



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

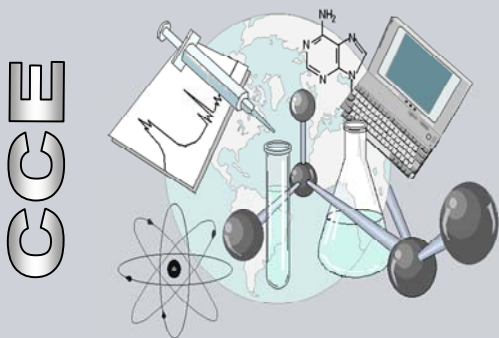
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS
POLIELETRÓLITOS DE QUITOSANA/SULFATO DE
CONDROITINA E ESTUDOS DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA”**

Dissertação apresentada por
Juliana Francis Piai ao Programa de
Pós-Graduação em Química do
Departamento de Química do Centro
de Ciências Exatas da Universidade
Estadual de Maringá como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Química



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, ABRIL/2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA FRANCIS PIAI

***Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de
Quitosana/Sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada***

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Química da
Universidade Estadual de Maringá, como
requisito parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz

MARINGÁ
2008

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

P579p	Piai, Juliana Francis Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de quitosana/sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada / Juliana Francis Piai. - Maringá : [s.n.], 2008. 61 f. : il. color. Orientador : Prof. Dr. Edvani Curti Muniz. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-graduação em Química, 2008. 1. Hidrogel (quitosana e sulfato condroitina) - Preparação. 2. Quitosana e sulfato condroitina - Complexo polieletrólito. 3. Sulfato de condroitina - Liberação (<i>in vitro</i>). 4. Hidrogel (quitosana e sulfato condroitina) - Caracterização. 5. Complexo polieletrólito - Cadeias poliméricas - Reorganização. I. Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-graduação em Química. II. Título. CDD 21.ed.541.2254
-------	---



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Juliana Francis Piai**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 30 de abril de 2008.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
Presidente - UEM-DQI

Prof. Dr. Adley Forti Rubira
Membro - UEM-DQI

Profa. Dra. Nadya Pesce da Silveira
Membro - UFRGS

Dedico este trabalho aos meus pais, Mariusa e Durval, à minha irmã, Grasiela e a todos que de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, amigo de todas as horas, pela oportunidade e por ter me mostrado, mais uma vez, que temos que fazer nossa parte, termos força e fé para que as coisas aconteçam e tenham um bom desfecho.

Aos meus pais, Mariusa e Durval, pela oportunidade, força, carinho e amizade.

À minha irmã, Grasielle, que sempre me apoiou e me deu forças, pela amizade e cumplicidade.

Às minhas “grandes” amigas Silvia e Valquíria que sempre me apoiaram e me ajudaram nas horas em que mais precisei.

A todos os meus amigos que, direta ou indiretamente, me deram força e carinho para continuar a crescer.

Ao Prof. Dr. Edvani Curti Muniz pela atenção, orientação, amizade e apoio.

Aos colegas do bloco 18: Adonilson, Adriana, Alexandre, Alessandro, Allan, André, André Riul, Beto, Elisângela, Guilherme, Josi, Laís, Luciana, Marquinhos, Matheus, Ricardo, Silvia, Thais e Vinícius pela amizade e apoio.

Ao Antônio Frimmel pela realização dos experimentos de DSC durante o transcorrer deste trabalho, pela atenção e apoio.

À Silvia pela realização dos experimentos de MEV durante o transcorrer deste trabalho.

À Rúbia e Prof. Dr. Fernando Galembeck (UNICAMP) pela ajuda no experimento de potencial zeta durante o transcorrer deste trabalho.

Ao Ivan e ao Prof. Dr. Antonio Carlos Saraiva da Costa (DAG – UEM) pelas análises de DRX durante o transcorrer deste trabalho.

Ao Claudemir e à Cristina, da secretaria da pós-graduação, pela prestatividade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para que eu pudesse realizar este trabalho.

RESUMO

Neste trabalho foi possível preparar hidrogéis constituídos de quitosana (QT) e sulfato de condroitina (SC) através da mistura desses polímeros em soluções aquosas ácidas. Foram obtidos hidrogéis de QT/SC nas seguintes razões de massa: 40/60, 50/50 e 60/40. Usando diferentes técnicas, tais como DSC, WAXS, SEM, HPLC e eletroacústica, foi possível verificar que o hidrogel QT/SC 40/60 apresenta sensibilidade ao pH em relação ao grau de intumescimento, propriedades térmicas, morfologia, e liberação de SC. Concomitante ao processo de liberação, foi observada a reorganização das cadeias poliméricas de QT e de SC remanescentes, fato que também depende do pH. Isto torna este hidrogel um material interessante para aplicação tecnológica. Essas propriedades são resultantes da protonação ou desprotonação dos diferentes grupos presentes nas cadeias de QT e de SC bem como do desentrelaçamento das cadeias no processo de liberação de SC. A liberação de SC ocorre mais intensamente em valores de pH próximos ou maiores que o pK_a da QT ($= 6,5$) onde a fração máxima liberada é próxima de 0,5. Com o auxílio de modelos matemáticos específicos para a liberação do SC foi possível concluir que o hidrogel QT/SC 40/60 possui diferentes propriedades, tanto de difusão quanto de partição em diferentes valores de pH. De acordo com os resultados de WAXS, foi mostrado que na faixa de pH de 6 a 12 o hidrogel QT/SC 40/60 apresenta reorganização na sua estrutura tridimensional. Dessa forma, os hidrogéis envolvendo QT e SC apresentam potencial para aplicação em biomateriais como carreadores de SC e de outros fármacos.

Palavras chave: quitosana, sulfato de condroitina, complexo polieletrólito, liberação controlada de SC, reorganização de cadeias poliméricas.

ABSTRACT

In this work the hydrogel constituted of chitosan (CT) and chondroitin sulfate (CT/CS) in (40/60 wt-%) was synthesized by mixing the polymers in acidic aqueous solution. Using several techniques, (DSC, WAXS, SEM, HPLC and zeta potential), it was verified that the hydrogel presents interesting properties such as swelling degree, thermal, morphology, releasing of CS and reorganization of reminiscent CS chains that are dependent of pH. The properties were due to protonation or deprotonation of different groups that participate of complex as well as to the coiling or uncoiling of like or unlike chains concomitant to the releasing of the CS chains. The release of CS occurs mainly at pHs higher than 6.5 (the value of pK_{aCT}) and the maximum fraction of CS released is close to 0.5. With support of mathematical model for the prediction of the profile of *in vitro* CS release from CT/CS networks it was possible to see that this hydrogel respond in pH change and the CS release is more important at higher pH values. Based in the WAXS results, it was pointed out that the complex CT/CS in hydrogel presents reorganization in the 3D matrix mainly at pHs from 6 to 12. These findings imply that the CT/CS hydrogel can be utilized in biomaterials as carrier for specific releasing of CS and other moieties.

Keywords: Chitosan, chondroitin sulfate, polyelectrolyte complex, CS release, polymeric chain reorganization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura das unidades repetitivas da quitosana parcialmente acetilada, $m > n$	14
Figura 2 - Estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina	16
Figura 3 – Estudos de intumescimento de hidrogéis constituídos de QT/SC imersos em diferentes pHs a 37 °C	26
Figura 4 - Cromatogramas obtidos de alíquotas do estudo de liberação após 10 horas de liberação de SC em diferentes pHs, em $\lambda = 210$ nm, com vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$	28
Figura 5 – Curvas analíticas de calibração de área do pico versus concentração de SC (%m/v) em pHs 2, 6 e 8	28
Figura 6 – Esquema das interações físicas existentes entre as cadeias do PEC de QT e SC em diferentes condições de pH	31
Figura 7 – Fração de SC liberada em função do tempo de imersão em soluções de três diferentes pHs a 37 °C	32
Figura 8 - Termogramas de QT e SC e também, do hidrogel seco após ter sido purificado em água destilada e novamente seco e reintumescido por 200 h em água destilada	34
Figura 9 - Termogramas do hidrogel de QT/SC seco após ser reintumescimento por 200 h em água pura e em soluções aquosas de diferentes pHs	35
Figura 10 – Difrátogramas de raios-X dos polissacarídeos puros e do complexo polieletrônico de QT/SC seco após reintumescido por 200 h em água destilada e em diferentes soluções de pH	40
Figura 11 – Micrografias do hidrogel liofilizado após ter sido purificado em água (a) e após ter sido seco e reintumescido em água (b) e em soluções aquosas de pH: pH 2 (c), pH 6 (d), pH 8 (e), pH 10 (f) e pH 12 (g)	44
Figura 12 – Micrografias do hidrogéis de diferentes composições (QT/SC %-m/m): 40/60 (a); 50/50 (b); e 60/40 (c), liofilizados após terem sido purificados em água	46
Figura 13 – Fotos de hidrogel de QT/SC após intumescer por 200 h em solução tampão de pH 1 a 12	47
Figura 14 – Potenciais zeta do complexo polieletrônico de QT/SC (40/60% m/m) em função do pH	48
Figura 15 – Perfis experimentais e teóricos (Eq. 3 e 5) obtidos para a liberação de SC a partir do hidrogel QT/SC a 37 °C em função do tempo em pHs 2, 6 e 8	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planilha utilizada para o preparo de soluções tampão com força iônica constante ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$)	21
Tabela 2 - Dados obtidos a partir das curvas analíticas apresentadas na Fig. 5	29
Tabela 3 – Áreas dos picos obtidos pelo difratograma de Raios-X da Fig. 10	41
Tabela 4 – Valores do expoente difusional (n) e constante (k) obtidas por aplicação do modelo de Ritger-Peppas nos diferentes pHs a 37°C	51
Tabela 5 – Valores do coeficiente de partição (α) e constante cinética de liberação (k_L) para a liberação de SC a partir de hidrogéis de QT/SC em pHs 2, 6 e 8 a 37°C	52

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Sistemas de liberação controlada.....	1
1.2. Liberação específica	2
1.3. Hidrogéis	4
1.4. Complexos polieletrônicos	8
1.4.1. Potencial zeta	11
1.4.2. Quitosana	12
1.4.3. Sulfato de condroitina.....	15
2. OBJETIVO GERAL.....	18
2.1. Objetivos específicos.....	18
3. EXPERIMENTAL.....	19
3.1. Materiais	19
3.2. Procedimentos	19
3.2.1. Preparação dos hidrogéis	19
3.2.2. Preparação das soluções tampão com força iônica constante.....	20
3.2.3. Estudo de intumescimento	20
3.2.4. Ensaio de liberação de SC in vitro a partir de redes do hidrogel QT/SC	21
3.2.5. Caracterizações	22
3.2.5.1. Calorimetria Diferencial de Varredura	22
3.2.5.2. Difração de Raio X	23
3.2.5.3. Microscopia Eletrônica de Varredura.....	23
3.2.5.4. Potencial Zeta	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4.1. Perfil de liberação de SC in vitro a partir de redes do hidrogel QT/SC	27
4.2. Caracterizações dos hidrogéis intumescidos em diferentes valores de pH	33
4.2.1. Análises por DSC.....	33
4.2.2. Análise dos difratogramas de raio-X	38
4.2.3. Análise morfológica.....	42
4.2.4. Medidas de potencial zeta.....	47
4.3. Estudo da cinética de liberação de SC com auxílio de modelos matemáticos	50
5. CONCLUSÕES	57
6. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistemas de liberação controlada

No desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes, uma grande parcela dos estudos é voltada para o modo como as substâncias ativas contidas nos fármacos serão administradas. Nas últimas décadas, sistemas de liberação controlada de fármacos têm sido alvo de muitos estudos, principalmente porque a utilização da maioria dos compostos terapêuticos é sempre limitada pela impossibilidade de aumento excessivo de dosagem (Henrique *et al.*, 2006).

Sistemas de liberação controlada oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas convencionais de administração de fármacos. Nas formas de administração convencionais (*spray*, injeção, pílulas) a concentração da substância ativa (ou freqüentemente chamada de droga, termo proveniente do francês *drogue*) na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada droga possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual é tóxica e abaixo da qual é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático principalmente se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica (Azevedo, 2002). Nesse sentido, os sistemas de liberação controlada possuem dois objetivos principais: manter constante a concentração sanguínea de uma determinada droga, assegurando uma maior biodisponibilidade da mesma, e reduzir os efeitos colaterais, realçando a adesão do paciente ao tratamento com um menor número de dosagens (Mainardes *et. al.*, 2005).

Nos sistemas de liberação controlada o fármaco está ligado ao carreador, que é o responsável por mitigar as limitações dos fármacos convencionais. A natureza e a composição dos carreadores são muito variadas e têm a capacidade de manter a

estrutura original do fármaco sem que haja degradação do mesmo, tornando sua administração segura (sem causar reações inflamatórias locais) e conveniente (menor número de doses) ao paciente. Nesse sentido, desenvolver sistemas capazes de transportar o fármaco até um alvo específico, diminuindo os efeitos indesejáveis resultantes de sua ação em outros locais, despertou grande interesse de muitos pesquisadores (Azevedo, 2002; Henrique *et al.*, 2006).

1.2. Liberação específica

A administração de fármacos por via oral é a mais conveniente e é, geralmente, a mais segura, a que custa menos e, por isso, a mais freqüentemente utilizada. Tem, no entanto, as suas limitações, devido a vários fatores que afetam o modo de absorção do fármaco administrado por via oral. No organismo humano, a maioria das substâncias, tais como nutrientes e fármacos, são absorvidas no intestino delgado para, então, serem levadas para todo o corpo através da corrente sanguínea. Além disso, muitas substâncias degradam quando entram em contato com a condição ácida da região estomacal (pH $\approx$ 2). Assim, não são capazes de chegar à região cólon-intestinal ou para que uma fração do fármaco atinja aquela região são necessárias altas doses dessas substâncias, o que pode ser nocivo ao paciente. Dessa forma, têm sido desenvolvidas medidas para se contornar esse problema. Uma dessas medidas seria a administração da substância via parenteral (injeção) o que inclui as vias subcutânea, intramuscular e endovenosa. Porém, essas vias podem causar dores no local da injeção, riscos de infecção ou reações alérgicas ao paciente e, portanto, algumas rejeições e contra-indicações. Dessa forma, se a administração for via oral, pode-se fazer o uso de carreadores para liberação específica.

Carreadores para liberação cólon-específica precisam possuir a propriedade de proteger a substância ativa em condições ácidas semelhantes às do trato gastroestomacal e, então, começar a liberar a substância na região do cólon e intestino fino, onde o pH é relativamente alcalino (Ganong, 1998). Dessa forma, essa tecnologia proporciona algumas vantagens em relação aos sistemas convencionais de liberação de fármacos. Entre tais vantagens estão a melhora da eficácia e a diminuição da toxicidade, liberação do fármaco no local específico de ação (direcionamento de fármacos), mascaramento do sabor/odor desagradável de alguns fármacos e diminuição do número de doses (Redeschi, 2006).

Muitos sistemas propõem o uso de macromoléculas poliméricas como carreadoras de fármacos. Esses polímeros normalmente possuem em suas cadeias, entre outras características, grupos eletrônicos que respondem a diferentes valores de pH e de força iônica. Para liberação colônica, normalmente são utilizadas cadeias poliméricas que têm a capacidade de se ionizar em condições onde os valores de pH são próximos a 7. Entre esses polímeros, podemos citar o poliácido acrílico (Jabbari e Nozari, 2000), a goma-arábica modificada (Reis *et al.*, 2006) e o amido modificado (Moia *et al.*, 2008). A maioria destes polímeros são polieletrólitos contendo grupos de ácidos fracos, como grupos carboxílicos (-COOH), que se ionizam nas condições de altos valores de pH. Dessa forma, a presença dos grupos carregados aumenta a repulsão entre as cadeias e as moléculas do soluto ficam mais livres proporcionando uma maior liberação (Reis *et al.*, 2006). Neste aspecto, as matrizes tridimensionais (3D) típicas de hidrogéis, constituídas de polímeros com resposta ao pH e força iônica, são materiais com características e requisitos adequados para aplicações como dispositivos para liberação de fármacos (Gupta *et al.*, 2002).

1.3. Hidrogéis

Hidrogéis são cadeias poliméricas hidrofílicas tridimensionais capazes de absorver uma grande quantidade de água ou fluidos biológicos. As cadeias são compostas por homopolímeros ou copolímeros e são insolúveis devido à presença de reticulações químicas (ligações covalentes formando géis não reversíveis) ou reticulações físicas (interações eletrostáticas e/ou ligações de hidrogênio formando géis reversíveis). Nos hidrogéis, as cadeias reticuladas possuem frequentemente compatibilidade termodinâmica com fluidos aquosos e isso permite que intumescam em meio aquoso.

Existem numerosas aplicações para os hidrogéis, em particular nas áreas biomédicas e farmacêuticas (Peppas *et al.*, 2000). Hidrogéis se assemelham aos tecidos vivos naturais mais do que qualquer outra classe de materiais sintéticos. A grande quantidade de água e a sua natureza elástica são os principais parâmetros que tornam os hidrogéis semelhantes aos tecidos naturais. Além disso, a grande quantidade de água nesse tipo de material contribui para sua biocompatibilidade. Dessa forma, hidrogéis podem ser usados como lentes de contato, membranas para biossensores, revestimento para coração artificial, material para pele artificial e dispositivo para liberação de fármacos, entre outros (Peppas *et al.*, 2000).

Hidrogéis têm sido muito utilizados como carreadores de medicamentos devido a suas propriedades de biocompatibilidade e semelhança com os tecidos biológicos (Serra *et al.*, 2006). Hidrogéis podem ser usados no controle cinético de liberação devido a sua estrutura tridimensional. São dispositivos de entrega de droga pertencentes ao grupo de sistemas de intumescimento controlado. Quando as cadeias poliméricas de um hidrogel entram em contato com soluções aquosas, a compatibilidade termodinâmica entre as cadeias do polímero e a água causa o intumescimento. Assim, a

droga presa dentro do hidrogel se dissolve na água presente no interior e se difunde para fora do hidrogel.

Hidrogéis podem apresentar comportamento de intumescimento dependente de ambientes externos. Com base na natureza dos grupos presentes na cadeia polimérica, os hidrogéis podem ser classificados como neutros ou iônicos. Existem polímeros dos quais se produzem hidrogéis fisiologicamente responsivos. Nestes, complexos e interações entre grupos dos polímeros podem ser quebrados e o gel intumesce como resultado de mudanças no ambiente externo. Esses sistemas tendem a apresentar mudanças drásticas em seu grau de intumescimento. Entre os fatores que afetam o intumescimento de hidrogéis fisiologicamente responsivos incluem-se o pH, a força iônica, a temperatura e o grau de reticulação (Peppas *et al.*, 2000).

Polímeros que possuem grupos ionizáveis em soluções aquosas de diferentes valores de pH são chamados de polieletrólitos. Todos os polímeros pH-sensíveis contêm em sua cadeia grupos ácidos (por exemplo ácidos carboxílicos e sulfúricos) e/ou básicos (por exemplo sais de amônia) que aceitam ou liberam prótons em resposta à mudança de pH no ambiente. O poli(ácido acrílico) se torna ionizável em altos valores de pH, enquanto que a quitosana (QT) se torna ionizável em baixos valores de pH.

Diversos grupos de pesquisa têm realizado estudos em hidrogéis de polímeros que contêm grupos ácidos ou básicos fracos na cadeia polimérica. A densidade da carga dos hidrogéis depende do pH e da composição iônica da solução exterior (a solução em que o hidrogel é intumescido). A alteração do pH da solução pode causar o intumescimento ou contração do hidrogel. Os hidrogéis contendo cadeias poliméricas de poliácidos se contrairão em baixos valores de pH, uma vez que os grupos ácidos nesses hidrogéis estarão protonados e, então, não-ionizados (Kost e Langer, 2001). Com o aumento do pH, os grupos estarão mais ionizados ocasionando repulsão entre as cadeias

do poliácido e o hidrogel aumentará seu intumescimento. Os polímeros polibásicos agem de forma oposta, pois a ionização dos grupos básicos aumentará com a diminuição do pH. Assim a liberação de fármacos de hidrogéis feitos de polieletrólitos indicará taxas de liberação dependentes do pH.

Nos hidrogéis de polieletrólitos reticulados há grandes diferenças nas propriedades de intumescimento que dependem do pH do ambiente nos quais estão imersos. A presença de grupos ionizáveis no polímero proporciona resultados no intumescimento dos hidrogéis muito além daquele observado em hidrogéis de polímeros não-eletrólitos. Nas cadeias poliméricas, os grupos ionizados se repelem com outros grupos ionizados de mesma carga. Dessa forma, as cadeias reticuladas dos hidrogéis se expandem devido à repulsão eletrostática entre cargas elétricas de mesmo sinal. Isso proporciona uma maior difusão de água para o interior do hidrogel para que haja a solvatação e estabilização dessas cargas e, conseqüentemente, o aumento na capacidade de intumescimento.

Hidrogéis pH-sensíveis têm sido freqüentemente usados no desenvolvimento de formulações de liberação para administração oral. Como já dito anteriormente, o pH do estômago (< 2) é diferente do pH alcalino do intestino delgado (≈ 8). Tal diferença é grande o bastante para indicar o comportamento pH-dependente de hidrogéis polieletrólitos. Para hidrogéis policationicos, o intumescimento é mínimo em pH neutro, minimizando a liberação da droga. Esta propriedade foi utilizada por Qiu e Park, 2001 para prevenir a liberação de drogas no ambiente neutro ($\text{pH} \cong 7$) da boca. Hidrogéis constituídos de copolímeros de metilmetacrilato e *N,N'*-dimetilaminoetilmetacrilato (DMAEM) carregados com cafeína não liberam esta droga em pH neutro, mas a mesma é liberada facilmente em meios em que o pH possua valores entre 3 e 5, situação em que o DMAEM se ioniza (Qiu e Park, 2001).

Uma limitação intrínseca de polímeros sintéticos pH-responsíveis é a sua não-biodegradabilidade. Por essa razão, os hidrogéis feitos de polímeros não-biodegradáveis devem ser removidos do corpo após o uso. A não-biodegradabilidade não é um problema na aplicação em liberação de fármacos, mas pode se tornar uma limitação para uso desses hidrogéis como agentes de liberação controlada de fármacos ou biosensores implantáveis (Qiu e Park, 2001). Devido a isso, tem sido dada muita atenção ao desenvolvimento de hidrogéis pH-sensíveis biodegradáveis baseados em polipeptídeos, proteínas e polissacarídeos.

Chen *et al.* (2004) desenvolveram um hidrogel pH-sensível composto de (*N,O*-carboximetil quitosana, NOCC), um derivado da quitosana solúvel em água, misturado com alginato e tendo genipin como agente de reticulação. Foram investigadas as características de intumescimento desses hidrogéis em função do pH. Adicionalmente, foi estudado, em meios de simulação gástrica e intestinal, o perfil de liberação de uma proteína modelo (albumina de soro bovino, BSA). Em pH 1,2 o intumescimento do hidrogel NOCC/alginato reticulado com genipin foi reduzido (2,5 vezes sua massa seca) devido a formação de ligações de hidrogênio entre NOCC e alginato. Em pH 7,4, os grupos ácido carboxílicos presentes no hidrogel se tornaram progressivamente ionizados. Neste caso, o hidrogel intumescceu mais significativamente (6,5 vezes sua massa seca) devido à maior força de intumescimento criada pela repulsão eletrostática entre os grupos ácidos ionizados. A quantidade de BSA liberada em pH 1,2 foi relativamente baixa (20 %), enquanto que a liberação em pH 7,4 aumentou significativamente (80 %). Os resultados sugeriram claramente que hidrogel de NOCC/alginato reticulado com genipin pode ser utilizado como carreador polimérico apropriado para liberação de proteínas no intestino (Chen *et al.*, 2004).

Assim, hidrogéis sintetizados a partir de polímeros biodegradáveis possuem maior biocompatibilidade em relação aos hidrogéis sintetizados a partir de polímeros sintéticos. Porém, o uso de catalisadores, agentes de reticulação e iniciadores, podem afetar a biocompatibilidade de alguns desses hidrogéis. Para ultrapassar tal barreira tecnológica, muitos estudos têm sido realizados a partir de hidrogéis reticulados fisicamente. Estes são constituídos de polieletrólitos de cargas opostas que em solução podem formar hidrogéis denominados complexos polieletrônicos.

1.4. Complexos polieletrônicos

Quando dois polímeros com cargas opostas são misturados em meio aquoso a atração eletrostática entre eles pode conduzir à formação de complexos polieletrônicos (PECs). PECs são estruturas formadas por interações físicas entre um polímero que possui grupos que possuem cargas positivas, tais como a quitosana (Denuziere *et al.*, 1996) ou o polietileno imina (Bastardo *et al.*, 2005), e um polímero que possui grupos carregados negativamente, tais como o ácido hialurônico, o sulfato de condroitina (Denuziere *et al.*, 1996) ou o carboximetil Konjac glucomana (Du *et al.*, 2006). A atração eletrostática entre os grupos catônicos com grupos aniônicos de polieletrólitos são as principais interações na formação dos PECs. Elas são mais fortes do que quaisquer outras interações secundárias, tais como ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo (por exemplo, na parte acetilada da quitosana) (Berger *et al.*, 2004).

A formação de PECs pode induzir mudanças conformacionais em polieletrólitos. A estrutura rígida e estéreo-regular da QT, contendo anéis piranose volumosos, por exemplo, é alterada por outros polieletrólitos que possuem estrutura não-rígida, tais como poli(ácido acrílico) ou colágeno (Berger *et al.*, 2004). Porém, as influências que

causam mudanças na estrutura do hidrogel ou do polieletrólito ainda não estão muito bem estabelecidas.

Durante a complexação, os polieletrólitos podem formar aglomerados que seriam, na realidade, partículas sólidas de PEC mais ou menos compactas dispersas no meio em que foram formadas. Se as interações entre os polieletrólitos de cargas opostas forem muito intensas, os PECs podem precipitar (Berger *et al.*, 2004). Denuziere *et al.*, 1996 estudaram complexos constituídos de quitosana / sulfato de condroitina e complexos constituídos de quitosana / ácido hialurônico. Eles realizaram medidas de pH e condutimetria na reação de formação dos complexos e demonstraram a existência de interações eletrostáticas fortes entre os grupos -NH_3^+ da QT e os grupos -OSO_3^- e/ou -COO^- dos dois polissacarídeos estudados. Eles mostraram ainda que, embora os complexos sejam formados em meio ácido, os respectivos hidrogéis apresentaram estabilidade relativa em qualquer valor de pH.

Hidrogéis fisicamente reticulados apresentam muitas vantagens em relação aos hidrogéis que são covalentemente reticulados. Isso ocorre por que a maioria dos agentes de reticulação são relativamente tóxicos ou não são degradados pelo corpo humano, o que diminui a sua biocompatibilidade. Para a formação de PECs, basta a presença dos polímeros com cargas opostas (Berger *et al.*, 2004), ou seja, não são necessárias moléculas auxiliares, tais como catalisadores ou iniciadores. Além disso, a reação de complexação ocorre eficientemente em soluções aquosas. Assim, a possibilidade de aumento da toxicidade associada a agentes de reticulação, moléculas auxiliares e o uso de solventes pode ser eliminada na formação dos complexos polieletrônicos. Dessa forma, PECs possuem um grande número de aplicações como biomateriais. Eles podem ser usados como sistemas de liberação de drogas, cultura de células, imobilização de

enzimas, reconstituição de tecidos e tratamento na cicatrização de feridas (Berger *et al.*, 2004).

Como já visto, polieletrólitos são sensíveis às alterações de pH e força iônica. Devido a isso, PECs também são sensíveis as mudanças de pH e de força iônica de soluções aquosas. Dependendo do meio em que os PECs estão intumescidos, eles exibem alta densidade de carga e diferentes comportamentos de intumescimento. Dessa forma, permitem a difusão de água e/ou moléculas de solutos, tais como fármacos (Ghaffari *et al.*, 2007) e proteínas (Du *et al.*, 2006).

Dai *et al.*, 2007 prepararam complexos polieletrônicos de QT com poli(L- ácido glutâmico). O PEC apresentou sensibilidade a meios de diferentes pHs e isso foi atribuído aos valores de pKa dos grupos carboxílicos do poli(L- ácido glutâmico) e dos grupos aminos da QT e, conseqüentemente, às interações eletrostáticas entre as cadeias. Dependendo do pH da solução em que o PEC está intumescido ele pode apresentar grupos carregados negativamente e/ou positivamente. Nos PECs de QT com poli(L- ácido glutâmico) as cadeias possuem maior número de cargas positivas em condições de pH menores do que o pKa do poli(L- ácido glutâmico) (= 4,4) e maior número de cargas negativas em pH maiores do que o pKa dos grupos amino da QT (= 6,5). Isso ocorre por que em baixos valores de pH os grupos amino da QT ficam na forma protonada ($-\text{NH}_3^+$), enquanto os grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) do poli(L-ácido glutâmico) não são ionizados. Já, em meios cujos pHs possuem valores maiores do que o pKa da QT o número de grupos $-\text{NH}_3^+$ diminui sensivelmente e os grupos carboxílicos ficam na sua forma ionizada ($-\text{COO}^-$). Assim, em valores extremos de pH (baixos ou altos) os PEC constituídos de QT/ poli(L-ácido glutâmico) apresentaram maior razão de equilíbrio de intumescimento devido a repulsão eletrostática entre as cadeias.

Como PECs possuem grupos químicos que podem se tornar carregados nas diferentes condições de pH, a propriedade de variar o intumescimento nestas condições é muito conhecida e tem aplicações importantes (Dai *et al.*, 2007) (Du *et al.*, 2006). Assim, os PECs apresentam maiores graus de intumescimento em valores extremos de pH. Porém, quando o hidrogel é intumescido em meios em que o pH se situa entre os valores de pKa dos grupos predominantes que geram as cargas opostas do PEC, as cadeias tendem a apresentar carga líquida pequena ou nula. Esse tipo de comportamento pode ser quantificado a partir de medidas de potencial zeta.

1.4.1. Potencial zeta

Colóides podem adquirir cargas elétricas superficiais pela ionização de grupos químicos. Esta dissociação produz uma superfície eletricamente carregada. Próximo de uma superfície negativamente carregada há a formação de uma camada de contra-íon (cátions) a fim de manter a eletroneutralidade. Dessa imagem simples, originou-se a designação de dupla camada elétrica. Helmholtz propôs que a carga negativa que se iguala à carga positiva de um metal, por exemplo, está localizada em um plano a distância fixa, δ , da superfície do metal. Já, Gouy e Chapman propuseram que a carga negativa está distribuída de uma maneira difusa dentro da solução. Em soluções diluídas essas propostas, isoladamente, não se mostram totalmente adequadas. Stern propôs uma combinação dos modelos das camadas fixa e difusa. A distância δ há uma camada fixa de carga negativa, proposta por Helmholtz, mas insuficiente para balancear a carga positiva no metal. Assim, após a camada fixa (δ) há uma camada difusa contendo o restante da carga negativa (Castellan, 1986) (Rabockai *et al.*, 1979).

Partículas finamente divididas suspensas em um líquido carregam consigo cargas equivalentes à própria carga mais a carga da porção fixa da dupla camada. A existência da dupla camada tem como consequência efeitos eletrocinéticos. Todos esses efeitos são causados pelo fato de que a dupla camada está apenas ligeiramente ligada à superfície sólida sendo, portanto, móvel. A intensidade de todos os efeitos eletrocinéticos depende da quantidade de carga na parte móvel da dupla camada. Isto cria uma diferença de potencial muito próxima à parede e este fenômeno é conhecido como potencial zeta, ζ . É a diferença de potencial entre a partícula com a sua camada adsorvida na superfície e a solução, ou seja, é o potencial através da linha divisória entre as partes fixa e móvel da dupla camada. A carga da parte móvel da dupla camada depende do potencial ζ e, portanto, deste potencial dependem as intensidades de todos os efeitos eletrocinéticos (Castellan, 1986).

O valor do potencial zeta se reduz, em módulo, a partir da superfície da partícula, e se torna zero onde as concentrações de cargas elétricas opostas são iguais. O potencial zeta aumenta à medida que diminui a distância em relação à superfície da partícula e a sua redução, em dada escala de distância, se consegue pelo ajuste do pH próximo do ponto isoelétrico, onde a carga primária é zero e não conseguindo portanto a dupla camada para produzir esse potencial, podendo ser reduzido também com adição de íons ou colóides de carga oposta ao sistema coloidal (Adamson, 1997).

1.4.2. Quitosana

A quitosana (poli[β -(1-4)-2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose]), QT, é um polissacarídeo obtido a partir de desacetilação parcial da quitina que, por sua vez, é um

polímero natural constituinte do esqueleto de invertebrados. (Kumar *et al.*, 2004) (Fredel *et al.*, 2004).

Devido às suas propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e não-toxicidade, a quitosana é um biopolímero que tem sido utilizado dentro das áreas biomédica e farmacêutica como carreador de medicamento para liberação controlada de fármacos e DNA, em manufatura de lentes de contato, membranas artificiais, pele artificial, aplicações ortopédicas e periodontais. A biodegradabilidade da quitosana se deve ao fato de ser metabolizada por algumas enzimas presentes no corpo humano, especialmente a lisozima. A não toxicidade se deve ao fato da quitosana, administrada oralmente, ser relativamente inofensiva, com LD₅₀ em ratos 16 g.kg⁻¹ (Fredel *et al.*, 2004; Kumar *et al.*, 2004).

A quitosana é insolúvel em água pura, mas é solúvel em água contendo ácidos orgânicos como ácido acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos como ácido clorídrico diluído resultando em soluções viscosas. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados (-NH₃⁺) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação pela água. (Capitani *et al.*, 2001). Na Figura 1 é apresentada a estrutura das unidades repetitivas da quitosana parcialmente acetilada.

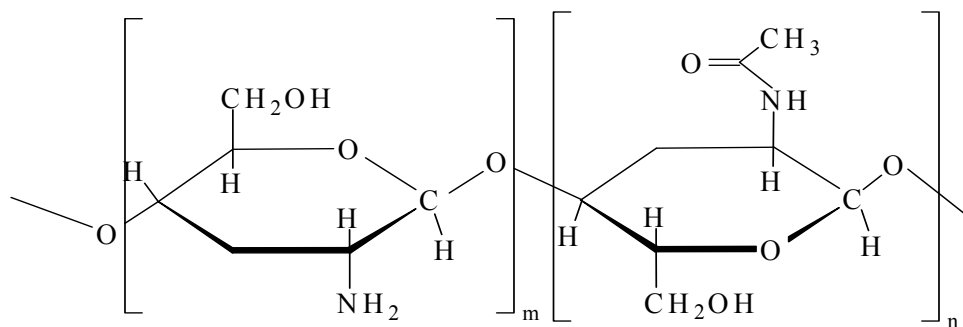


Figura 1 - Estrutura das unidades repetitivas da quitosana parcialmente acetilada, $m > n$

Devido às suas propriedades de natureza catiônica e alta densidade de carga em soluções ácidas, a quitosana pode formar complexos iônicos insolúveis em água com espécies polianiônicas solúveis (Vasiliu *et al.*, 2005).

Atualmente, têm sido publicados trabalhos baseados em complexos de polieletrólitos contendo quitosana como um dos componentes. Nesses trabalhos é obtida uma variedade de complexos por alteração na estrutura da substância química dos polímeros ou nas condições da reação de complexação. Assim, em soluções ácidas a quitosana reage com polissacarídeos tais como: carboximetilcelulose, xantana, alginato, sulfato de condroitina e hialuronano, poli(ácido galacturônico), poli(ácido α -L-glutâmico), bem como com poliânions sintéticos tais como poli(ácido acrílico) para dar PECs (Vasiliu *et al.*, 2005). Além disso, as propriedades de biocompatibilidade conhecidas da QT e sua habilidade para promover cicatrização de feridas são mantidas após a formação do PEC (Berger *et al.*, 2004).

A QT apresenta domínios cristalinos em sua estrutura. A presença desses domínios é confirmada pelo aparecimento, em análises por difração de raio-X em alto ângulo, de picos na região de $2\theta = 11^\circ$ e 20° (Dai *et al.*, 2007). Quando a QT é misturada com poliânions perde seus domínios cristalinos. Isso ocorre por que as interações eletrostáticas entre os polieletrólitos de cargas opostas são mais fortes do que as

ligações de hidrogênio entre as cadeias da QT e a formação do PEC destrói a estrutura cristalina original da mesma (Dai *et al.*, 2007).

Quando QT é reticulada fisicamente com poliânions naturais providos da matriz extracelular da cartilagem, denominados glicosaminoglicanos, é possível a obtenção de substratos para crescimento de células (*scaffolds*). Esses dois polissacarídeos conjugados apresentam sinergismo para a cultura de condrócitos e produção da matriz extracelular da cartilagem (ECM) (Chen *et al.*, 2007). Dessa forma, PECs de QT com substâncias glicosaminoglicanas podem apresentar grande importância para o tratamento de muitas doenças relacionadas à ECM.

1.4.3. Sulfato de condroitina

Existe cerca de 350 milhões de pessoas no mundo que sofrem de algum tipo de artrite. Artrite é um termo genérico para aproximadamente 100 doenças que produzem ou uma inflamação no tecido conjuntivo (particularmente nas articulações), ou uma degeneração não-inflamatória desses tecidos. Onde exista uma cartilagem degenerada, o osso fricciona e provoca a dor (Artrite – saiba mais sobre essa doença, 2002).

O sulfato de condroitina, SC, é uma substância classificada como glicosaminoglicana (GAG) que é extraída da aorta bovina ou suína. Este biopolímero, solúvel em água, é muito importante, pois tem sido usado para combater doenças relacionadas à arterosclerose, trombose, hiperlipidemia e osteoartrites (Johnson e Mokler, 2001) (Richy *et al.*, 2003). No tratamento de doenças, o SC é classificado como uma droga que produz alívio sintomático de ação demorada (*slow-acting symptom relieving drugs* – SASRD) (Zaire *et al.*, 2005). Ele mostra eficácia terapêutica na dose de 800 a

1200 miligramas diariamente, em dose única ou em doses divididas oralmente administradas (Bourgeois *et al.*, 1998).

Além disso, ele é um importante constituinte da matriz extracelular da cartilagem (ECM) e confere desejáveis propriedades mecânicas para a mesma. Em seu papel estrutural, GAGs são pivôs em agrupar complexos de proteína-proteína na superfície das células ou na ECM e, conseqüentemente, estão envolvidos na sinalização ou inibição de eventos celulares por caminhos bioquímicos. Adicionalmente, GAGs extracelulares podem isolar proteínas e apresentá-las nos sítios apropriados para ativação (Raman *et al.*, 2005). Com esta função, as GAGs são capacitadas para influenciar na adesão, migração, proliferação e diferenciação de células (Chen *et al.*, 2006). Na Figura 2 é apresentada a estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina.

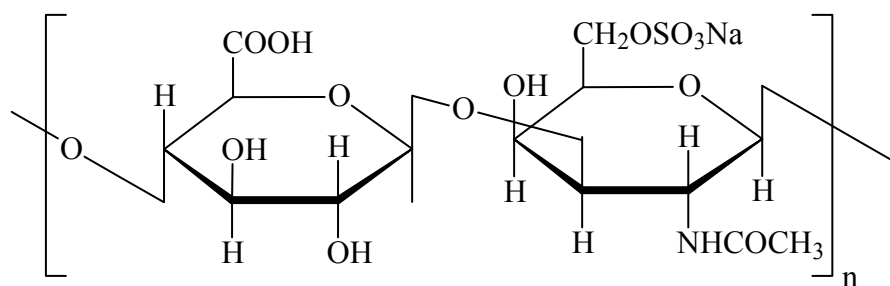


Figura 2 - Estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina

Devido às características da quitosana e do sulfato de condroitina, hidrogéis de complexos envolvendo esses dois polissacarídeos poderão ter potencial para aplicação nas áreas farmacêutica e biomédica. Se hidrogéis envolvendo esses dois polissacarídeos forem sintetizados com excesso de SC, as cadeias poderão se enovelar na formação da suspensão e precipitarem carregando cadeias de SC para posterior liberação. Se a

liberação de SC das redes do complexo polieletrônico QT/SC ocorrer em velocidades compatíveis, os sistemas QT/SC poderão ter potencial para serem aplicados como veículos para liberação controlada de sulfato de condroitina.

2. OBJETIVO GERAL

Sintetizar e caracterizar hidrogéis de quitosana e sulfato de condroitina (QT/SC) e investigar as propriedades em diferentes condições de pH, visando aplicações como biomateriais.

2.1. Objetivos específicos

- i) Desenvolver metodologia para a síntese de hidrogéis de QT/SC;
- ii) Avaliar as propriedades físico-químicas do hidrogel formado, tais como intumescimento, estabilidade térmica, morfologia, potencial zeta, e possíveis modificações na estrutura 3D do hidrogel, em diferentes condições de pH;
- iii) Avaliar a liberação de SC a partir da estrutura 3D do hidrogel QT/SC aplicando modelos matemáticos específicos, visando aplicações do hidrogel de QT/SC como dispositivo para liberação controlada de SC.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Quitosana, 15% acetilada (9012-76-4, Acros Organics) sendo M_V : 380×10^3 g mol⁻¹ obtida pelo método de Mao (Mao *et al*, 2004);

Sulfato de condroitina, (Lote: B5B234 – B.01; Solabia) sendo a M_V : 22×10^3 g mol⁻¹ obtida pelo método de Wastenson (Wasteson, A., 1971);

Ácido clorídrico (HCl) P.A. 37% m/m (Nuclear); cloreto de potássio (KCl) P.A., 99,5% m/m (Dinâmica); fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) P.A., 98% m/m (Nuclear); biftalato de potássio (KHC₆H₄(COO)₂) P.A., 99,95% m/m (Vetec); hidróxido de sódio (NaOH) P.A. 95 – 100% m/m (Nuclear); ácido bórico (H₃BO₃) P. A., 95% m/m (Nuclear) e fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Na₂HPO₄•12H₂O) P. A. 98 % m/m (Nuclear).

3.2. Procedimentos

3.2.1. Preparação dos hidrogéis

Para a síntese dos hidrogéis foram preparadas duas soluções. Em uma delas a QT foi solubilizada em 80 mL de solução aquosa de ácido clorídrico 0,57 mol L⁻¹, a 65 °C e sob agitação, de modo a obter concentração 1,25% (m/v) em QT. A outra solução foi preparada ao dissolver SC em 20 mL de água para obter a concentração de 25% (m/v). A solução de SC foi, então, adicionada à solução de QT, sob agitação, a temperatura ambiente. Neste momento, houve a formação de uma suspensão que foi deixada em repouso por 24 horas para decantação. Com isso, ocorreu a precipitação do complexo polieletrólito entre QT e SC (aqui será denominado complexo QT/SC). O precipitado é o hidrogel QT/SC que foi, então, separado do sobrenadante e purificado

por imersão em 500 mL de água destilada por 24 h. Foi ajustado o pH da água de purificação, a cada uma hora, com solução $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ de NaOH. Depois de purificado, o hidrogel ainda intumescido foi cortado em pedaços em forma de cubos (aresta de cerca de aproximadamente 2 cm) e secos a temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas.

3.2.2. Preparação das soluções tampão com força iônica constante

Para o preparo de 1 L de cada solução tampão 50 mmol L^{-1} foram utilizados os volumes das soluções aquosas listadas na Tabela 1, sendo ajustada a força iônica para $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ por adição de KCl.

3.2.3. Estudo de intumescimento

Para medidas do grau de intumescimento, cubos do hidrogel após serem secos em temperatura ambiente foram pesados e colocados em 25 mL de soluções aquosas de 50 mmol L^{-1} HCl/KCl (pH 2) e de 50 mmol L^{-1} $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$, pHs 6 e 8, com força iônica constante ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl) a 37°C . Os hidrogéis foram pesados em função do tempo até atingir o equilíbrio a 37°C . O grau de intumescimento foi calculado pela equação

$$q = \frac{m_t}{m_0}$$

Equação 1

Sendo m_t a massa do hidrogel intumescido no tempo t e m_0 a massa de hidrogel seco.

Tabela 1 – Planilha utilizada para o preparo de soluções tampão com força iônica constante (0,1 mol L⁻¹)

pH	Soluto	Soluções 0,5 mol L ⁻¹ (mL)	HCl 0,2 mol L ⁻¹ (mL)	NaOH 0,2 mol L ⁻¹ (mL)	adição KCl (g)
1,00	KCl	100	485,0	0	0
2,00	KCl	100	53,0	0	2,94
3,00	KHC ₆ H ₄ (COO) ₂	100	10,16	0	3,65
4,00	KHC ₆ H ₄ (COO) ₂	100	0	2	3,70
5,00	KHC ₆ H ₄ (COO) ₂	100	0	119	1,96
6,00	KH ₂ PO ₄	100	0	29	3,30
7,00	KH ₂ PO ₄	100	0	148	1,52
8,00	KH ₂ PO ₄	100	0	234	3,04
9,00	H ₃ BO ₃ / KCl	100	0	107	2,13
10,00	H ₃ BO ₃ / KCl	100	0	220	0,45
12,00	Na ₂ HPO ₄	100	0	44	0

3.2.4. Ensaios de liberação de SC in vitro a partir de redes do hidrogel QT/SC

Cubos do hidrogel secos foram pesados e colocados em 25 mL de soluções aquosas de 50 mmol L⁻¹ HCl/KCl (pH 2) e de 50 mmol L⁻¹ KH₂PO₄/NaOH, pHs 6 e 8, com força iônica constante (0,1 mol L⁻¹ de KCl) a 37 °C. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante em função do tempo. A liberação de SC do hidrogel foi avaliada utilizando uma Estação de Trabalho Cromatográfico Star com programa para gerenciamento (Varian Inc. Scientific Instruments) constituída de: bomba de pistão reciprocante com quatro vias, modelo 240, injetor automático Varian (AutoSampler ProStar 410), coluna cromatográfica PolySep-GFC-P 6000, 300 x 7,8 mm

(Phenomenex) e detector espectrofotométrico com arranjo de fotodiodos modelo ProStar 350 com programa PolyView. Foram utilizadas soluções aquosas de 50 mmol L⁻¹ HCl/KCl (pH 2) e de 50 mmol L⁻¹ KH₂PO₄/NaOH, pHs 6 e 8, com força iônica constante (0,1 mol L⁻¹ de KCl) como fases móveis. Os sinais dos compostos eluídos foram monitorados em $\lambda = 210$ nm e com vazão 0,5 mL min⁻¹. Neste comprimento de onda há um máximo de absorbância do composto estudado.

Com o tempo de retenção do SC foram construídas as curvas analíticas de área do pico versus concentração de SC (%m/v), em pHs 2, 6 e 8. Para isso, foram preparadas soluções de concentrações conhecidas (0,4 - 0,8% m/v) e então monitoradas em $\lambda = 210$ nm, vazão 0,5 mL min⁻¹ durante 30 min. As análises foram repetidas três vezes e então, a partir das equações de reta para cada valor de pH foram analisadas as quantidades de SC em cada alíquota do estudo de liberação.

Para a análise das quantidades de QT e SC incorporadas nas redes do complexo QT/SC foi coletado o sobrenadante, após a precipitação do complexo QT/SC, e ajustado o pH até aproximadamente 2 com solução NaOH 2,0 mol L⁻¹. Foram coletadas alíquotas da solução sobrenadante, após ajustado o pH, e da solução de purificação do hidrogel. As alíquotas foram avaliadas por meio de análise HPLC, determinando-se, por diferença, a quantidade de QT e SC incorporada a partir da solução de alimentação em que o hidrogel foi sintetizado.

3.2.5. Caracterizações

3.2.5.1. Calorimetria Diferencial de Varredura

Após ter atingido o equilíbrio de intumescimento na respectiva solução tampão, cerca de 200 horas de imersão, o hidrogel foi retirado da solução, triturado e liofilizado.

Pós dos hidrogéis secos após serem intumescidos e também dos polissacarídeos secos puros (QT e SC) foram submetidos a análises calorimétricas. As análises por meio de Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) os ensaios foram realizados em um equipamento SHIMADZU, modelo DSC-50, operando com taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de nitrogênio gasoso de 20 mL min^{-1} , na faixa de temperatura de $22 - 400\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5.2. *Difração de Raio X*

Pós dos hidrogéis liofilizados depois de intumescidos até o equilíbrio (cerca de 200 hs), em soluções de diferentes pHs, triturados e liofilizados foram caracterizados por meio de difração de raio-X de alto ângulo. Foram também realizadas medidas de difração de Raio-X de pós secos dos polissacarídeos puros (QT e SC). As medidas foram conduzidas em um difratômetro XRD-6000 Shimadzu, operando na região de 5° a 70° com resolução $0,02^{\circ}$ e velocidade de $2\theta = 2^{\circ}\text{ min}^{-1}$. A radiação foi gerada em linha de Cu K_{α} a 40,0 kV e 30,0 mA ($\lambda = 0,15418\text{ nm}$). Foi usado um sistema de fenda de 0,300 mm para coleta do feixe de luz difratado com ângulo de divergência de 1° .

3.2.5.3. *Microscopia Eletrônica de Varredura*

Depois de intumescidos no equilíbrio em diferentes pHs, os hidrogéis foram analisados por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um equipamento SHIMADZU, modelo SS-550. Para isso, os hidrogéis intumescidos foram inicialmente imersos em nitrogênio líquido por aproximadamente 10 minutos e, em seguida, liofilizados por 48 h à $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$ (liofilizador Martin Christ, Freeze Dryer, modelo

Alpha 1–2/LD) e fraturados. Antes das análises por MEV foi depositada uma fina camada de ouro sobre a superfície das amostras para torná-las eletricamente condutoras.

3.2.5.4. *Potencial Zeta*

Para medidas de Potencial Zeta os hidrogéis foram sintetizados na forma de micropartículas. Para isso, foram preparadas soluções de QT e SC similares às usadas na síntese do hidrogel 40/60 (% em massa) descritas anteriormente. Foram colocados 80 mL de solução 1,25% (m/v) de QT em um balão de fundo redondo e agitado por um dispersor Extratur (Quimis) com rotação de 12.000 rpm, a temperatura ambiente. Sob essas condições uma solução de SC (volume de 20 mL, 25% m/v) foi vagarosamente gotejada sobre a solução de QT, com fluxo de aproximadamente 4 mL min^{-1} , processo que durou cerca de 6 min. Assim, foi obtido 100 mL de dispersão do complexo QT/SC. A suspensão das partículas foi centrifugada por 10 minutos. As partículas foram separadas do sobrenadante e colocadas em aproximadamente 100 mL de água destilada. A solução contendo as partículas foi deixada em banho de ultrassom por aproximadamente 10 minutos para purificação das mesmas, sendo a solução novamente centrifugada. O processo de purificação e centrifugação foi repetido três vezes. As micropartículas, depois de purificadas, foram imersas em nitrogênio líquido por aproximadamente 5 minutos e então, liofilizadas. Após secas, as micropartículas foram passadas por peneira ABNT Mesh 48 ($300 \mu\text{m}$).

Foi preparada uma solução 5% de micropartículas em solução tampão HCl/KCl (50 mmol/L) pH 1 com força iônica constante ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl). A solução foi deixada, sob agitação, por aproximadamente 1 hora para intumescimento das partículas. As medidas foram realizadas em aparelho Dispersion technology AcoustoPhor ZetaSize

DT 1200. O método utilizado para a determinação de potencial zeta foi o eletroacústico (CVI). O valores de pH foram ajustados com soluções de NaOH 1,0 mol/L. Após ajuste para um pH desejado, a solução foi deixada sob agitação por aproximadamente 10 minutos para atingir equilíbrio e então, foram realizadas cinco determinações de potencial zeta em cada valor de pH a temperatura ambiente.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em uma etapa anterior deste projeto, também desenvolvida em nosso grupo de pesquisas, foi sintetizado hidrogel QT/SC 40/60. Cubos secos desse hidrogel foram submetidos a ensaios de intumescimento os quais demonstraram a existência de um máximo nas curvas de grau de intumescimento em função do tempo de imersão nas soluções de pHs 6 ou 8, como mostrado na Figura 3 (Piai *et al.*, 2004). Este comportamento indica que no início os hidrogéis intumesceram, mas a partir de um determinado tempo de imersão ocorreu perda de massa nos hidrogéis. Em pH 6 a perda de massa é mais rápida do que em pH 8. No entanto, em pH 2 não se verificou a existência desse máximo, o que indica que o fenômeno e sua velocidade e/ou intensidade são dependentes do pH. Esse comportamento pode ser observado nas curvas de intumescimento do hidrogel em função do tempo de imersão em pHs 2, 6 e 8 a 37 °C apresentadas na Figura 3. Assim, surgiu a necessidade de investigar com mais detalhe essa perda de massa.

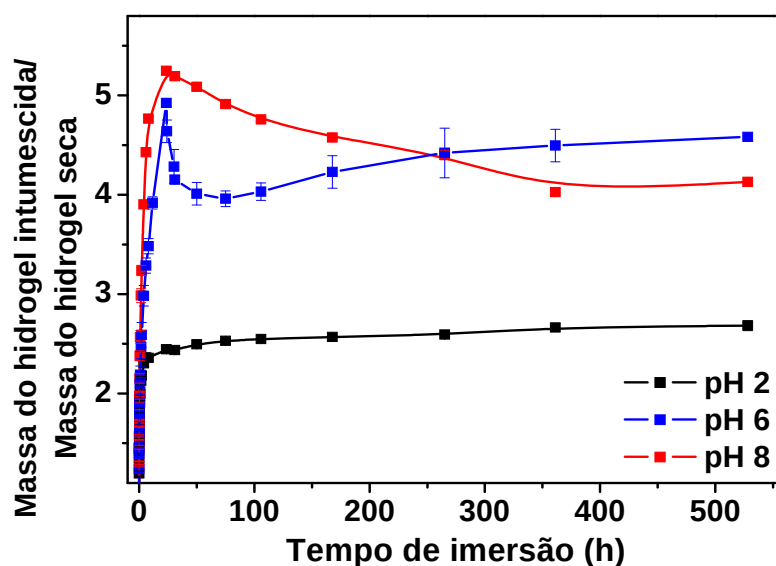


Figura 3 – Estudos de intumescimento de hidrogéis constituídos de QT/SC imersos em diferentes pHs a 37 °C

Hidrogéis que possuem grupos altamente hidrofílicos intumescem quando colocados em contato com soluções aquosas. Há uma expansão da rede tridimensional e as regiões hidratadas adquirem maior mobilidade. Em alguns casos, cadeias poliméricas não reticuladas, portanto solúveis, bem como a água de intumescimento são liberadas do interior do hidrogel para a solução externa em que o hidrogel está em contato. Esse processo é chamado de erosão (Makino *et al.*, 1996). A diminuição da massa do hidrogel observada nas curvas de grau de intumescimento em função do tempo em pH 6 e 8 pode ser atribuída ao influxo de moléculas de água na matriz e efluxo de cadeias de polímero solúveis que ocorrem simultaneamente durante o processo de erosão. Os resultados mostrados na Figura 3 são reprodutíveis, pois foram obtidos em outros experimentos independentes, utilizando novo lote de hidrogéis, os quais foram realizados igualmente nos pHs 2, 6 e 8. Para confirmar a ocorrência do possível processo de erosão e entendê-lo melhor, novos hidrogéis foram submetidos a ensaios de intumescimentos. Nestes, alíquotas do sobrenadante foram coletadas em diferentes tempos e analisadas por meio de HPLC nas condições já descritas.

4.1. Perfil de liberação de SC in vitro a partir de redes do hidrogel QT/SC

Na Figura 4 são apresentados cromatogramas do SC eluído e detectado em $\lambda = 210$ nm em diferentes valores de pHs. Esses cromatogramas são obtidos de alíquotas do estudo de liberação de SC em pHs 2, 6 e 8 após 10 horas de liberação (Fig. 7). É possível perceber que com a vazão de $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, o tempo de retenção obtido para o SC em diferentes valores de pHs foi próximo de 19 min. Foi possível observar a presença de dois picos sobrepostos referente ao SC solubilizado em pH 6. Isso ocorre, possivelmente, devido a interações que entre as cadeias de SC neste valor de pH.

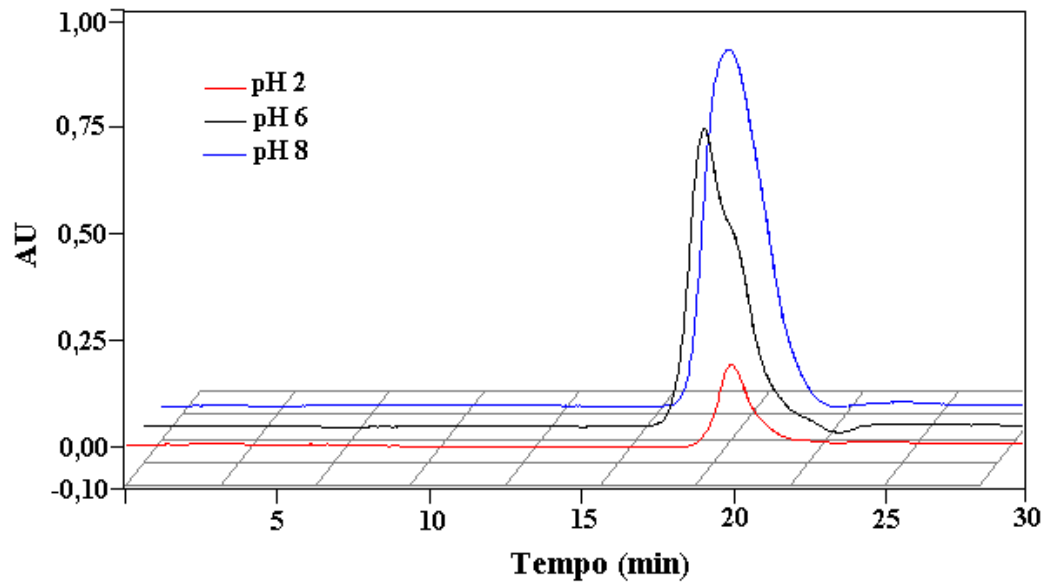


Figura 4 - Cromatogramas obtidos de alíquotas do estudo de liberação após 10 horas de liberação de SC em diferentes pHs, em $\lambda = 210 \text{ nm}$, com vazão $0,5 \text{ mL min}^{-1}$

Com o tempo de retenção do SC foram construídas as curvas analíticas de área do pico versus concentração de SC (% m/v), em pHs 2, 6 e 8, apresentadas na Fig. 5. Foi possível obter, a partir das curvas analíticas, as equações de reta para o SC em cada valor de pH. Esses dados são apresentados na Tabela 2.

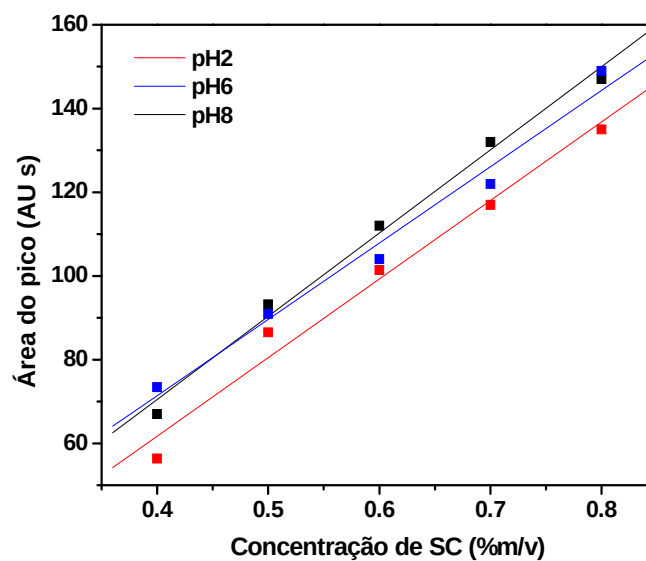


Figura 5 – Curvas analíticas de calibração de área do pico versus concentração de SC (%m/v) em pHs 2, 6 e 8

Tabela 2 - Dados obtidos a partir das curvas analíticas apresentadas na Fig. 5

pH da solução aquosa	Equação de reta	R ²
2	$Y = -132414 + 471265 X$	0,989
6	$Y = -1520 + 182300 X$	0,991
8	$Y = -9040 + 198800 X$	0,995

Das análises feitas por meio de HPLC usando a solução do sobrenadante, resultante da obtenção do hidrogel e a solução de purificação do hidrogel, foi constatado que houve um decréscimo na concentração de SC em relação à concentração de alimentação da qual foi sintetizado o hidrogel. Por outro lado, não foi observado no cromatograma, pico referente à QT, o que demonstra ser a mesma reagente limitante na síntese do complexo polieletrônico QT/SC nessas condições. Assim, chegou-se a conclusão que o hidrogel sintetizado utilizando o procedimento descrito anteriormente é constituído de 40 % de QT e 60 % de SC, em massa.

Na Figura 7 são apresentados os perfis de liberação de SC dos hidrogéis imersos nas soluções de pH 2, 6 e 8. Há de se reforçar que os hidrogéis foram purificados e secos antes de serem adicionados às respectivas soluções tampão para os estudos de liberação. A amostra que foi adicionada e intumescida em solução aquosa de pH 2 apresentou menor taxa inicial de liberação de SC quando comparada com as intumescidas em soluções aquosas de pHs 6 e 8, assim como uma menor quantidade de SC liberado. Em meio ácido (pH 2) há a protonação dos grupos amino da quitosana, isto é, há a ocorrência da reação: $-NH_2 + H^+ \rightleftharpoons -NH_3^+$ (Fig. 6). A presença de grupos positivamente carregados ocasiona a repulsão entre as cadeias de quitosana e a

solvatação da mesma. Isso deveria permitir uma maior expansão do hidrogel. No entanto, nesta condição, o SC aprisionado no hidrogel não é facilmente liberado. Isso pode ser atribuído ao equilíbrio de ionização dos grupos hidrogenossulfato ($-\text{OSO}_3\text{H} \rightleftharpoons -\text{OSO}_3^- + \text{H}^+$) uma vez que o pKa do mesmo é 2,6 (Larsson *et al.*, 1981). Dessa forma, em pH 2 há a presença de interações eletrostáticas entre grupos sulfato do SC e grupos $-\text{NH}_3^+$ da QT além de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas. Em pH = 8, os grupos amino permanecem em sua forma neutra pois o pH é maior que o valor do pKa da QT (= 6,5) (Strand *et al.*, 2001), enquanto que os grupos hidrogenossulfato ($-\text{OSO}_3\text{H}$) e carboxílico ($-\text{COOH}$) do SC, com pKas 2,6 e 4,57 (Larsson *et al.*, 1981), respectivamente, tornam-se desprotonados e negativamente carregados (Fig. 6). Devido à maior quantidade de SC no hidrogel (60 % em massa) e ao maior número de grupos negativamente ionizados, há uma significativa repulsão entre as cargas negativas, o que possibilita maior intumescimento e aumento da taxa inicial de liberação de SC. Dessa forma, em maiores valores de pH, a quantidade de SC liberada a partir do hidrogel torna-se maior do que a observada em pH 2.

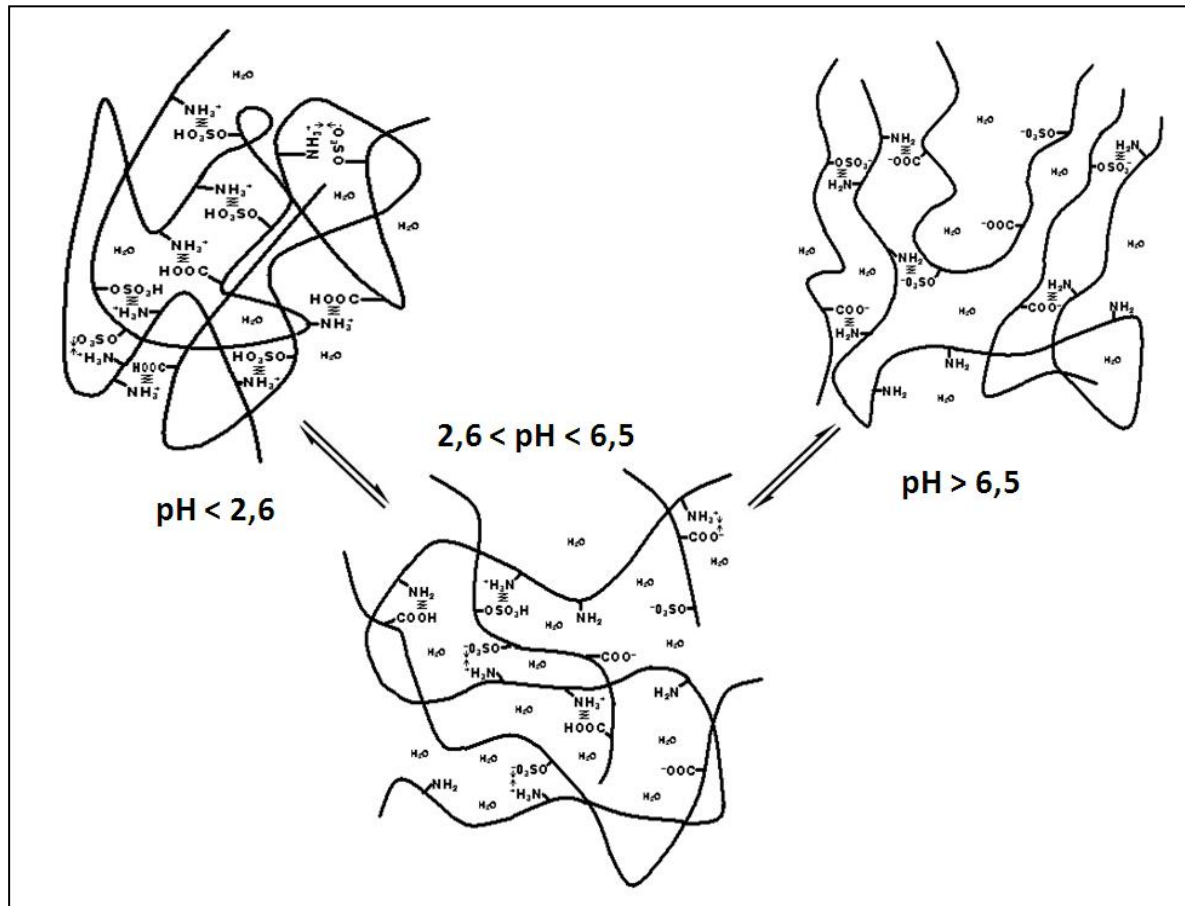


Figura 6 – Esquema das interações físicas existentes entre as cadeias do PEC de QT e SC em diferentes condições de pH

Du *et al.* (2006), mostraram que o ponto isoelétrico do complexo QT/carboximetil Konjac glucomanana ocorre entre pHs 4,5 e 6,5, que correspondem aos pKas dos polissacarídeos puros, respectivamente. Por meio de medidas de potencial zeta em soluções de QT e carboximetil Konjac glucomanana, separadamente, eles mostraram que o ponto isoelétrico ocorre onde as duas curvas de potencial zeta versus pH se cruzam ($pI = 5,8$). Assim, nessas condições as cargas de $-NH_3^+$ e $-COO^-$ tendem a ser equivalentes. A partir do ponto de vista eletrostático, eles mostraram que a atração entre os polissacarídeos neste ponto tende a ser máxima. Dessa forma, em pHs acima de

6,5 as interações entre os grupos -NH_2 e -COO^- tornam-se mais fracas do que as interações existentes no ponto isoelétrico do complexo (Du *et al.*, 2006).

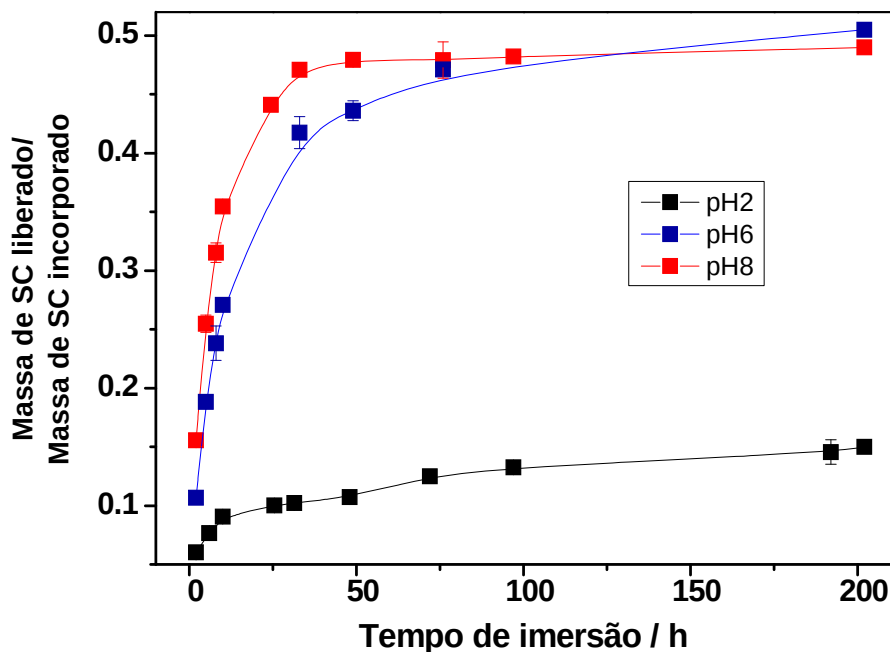


Figura 7 – Fração de SC liberada em função do tempo de imersão em soluções de três diferentes pHs a 37 °C

Em pHs menores do que 4,5, valor de pH que corresponde ao pKa do grupo carboxílico do complexo polieletrônico, há a formação de grupos -NH_3^+ na QT e -COOH no carboximetil Konjac glucomanana, ou mesmo no SC, que também interagem menos fortemente do que no ponto isoelétrico. Porém, o hidrogel estudado neste trabalho contém, além dos grupos carboxílico, grupos hidrogenossulfato o que poderia abaixar o valor do ponto isoelétrico do mesmo. Em solução de pH 2 os grupos hidrogenossulfato e carboxílico poderiam interagir fortemente com os grupos amino protonados da QT (-NH_3^+), uma vez que pode haver um maior número de ligações de hidrogênio entre eles (Du *et al.*, 2006). Com isso, em valores de pH maiores que o pKa da QT, o hidrogel pode apresentar menor atração eletrostática entre as cadeias de QT e

SC deixando as cadeias de SC mais livres. Isso permitiria uma maior difusão do SC do hidrogel para a solução. Isso será discutido mais detalhadamente nas próximas seções.

4.2. Caracterizações dos hidrogéis intumescidos em diferentes valores de pH

4.2.1. Análises por DSC

Na Figura 8 são apresentados os termogramas do hidrogel seco após ter sido purificado em água destilada (curva em azul) e novamente seco e reintumescido em água destilada (curva em alaranjado). Para comparação, também são apresentados na Figura 8 os termogramas de QT (em cor rósea) e de SC (em preto) puros. Através das análises de DSC foi verificada uma significativa variação na intensidade e na forma do pico que aparece em cerca de 250 °C no termograma do hidrogel de QT com SC em meio aquoso em relação ao apresentado no termograma do SC (246 °C). Esse efeito foi atribuído às interações entre os grupos amino da QT e os grupos carboxílico e sulfato do SC. De acordo com Du *et al.* (2006), as interações entre os grupos dos dois polissacarídeos poderiam romper a estrutura cristalina individual de ambos pela perda de ligações de hidrogênio. Sendo os picos que aparecem em 246 °C no termograma de SC e em 315 °C no termograma da QT atribuídos à degradação dos polissacarídeos puros (dado TGA não apresentado), é possível afirmar que a interação entre os dois polissacarídeos diminui a estabilidade térmica dos mesmos. É possível observar que não há deslocamento dos picos em 221 °C e em 250 °C nos termogramas do hidrogel purificado em água destilada e reintumescido em água (curva alaranjado) em relação ao não reintumescido (curva em azul). Isso demonstra que não há variação na estabilidade térmica do hidrogel no processo de reintumescimento em água pura. Porém, quando cubos do hidrogel são colocados em soluções de diferentes pHs (Figura 9) o hidrogel

apresenta deslocamentos significativos na forma, na intensidade e na temperatura em que ocorrem diversos picos nos termogramas dos hidrogéis de QT/SC.

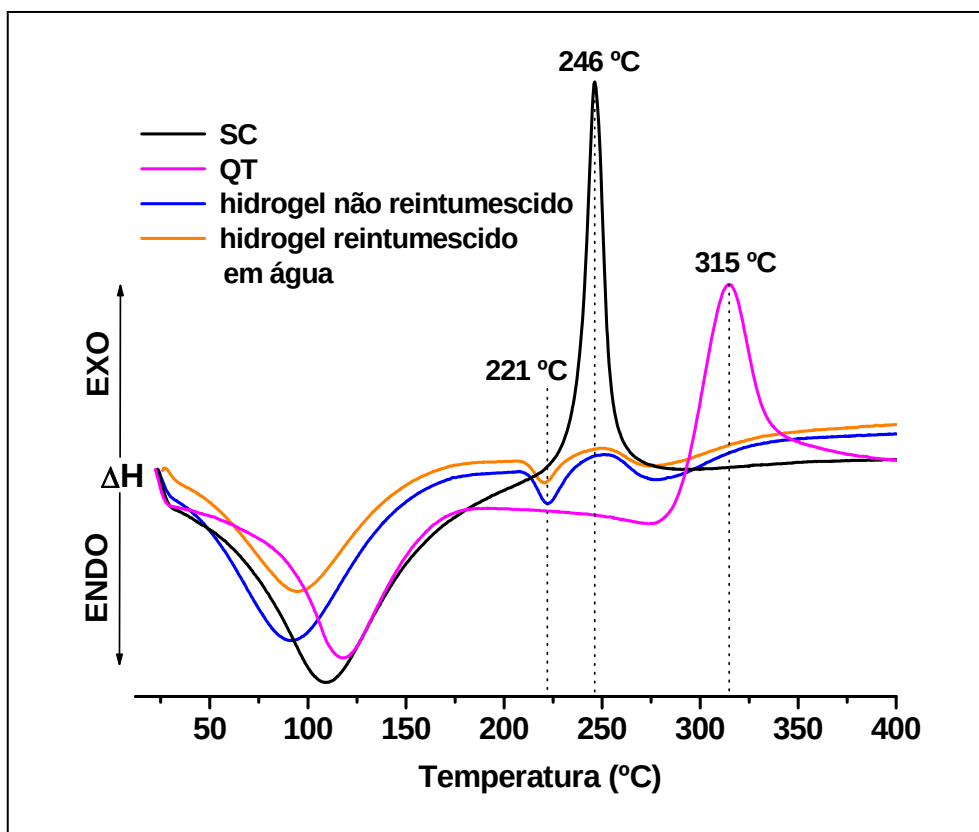


Figura 8 - Termogramas de QT e SC e também, do hidrogel seco após ter sido purificado em água destilada e novamente seco e reintumescido por 200 h em água destilada

É possível observar que em maiores valores de pH o pico observado no termograma do hidrogel desloca-se de 250 °C para 261 °C. Em pHs 6 a 12 os grupos NH_3^+ estão desprotonados permanecendo na sua forma neutra ($-\text{NH}_2$). Com a QT desprotonada, a atração eletrostática de seus grupos amino com os grupos carboxílico do SC é efetivamente diminuída, ficando as cadeias de QT mais livres e suas

propriedades térmicas passam a se assemelhar às da QT pura. Há de se enfatizar que na QT pura este pico aparece em 315 °C (veja Figura 8).

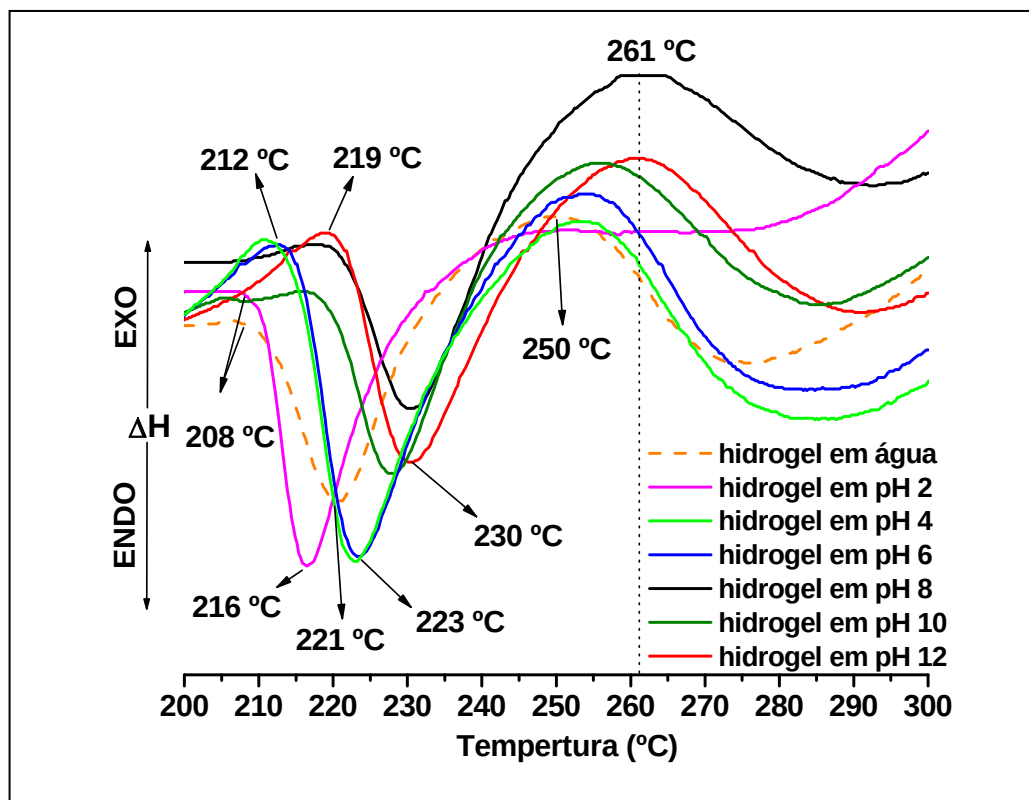


Figura 9 - Termogramas do hidrogel de QT/SC seco após ser reintumescimento por 200 h em água pura e em soluções aquosas de diferentes pHs

Ainda, na Figura 9 o pico endotérmico que aparece em aproximadamente 230 °C no hidrogel seco após ter sido intumescido em soluções com altos valores de pH desloca-se para temperaturas menores com o abaixamento do pH da solução de intumescimento (pHs 6, 4 e 2) e suas intensidades são aumentadas. Em pH 4 e 6 o pico endotérmico ocorre em 223 °C e em pH 2 ocorre na temperatura de 216 °C. Em água destilada-deionizada, que tem pH próximo de 7, o pico ocorre em temperatura levemente superior, de 221 °C. Nas soluções-tampão a força iônica foi mantida constante em 0,1 mol L⁻¹ de KCl. Se o complexo polieletrônico QT/SC for considerado

como similar ao que ocorre em uma proteína, devido à presença de grupos amino ($-NH_2$), carboxílico ($-COOH$) e hidrogenossulfato ($-OSO_3H$), o hidrogel poderá possuir propriedades que são associadas a diferentes tipos de estruturas tridimensionais, como ocorre em proteínas. Alguns trabalhos (Mothé *et al.*, 2005 e Relkin *et al.*, 1994) mostram que a desnaturação de uma proteína pode ser estudada por análises térmicas. Dessa forma, Mothé *et al.* (2005) atribuíram a presença de um pico endotérmico, em termogramas obtidos por DSC, à desestabilização de interações físicas, tais como ligações de hidrogênio, interações eletrostática e dipolo-dipolo em proteínas que causam a desnaturação. Com isso, é possível inferir que a diminuição na intensidade do pico endotérmico em altos valores de pH pode estar relacionada à desestabilização prévia do complexo QT/SC. Em outras palavras, é possível afirmar que a estrutura tridimensional do hidrogel intumescido em altos valores de pH se torna menos enovelada antes mesmo do início da execução dos ensaios de análise térmica. Tal fenômeno está relacionado com a liberação de SC. Com a desestabilização de interações físicas do complexo nestes pHs há maior expansão das cadeias o que conduz à maior mobilidade do SC na matriz polimérica e, portanto, a sua liberação.

Há também o deslocamento desses picos endotérmicos em relação ao pH, ou seja, conforme há o aumento do pH, maior é a temperatura ao qual há a perda da estrutura tridimensional. Pode ser inferido que, dependendo do pH, as interações entre os grupos da QT e do SC são mais intensas o que se reflete nas suas estabilidades térmicas. Isso pode ser explicado pelo enovelamento das cadeias. O evento endotérmico que ocorre em 221 °C no termograma do hidrogel intumescido em água pura (Figura 8) desloca-se para temperaturas maiores e, ao mesmo tempo, passa a ter menor intensidade se o hidrogel é intumescido em soluções de pH 8-12. Isto indica que após a liberação de parte do SC há, possivelmente, reordenamento das cadeias remanescentes de SC

complexadas às cadeias de QT. Tal reordenamento, em estado sólido, poderia ser associado à maior termo-estabilidade do complexo o que explicaria o deslocamento do pico endotérmico para temperaturas maiores. Com a liberação de parte do SC no hidrogel intumescido em um determinado pH acima do pKa da QT e havendo possibilidade de repulsão entre os grupos sulfato e carboxilato do SC remanescente, segmentos das cadeias de QT, apesar de não protonados, poderiam estabilizar tais repulsões o que justificaria o re-ordenamento das cadeias no hidrogel (Fig. 6). Assim, a intensidade do evento endotérmico diminuiria com o aumento da fração de SC liberado, porém, necessitaria de uma maior energia para tal ordenamento, pois as cadeias de SC embora presentes em quantidades menores em relação ao hidrogel em pH 2, 4 e 6, estariam mais ordenadas nos pHs 8-12. Nos termogramas dos hidrogéis intumescidos em soluções de diferentes pHs há o aparecimento de um pico exotérmico que se desloca de 212 °C (pH 4 e 6) para 219 °C (pH 8 e 12). O aparecimento destes picos pode estar relacionado à instabilidade do hidrogel nas condições de pH ($2 < \text{pH} < 6$), pois o hidrogel passa de um estado totalmente enovelado e sem ordem para um estado mais ordenado. Dados de raios X, que serão apresentados na sequência, mostram ausência de sinais de ordem quando o hidrogel é seco após ter sido intumescido em pH 2 e em água pura. No termograma do SC puro o pico exotérmico com grande intensidade ocorre em 246 °C (Fig. 8). Dessa forma, a presença do pico exotérmico pode mostrar que o hidrogel fica com propriedades mais próximas do SC puro nestas condições, uma vez que com o aumento do pH parte das cadeias de SC estariam mais livres o que facilita a liberação de SC para a solução.

4.2.2. Análise dos difratogramas de raio-X

Na técnica de espalhamento de raio-X em alto ângulo (WAXS, Wide Angle X-ray Scattering) mede-se a intensidade de espalhamento de um feixe de elétrons, originário de uma determinada fonte e incidente sobre a amostra, como função do ângulo espalhado (Kofinas e Cohen, 1997). O ângulo θ em que o feixe é espalhado fornece a conexão para escalas de distâncias periódicas no material, indicando arranjos ordenados em materiais ou da cadeia polimérica dos quais podem ser calculados parâmetros importantes dentre os quais a cristalinidade e distância entre ligações. Essa conexão é dada pela lei de difração de Bragg (Callister, 2002)

$$\lambda = 2 d \sin (\theta) \quad \text{Equação 2}$$

onde λ é o comprimento de onda da radiação [0,154 nm para raios-X provenientes da fonte ($\text{Cu}_{\text{K}\alpha}$)], e d é a distância predominante entre os planos que espalham a luz em um ângulo θ .

Na Figura 10 são apresentados os difratogramas dos polissacarídeos puros (QT e SC) e do hidrogel de QT/SC, onde se tem a formação do complexo polieletrônico, depois de seco a temperatura ambiente e reintumescido em água destilada (curva em verde) e em soluções tampão de diferentes valores de pH (2, 6, 8, 10 e 12), por 200 h, e depois, triturados e liofilizados. Pode ser observado que no difratograma obtido da QT aparecem dois picos de difração, em $2\theta = 11,8^\circ$ e $20,2^\circ$, que confirmam a existência de domínios cristalinos na estrutura da QT. No difratograma do SC observa-se um sinal de intensidade fraca, porém alargado com um máximo na região de $2\theta = 22,2^\circ$, que foi atribuído à baixa cristalinidade do SC. Já no difratograma do complexo polieletrônico é

mostrado que a interação entre os dois polissacarídeos altera o perfil de cristalinidade em relação aos componentes puros. As alterações são fortemente dependentes do pH da solução onde o hidrogel foi intumescido. Por exemplo, nos difratogramas dos hidrogéis não é observado com clareza o pico em $2\theta = 11,8^\circ$ e tampouco o pico em $2\theta = 20,2^\circ$, ambos atribuídos à QT. Por outro lado, observa-se nos difratogramas dos hidrogéis o pico em $2\theta = 22,2^\circ$ relativo ao SC, principalmente nos obtidos dos hidrogéis intumescidos em pHs 8, 10 e 12. A interação entre os dois polissacarídeos pode romper as estruturas cristalinas da QT por meio da desestabilização de ligações de hidrogênio entre segmentos de cadeias da QT para a formação de ligações iônicas dos grupos carboxílico (-COOH) e hidrogenossulfato (-OSO₃H) do SC com os grupos amino (-NH₂) da QT. Picos de difração na região de $2\theta = 43,9^\circ$ e $64,3^\circ$ bastante intensos são observados nos difratogramas do hidrogel após ser intumescido em soluções tampão de pH 6, 8, 10 e 12, os quais não são observados no termograma obtido do hidrogel intumescido em água pura ou em solução tampão pH 2. Isso demonstra que, se intumescido em soluções de pH próximo ou acima do pKa da QT, há um maior ordenamento das cadeias poliméricas no interior do hidrogel, ou seja, nessas condições as cadeias dos polímeros (QT e SC remanescente) se organizam de forma diferenciada após 200h de imersão. Desta forma, infere-se que no hidrogel intumescido em pHs entre 6 e 12 parte das cadeias poliméricas está no estado ordenado. Assim, o hidrogel de QT/SC seco será semicristalino se foi previamente intumescido em solução com pHs entre 6 e 12.

Este resultado se alinha com a inferência feita a partir da análise dos termogramas da Figura 9. Ou seja, em pHs entre 6 e 12 as cadeias de SC remanescentes se rearranjam junto às cadeias de QT e assim formam partes cristalinas na estrutura do hidrogel. Aplicando a lei de Bragg (Eq. 2) foi possível calcular as distâncias periódicas

nos hidrogéis intumescidos em pH 6 – 12, cujos difratogramas são apresentados na Figura 10. Os valores para as distâncias periódicas são 2,06 Å para $2\theta = 43,9^\circ$ e 1,45 Å para $2\theta = 64,3^\circ$ mostrando que no hidrogel seco após ter sido intumescido em pHs de 6 a 12 formam estruturas cristalinas com distâncias periódicas distintas.

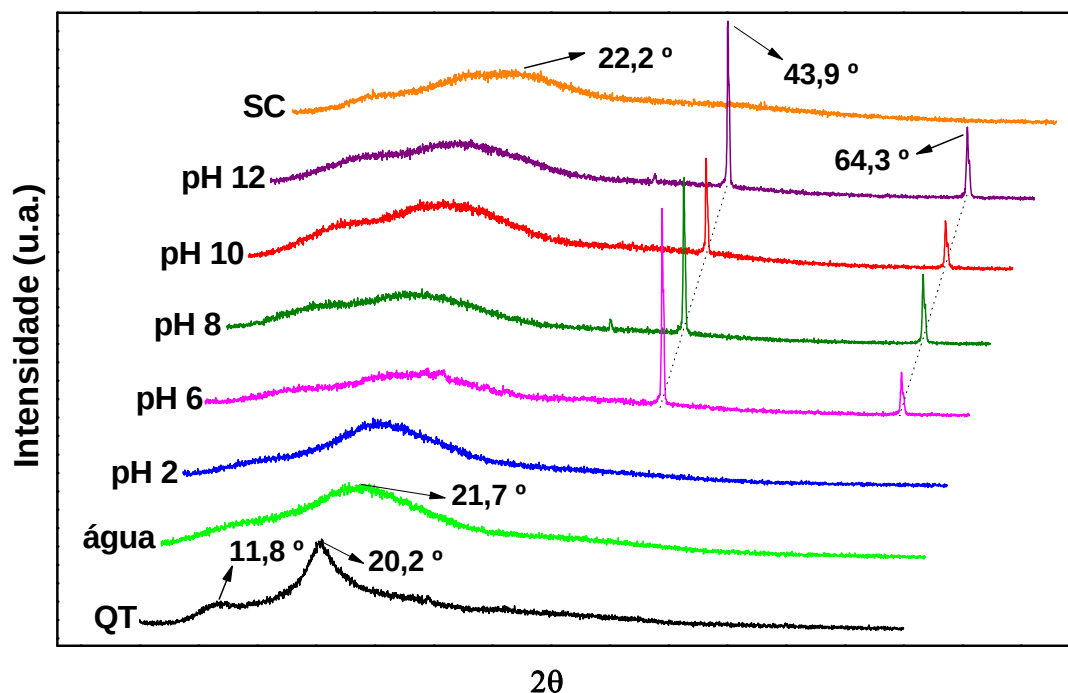


Figura 10 – Difratogramas de raios-X dos polissacarídeos puros e do complexo polieletrônico de QT/SC seco após reintumescido por 200 h em água destilada e em diferentes soluções de pH

Foi possível realizar o cálculo das áreas dos picos bem como a razão entre as elas. Os valores dessas áreas são apresentados na Tabela 3:

Tabela 3 – Áreas dos picos obtidos pelo difratograma de Raios-X da Fig. 10

Solução na qual o hidrogel é intumescido	Áreas dos picos		Área pico em 64,3 ° / área pico em 43,9 °
	2θ = 43,9 °	2θ = 64,3 °	
pH 6	511,88	134,68	0,263
pH 8	408,92	225,16	0,551
pH 10	245,92	150,84	0,613
pH 12	426,84	233,38	0,547

Com os valores da razão da área do pico em $2\theta = 64,3^\circ$ pela área do pico em $2\theta = 43,9^\circ$, apresentados na Tabela 3, foi possível perceber que a razão das áreas ($64,3^\circ / 43,9^\circ$) aumenta na ordem que o pH da solução na qual esteve imerso o hidrogel aumenta. Isto indica que no hidrogel de QT/SC seco após ser intumescido em pH 6 por 200 h há prevalência da estrutura cristalina que possui distância 2,06 Å em relação aquela cuja distância periódica é 1,45 Å. Porém, quando o pH é aumentado para 8, 10 ou 12, a razão das áreas é aumentada mostrando que as cadeias remanescentes no hidrogel se reorganizam para formar estruturas com maior distância periódica em pH 6 e em pHs maiores as estruturas com menor distância periódica (1,45 Å) estariam, relativamente, em maior quantidade. Isso ocorre porque no pH 6 as cadeias de QT ainda estão parcialmente protonadas e, devido a interações eletrostáticas, ficam parcialmente enoveladas. Acima do valor do pH equivalente ao pKa da QT (= 6,5), a repulsão eletrostática entre as cadeias de SC, devido aos grupos aniônicos, é maior pois não mais existirão grupos NH_3^+ para estabilizá-los. Nestas condições, as cargas negativas seriam estabilizadas por ligações de hidrogênio dos grupos amino da QT. Dessa forma, as cadeias remanescentes de SC se organizam e, para determinado valor de pH, entram em

equilíbrio e, após o equilíbrio, não ocorre liberação nem mudanças significativas na estrutura do complexo formado.

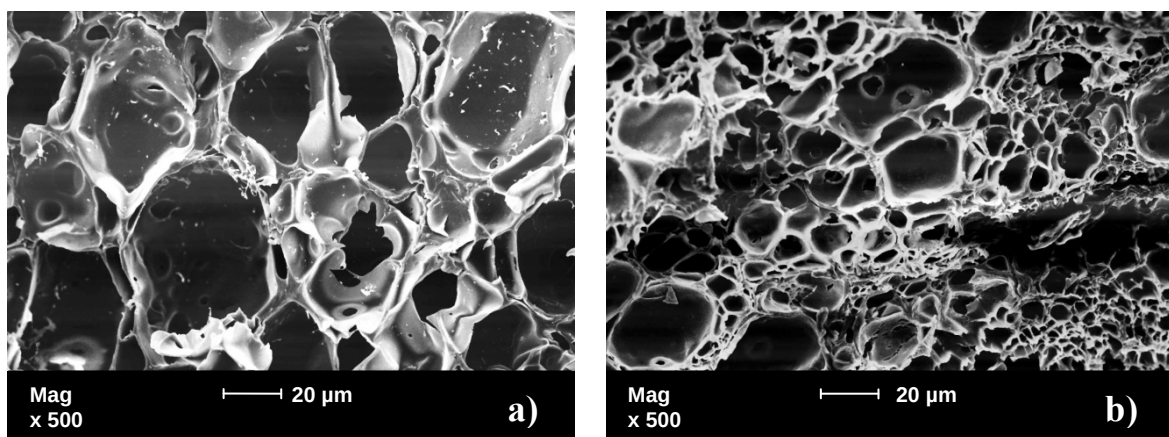
Com isso, podemos perceber, até aqui, que o complexo apresenta mudanças significativas do pH 2 até próximo ao pH 6, pois é a faixa de pH que ocorrem ionização e desprotonação dos grupos presentes nas cadeias do complexo, bem como perda de enovelamento da cadeia devido à liberação de SC. Após o pH 8 o complexo apresenta estrutura semicristalina e não há muitas alterações na mesma.

4.2.3. Análise morfológica

Na Figura 11 são apresentadas micrografias do hidrogel liofilizado à -55 °C após ter sido purificado em água (a) e após ter sido seco e novamente intumescido por 200 h em água pura (b) e em soluções aquosas de pH: 2 (c), 6 (d), 8 (e), 10 (f) e 12 (g). As micrografias obtidas do hidrogel apresentaram poros de diversos tamanhos distribuídos heterogeneamente no interior do hidrogel. Nas Figuras 11a e 11c, que correspondem ao hidrogel somente purificado em água pura sem ser reintumescido (11a) e reintumescido em solução de pH 2 (11c), observa-se a formação de película no interior dos poros se comparadas com as micrografias das Figuras 11b, 11d, 11e, 11f e 11g, que correspondem, respectivamente, ao hidrogel reintumescido em água destilada e em soluções de pHs 6; 8; 10 e 12. A formação da película mostra que em pH 2 o hidrogel possui propriedades morfológicas semelhantes às observadas no hidrogel purificado em água sem passar pelo processo de secagem. Isso pode ser devido à interação de grupos de QT e SC presentes no hidrogel intumescido em pH 2 ou nas condições de formação do hidrogel, uma vez que o mesmo é formado em meio ácido (com baixos valores de pH). Como já mencionado anteriormente, em valores de pH menores do que o valor de

pK_a (6,5) da quitosana (Strand *et al.*, 2001), os grupos amino ficam ionizados ($-NH_3^+$) e a atração eletrostática por meio de ligações de hidrogênio com os grupos hidrogenossulfato ($-OSO_3H$) e carboxílico ($-COOH$) do SC é bem maior se comparado em altos valores de pH.

A desestabilização dessas interações eletrostáticas quando o hidrogel está intumescido em condição de pequena força iônica (água pura) e em solução de pH 6 e, principalmente, nas soluções de pH 8, 10 e 12 possibilita maior expansão ao hidrogel conduzindo à maior abertura dos poros (Fig. 11d, 11e, 11f e 11g). Esses resultados estão de acordo com as isotermas apresentadas nas Figuras 3 e 7 nas quais o hidrogel apresentou maior perda de massa e, então, maior liberação de SC comparado à respectivas curvas obtidas em pH 2. Se intumescido em soluções de altos valores de pH os grupos amino protonados ($-NH_3^+$) são neutralizados pela presença de grupos básicos (exemplo o OH^-) na solução em que o hidrogel está em contato. Como o hidrogel possui em sua composição maior quantidade de SC (60% em massa), as cadeias de SC ficam mais livres e com maior mobilidade. Dessa forma, há um aumento do fluxo de água para o interior do hidrogel (Figuras 3 e 7) e a saída de SC para fora da matriz causando maior erosão e conseqüentemente maior abertura dos poros.



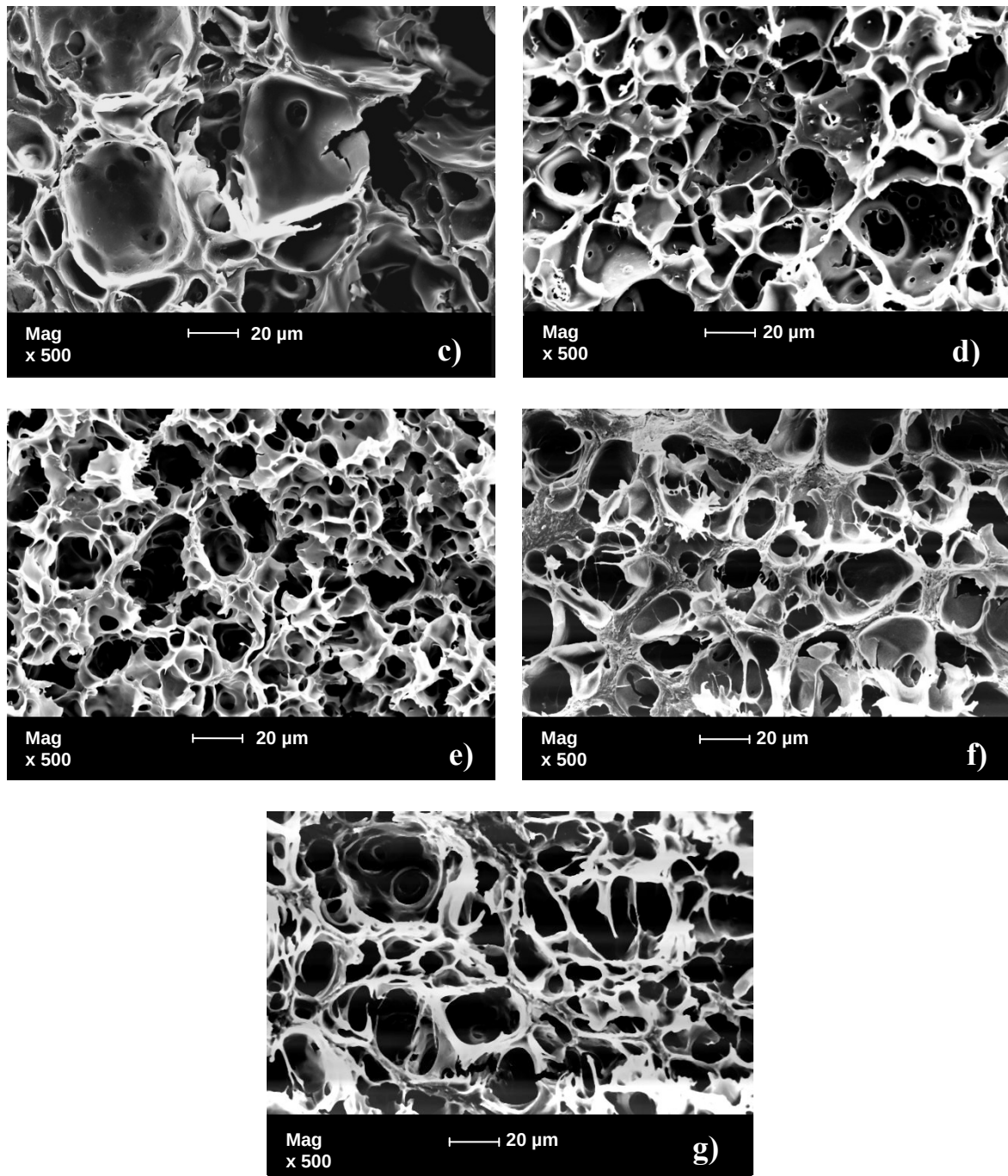


Figura 11 – Micrografias do hidrogel liofilizado após ter sido purificado em água (a) e após ter sido seco e reintumescido em água (b) e em soluções aquosas de pH: pH 2 (c), pH 6 (d), pH 8 (e), pH 10 (f) e pH 12 (g)

Na Figura 12, são apresentadas micrografias de hidrogéis com três diferentes razões QT/SC e liofilizados após serem purificados em água destilada por 24 h, portanto

não reintumescidos. É possível observar a presença da película no interior dos poros somente no hidrogel de composição QT/SC (40/60, em massa), que corresponde a morfologia apresentada na Fig. 12a que é a mesma foto apresentada na Figura 11a. A formação da película pode ser devido às diferentes propriedades de QT e SC. Em água pura, filmes de QT apresentam pequeno intumescimento e baixo grau de erosão. Por outro lado, devido à alta solubilidade de SC em meio aquoso, filmes de SC apresentam extensa erosão até se solubilizar por completo (Huang *et al.*, 2007). Isso demonstra que nas condições em que o hidrogel (QT/SC 40/60, em massa) foi reintumescido (Fig. 11b-11g) a película só permanece devido à maior presença de SC na matriz, ou seja, em pH 2 há maior atração eletrostática devido a ligações de hidrogênio entre as cadeias dos diferentes tipos de polímeros que constituem o hidrogel. Além disso, nessas condições a ionização dos grupos carboxílicos do SC é muito menor que em condições de altos valores de pH. Assim, o SC é menos solubilizado e a erosão é menor. Dessa forma, em pH 2 a morfologia do hidrogel é dependente da quantidade de SC presa na matriz.

Acima do pH 8, o hidrogel parece não apresentar alterações significativas na morfologia. Huang *et al.* (2007) avaliaram o intumescimento de hidrogéis polieletrólitos baseados em goma guar catiônico e poli(ácido acrílico) e verificaram que acima do pH 9 houve a diminuição no grau de intumescimento do hidrogel. Eles atribuíram isso à completa dissociação dos grupos ácido e também ao aumento na quantidade de íons móveis direcionando a pressão osmótica (Huang *et al.*, 2007). No hidrogel estudado nesta dissertação, em pH acima de 8 pode haver a completa dissociação dos grupos carboxílico e hidrogenossulfato livres, ou seja, aqueles que não estão presos por atração eletrostática aos grupos amino da QT. Dessa forma, a atração eletrostática entre os grupos amino com grupos carboxilato e sulfato é tão forte, devido a maior organização

(como visto no raio-X), que não é possível rompê-las totalmente nas condições estudadas, não levando a liberação completa do SC inicialmente complexado com a QT.

Apesar de se tratar de hidrogéis físicos que se formam em meio ácido, em que não há a presença da ligação covalente entre as cadeias poliméricas de QT e SC, estes são relativamente estáveis mesmo em pH alcalino pois com a liberação de cerca de 50% da quantidade de SC usada na formação do complexo, o hidrogel se mostrou mecanicamente consistente em diversos pHs. Na Figura 13 são apresentadas fotos do hidrogel intumescido por cerca de 200 h em soluções tampão de pH 1 a 12. Denuziere *et al.* (1996), também observaram comportamento semelhante em relação a hidrogéis de QT/SC e QT/ácido hialurônico.

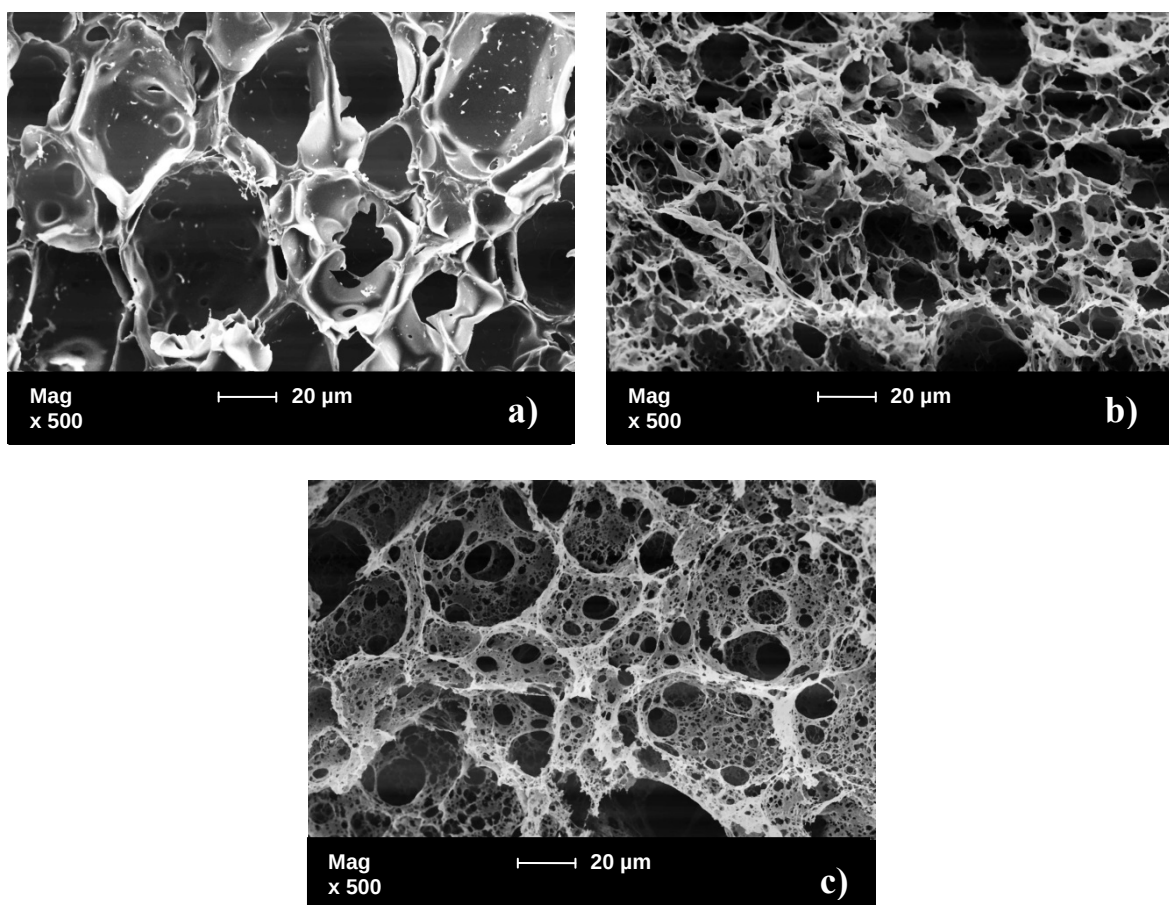


Figura 12 – Micrografias do hidrogéis de diferentes composições (QT/SC %-m/m): 40/60 (a); 50/50 (b); e 60/40 (c), liofilizados após terem sido purificados em água

Eles mostraram que a interação entre os polieletrólitos formam sistemas espirais que são altamente enroladas. Dessa forma, esses sistemas têm a capacidade de estabilizar fortemente os complexos polieletrônico em água.

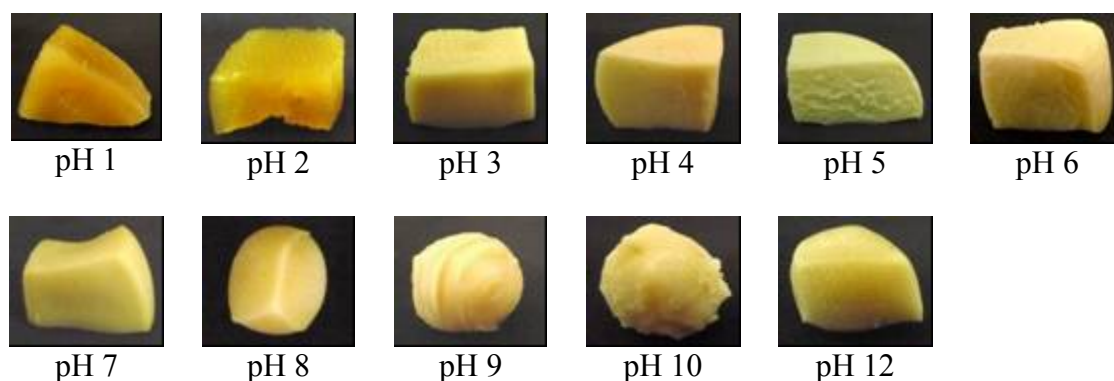


Figura 13 – Fotos de hidrogel de QT/SC após intumescer por 200 h em solução tampão de pH 1 a 12

4.2.4. Medidas de potencial zeta

A determinação do potencial zeta em diferentes valores de pH pode ser útil na avaliação da carga superficial das partículas em estudo e determinação do ponto isoelétrico, que ocorre quando potencial zeta é nulo. Na Figura 14 é apresentada a curva de potencial zeta em micropartículas do complexo polieletrônico QT/SC (40/60 % em massa) em função do pH. É possível observar a existência de um máximo na curva de potencial zeta na faixa de pH analisada e que a curva não apresenta um valor de potencial zeta nulo nesta faixa. Além disso, os menores valores de potencial zeta observados naquela faixa de pH situam-se nos pHs 1 e 9.

Du *et al.* (2005) estudaram o potencial zeta em função do pH de nanopartículas de carboximetil Konjac glucomanana/QT e observaram que o complexo também possuía menores valores de potencial zeta em pHs 2,48 e 5,05 e entre este observaram a

existência de um máximo no potencial zeta em torno do pH 3,60. Os menores valores de potencial zeta que ocorreu na região de baixos valores de pH foi atribuído à conformação aleatória devido à hidratação dos grupos -NH_3^+ para estabilizar a forte repulsão entre eles. Os autores designaram que o aumento do potencial para o pH 3,60 e posterior diminuição foi atribuído ao excesso de íons Cl^- adsorvidos na superfícies das partículas.

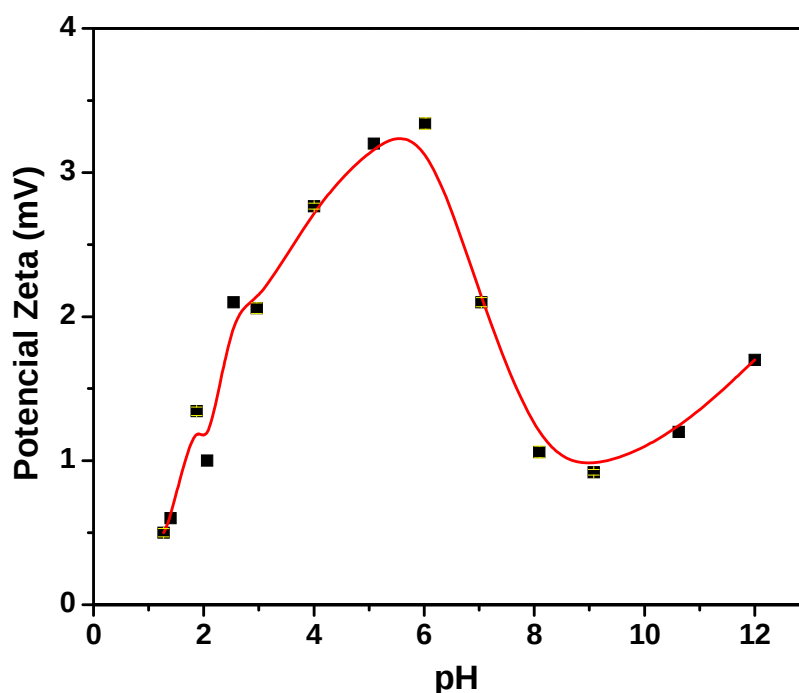


Figura 14 – Potenciais zeta do complexo polieletrônico de QT/SC (40/60% m/m) em função do pH

Neste trabalho, os baixos valores de potencial zeta para o hidrogel QT/SC em $\text{pH} < 2$ podem ser associados a presença de cadeias de SC que, mesmo na sua forma neutra, podem estabilizar os grupos -NH_3^+ da QT principalmente por ligações de hidrogênio. Isso explicaria a enovelamento aleatório de QT na matriz tridimensional do hidrogel em baixos valores de pH. Isso explicaria, também, a menor quantidade de SC

na solução, nos ensaios de liberação, em que o hidrogel QT/SC foi reintumescido em $\text{pH} = 2$.

O valor de potencial zeta aumenta na faixa de $2 < \text{pH} < \text{pK}_{\text{aQT}}$. A razão disso ainda não é bem entendida. Pode ser inferido que a adição de NaOH, para aumentar o pH durante as medidas de potencial zeta, provoca alterações no enovelamento da cadeia do hidrogel QT/SC. Dessa forma, podem haver alteração na conformação da cadeia de QT devido a um estado transitório de reorganização de cadeias. Isso produziria um desequilíbrio nas cargas locais que contribuiria para repulsão entre os grupos $-\text{NH}_3^+$. O reflexo é o aumento do potencial zeta nesta faixa.

Em valores de pH maiores que pK_{aQT} , a quantidade de grupos $-\text{NH}_3^+$ no hidrogel QT/SC é diminuída e, conseqüentemente, o potencial zeta é diminuído. Assim, é necessária menor quantidade de cadeias de SC para estabilizar esses grupos carregados e o excesso de SC é, então, liberado (como já discutido). Porém, é atingido, com aumento do pH, um valor de potencial zeta próximo de zero, mas não negativo. Após liberação de uma fração de SC, as cadeias remanescentes são atraídas pelas cadeias de QT o que evita a completa erosão do hidrogel. Isso pode ocorrer devido à estabilização, por ligações de hidrogênio, das cargas negativas do SC remanescentes com as cadeias da QT. Esses resultados estão de acordo com os obtidos por meio de difração de raio-X (Fig. 10), onde as cadeias apresentaram cristalinidade em valores de pH próximos ou maiores ao pK_{a} da QT.

Foi sugerido a existência de maior organização das cadeias de QT/SC na região de pH 6 a 12. Isso também explica o fato de as cadeias de SC serem liberadas mais rapidamente em altos valores de pH, uma vez que somente parte delas seriam necessárias para tal ordenação.

4.3. Estudo da cinética de liberação de SC com auxílio de modelos matemáticos

O mecanismo de liberação de solutos pode ser visto tanto como um processo de transporte difusional quanto como um fenômeno de partição (Reis *et al.*, 2007). O perfil de liberação de solutos a partir de hidrogéis pode descrito por modelos matemáticos. Um modelo semi-empírico que descreve o mecanismo de transporte de solutos a partir de uma matriz flexível é dado pela equação de Ritger-Peppas (Serra *et al.*, 2006).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{Equação 3}$$

onde M_t/M_∞ é a fração de fármaco liberado da matriz, t é o tempo de liberação, k é uma constante dependente do sistema solvente/polímero e n é o coeficiente difusional que caracteriza o mecanismo de difusão do solvente para o interior do gel ou o mecanismo de liberação do soluto. Para blocos ou filmes finos, quando n é próximo de 0,5 o mecanismo de liberação é comandado por difusão Fickiana. Quando $n = 1$, o mecanismo de transporte é caracterizado como caso II e ocorre principalmente por cinética de liberação de ordem zero, ou seja, a liberação lenta do fármaco ocorre a partir de formas farmacêuticas que não se degradam. Este está associado ao relaxamento da matriz que, no caso de hidrogéis, implica em relaxamento macromolecular. Quando o valor de n fica entre 0,5 e 1, é observado o transporte anômalo (Reis *et al.*, 2006 e Serra *et al.*, 2006), em que há ao mesmo tempo contribuições de difusão e relaxamento da matriz. Para o hidrogel de QT/SC estudado foram obtidos valores de n e de k apresentados na Tabela 4:

Tabela 4 – Valores do expoente difusional (n) e constante (k) obtidas por aplicação do modelo de Ritger-Peppas nos diferentes pHs a 37 °C

pH	n	$k (10^{-2})$	R^2
2	0,166	5,7	0,987
6	0,439	8,9	0,983
8	0,423	12,5	0,982

Como os valores de n foram menores que 0,5, é possível afirmar que o mecanismo de difusão do SC do interior do hidrogel para a solução ocorre, principalmente, por difusão Fickiana nos pHs 6 e 8. Como k é uma constante dependente do sistema solvente/polímero, os valores obtidos demonstram que o hidrogel é sensível à variação de pH, sendo encontrados valores de k maiores nos pHs 6 e 8.

Na Figura 7, foi apresentada a dependência da fração de SC liberado (F_L) das redes do hidrogel QT/SC em função do tempo a 37 °C. No equilíbrio, as taxas de liberação e absorção do SC são iguais e a fração atinge um valor máximo (F_{max}). Neste trabalho, a liberação do SC a partir do hidrogel pôde ser tratada, além de um fenômeno de difusão, como um fenômeno de partição. O parâmetro que determina a ocorrência de tal fenômeno é α , que é calculado por meio da Eq. 4 (Reis *et al.*, 2007).

$$\alpha = \frac{F_{max}}{1 - F_{max}} \quad \text{Equação 4}$$

O termo α expressa a afinidade físico-química do fármaco entre as fases hidrogel e solvente. Com $\alpha > 0$, é observada a difusão do soluto na fase solvente. O valor de α é dependente de um grande número de variáveis, tais como temperatura, pressão, pH,

força iônica, composição do hidrogel, geometria do hidrogel, grau de intumescimento do hidrogel, natureza química do solvente e do fármaco, etc. Dessa forma, a atividade de partição (α), pode assumir um número ilimitado de valores.

Com os valores de $F_{\max}$ obtidos das curvas de liberação realizadas em diferentes pHs, como as apresentadas na Figura 7, foram obtidos os valores de α para o hidrogel do complexo QT/SC, que são apresentados na Tabela 5. Uma vez determinados os valores de α para os respectivos pHs, pôde ser calculado os valores das constantes cinéticas de liberação (k_L), assumindo que a cinética de liberação ocorre através de uma cinética de segunda ordem (Eq. 5). Os valores obtidos para a liberação de SC a partir dos hidrogéis de QT/SC são apresentados na Tabela 5.

$$\frac{\alpha}{2} \times \ln \left(\frac{F_L - 2F_L F_{\max} + F_{\max}}{F_{\max} - F_L} \right) = k_L t \quad \text{Equação 5}$$

Tabela 5 – Valores do coeficiente de partição (α) e constante cinética de liberação (k_L) para a liberação de SC a partir de hidrogéis de QT/SC em pHs 2, 6 e 8 a 37 °C

pH	α	$k_L (10^{-3})$	R^2
2	0,177	5,8	0,999
6	1,020	33,2	0,998
8	0,958	54,0	0,999

A natureza química do solvente que está em contato com o hidrogel pode afetar tanto a velocidade de liberação como o valor de α (Reis *et al.*, 2007). Isso significa que,

quando em contato com soluções de pH 8, o sistema hidrogel QT/SC apresenta maiores valores de α maiores se comparados com os obtidos em pH 2 e 6. Em concordância com as condições previamente estabelecidas, maiores valores de α implicam que o soluto tem mais afinidade pelo solvente do que pela matriz na qual está inserido. Isso ocorre, pois em pHs maiores do que os pK_{as} dos grupos hidrogenossulfato e carboxílico, a cadeia polimérica do SC terá seus grupos sulfato e carboxilato na forma ionizada e, conseqüentemente, haverá um aumento da repulsão eletrostática e ocorre um maior desnovelamento da cadeia polimérica e maior difusão do SC para a solução.

Se a cinética de liberação for definida como de segunda ordem reversível (Eq. 5), o meio tempo de liberação de fármaco ($t_{1/2}$) pode ser determinado por meio da Equação 6:

$$t_{1/2} = \frac{\alpha}{2k_L} \times \ln(3 - 2F_{\max}) \quad \text{Equação 6}$$

onde $t_{1/2}$ é o tempo necessário para que a concentração do fármaco no solvente atinja 50% de $F_{\max}$. Para a liberação de SC a partir do hidrogel estudado foram obtidos os valores de $t_{1/2}$ (em horas) iguais a 15,24; 10,57 e 6,24 para os pHs 2, 6 e 8, respectivamente. Isso significa que, em maiores valores de pHs o tempo necessário para que 50 % do SC seja liberado da matriz de QT/SC é menor do que em menores valores de pH.

A fração de soluto liberado, F_L , é relacionada ao parâmetro de liberação designado como atividade de partição (α), que determina a ocorrência do fenômeno de partição (Reis *et al.*, 2007). Com auxílio da equação 5, foi plotada a curva relativa ao modelo de Reis *et al.*, (2007) utilizando os valores das constantes α e k_L (Tabela 5) e comparadas com os pontos experimentais nos respectivos pHs, como apresentado na

Figura 15. Para comparação, foi plotado também, com auxílio dos valores do expoente difusional (n) e constante (k) obtidas por aplicação da Equação 3, a curva relativa ao modelo de Ritger-Peppas (Serra *et al.*, 2006).

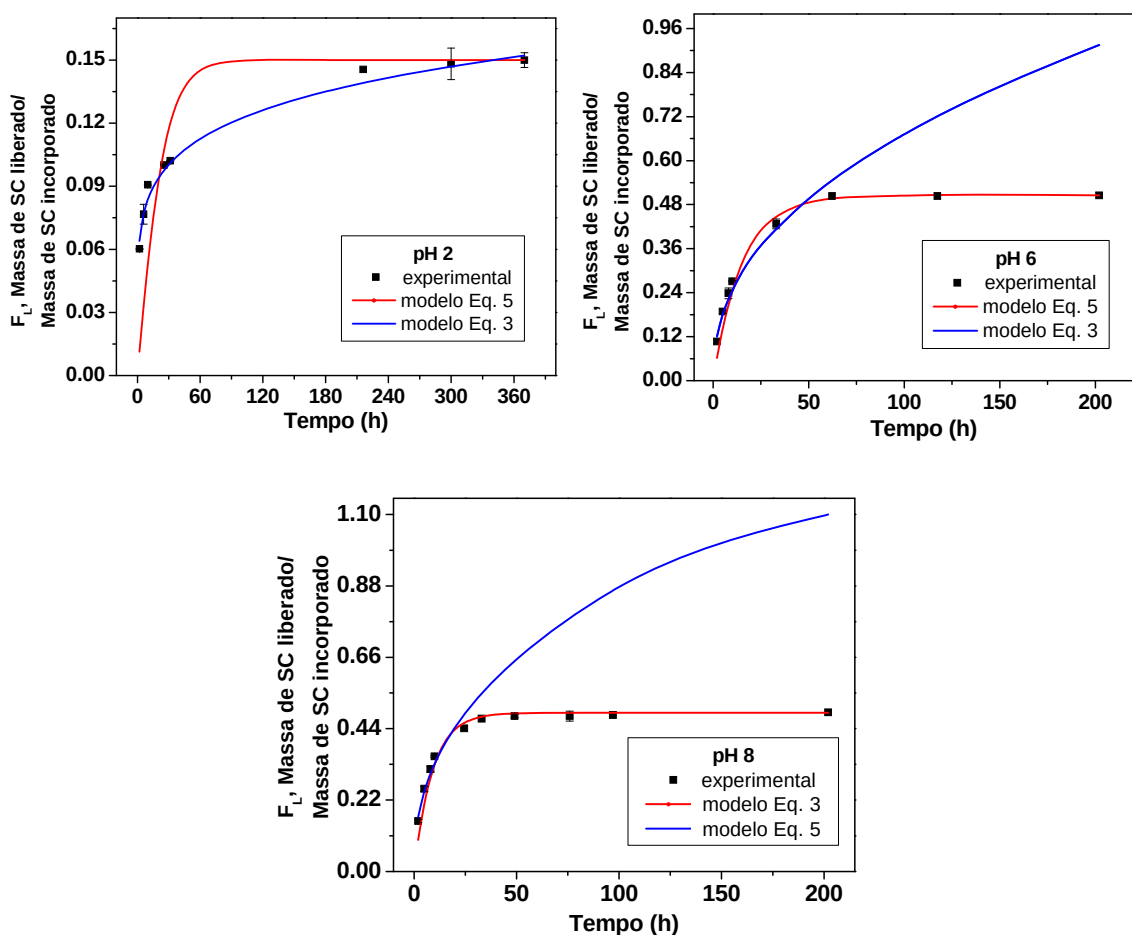


Figura 15 – Perfis experimentais e teóricos (Eq. 3 e 5) obtidos para a liberação de SC a partir do hidrogel QT/SC a 37 °C em função do tempo em pHs 2, 6 e 8

Os modelos aos quais os dados foram tratados para a previsão do perfil de liberação de SC apresentaram diferenças significativas do valor da constante de liberação em relação ao pH (Tab. 4 e 5). Além disso, as constantes de liberação obtidas para o modelo semi-empírico, dado pela Equação 3, apresentaram maiores valores do

que as obtidas no modelo dado pela Equação 5. Não é possível ter uma comparação favorável entre os dois modelos devido alguns fatores importantes. Primeiro, o modelo semi-empírico dado pela Eq. 3 prediz apenas 60 % da liberação total enquanto que o modelo dado pela Eq. 5 prediz 100 %. Além disso, ambos difusão Fickiana e mecanismo de relaxação molecular são vistos no modelo dado pela Eq. 5 como fatores intrínsecos nos parâmetros α e k_L (Reis *et al.*, 2007).

A Equação 5 mostra que a liberação é tanto um processo de transporte difusional quanto um fenômeno de partição em que o particionamento do soluto ocorre entre as fases do solvente e do hidrogel (Reis *et al.*, 2007). Se observarmos as razões entre as constantes de liberação obtidas pelo uso da Equação 5 pelas respectivas constantes obtidas pelo uso da Equação 3, podemos perceber que em pH 6 e 8, respectivamente, as razões apresentaram valores semelhantes, 0,37 e 0,43. Porém, em pH 2 a razão entre as constantes foi menor do em pH 6 e 8, sendo neste caso igual a 0,10. Isso mostra as diferenças significativas na liberação de SC em diferentes valores de pH.

A previsão de todo o perfil de liberação do soluto a partir de um determinado sistema, permite uma melhor avaliação da dosagem do soluto, visto que qualquer variação na quantidade administrada pode provocar efeitos indesejáveis (Reis *et al.*, 2007). Assim, o modelo dado pelas Equações 4 e 5, pode explicar melhor os resultados obtidos, uma vez que prevê 100% da liberação do soluto e mostra que o mecanismo de liberação de solutos pode ser visto tanto como um processo de transporte difusional quanto como um fenômeno de partição.

Dessa forma, com o auxílio de modelos matemáticos, é possível perceber que o hidrogel responde à variação de pH e que a liberação de SC é bem mais significativa nos pHs 6 e 8 do que no pH 2. Como o SC é classificado como uma droga que produz alívio sintomático de ação demorada pode ser inferido que o hidrogel do complexo

QT/SC pode ser utilizado como carreador de SC para liberação específica em condições fisiológicas onde o pH é maior que o pKa dos grupos carboxílico ($pK_a = 4,57$) e sulfato ($pK_a = 2,60$) do SC.

5. CONCLUSÕES

O hidrogel constituído de 40 % de QT e 60 % SC, em massa, apresenta diferentes propriedades que são dependentes do valor de pH em que ele é reintumescido. Entre as propriedades estão grau de intumescimento, térmicas, morfológicas, liberação de SC e reorganização de cadeias de SC remanescentes. Elas ocorrem devido a protonação ou desprotonação dos diferentes grupos que participam do complexo polieletrônico bem como organização ou desorganização das cadeias acompanhadas da liberação de cadeias de SC. A liberação de SC ocorre principalmente em valores de pH maiores ou próximos do pKa da QT (= 6,5) e a fração máxima liberada é próxima de 0,5. O processo de liberação de cadeias de SC durante o intumescimento do hidrogel QT/SC é dirigido principalmente pelo balanço de interação das cadeias remanescentes de SC e QT através de interações eletrostáticas em $\text{pH} < \text{pKa}$ da QT e ligações de hidrogênio em $\text{pH} > \text{pKa}$ da QT. Com auxílio de modelos matemáticos para prognóstico da liberação do SC *in vitro* foi possível perceber que o hidrogel possui diferentes propriedades, tanto de difusão quanto de partição em diferentes condições de pH, obtendo-se maiores velocidades de liberação de SC naqueles onde o pH é maior. A estabilidade térmica de hidrogéis de QT/SC aumenta após a fração de SC liberada. Isso ocorre por que o complexo QT/SC apresenta reorganizações na matriz tridimensional na faixa de pH entre 6 e 12 e isso foi comprovado nos difratogramas de raios-X. O estudo aprofundado desse comportamento em hidrogéis de QT/SC de diferentes razões de QT/SC e também a avaliação de propriedades mecânicas de hidrogéis de QT/SC intumescidos em ampla faixa de pH podem auxiliar em um melhor entendimento deste importante sistema e aplicações mais específicas e eficientes de tais materiais seja como biomaterial ou seja no campo da biotecnologia.

6. REFERÊNCIAS

- Adamson, A. W. e Gast, A. P. **Physical Chemistry of Surfaces**. 6. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1997.
- Artrite – Saiba mais sobre essa doença. **Saúde em Movimento**. 2002. Disponível em: <http://www.saudeemmovimento.com.br/conteudos/conteudo_exibe1.asp?cod_notici=406> Acesso em: 14 abr. 2008.
- Azevedo, M. M. M. de, **Nanoesferas e a liberação controlada de Fármacos**. 20f. Monografia (Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico) - LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – UNICAMP, 2002.
- Bastardo, L. A.; Garamus, V. M.; Bergstrom, M. e Claesson, P. M. **Journal of Physical Chemistry B** 109 (2005) 167-174.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O. e Gurny, R. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 57 (2004) 35–52.
- Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Peppas, N. A. e Gurny, R. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 57 (2004) 19-34.
- Bourgeois, P.; Chales, G.; Dehais, J.; Delcambre, B.; Kuntz, J. L. e Rozenberg S. **Osteoarthritis and Cartilage** 6 (1998) 25 – 30.
- Callister, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5. ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 2002.
- Capitani, D.; Crescenzi, V.; De Angelis, A. A. e Segre, A. L., **Macromolecules** 34 (2001) 4136 – 4144.
- Castellan, G. **Fundamentos de Físico-Química**. 1.ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1986.
- Chen, S. C.; Wu, Y. C.; Mi, F. L.; Lin, H. W.; Yu, L. C. e Sung, H. W. **Journal of Controlled Release** 96 (2004) 285– 300.

- Chen, Y. L.; Chen, H. C.; Lee, H. P.; Chan, H. Y. e Hu, Y. C. **Biomaterials** 27 (2006) 2222-2232.
- Chen, Y. L.; Lee, H. P.; Chan, H. Y.; Sung, L.Y.; Chen, H. C. e Hu, Y. C. **Biomaterials** 28 (2007) 2294 – 2305.
- Dai, Z.; Yin, J.; Yan, S.; Cao, T.; Ma, J. e Chen, X. **Polymer International** 56 (2007), 1122-1127.
- Denuziere, A.; Ferrier, D.; Damour, O. e Domard, A. **Biomaterials** 19 (1998) 1275-1285.
- Denuziere, A.; Ferrier, D. e Domard, A. **Carbohydrate Polymers** 29 (1996) 317-323.
- Du, J.; Dai, J.; Liu, J.-L. e Dankovich, T. **Reactive & Functional Polymers** 66 (2006) 1055-1061.
- Du, J.; Sun, R.; Zhang, S.; Zhang, L. F.; Xiong, C. D. e Peng, Y. X. **Biopolymers** 78 (2005) 1 – 8.
- Du, J.; Zhang, S.; Sun, R.; Zhang, L. F.; Xiong, C. D. e Peng, Y. X. **Journal Of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials** 72B (2005) 229 – 304.
- Fredel, M.C.; Barra, G. e Donabel, K. **Estruturas, propriedades e aplicações da quitina e quitosana** Disponível em: <www.materiais.ufsc.br/Disciplinas/BIOMAT/Trabalhos/trabalho_quitosana.pdf> - Acesso em: 23 mar. 2005.
- Ganong, W. F. **Fisiologia Médica**. 17.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998, p. 355.
- Ghaffari A.; Navaee, K.; Oskoui, M.; Bayati, K. e Tehrani, M. R. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 67 (2007) 175–186.
- Gupta, P.; Vermani, K. e Garg, S. **Drug Discovery Today** 7 (2002) 569 – 579.
- Henrique, J. S.; Falcare, R. S. e Lopes, P. S. **Pharmacia Brasileira** 56 (2006), 22.

- Huang, Y.; Yu, H. e Xiao, C. **Carbohydrate Polymers** 69 (2007) 774 – 783.
- Jabbari E. e Nozari S. **European Polymer Journal** 36 (2000) 2685 – 2692.
- Johnson, D. W. e Mokler, D. J. **Natural Healing Track** (2001) 1 – 7.
- Kofinas, P. e Cohen, R. E. **Biomaterials** 18 (1997) 1361 – 1369.
- Kost, J. e Langer, R. **Advanced Drug Delivery Reviews** 46 (2001) 125–148.
- Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H. e Domb, A. J. **Chemical Reviews** 104 (2004) 6017 – 6084.
- Larsson, B.; Nilsson, M. e Tjalve, H. **Biochemical Pharmacology** 30 (1981) 2963-2970.
- Mao, S.; Shuai, X.; Unger, F.; Simon, M.; Bi, D. e Kissel, T. **International Journal of Pharmaceutics** 281 (2004) 45-54.
- Makino, K.; Idenuma, R. e Ohshima, H. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 8 (1996) 93-100.
- Mothé, C. G.; Damico, A. e Machado, M. da G. S. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 25 (2005) 1-7.
- Peppas, N.A.; Bures, P.; Leobandung, W. e Ichikawa, H. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 50 (2000) 27-46.
- Piai, J. F.; Reis, A. V.; Rubira, A. F. e Muniz, E. C. **Anais da 28^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2005, Poços de Caldas.
- Qiu, Y. e Park, K. **Advanced Drug Delivery Reviews** 53 (2001) 321–339.
- Rabockai, T. **Físico-Química de Superfícies**. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo. Monografia apresentada ao Programa Regional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Secretaria Geral da Organização dos Estados Americanos, Washington, D.C. – 1979.
- Raman, R.; Sasisekharan, V. e Sasisekharan R. **Chemistry Biology** 12 (2005) 267–77.

- Redeschi, M. C. M. **Preparação e caracterização de filmes a base de Xiloglucana extraída de sementes de *Hymenaea Courbaril* (jatobá)** 95f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", Campus de Araraquara, 2006.
- Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Cavalcanti, O. A.; Rubira, A. F. e Muniz E. C. **Polymer** 47 (2006) 2023-2029.
- Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Rubira, A. F. e Muniz, E. C. **Journal of Colloid and Interface Science** 310 (2007) 128-135.
- Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Moia, T. A.; Mattoso, L. H. C. e Muniz, E. C. **Journal of Polymer Science A** 46 (2008) 2567–2574.
- Relkin, P. **Thermochimica Acta** 246 (1994) 371-386.
- Richy, F.; Bruyere, O.; Ethgen, O.; Cucherat, M.; Henrotin, Y. e Reginster, J. Y. **Archives of Internal Medicine** 163 (2003) 1514-1522.
- Serra, L.; Doménech, J. e Peppas, N. A. **Biomaterials** 27 (2006) 5440–5451.
- Strand, S. P.; Tommeraas, K.; Varum, K. M. e Ostgaard, K. **Biomacromolecules** 2 (2001) 1310-1314.
- Vasiliu, S.; Popa, M. e Rinaudo, M. **European Polymer Journal** 41 (2005) 923–932.
- Wasteson, A. **Biochemistry Journal** 122 (1971) 477-485.
- Zaire, C. E. F.; Barros, R. de C. A.; Oliveira, N. V. B. V. de e Passos, M. M. B. dos
Informativo do CRIM – Centro Regional de Informação de Medicamentos
1 (2005) Ano VII . Disponível em:
<<http://www.farmaciauniversitaria.ufrj.br/informativo/Info2005glucosamina.pdf>.
> Acesso em: 12 abr. 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)