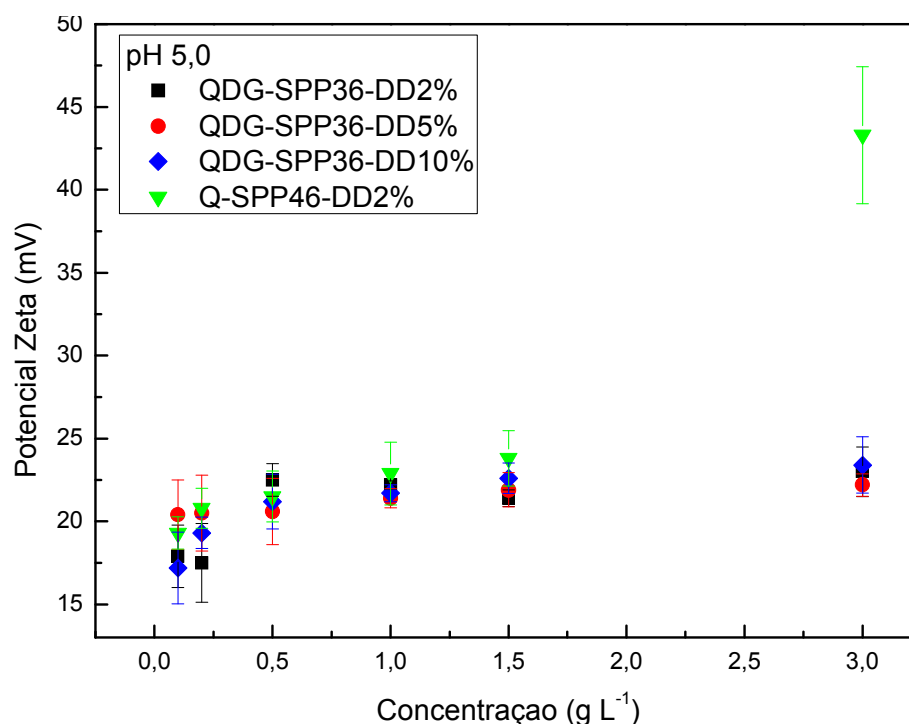


Figura 37: Potencial zeta dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em função da concentração de polímero (g L⁻¹) em solução tamponante pH 5,0 (concentração de 50 mmol L⁻¹ e força iônica 150 mmol L⁻¹).

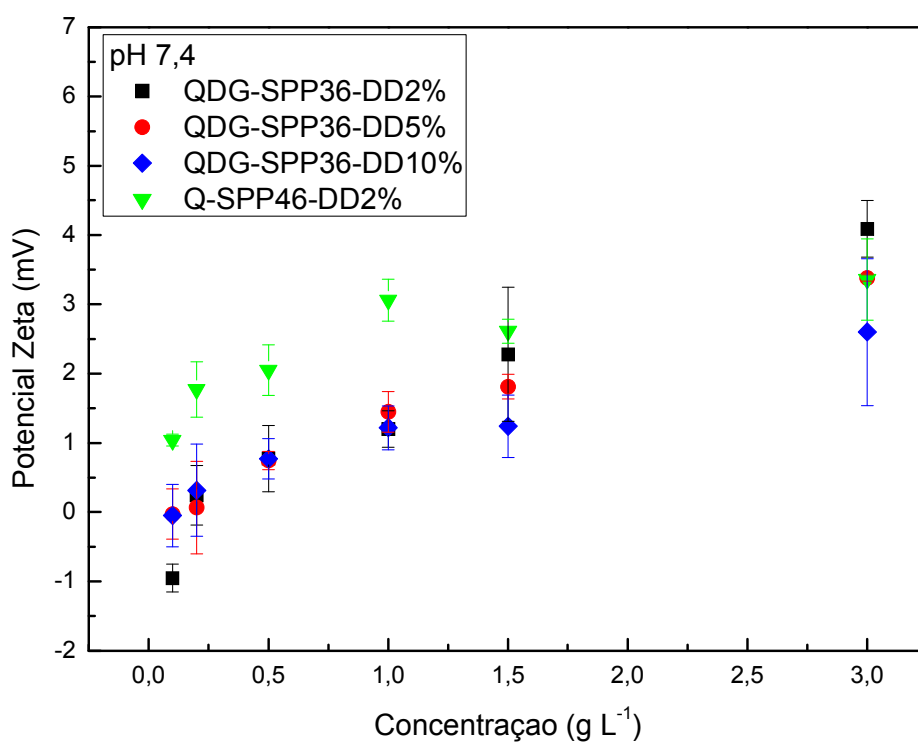


Figura 38: Potencial zeta dos derivados QDG-SPP36-DD2%, QGD-SPP36-DD5%, QDG-SPP36-DD10% e Q-SPP46-DD2% em função da concentração de polímero (g L⁻¹) em solução tamponante pH 7,4 (concentração de 50 mmol L⁻¹ e força iônica 150 mmol L⁻¹).

4.2.5 Estudo da Incorporação de Fármaco Utilizando a Espectroscopia UV-Vis

Inicialmente foi determinado o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da quercetina em *N-N*-dimetilformamida (DMF), a partir da avaliação do comprimento de onda máximo de absorção ($\lambda_{\text{máx}}$) de 376 nm, o qual foi utilizado para determinar o (ϵ) da quercetina (Figura 39).

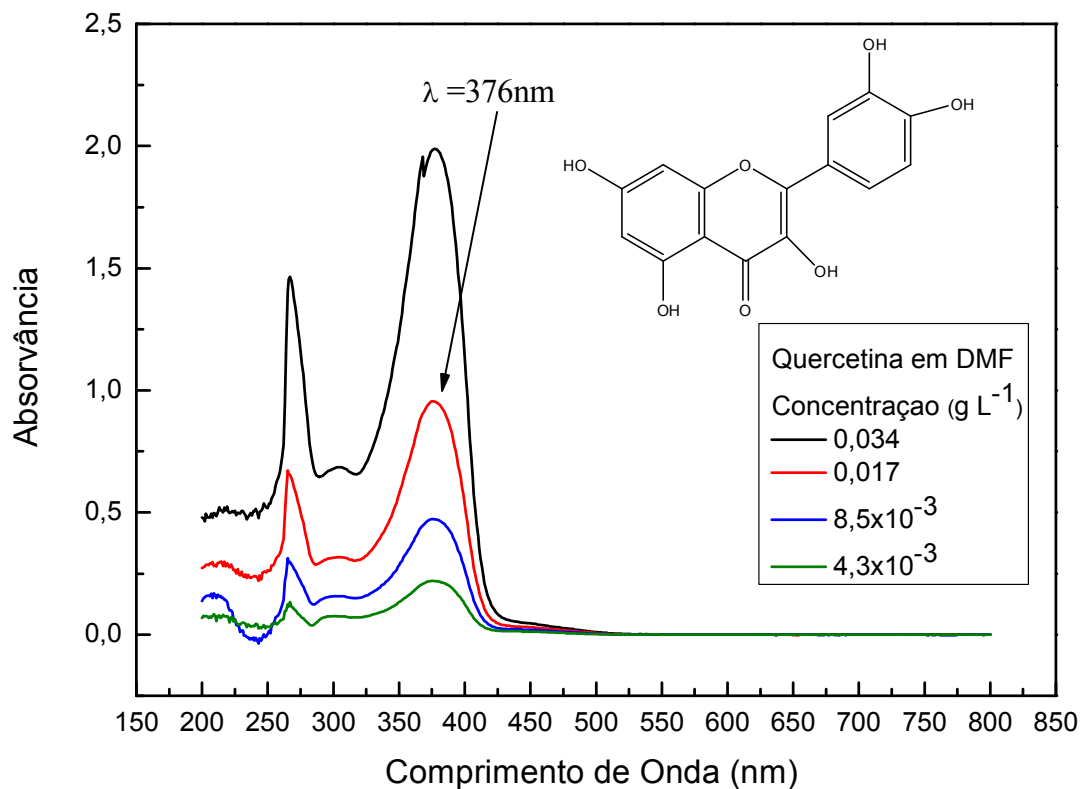


Figura 39: Estrutura química e espectros de absorção da quercetina em DMF.

Em DMF o coeficiente de absorvidade molar da quercetina é $\epsilon = 2,25 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, a correlação linear $r = 0,99962$ (Figura 40). O (ϵ) foi determinado a partir de uma solução estoque de quercetina 1 g L^{-1} em DMF, com diluições consecutivas, sendo o procedimento realizado em triplicata.

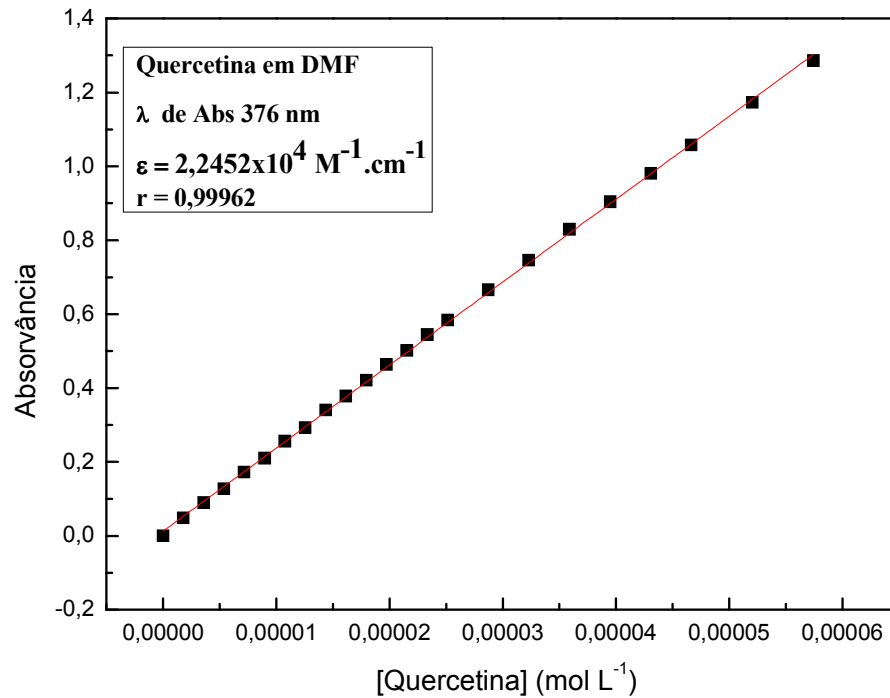


Figura 40: Determinação do coeficiente de absorvidade molar (ϵ) da quercetina em N-N-dimetilformamida (DMF).

A partir da lei de Lambert-Beer foi possível determinar a quantidade de fármaco incorporada aos agregados. A técnica utilizada para essa separação foi a diálise, que permite determinar a concentração de fármaco que é incorporada no polímero, e portanto, fica retida no interior da membrana de diálise. Nas Tabelas 9 e 10 estão os valores obtidos de eficiência de encapsulamento (EE) calculada utilizando a (Equação 5) e a capacidade de carreamento (DL) utilizando a (Equação 6) em solução tamponante de acetato e de fosfato de sódio (concentração de 50 mmol L^{-1} e força iônica de 150 mmol L^{-1}) para pH 5 e 7,4, respectivamente.

Tabela 9 - Eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (DL) utilizando espectrofotometria UV-Vis em solução tamponante, pH 5,0.

Polímero	EE *(%)	DL*(%)
QDG-SPP36-DD2%	13,35 ± 1,04	1,21 ± 0,09
QDG-SPP36-DD5%	20,40 ± 2,44	1,85 ± 0,22
QDG-SPP36-DD10%	58,07 ± 8,51	5,28 ± 0,78
Q-SPP46-DD2%	19,62 ± 4,77	1,28 ± 0,31

*Média ± Desvio Padrão (n=3)

Tabela 10 - Eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (DL) utilizando espectrofotometria UV-Vis em em solução tamponante, pH 7,4.

Polímero	EE *(%)	DL*(%)
QDG-SPP36-DD2%	17,60 ± 0,87	1,60 ± 0,08
QDG-SPP36-DD5%	22,11 ± 3,58	2,01 ± 0,33
QDG-SPP36-DD10%	56,46 ± 12,78	5,13 ± 1,01
Q-SPP46-DD2%	17,99 ± 3,98	2,21 ± 0,49

*Média ± Desvio Padrão (n=3)

Em geral, foi observado que os derivados anfífilos podem formar agregados em solução aquosa pela auto-associação possibilitando a solubilização de fármacos hidrofóbicos ou anfífilos no interior desses agregados. Os estudos de incorporação mostraram que a capacidade de solubilização se eleva com o aumento da proporção do conteúdo hidrofóbico dos derivados. A eficiência de encapsulamento variou de aproximadamente 13 a 58 % em pH 5 e de 17 a 56 % em pH 7,4 para os derivados menos e mais substituídos com DD.

Esse comportamento é similar ao que reporta DUAN e colaboradores (DUAN K. et al.,2010). Segundo os autores, um aumento de conteúdo de policaprolactona (PCL) na quitosana aumenta a eficácia de encapsulação do fármaco (EE) de 64,3 para 84,6 % e a capacidade de carregamento (DL) de 6,43 para 8,66 %. Já a variação do pH teve uma sutil influência na eficiência de encapsulação. E a capacidade de carregamento variou de aproximadamente 1,2 a 5,3 % em pH 5,0 e de 1,6 a 5,1% em pH 7,4.

Medidas de espalhamento de luz e potencial zeta também foram realizadas para os agregados e arregados com o fármaco quercetina. Essas medidas foram feitas em soluções tamponante de acetato de sódio em força iônica baixa de 50 mmol L⁻¹ e força iônica fisiológica de 150 mmol L⁻¹, em pH 5,0. Para as medidas foi empregado o polímero degradado de menor GS-DD (QDG-SPP36-DD2%) que foi preparado na concentração de 0,2 g L⁻¹.

Os resultados obtidos de tamanho, potencial zeta e índice de polidispersividade PDI estão apresentados na Tabela 11. De modo geral, os valores obtidos de diâmetro hidrodinâmico D_h permaneceram em torno de 900 nm e praticamente constante tanto para a nanopartícula carregada de fármaco quanto para a nanopartícula sem fármaco (vazia), nas diferentes forças iônicas estudadas. O potencial zeta ζ bem como o tamanho não foi alterado quando se compara os valores obtidos para as nanopartículas carregadas e vazias, entretanto, com a variação da força iônica do meio o potencial eletrocinético sofreu uma pequena alteração de +18 para +25 mV tanto para as nanopartículas vazias carregadas com quercetina quanto para as nanopartículas vazias. E os índices de polidispersividade permaneceram praticamente constantes para todas as medidas realizadas.

Tabela 11- Medidas de diâmetro hidrodinâmico D_h , potencial zeta ζ e PDI dos agregados obtidos com o derivado QDG-SPP36-DD2% vazio e carregado com quercetina em diferentes forças iônicas.

Polímero	Força Iônica (mmol L ⁻¹)	D_h^* (nm)	ζ^* (mV)	PDI*
QDG-SPP36-DD2% (Vazio)	150	770± 89,3	17,5± 2,39	0,6±0,1
QDG-SPP36-DD2% (Carregado)	150	1057± 170,2	18,6± 1,23	0,8±0,2
QDG-SPP36-DD2% (Vazio)	50	1144± 136,0	24,4± 2,25	0,8±0,2
QDG-SPP36-DD2% (Carregado)	50	967,5± 105,8	25,4± 1,42	0,7±0,1

*Média ± Desvio Padrão (n=6)

A Figura 41 mostra soluções de quercetina em diferentes meios. Na figura 41 (A) é uma imagem da solução de quercetina dispersa em água na concentração de 0,3 g L⁻¹ nessa condição foi observado que a quercetina permanece praticamente insolúvel e água. Na figura 41(B) é a imagem de uma solução das nanopartículas carregados com quercetina em solução tamponante de concentração 50 mmol L⁻¹ e força iônico 150 mmol L⁻¹ e pH 5,0. O polímero está na concentração de 1 g L⁻¹ e o fármaco na concentração de 0,1 g L⁻¹, nessas condições foi observado que a quercetina interagiu com o agregado polimérico e se solubilizou mesmo o meio sendo aquoso.

As figuras 41 (C) e (D) são imagens das soluções obtidas dos experimentos de eficiência de encapsulamento (EE) e a capacidade de carregamento (DL), essas são soluções que passaram pelo processo de diálise e que posteriormente foram quantificadas por UV-Vis. Na figura 41 (C) os agregados carregados com quercetina estão solubilizados em soluções tamponantes em pH 5,0 de concentração 50 mmol L^{-1} e força iônica 150 mmol L^{-1} , o polímero está na concentração de 2 g L^{-1} e a quercetina $0,2 \text{ g L}^{-1}$. E na figura 41 (D) tem-se uma imagem dos agregados carregados com quercetina em soluções tamponantes em pH 7,4 de concentração 50 mmol L^{-1} e força iônica 150 mmol L^{-1} . Observando as imagens (C) e (D) é possível verificar que em soluções de polímero tanto em pH 5, quanto em 7,4 a quercetina se solubiliza nos derivados de quitosana. Portanto, os agregados foram capazes de solubilizar o fármaco hidrofóbico quercetina em meio aquoso nas concentrações estudadas.

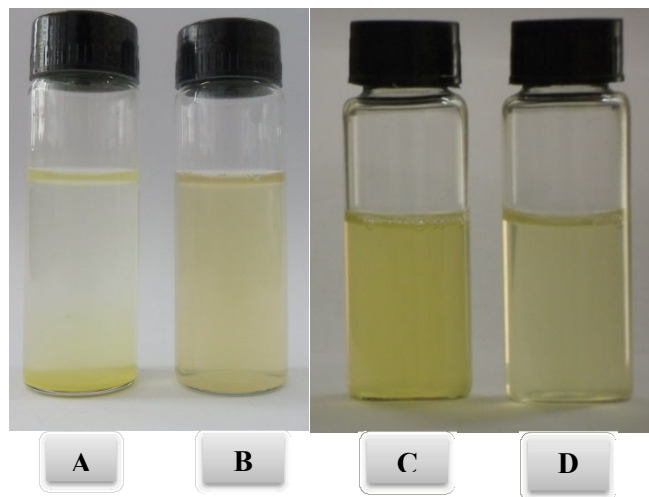


Figura 41: Soluções de quercetina: A) Quercetina em água concentração $0,3 \text{ g L}^{-1}$, B) Polímero na concentração de 1 g L^{-1} e a quercetina $0,1 \text{ g L}^{-1}$ em pH 5,0, C) Polímeros na concentração de 2 g L^{-1} e a quercetina $0,2 \text{ g L}^{-1}$ em pH 5 e D) Polímeros na concentração de 1 g L^{-1} e a quercetina $0,1 \text{ g L}^{-1}$ em pH 7,4.

5 CONCLUSÃO

Quitosana desacetiladas com altos graus de desacetilação podem ser obtidas a partir de quitosanas comerciais por dois processos consecutivos de hidrólise alcalina, ou seja, pelo processo desacetilação. A reação de desacetilação foi realizada com eficiência, visto que o grau de desacetilação da quitosana comercial é de 79% obtido a partir da técnica de RMN de ^1H e após a reação de desacetilação o valor obtido foi de 99,99%. Essas determinações do grau de desacetilação também foram obtidas titulação potenciométrica sendo que os valores obtidos foram de 75,56 e 94,41% para as quitosanas comerciais e desacetiladas respectivamente. A degradação da quitosana foi também bem eficiente, pois a massa molar médias dos polímeros foi determinada por GPC e os valores obtidos para a quitosana desacetilada foi de 205,58 kDa e de 41,64 kDa após o processo de degradação, ou seja, foram obtidos derivados de massa molar menor. As sínteses realizadas indicaram que derivados anfílicos zwitteriônicos de quitosana podem ser obtidos utilizando reações de adição nucleofílicas e as composições dos derivados foram bem controladas ajustando-se a proporção dos reagentes no meio reacional e as técnicas de potenciometria, UV-Vis, IV e RMN de ^1H mostraram-se apropriadas para a determinação dos graus de substituição dos derivados obtidos.

Em geral, os estudos em solução aquosa mostraram que os derivados são capazes de se auto-organizar em meio aquoso em diferentes valores de pH. Os derivados hidrofílicos zwitteriônicos obtidos apresentaram solubilidade em meio aquoso em toda a faixa de pH, o que pode permitir sua utilização em diferentes aplicações no qual o pH neutro é requerido. A modificação com grupos dodecil controla a hidrofobicidade e confere aos polímeros a capacidade de auto-organização em solução aquosa formando agregados com dimensões da ordem de 100 nm a 1000 nm. A formação de agregados mostrou depender da quantidade de grupos hidrofóbicos ligados à cadeia polimérica, da massa molar do polímero e do pH. Os resultados obtidos por meio de medidas de tamanho, por espalhamento de luz dinâmico DLS e potencial zeta ζ demonstraram que a capacidade dos derivados em agregar está diretamente relacionada ao GS-DD. A CAC diminui com o pH e com o aumento do conteúdo hidrofóbico e os estudos de incorporação mostraram que a capacidade de solubilização aumenta com a proporção de grupos dodecil, a qual pode ser ajustada para solubilizar fármacos hidrofóbicos e/ou anfílicos.

Portanto, de forma geral os resultados obtidos demonstram que a proposta de síntese de derivados contendo os grupos zwitteriônicos e grupos hidrofóbicos possibilita a obtenção de sistemas anfífilos zwitteriônicos derivados de quitosana com sensibilidade ao pH, com potencial para serem utilizados como sistemas de liberação controlada de fármacos, pois os derivados sintetizados são capazes de se auto-organizar em meio aquoso em diferentes valores de pH. Sendo assim, é possível controlar as propriedades dos sistemas variando-se o conteúdo hidrofóbico e hidrofílico e dessa forma aperfeiçoar esses sistemas nanoparticulados para que eles possam ser empregados em aplicações importantes da área médica-farmacêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKCELRUD, L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. Editora Manole Ltda, 1º Edição, 2007.

AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; FOOK, L. M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: Aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2.3, p. 27-34, ISSN 1809-8797. Universidade Federal de Campina Grande - PB, 2007.

BAXTER, A.; DILLON, M.; TAYLOR, K. D. A.; ROBERTS, G. A. F. Improved method for i.r. determination of the degree of *N*-acetylation of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, p. 166-169, 1992.

BRAND, L.; GOHLKE, J. R. Fluorescence probes for structure. **Annual Review of Biochemistry**, v. 41, p. 843-868, 1972.

BROMBERG L. Polymeric micelles in oral chemotherapy. **Journal of Controlled Release**, v. 128, p. 99-112, 2008.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUEELLES-MONAL, W.; DESBRIEARES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001b.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeitos de aditivos na desacetilação da quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001a.

CARREÑO-GÓMEZ, B.; DUNCAN, R. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, p. 231-240, 1997.

CASSIDY, J.; SCHÄTZLEIN, A. G. Tumor-targeted drug and gene delivery: principles and concepts. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 6, n.19, p. 1-17, 2004.

COSTA, A. C. A. Tecnologia Mineral. Degradação de cianeto por hipoclorito de sódio, ISSN 0103-7382, **CETEM-CNPQ**, 1992.

DESBRIÈRES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behavior. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, p. 21-28, 1996.

- DOS SANTOS, J. E., SOARES, J. P., DOCKAL, E. R., CAMPANA, S. P. F., CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- DU, Y. Z.; WANG, L.; YUAN, H.; WEI, X. H.; HU, F. Q. Preparation and characteristics of linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles as a carrier for doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 69, p. 257-263, 2009.
- DUAN, J.; MANSOUR, H. M.; ZHANG, Y.; DENG, X.; CHEN, Y.; WANG, J.; PAN, Y.; ZHAO, J. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and curcumin in chitosan/poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 193-201, 2012.
- DUAN, K.; ZHANG, X.; TANG, X.; YU, J.; LIU, S.; WANG, D.; LI, Y.; HUANG, J. Fabrication of cationic nanomicelle from chitosan-graft-polycaprolactone as the carrier of 7-ethyl-10-hydroxy-camptothecin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 76, p. 475-482, 2010.
- FREITAS, M. N.; MARCHETTI, J. M. Nimesulide PLA microspheres as a potential sustained release system for the treatment of inflammatory diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 295, n.1-2, p. 201-211, 2005.
- GOREISH, H. H.; LEWIS, A. L.; ROSE, S.; LLOYD, A. W. The effect of phosphorylcholine-coated materials on the inflammatory response and fibrous capsule formation: In vitro and in vivo observations. **Wiley Periodicals**, p. 1-9, 2003.
- GUO, Z.; XING, R.; LIU, S.; ZHONG, Z.; JI, X.; WANG, L.; LI, P. The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 71, p. 694-697, 2008.
- HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro, LTC. Livros Técnicos e Científicos Editora S. A. p. 862, 2001.
- HSIAO, M. H.; TUNG, T. H.; HSIAO, C. S.; LIU, D. M. Nano-hybrid carboxymethyl-hexanoyl chitosan modified with (3-aminopropyl)triethoxysilane for camptothecin delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, p. 632-639, 2012.
- HU, F. Q.; MENG, P.; DAI, Y. Q.; DU, Y. Z.; YOU, J.; WEI, X. H.; YUAN, H. PEGylates chitosan-based polymer micelle as an intracellular delivery carrier for anti-tumor targeting therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, p. 749-757, 2008.
- JAKUBOWICZ-GIL, J.; PADUCH, R.; PIERSIAK, T. The effect of quercetin on proapoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, p. 1343-1350, 2005.
- JANES, K. A.; CALVO, P.; ALONSO, M. J. Polysaccharide colloidal particles as delivery systems for macromolecules. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 83-97, 2001.

JUNG, B-O.; KIM, C-H.; CHOI, K-S.; LEE, Y. M.; KIM, J. J. Preparation of amphiphilic chitosan and their antimicrobial activities. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 72, p. 1713-1719, 1999.

KATHMANN, E. E. L.; WHITE, L. A.; MCCORMICK, C. L., Water-soluble polymers .7. Electrolyte and pH responsive zwitterionic copolymers of 4-[(2-acrylamido-2methyl propyl)dimethylammonio]butanoate with 3-[(2-acrylamido-2-methylpropyl) dimethyl ammonio]propanesulfonate. **Macromolecules**, v. 30, p. 5297-5304, 1997.

KHONKARN, R., MANKHETKORN, S.; HENNINK, W. E.; OKONOGI, S. PEG-OCL micelles for quercetin solubilization and inhibition of cancer cell growth. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 268-275, 2011.

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

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

LIU, W. G; ZHANG, X; SUN, S. J; SUN, G. J; YAO, K. D. N-Alkylated chitosan as a potential nonviral vector for gene transfection. **Bioconjugate Chemistry**, v. 14, p. 782-789, 2003.

LOWE, A. B.; MCCORMICK, C. L. Synthesis and solution properties of zwitterionic polymers. **Chemical Reviews**, v. 102, p. 4177-4190, 2002.

MALHOTRA, B. D.; KAUSHIK, A. Metal oxide–chitosan based nanocomposite for cholesterol biosensor. **Thin Solid Films**, v. 518, p. 614–620, 2009.

MANASPON, C.; PASUWAT, K. V.; PIMPHA, N. Preparation of folate-conjugated pluronic F127/Chitosan core-shell nanoparticles encapsulating doxorubicin for breast cancer treatment. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Nanomaterials**, 2012.

MARGUERITE, R. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.

MILHOME, M. A. L.; KEUKELEIRE, D.; RIBEIRO, J. P.; NASCIMENTO, R. F., CARVALHO, T. V., QUEIROZ, D. C. Removal of phenol and conventional pollutants from aqueous effluent by chitosan and chitin. **Química Nova**, v. 32, n. 8, p. 2122-2127, 2009.

MURPHY, E. F.; LU, J. R.; LEWS, A. L.; BREWER, J.; RUSSELL, J.; STRATFORD, P. Characterization of protein adsorption at the phosphorylcholine incorporated polymer -water interface. **Macromolecules**, p. 4545- 4554, 2000.

MUZZARELLI, R. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, p. 131-140, 1997.

NABID, M. R.; REZAEI, S. J. T.; SEDGHI, S.; NIKNEJAD, H.; ENTEZAMI, A. A.; OSKOOIE, H. A.; HERAVI, M. M. Self-assembled micelles of well-defined pentaerythritol-centered amphiphilic A₄B₈ star-block copolymers based on PCL and PEG for hydrophobic drug delivery. **Polymer**, v. 52, p. 2799-2809, 2011.

PAVINATTO, A. Efeito de características estruturais da quitosana sobre a sua interação com filmes de Langmuir como modelo de membrana. **Dissertação de mestrado** (Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais), Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

PHILIPPOVA, O. E.; VOLKOV, E. V.; SITNIKOVA, N. L.; KHOKHLOV, A. R.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Two types of hydrophobic aggregates in aqueous solutions of chitosan and its hydrophobic derivative. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 483-490, 2001.

PLUMB, G. W.; PRICE, K. R.; WILLIAMSON G. Antioxidant properties of flavonol glycosides from tea. **Redox Report**. v. 4, p. 13-16, 1999.

QIU, X.; KWAN, C. M. S.; WU, C., Laser light scattering study of the formation and structure of poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) nanoparticles. **Macromolecules**, v. 30, p. 6090-6093, 1997.

RANELLETTI, F. O.; RICCI, R.; LAROCCA, L. M.; MAGGIANO, N.; CAPELLI, A.; SCAMBIA, G.; BENEDETTI-PANICI, P.; MANCUSO, S.; RUMI, C.; PIANTELLI, M., Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogenbinding sites in human colon-cancer cell lines and primary colorectal tumors. **International Journal of Cancer**, v. 50, p. 486-492, 1992.

SADEGHI, A. M.; DORKOOSH, F. A.; AVADI, M. R.; SAADAT, P.; RAFIEE-TEHRANI, M.; JUNGINGER, H. E. Preparation, characterization and antibacterial activities of chitosan, N-trimethyl chitosan (TMC) and N-diethylmethyl chitosan (DEMC) nanoparticles loaded with insulin using both the ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation methods. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, p. 299-306, 2008.

SALEMA, R.; SANTOS, I. **Microscopia electrónica de transmissão**. Instituto Nacional de Investigação Científica, Lisboa, 1992.

SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, E. R.; CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, E. T. G. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**. v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.

SASHIWA, H.; YAMAMORI, N.; ICHINOSE, Y.; SUNAMOTO, J.; AIBA, S., Michael reaction of chitosan with various acryl reagents in water. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1250-1254, 2003.

SILVA, M. A. D. R. Utilização do pireno como uma sonda fluorescente na investigação de ligações intermoleculares em misturas binárias de solventes. **Dissertação de Mestrado em Química**, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis, 2002.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Tradução Paula Fernandes de Aguiar, Ricardo Bicca de Alencastro, Rio de Janeiro, Editora: LTC, 2006.

SKOOG, A. D.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Principles of Instrumental Analysis**; 5^o Edição, Saunders College Publishing, 1998.

SLUDDEN, J.; UCHEGBU, I. F.; SCHÄTZLEIN, A. G. The encapsulation of bleomycin within chitosan based polymeric vesicles does not alter its biodistribution. **Juornal Pharmacol**, v. 52, p. 377-382, 2000.

SOLOMONLOS, T. W. G.; FRYHLE, B. **Química Orgânica**, 8. Ed. Tradução de Robson Mendes Matos, Revisão Técnica Délio Soares Raslan- Rio de Janeiro: LTC, 2006.

STULZER, H. K.; LACERDA, L.; TAGLIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Synthesis and characterization of cross-linked malonyl chitosan microspheres for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 490, 2008.

TAN, W. F.; LIN, L. P.; LI, M. H.; ZHANG, Y. X.; TONG, Y. G.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, p. 255-262, 2003.

TIERA, M. J.; OLIVEIRA, V. A.; TOLEDO, E. C., SENA, G. L. Aggregation behavior of hydrophobically modified poly(allylammonium) chloride. **Colloid & Polymer Science**, v. 278, p. 1052-1060, 2000.

TIERA, M. J.; QIU, X. P.; BECHAOUCH, S.; SHI, Q.; FERNANDES, J. C.; WINNIK, F. M. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3151-3156, 2006.

TOLAIMATE, A.; DESBRIERESB, J.; RHAZIA, M.; ALAGUIC, A.; VINCENDOND, M.; VOTTEROD, P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

TOMMERAAS, K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E.; SMIDSRØD, O. Preparation and characterization of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, p. 137-144, 2001.

TUNGJAI, M.; POOMPIMON, W.; LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, N.; MANKHETKORN, S. Spectrophotometric characterization of behavior and the predominant species of flavonoids in physiological buffer: determination of solubility, lipophilicity and anticancer efficacy. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 2, p. 10-19, 2008.

VAN BUSTSELE, K.; JÉRÔNIMO, R.; JÉRÔNIMO, C. Functional amphiphilic and biodegradable copolymers for intravenous vectorisation. **Polymer**, v. 48, p. 7431-7443, 2007.

VARNA, A. J., DESHPANDE, S. V., KENNEDY, J. F. Metal complexation by chitosan and its derivatives: a review. **Carbohydrates Polymers**, v. 55, p. 77-93, 2003.

WANG, X. H.; TIAN, Q.; WANG, W.; ZHANG, C. N.; WANG, P.; YUAN, Z. In vitro evaluation of polymeric micelles based on hydrophobically-modified sulfated chitosan as a carrier of doxorubicin. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 23, p. 1663–1674, 2012.

WANG, X. L.; ZHAI, Y. L.; TANG, D. L.; LUI, G. Y.; WANG, Y. Z., Self-assembly, drug-delivery behavior, and cytotoxicity evaluation of amphiphilic chitosan-graft-poly(1,4-dioxan-2-one) copolymers. **Journal of Polymer Research**, v. 19, p. 9946, 2012.

WILLIAMS, D. F. The williams dictionary of biomaterials. **Liverpool: Liverpool University Press**, 1999.

XIA, C.; DING, X.; SUN, Y. H.; LIU, H.; LI, Y., Hyperbranched-upon-dendritic macromolecules as unimolecular hosts for controlled release. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry polymer chemistry**, p. 4013-4019, 2010.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, p. 381-406, 2001.

YANG, W.; XUE, H.; LI, W.; ZHANG, J. L.; JIANG, S. Y., Pursuing “zero” protein adsorption of poly(carboxybetaine) from undiluted blood serum and plasma. **Langmuir**, v. 25, p. 11911-11916, 2009.

YE, Y. Q.; YANG, F. L.; HU, F. Q.; DU, Y. Z.; YUAN, H.; YU, H. Y. Core-modified chitosan-based polymeric micelles for controlled release of doxorubicin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 352, p. 294-301, 2008.

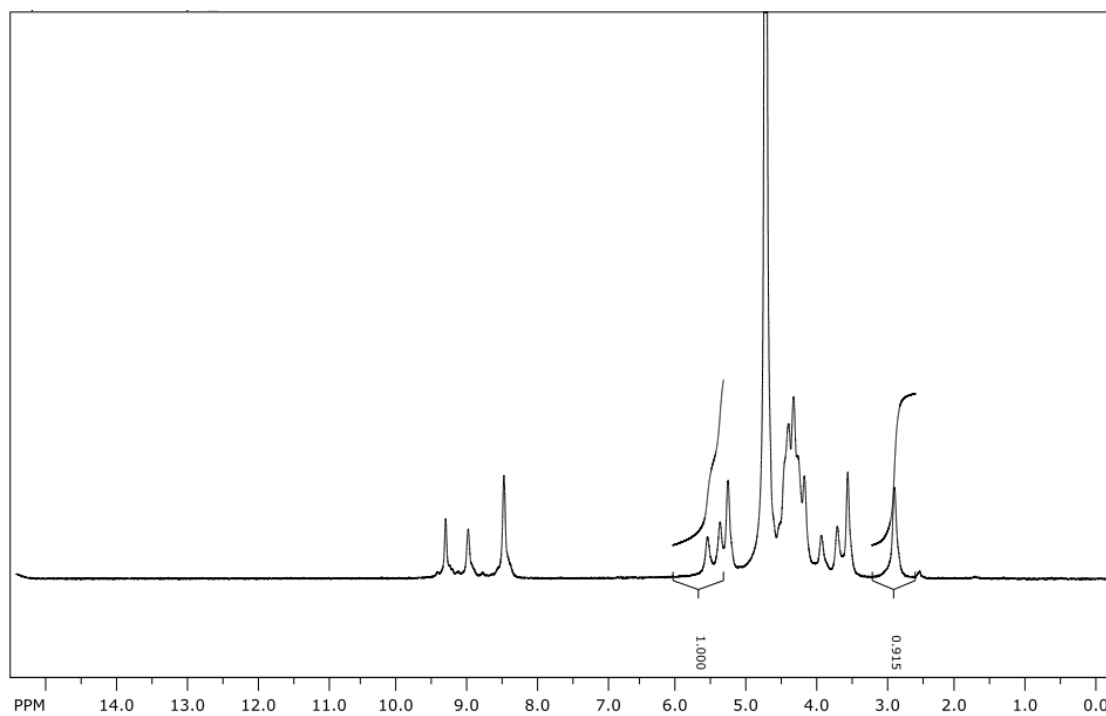
YOO, H. S; PARK, T. G., Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 70, p. 63-70, 2001.

ZHANG, J.; CHEN, X. G.; LIU, C. S.; PARK, H. J., Investigation of polymeric amphiphilic nanoparticles as antitumor drug carriers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p. 991-999, 2009.

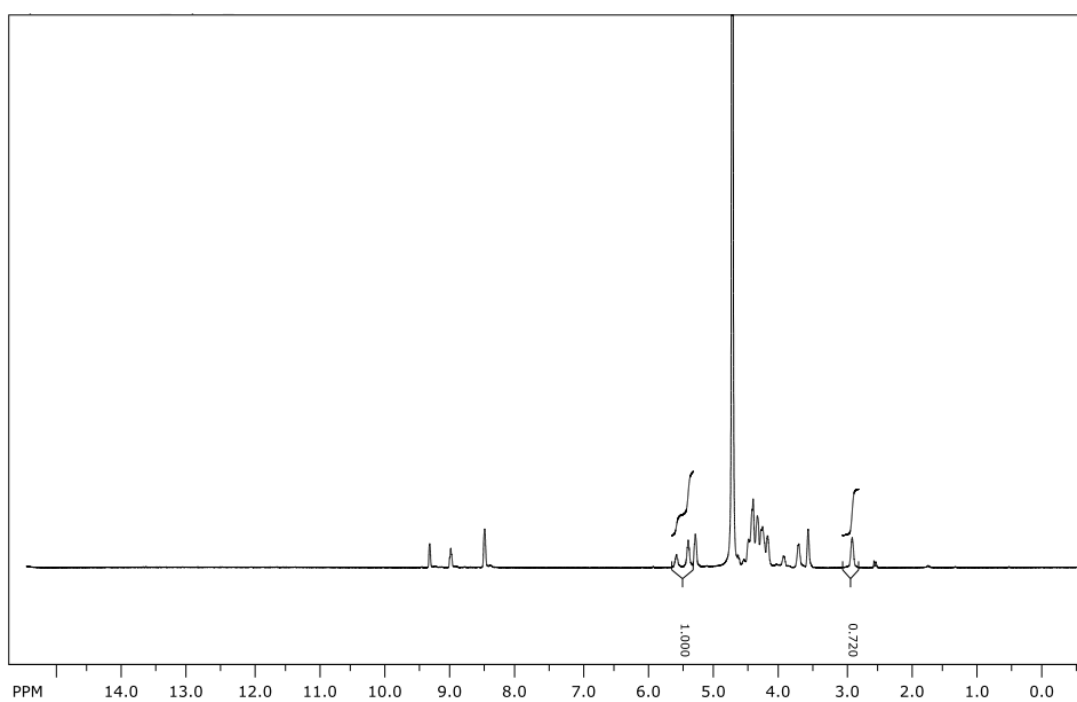
ZHU, A.; ZHANG, J.; SHEN, J. Preparation and anticoagulant property of phosphorylcholine-terminated o-benzoylchitosan derivative. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, p. 489-493, 2003.

APÊNDICE

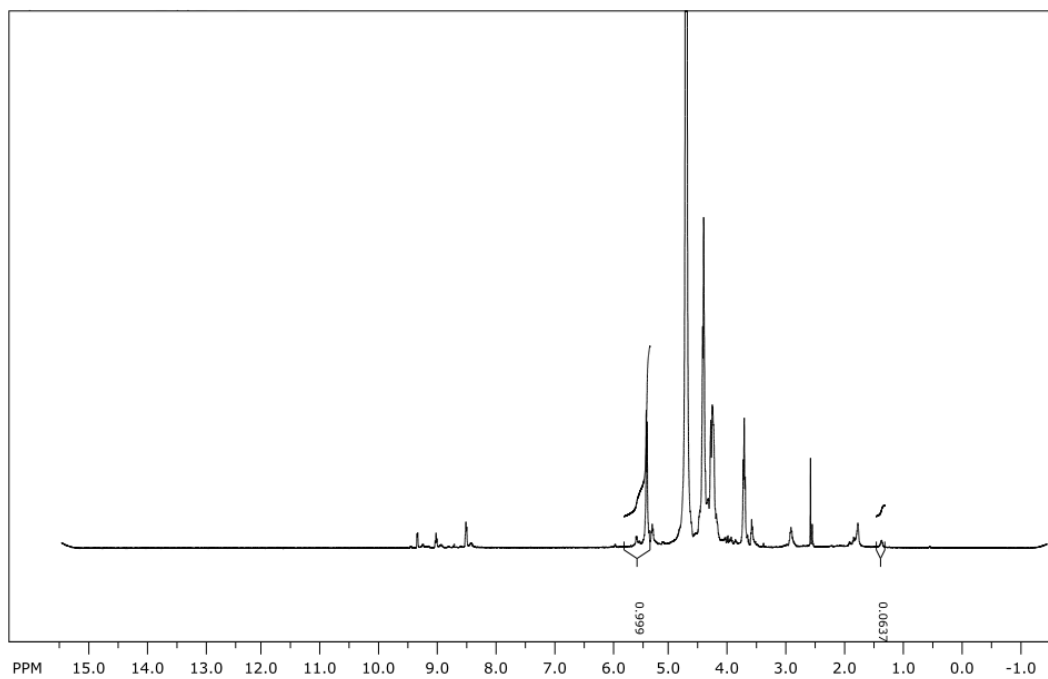
Janela Espectral da Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio dos Derivados Sintetizados (RMN de ^1H)



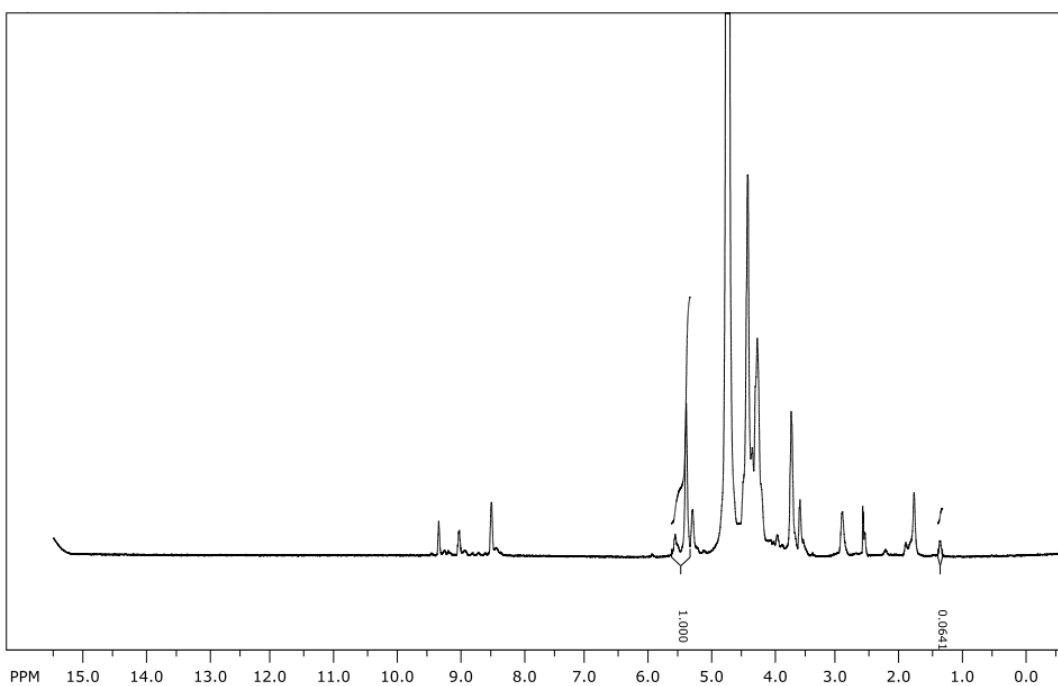
A) Espectro do derivado hidrofílico não-degradado Q-SPP46%



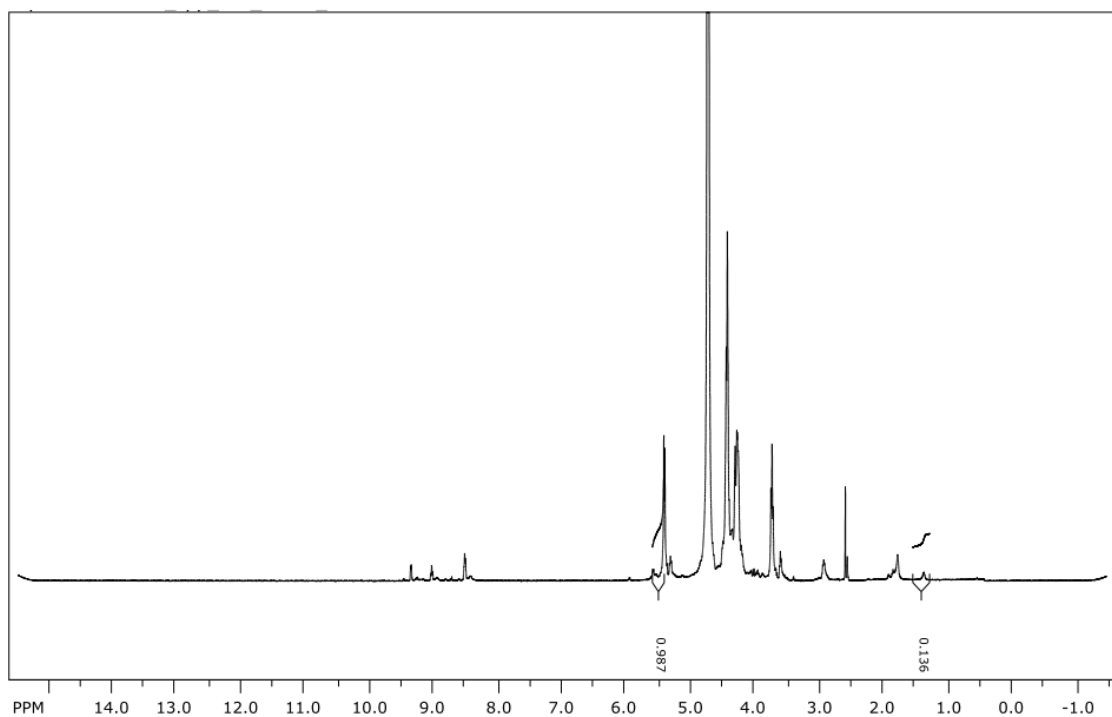
B) Espectro do derivado hidrofílico degradado QDG-SPP36%



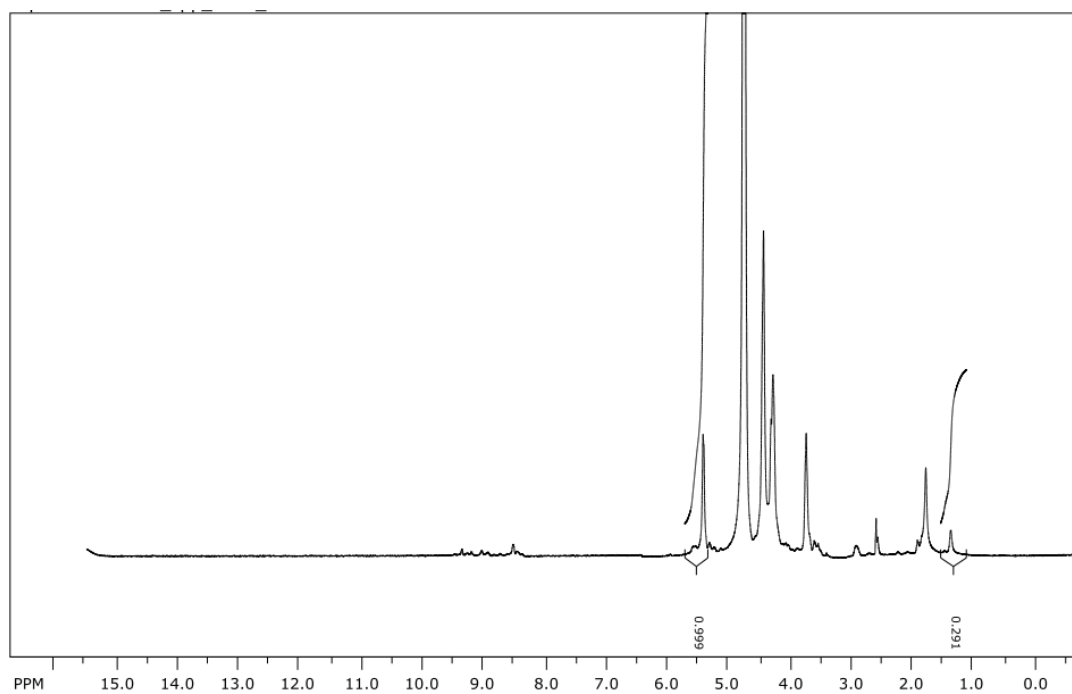
C) Espectro do derivado anfílico QDG-SPP46-DD2%



D) Espectro do derivado anfílico degradado QDG-SPP36-DD2%

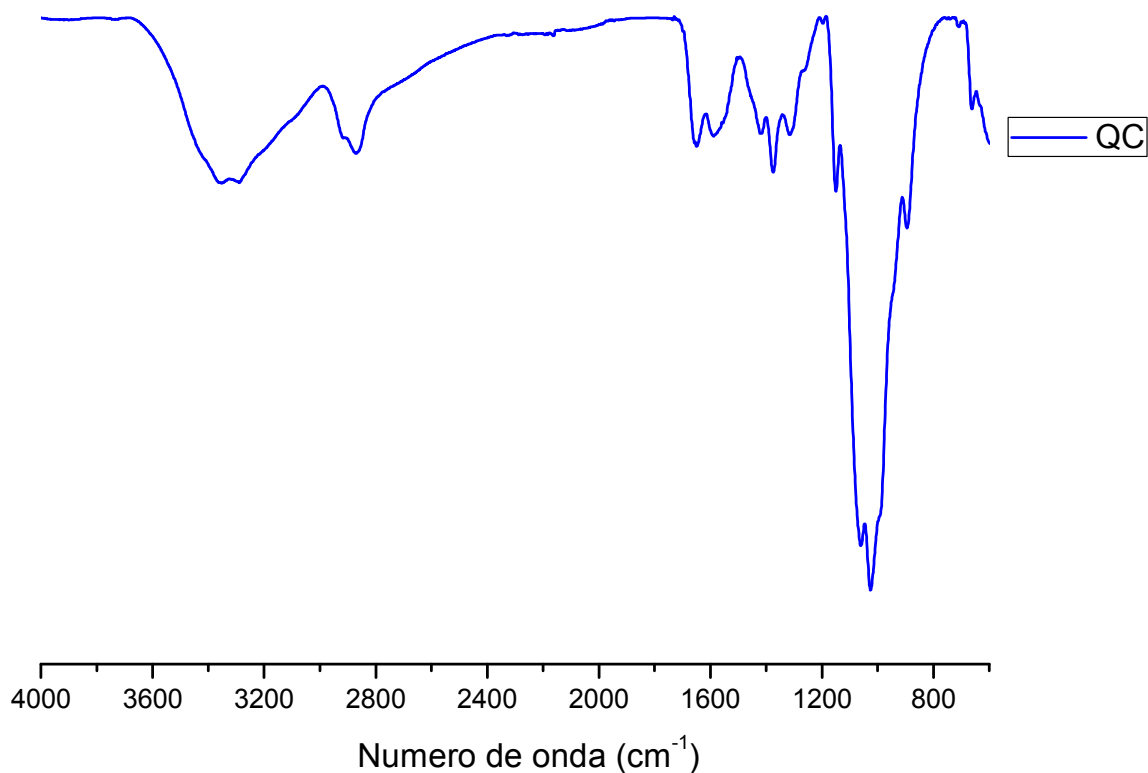


E) Espectro do derivado anfifílico degradado QDG-SPP36-DD5%

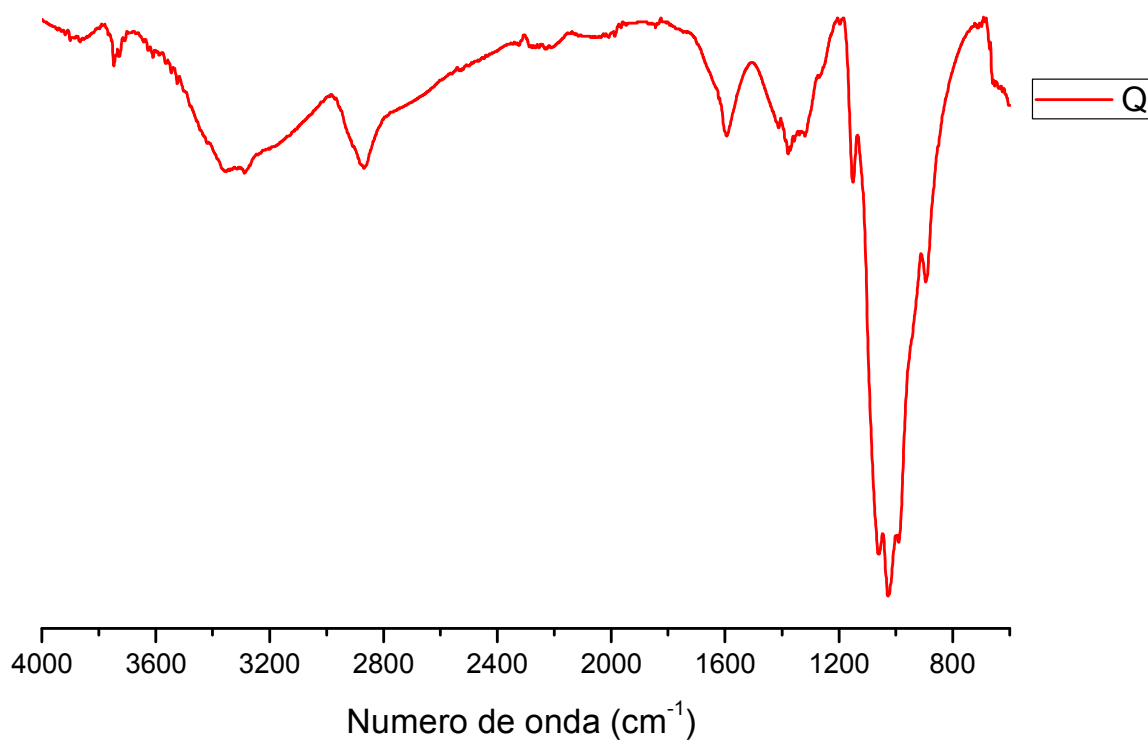


F) Espectro do derivado anfifílico degradado QDG-SPP36-DD10%

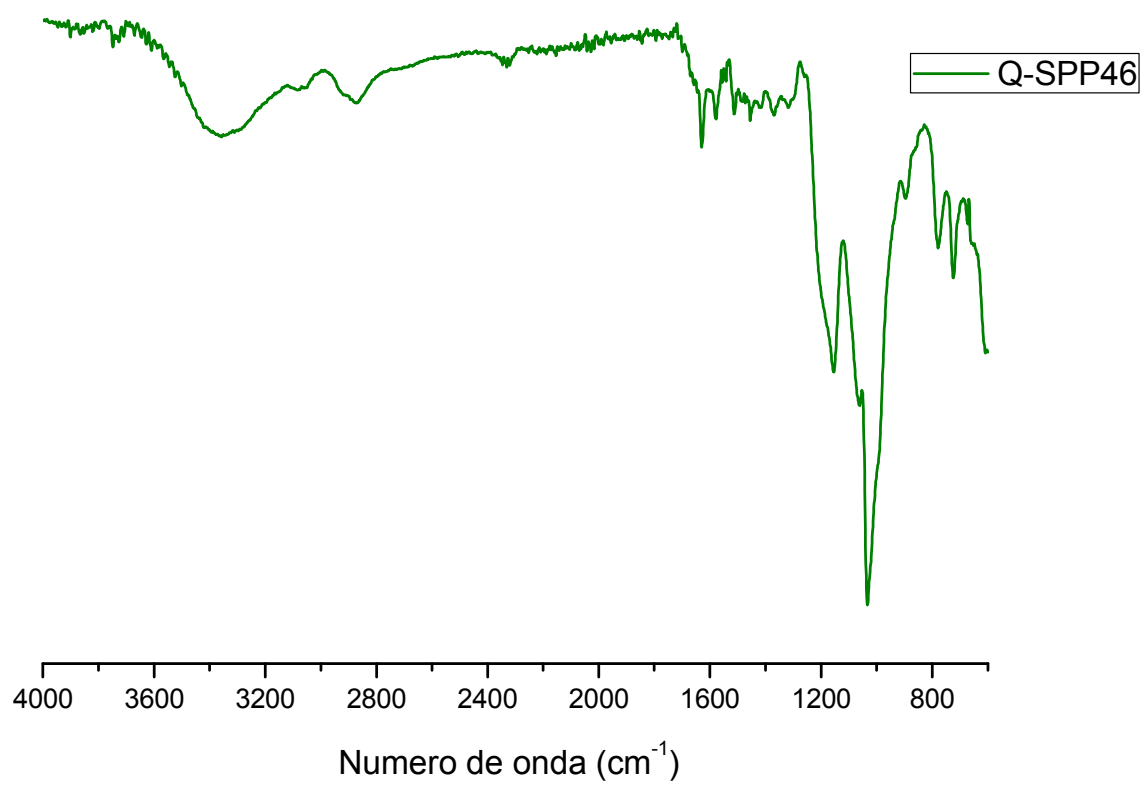
Janela Espectral de Infravermelho da Quitosana e dos Derivados Sintetizados



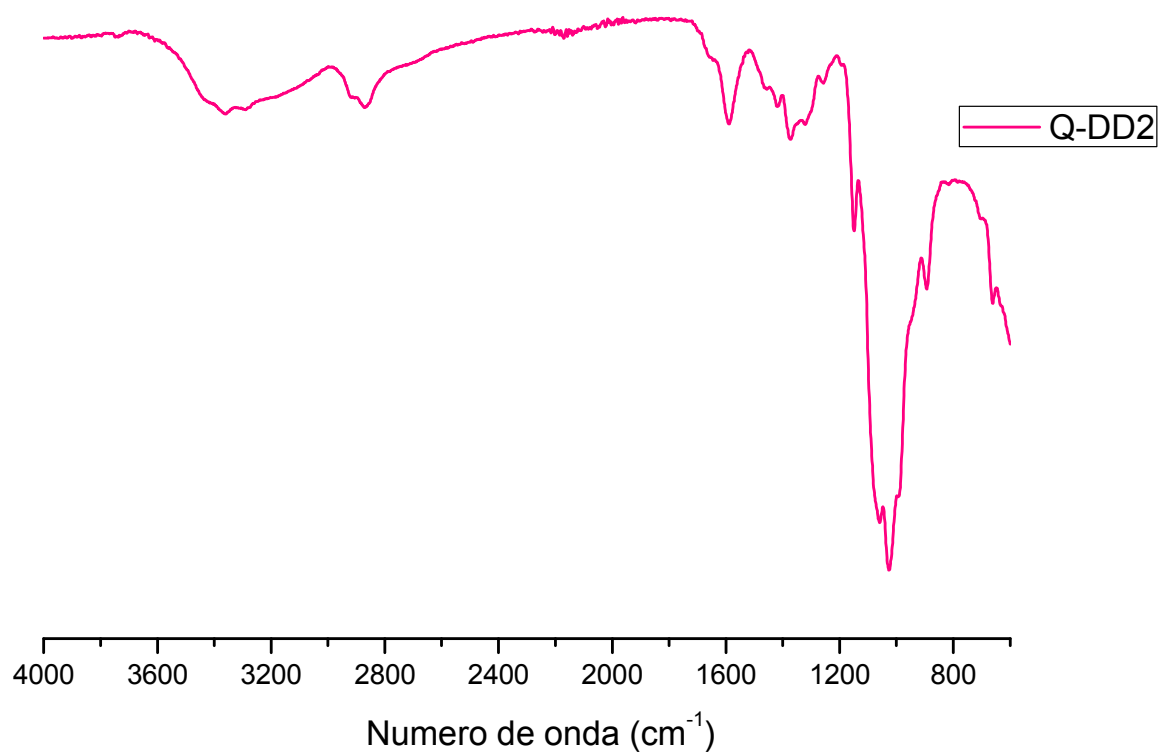
A) Infravermelho da QC



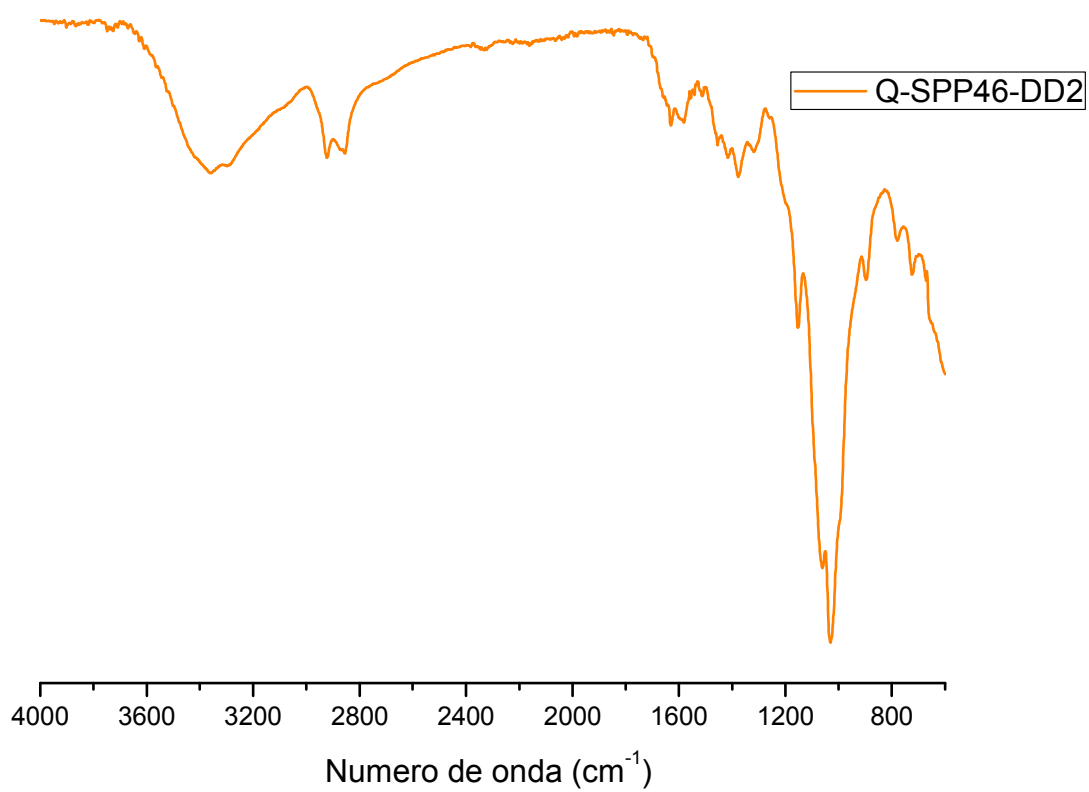
B) Infravermelho da Q



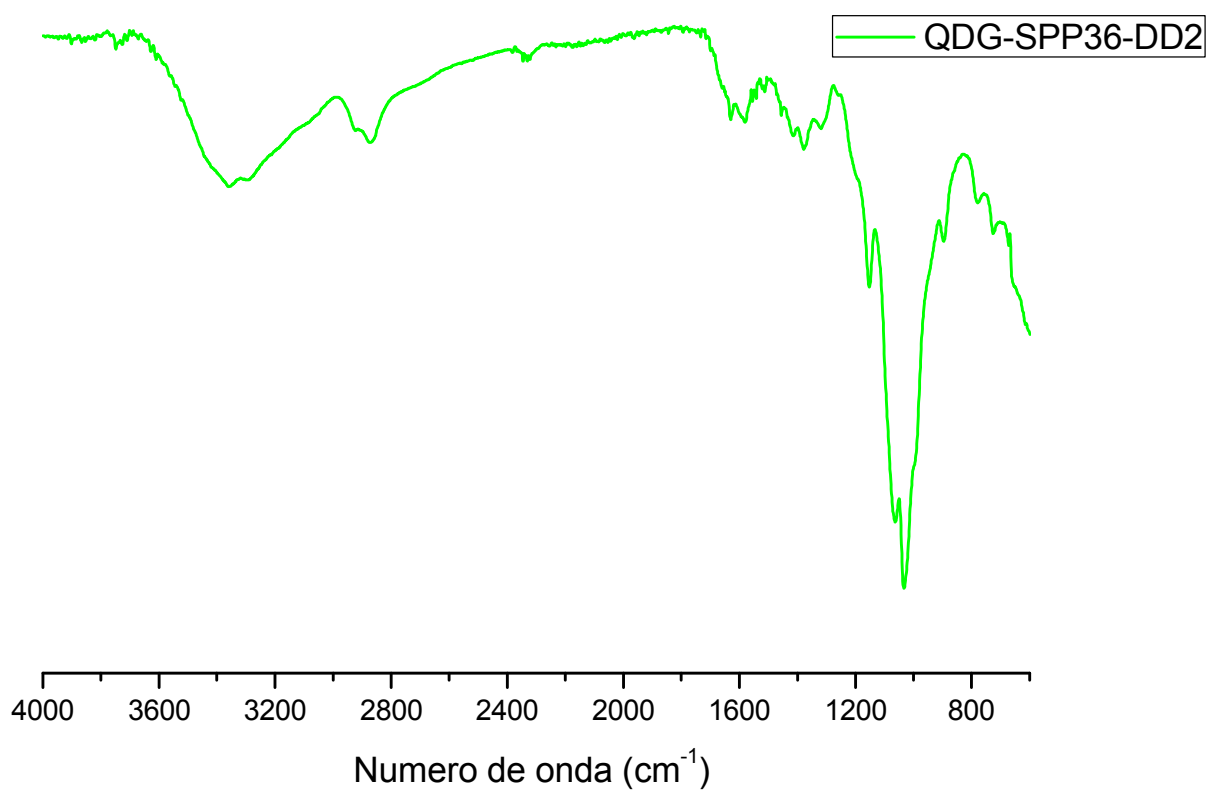
C) Q-SPP46%



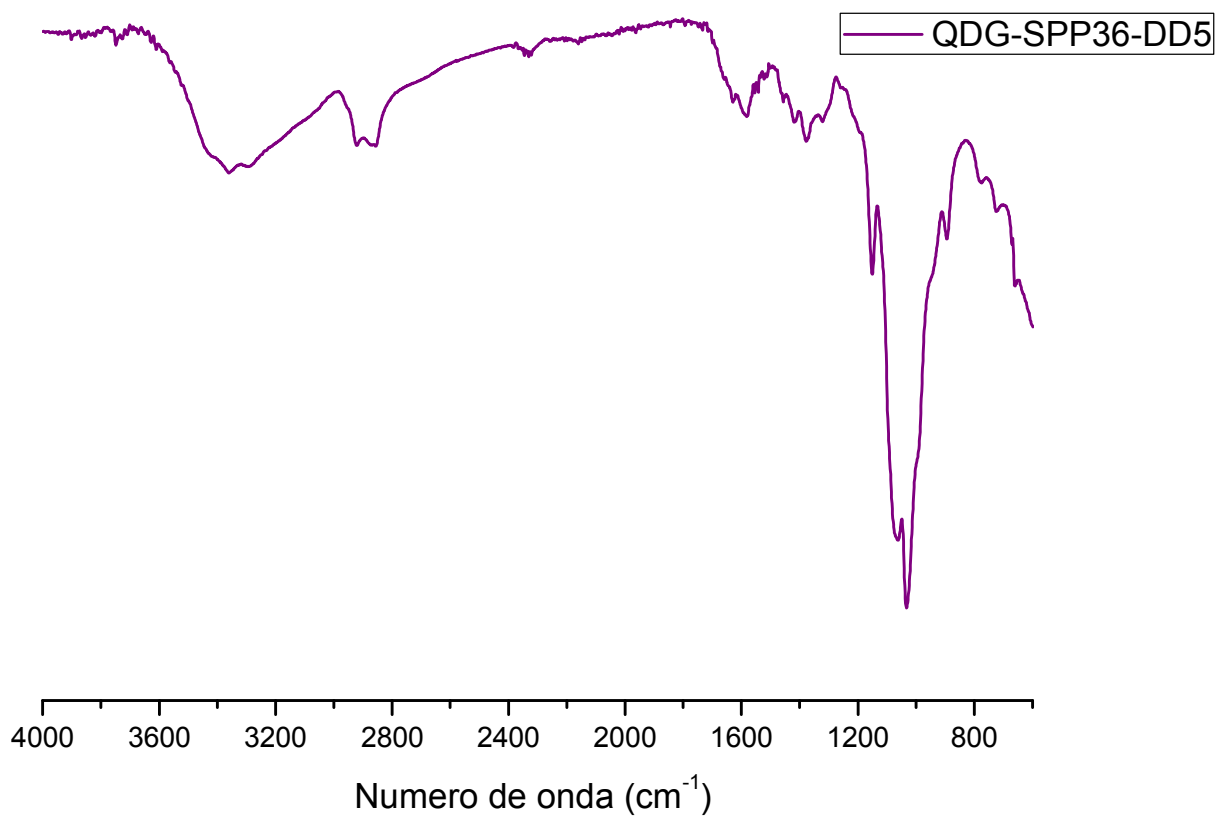
D) Q-DD2%



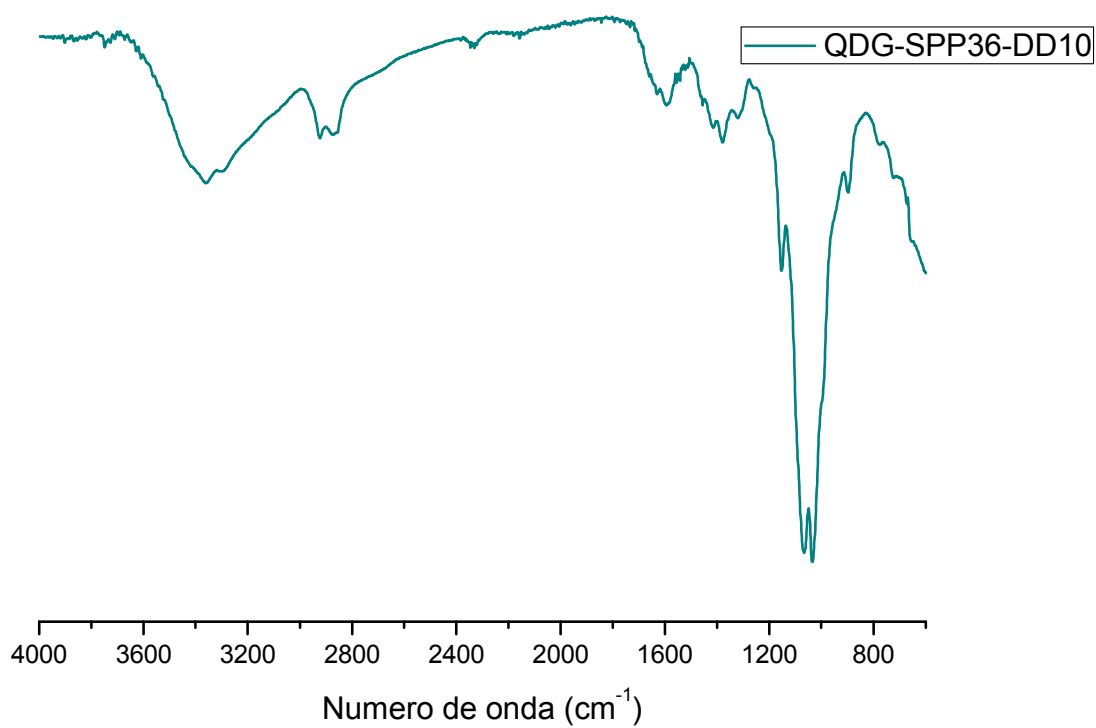
E) Q-SPP46-DD2%



F) QDG-SPP36-DD2%



G) QDG-SPP36-DD5%



G) QDG-SPP36-DD10%