



UNIVALI

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ

OSCAR D'AGOSTINI JUNIOR

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE E BIOADESÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
N-CARBOXIMETILQUITOSANA EM REDES HÍBRIDAS COM ÁCIDO
POLIACRÍLICO**

Itajaí – 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DO VALE DO ITAJAÍ
PROGRAMA DE MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E
SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS BIOATIVAS

OSCAR D'AGOSTINI JUNIOR

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE E BIOADESÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
N-CARBOXIMETILQUITOSANA EM REDES HÍBRIDAS COM ÁCIDO
POLIACRÍLICO

Dissertação submetida à Universidade do Vale do Itajaí como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rilton Alves de Freitas

Itajaí, Junho de 2009.

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA
BIOCOMPATIBILIDADE E BIOADESÃO DE NANOPARTÍCULAS DE
N-CARBOXIMETILQUITOSANA EM REDES HÍBRIDAS COM ÁCIDO
POLIACRÍLICO**

Oscar D'Agostini Junior

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Produtos Naturais e Substâncias Bioativas e aprovada em sua forma final pelo programa de mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Vale do Itajaí.

Tânia Mari Belle Bresolin

Coordenadora do programa Mestrado em Ciências Farmacêuticas

Apresentado perante a banca examinadora composta pelos professores:

Dr. Rilton Alves de Freitas (UNIVALI)

Presidente

Dra. Ruth Meri Lucinda (UNIVALI)

Dr. Alan Guilherme Gonçalves (UFPR)

Itajaí (SC), 30 de junho de 2009.

Dedicatória

Dedico este trabalho a meus pais, Oscar e Roseli, que sempre me mostraram o caminho que deveria seguir e ajudaram nas horas mais complicadas com muito carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre comigo, tornando possível mais um sonho.

Ao professor Rilton Alves de Freitas, meu orientador, pela enorme sabedoria, dedicação, empenho e principalmente paciência nesse último ano do meu mestrado.

À técnica do laboratório Ana Paula Souza, por auxiliar em vários testes e estar sempre disposta a ajudar.

À coordenadora do PMCF, prof^a. Tânia Mari Belle Bresolin, pela amizade e ajuda.

Aos professores do PMCF pela amizade criada durante as aulas.

À professora Daisy Aguilar Netz pelo auxílio na microscopia eletrônica de varredura.

À professora Angélica Garcia Couto pelo auxílio na secagem das partículas por *spray-dryer*.

As secretárias Rosélia e Vânia pela amizade e serviços prestados.

Ao meu amigo Gláucio Valdameri pelas hospedagens em Curitiba quando precisei trabalhar no laboratório da UFPR.

Aos colegas do PMCF, realmente uma turma muito boa de conviver.

Ao CNPq pela bolsa de estudos durante um ano de trabalho.

Epígrafe

Sábio é aquele que conhece os limites da própria ignorância.

(Sócrates)

SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE E BIOADESÃO DE NANOPARTÍCULAS DE N-CARBOXIMETILQUITOSANA EM REDES HÍBRIDAS COM ÁCIDO POLIACRÍLICO

Oscar D'Agostini Junior

Junho/2009

Orientador: Rilton Alves de Freitas, Dr.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Substâncias Sintéticas Bioativas

Número de Páginas: 83

Complexos nanoparticulados de quitosana com ácido poliacrílico tem sido empregados em nanotecnologia, por melhorarem, em termos químicos e biológicos, a atividade farmacológica, e principalmente por aumentarem a biodisponibilidade dos fármacos. Essa dissertação teve por objetivo avaliar a biocompatibilidade e bioadesão dos derivados *N*-carboximetilados de quitosana (N-CMQ) com polimerização *in situ* com ácido acrílico formando redes híbridas com ácido poliacrílico. As amostras de quitosana foram derivatizadas por *N*-carboximetilação com ácido glioxílico e posterior formação de redes híbridas por polimerização com ácido acrílico (N-CMQ_A). Também foram realizadas reticulações com *N,N*-metileno-bisacrilamida (N-CMQ_R). A N-CMQ foi avaliada quanto ao grau de desacetilação e carboximetilação e a estrutura química de todos os derivados foi confirmada por espectroscopia de infravermelho (IV) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹³C RMN). A perda de massa dos derivados foi avaliada por termogravimetria (TG) e varredura diferencial de temperatura (DSC). O raio hidrodinâmico (R_h) das partículas secas por atomização foram avaliados por espalhamento de luz dinâmico e a morfologia analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). A bioadesão dos sistemas foi avaliada após administração oral das nanopartículas fluorescentes N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC em ratos, com análise das partículas aderidas no estômago, intestino delgado inicial, médio e final após 1 h, 5,5 h e 8 h. O grau de desacetilação da quitosana foi de 85 %. A *N*-carboximetilação da quitosana foi confirmada pelo espectro IV com as bandas características em 1650 e 1550 cm⁻¹. Após precipitação etanólica e secagem o derivado N-CMQ apresentou uma porcentagem de carboximetilação de 60%, por titulometria. O raio hidrodinâmico para o polímero foi de 76,2 nm. A síntese dos derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R foram confirmadas pelo aumento das bandas de IV em 1650 cm⁻¹, bem como pelos deslocamentos químicos característicos da acrilização por ¹³C RMN. A morfologia por MEV das nanopartículas obtidas por atomização mostrou forma esférica. Os derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R apresentaram aumento da estabilidade térmica, com redução da perda de massa, quando comparada a N-CMQ. Nos estudos de biocompatibilidade os derivados N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R não apresentaram efeitos citotóxicos, mesmo em concentrações elevadas, de 1000 µg/mL e as nanopartículas de N-CMQ_R apresentaram maior capacidade bioadesiva, com um tempo de residência total de 4,0 horas no estômago e intestino delgado. Os

sistemas gerados são potenciais carreadores de fármacos para liberação estomacal, como em patologias relacionadas a ulcerações e inflamações gástricas.

Palavras-chave: Nanopartículas. N-Carboximetilquitosana. Acrilação. Copolimerização. Bioadesão.

SYNTHESIS, CHARACTERIZATION OF BIOCOMPATIBILITY AND EVALUATION OF BIOADHESION OF N-CARBOXYMETHYLCHITOSAN NANOPARTICLES IN HYBRID NETWORKS WITH POLIACRYLIC ACID

Oscar D'Agostini Junior

June/2009

Supervisor: Rilton Alves de Freitas, Dr

Area of Concentration: Natural products and Synthetic bioactive substances

Number of Pages: 83

Chitosan nanoparticle complexes with polyacrylic acid have been used in nanotechnology, as they improve pharmacological activity, in chemical and biological terms, and in particular, increase drug bioavailability. The aim of this work is to evaluate the biocompatibility and bioadhesion of *N*-carboxymethyl derivatives of chitosan (N-CMC) with *in situ* polymerization with acrylic acid, generating hybrid networks with polyacrylic acid. The chitosan samples were derivatized by *N*-carboxymethylation with glyoxilic acid and subsequent formation of hybrid networks by polymerization with acrylic acid (N-CMC_A). Cross-links were also carried out with *N,N*-methylene-bisacrylamide (N-CMC_R). The N-CMC samples were characterized in relation to degree of deacetylation and carboxymethylation, and the chemical structure of all the derivatives was confirmed by infrared spectroscopy (IR) and nuclear magnetic resonance (¹³C NMR). The loss of mass of the derivatives was evaluated by thermogravimetry (TG) and differential scanning calorimetry (DSC). The hydrodynamic radius (*R*_h) of nanoparticles obtained by spray drying was analyzed by dynamic light scattering, and the size and morphology by scanning electronic microscopy (SEM). The bioadhesion of the systems was analyzed after oral administration of the fluorescent nanoparticles N-CMC_A-FITC and N-CMC_R-FITC in rats, with analysis of the adhered particles in the stomach and initial, medium and final portions of the small intestine, after 1 h, 5,5 h and 8 h. The degree of chitosan deacetylation was 85%. The *N*-carboxymethylation of chitosan was confirmed by IR with characteristic bands at 1650 and 1550 cm⁻¹. After ethanol precipitation and drying, the N-CMC derivative showed a degree of carboxymethylation of 60% by titration. The *R*_h of N-CMC was 76.2 nm. The synthesis of derivatives N-CMC_A and N-CMC_R was confirmed by the increase of IR bands at 1650 cm⁻¹, as well as by the characteristic chemical shift of acrylation by ¹³C NMR. The morphology by SEM of the nanoparticles obtained by spray drying showed a spherical structure. The N-CMC_A and N-CMC_R derivatives showed an increase in thermal stability, with a reduction in loss of mass, compared with the N-CMC. In the biocompatibility studies, the N-CMC, N-CMC_A and N-CMC_R derivatives did not present any cytotoxic effects, even at a high concentration of 1000 µg/mL, and the N-CMC_R nanoparticles showed the highest bioadhesion capacity, with a total residence time of 4.0 h in the stomach and small intestine. The nanoparticles obtained have potential to deliver drugs in the stomach, for example in ulceration and inflammation related pathologies.

Keywords: Nanoparticles. N-carboxymethylchitosan. Acrylation. Copolymerization. Bioadhesion.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Forma da cadeia antiparalela arranjada em α -quitina.	20
Figura 2	Representação estrutural esquemática da quitina (A) e quitosana (B)	20
Figura 3	Estrutura esquemática química do monômero da <i>N</i> -carboximetilquitosana (A) e <i>O</i> -carboximetilquitosana (B)	23
Figura 4	Reação de <i>graft-copolymerization</i> de ácido acrílico em quitosana, por interação iônica, seguido de reticulação com glutaraldeído	26
Figura 5	Reação de <i>graft-copolymerization</i> por enxerto covalente de ácido acrílico na quitosana	27
Figura 6	A) Quitosana reticulada monopolimérica, B) Redes híbridas (Semi-rede). C) Redes híbridas reticuladas (Rede total)	28
Figura 7	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido a parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica	29
Figura 8	Micrografia eletrônica de varredura das amostras de N-CMQ secas por A) atomização em aumento de 4.000X; B) precipitação etanólica em aumento de 2.000X e C) liofilização em aumento de 2000X.	44
Figura 9	Espectro de infravermelho das amostras de A) QS; B) N-CMQ secas por liofilização; C) N-CMQ secas por atomização e D) N-CMQ seca por precipitação etanólica. As pastilhas foram preparadas com 2 mg das amostras e 100 mg de KBr. Para a N-CMQ foram utilizados o Lote 1 para a confecção das pastilhas.	45
Figura 10	Titulação potenciométrica (1) e primeira derivada ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$) (2) para o derivado de N-CMQ seco por precipitação etanólica, utilizando-se 200 mg do derivado, em 40 mL de água, pH inicial ~ 2 e pH final ~ 11 , utilizando-se como titulante o NaOH 0,1 M. Como controle foi utilizado 40 mL de água, pH inicial ~ 2 e pH final ~ 11 .	46
Figura 11	Dimensão fractal das amostras de N-CMCh secas por Etanol, liofilização e Spray dryer, dispersas em NaCl 0,1 M a 1mg/mL, filtradas por 0.22 μm (filtro millipore), determinado pelo $\text{Ln } l(q)$ em função de $\text{Ln } q$ (nm) por espalhamento de luz estático.	48
Figura 12	Espalhamento de luz (90°) e Absorção no UV a 210 nm durante a síntese do híbrido N-CMQ com ácido ácido poliacrílico. Utilizando-se N-CMQ em água (5,55 mmol), ácido acrílico (2,57 mmol), e persulfato de potássio (0,1 mmol). O meio reacional foi mantido a 70°C , sob fluxo constante de nitrogênio. Inserto: Conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico em função do tempo, considerando-se tempo zero o momento da adição de 0,1 mmol de persulfato de potássio. Concentração de N-CMQ (5,55 mmol), temperatura de 70°C , fluxo de nitrogênio (20 mL/min).	50
Figura 13	Espalhamento de luz (90°) e Absorção no UV a 210 nm durante a síntese do de ácido poliacrílico. Utilizando-se ácido acrílico (2,57 mmol), e persulfato de potássio (0,1 mmol). O meio reacional foi mantido a 70°C , sob fluxo constante de nitrogênio. Inserto: Conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico em função do tempo, considerando-se tempo zero o momento da adição de 0,1	51

	mmol de persulfato de potássio. Temperatura de 70°C, fluxo de nitrogênio (20 mL/min).	
Figura 14	Diâmetro hidrodinâmico (nm) em função do tempo de reação para conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico. Considera-se tempo zero o momento da adição de 0,1 mmol de persulfato de potássio. Concentração de N-CMQ (5,55 mmol), temperatura de 70°C sob fluxo de nitrogênio.	52
Figura 15	Foto ilustrativa da aparência das dispersões poliméricas, para N-CMQ; N-CMQ com acilação (N-CMQ _A) e N-CMQ com acilação e reticulação (N-CMQ _R)	53
Figura 16	Espectro de infra-vermelho das amostras de A) N-CMQ, B) N-CMQ _A e N-CMQ _R .	54
Figura 17	Espectro de ¹³ C-RMN de N-CMQ a 20 mg/mL, em D ₂ O como solvente, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.	54
Figura 18	Espectro de ¹³ C-RMN de N-CMQ _A e N-CMQ _R a 20 mg/mL, em D ₂ O com 0,1% de ácido acético deuterado como solvente, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.	55
Figura 19	Espectro de DEPT-135 de N-CMQ _A (inserto) e N-CMQ _R a 20 mg/mL, em D ₂ O com 0,1% de ácido acético deuterado como solvente, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.	57
Figura 20	Diâmetro das nanopartículas, determinadas por espalhamento de luz dinâmico para o derivado A) N-CMQ; B) N-CMQ _A e C) N-CMQ _C , avaliando-se a intensidade e o número de partículas espalhantes. Inserto em C: Nanopartículas de N-CMQ _R após filtração por membrana de 0,22 µm.	58
Figura 21	Diâmetro das nanopartículas, determinadas por espalhamento de luz dinâmico para o derivado N-CMQ _A e N-CMQ _R .	59
Figura 22	Microscopia eletrônica de varredura, para a amostra de 1 - N-CMQ _A e 2 - N-CMQ _R , em aumentos de 1000 e 2000 e 4000 x.	61
Figura 23	Curva de perda de massa (%) e DSC (inserto) para as amostras de N-CMQ, N-CMQ _A e N-CMQ _R , de 25 a 600°C, 10K/min, sob fluxo de nitrogênio (50 mL/min)	62
Figura 24	Degradação térmica do ácido poliacrílico por desidratação e descarboxilação	64
Figura 25	Viabilidade celular em células L929, para as amostra N-CMQ, N-CMQ _A e N-CMQ _R , de 0,1 a 1000 µg/mL. One-Way ANOVA, com análise posterior por Tukey (**p<0,05).	65
Figura 26	Fluorescência em para as amostra de 1-NCMQ _A -FITC e 2-NCMQ _R -FITC no estômago, intestino inicial, médio e final após 1 hora (One way ANOVA seguido de Tukey p* <0,05 em relação ao estômago).	67
Figura 27	Fluorescência em para as amostra de 1- NCMQ _A -FITC e 2- NCMQ _R -FITC no estômago, intestino inicial, médio e final após 5 horas e 30 min (One way ANOVA seguido de Tukey p* <0,05 em relação ao estômago).	68
Figura 28	Fluorescência em para as amostra de 1- NCMQ _A -FITC e 2- NCMQ _R -FITC no estômago, intestino inicial, médio e final após 8 h	69

(One way ANOVA seguido de Tukey $p^* < 0,05$ em relação ao estômago).

- Figura 29** Mucoadesão da nanopartículas (%) no trato digestório em função do tempo (h) para os derivados N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC. 70
- Figura 30** Micrografia de fluorescência para o derivado N-CMQ_R-FITC após 1 hora de administração em ratos Wistar. O corte refere-se ao fundo do estômago, em aumento de 100X. 71

LISTA DE ABREVIATURAS

- APA – ácido poliacrílico
- ASC_{0-t} – área sob a curva do tempo zero até a última concentração determinada
- $ASC_{0-\infty}$ – somatória da área sob a curva com a última concentração por k_{ads}
- $ASMC_{0-t}$ – área sob a curva do primeiro momento
- $ASMC_{0-\infty}$ – somatória da área sob a curva no primeiro momento por k_{ads}
- BSA-NP – albumina bovina
- CS – quitosana
- CM%- porcentagem de carboximetilação
- D₂O – Água deuterada
- D_f – Dimensão fractal
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- DSC- Análise de varredura diferencial de temperatura
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- GA – Grau de desacetilação (%)
- k_{ads} – taxa de eliminação ou esvaziamento das partículas
- $k_{conversão}$ – conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico em mmol/min
- MEM – *Minimum essential médium* (meio mínimo essencial)
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- MRT – tempo médio de residência das partículas no trato digestório
- N-CMQ – N-Carboximetilquitosana
- N-CMQ_A – FTIC – N-Carboximetilquitosana acrilada com fluorescência
- N-CMQ_A – N-Carboximetilquitosana acrilada
- N-CMQ_R – FTIC – N-Carboximetilquitosana reticulada com fluorescência
- N-CMQ_R - N-Carboximetilquitosana reticulada
- O-CMQ – O-Carboximetilquitosana
- PBS – *Phosphate-Buffered Saline* (tampão salino fosfato)
- PVM/MA – poli-(anidrido metilvinil éter-co-maleico)
- Q_{max} – quantidade máxima de partículas aderidas ao trato digestório
- R_h – Raio hidrodinâmico
- ¹³C RMN- ressonância magnética nuclear de carbono 13
- SNA-NP – lectina de *Sambucus nigra*
- TGA – Análise termogravimétrica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo Geral.....	18
2.2 Objetivos Específicos.....	18
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1 Quitosana.....	19
3.2 Derivados da quitosana.....	22
3.2.1 Derivados <i>N</i> ou <i>O</i> -Carboximetilados.....	22
3.2.2 Derivados copolimerizados por enxerto (<i>Graft copolymerization</i>).....	24
3.3 Sistemas de Nanopartículas.....	28
3.4 Polímeros bioadesivos e bioadesividade.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	32
4.1 Preparação e caracterização da quitosana.....	32
4.2 Síntese e secagem da <i>N</i> -carboximetilquitosana (N-CMQ).....	32
4.2.1 Determinação do grau de carboximetilação da N-CMQ.....	34
4.3 Obtenção de nanopartículas de N-CMQ por polimerização (N-CMQ _A) e por reticulação (N-CMQ _R) com ácido acrílico.....	35
4.3.1. Avaliação da acrilização da N-CMQ em tempo real.....	36
4.4 Formação dos derivados e nanopartículas fluorescentes.....	36
4.5 Caracterização dos polímeros e nanopartículas.....	35
4.5.1 Caracterização por espectroscopia de infravermelho (IV).....	37
4.5.2 Caracterização por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ¹³ C.....	37
4.5.3 Espalhamento de luz dinâmico.....	37
4.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38
4.5.5 Análise termogravimétrica (TG) e de varredura diferencial de temperatura (DSC).....	38
4.5.6 Avaliação da biocompatibilidade com células L929.....	38
4.5.7 Ensaio de Bioadesão	39
4.5.7.1 Delineamento experimental.....	39
4.5.7.2 Grupos de animais estudados.....	40

4.5.7.3 Procedimento de administração das partículas e coleta do trato digestório.....	40
4.5.7.4 Quantificação da bioadesão.....	40
4.5.7.5 Análise não compartimental da bioadesão.....	41
4.5.7.6 Análise microscópica da bioadesão.....	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
5.1 Síntese, secagem e caracterização dos derivados da N-CMQ.....	43
5.2 Síntese, secagem e caracterização dos derivados N-CMQ acrilados e reticulados.....	49
5.3 Estudos de biocompatibilidade utilizando células L929.....	64
5.4 Estudos de bioadesão.....	66
6 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia, mesmo não sendo um conceito novo, ganhou um momento especial em virtude da comprovação das significantes diferenças das propriedades físicas e biológicas, em relação aos sistemas micro e macroscópicos. A idéia de que nanosistemas tem propriedades físicas e biológicas únicas e que podem ser usados para resolver os problemas de liberação e distribuição de fármacos também tem despertado o interesse em se avançar em pesquisas nesta área. Por definição, os sistemas de nanopartículas são uma classe de compostos com no mínimo uma fase e dimensões entre 1-1000 nm (LABHASETWAR, 2005; SRIUPAYO et al., 2005).

Recentemente, observou-se um aparente crescimento em torno da criação de novos sistemas de liberação de fármacos, sendo que o sistema de liberação nanoparticulado foi um dos que mais tem recebido atenção. Neste período, a indústria farmacêutica se destacou no uso e no aprimoramento de matérias-primas de baixo custo e fácil acesso para o desenvolvimento de novos materiais poliméricos, assim como várias técnicas para incorporação de fármacos em sistemas micro particulados e nanoparticulados (KAZUHIRO et al., 1989; SINHA et al., 2004; AKTAS et al., 2005; WANG et al., 2007; HANSEN; JANKOVA; HVILSTED, 2007).

Dentre as inúmeras aplicações das nanopartículas tem-se observado um grande interesse nas formulações orais por apresentarem muitas vantagens como: dosagem única, possibilidade de mistura de fármacos com diferentes propriedades de liberação e uma variabilidade no tempo de trânsito no trato gastrintestinal (LARANJEIRA et al., 2000). Entre outras vantagens da incorporação de fármacos em sistemas poliméricos têm-se a estabilidade aumentada de fármacos lábeis, aumento da solubilidade (FROMTLING, 1988), liberação modificada do fármaco e biodisponibilidade aumentada devido ao fato que partículas em escala nanométricas são eficientes em cruzar barreiras semipermeáveis. Como exemplo, a absorção e a biodisponibilidade do anticoagulante heparina, do aminoglicosídeo tobramicina e de fármacos anti-tuberculosos foi demonstrada como sendo significativamente maior quando os fármacos foram administrados incorporados em nanopartículas em comparação com outras formas de liberação oral (SINHA et al., 2004; PANDEY et al., 2005; NISHIYAMA; KATAOKA, 2006).

As terapias utilizando nanopartículas permitem que a liberação do fármaco seja vetorizada com mais especificidade ao local de ação do mesmo. A dose total do medicamento e a cinética da liberação são as variáveis que podem ser manipuladas para conseguir o melhor resultado farmacológico (SINHA et al., 2004). Uma das variáveis manipuláveis para desenvolvimento de sistemas de nanopartículas é variar a relação do copolímero ou o peso molecular do polímero, para fornecer o perfil desejado da liberação do fármaco no organismo (SINHA et al., 2004; NISHIYAMA; KATAOKA, 2006).

Outra forma de se obter novas propriedades para os sistemas poliméricos nanoparticulados são as modificações químicas de polímeros naturais, representando um método recente e promissor para a produção de novos biomateriais com propriedades específicas, entre elas, baixa toxicidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade, propriedades de absorção, habilidade em formar filmes e propriedades para formação de bioadesivos (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; JOSHI; SINHA, 2007).

Como exemplo, nanopartículas de quitosana mostraram-se como sistemas carreadores catiônicos de peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos e plasmídeos (AKTAS et al., 2005). Elas possuem a capacidade de proteger os compostos bioativos sensíveis da degradação química e enzimática *in vivo* e durante o armazenamento, e de facilitar o transporte de moléculas carregadas através das células epiteliais (MAO et al., 2001).

A quitosana é um polissacarídeo favorável ao uso farmacêutico como insumo pela biocompatibilidade e biodegradabilidade. Ela é derivada da quitina, que é encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos, como cascas de camarões e carcaças de siri. Após um processo químico chamado desacetilação, a quitina transforma-se em quitosana (MUZZARELLI et al., 1982; SHEPHERD; READER; FALSHAW, 1997; RHAZI et al., 2000; CHEN; PARK, 2003; LI et al., 2005; AKTAS et al., 2005).

Destaca-se também que a quitosana e seus derivados demonstram algumas ações farmacológicas adjuvantes na terapia como antiácido e antiúlcera, protegendo a mucosa gástrica, inibindo a adesão das bactérias nas células epiteliais bucais e vaginais (BUGAMELLI et al., 1998).

Modificações químicas da quitosana, através de copolimerização, têm demonstrado ser um promissor método de preparação de novos materiais, e

também permitem introduzir propriedades especiais nesses biopolímeros para ampliar seu campo de aplicações comerciais (KANG; CAI; LIU, 2006; SUN et al., 2006). Dentre os inúmeros métodos eficazes de copolimerização de derivados da quitosana, tem-se a copolimerização com monômeros como ácido acrílico (HUACAI; WAN; DENGKE, 2006; SUN et al., 2006; FU et al., 2007).

Desta forma, o presente trabalho visa avaliar o efeito das formações de derivados híbridos de derivados *N*-carboximetilados de quitosana, através do método denominado copolimerização com ácido acrílico, utilizando o ácido acrílico e a bis-acrilamida, observando-se o comportamento hidrodinâmico e térmico das nanopartículas geradas, bem como estudos de biocompatibilidade *in vitro* e bioadesão *in vivo*.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

- Sintetizar, caracterizar e avaliar a biocompatibilidade e a bioadesão das nanopartículas de *N*-carboximetilquitosana em redes híbridas com ácido poliacrílico.

2.2 Objetivos Específicos:

- Sintetizar o derivado *N*-carboximetilado a partir da quitosana (N-CMQ);
- Obter derivados N-CMQ secos por 3 metodologias: precipitação etanólica, liofilização e atomização e determinar o melhor método de secagem;
- Sintetizar os derivados de N-CMQ híbridos, por polimerização *in situ*, com ácido acrílico (N-CMQ_A) e com ácido acrílico e *N,N*-metileno-bisacrilamida (N-CMQ_R);
- Sintetizar os derivados de N-CMQ_A e N-CMQ_R conjugados a fluoresceína, N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC;
- Analisar, em tempo real, a reação de formação dos derivados híbridos com ácido acrílico por espalhamento de luz estático, dinâmico e ultravioleta, com determinação dos parâmetros cinéticos reacionais;
- Caracterizar as modificações químicas por espectroscopia de infravermelho (IV) e espectroscopia de ¹³C RMN;
- Analisar a formação de nanopartículas por espalhamento de luz dinâmico, através da determinação do raio hidrodinâmico (R_h) e variação relativa das nanopartículas em função do pH ;
- Analisar a morfologia das nanopartículas secas por atomização por microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Analisar a perda de massa das nanopartículas por análises termogravimétricas (TG) e de varredura diferencial de temperatura (DSC);
- Verificar a biocompatibilidade *in vitro* das nanopartículas, utilizando-se células L929;
- Analisar os ensaios de bioadesão *in vivo* nas partículas geradas, bem como determinar parâmetros cinéticos da mucoadesão como Q_{max}, k_{ads} e MRT.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Quitosana

Na natureza, organismos biológicos produzem polímeros orgânicos e inorgânicos como materiais de estrutura funcional. Como exemplo tem-se a quitina, muito encontrada na natureza, substância derivada do exoesqueleto dos crustáceos, que é a precursora da quitosana, um importante biopolímero (polímero natural) e representa o segundo biopolímero mais abundante, atrás apenas da celulose (ROBERTS, 1992; DUAN et al., 2008; MUN et al., 2008; DUTTA et al., 2009; EL-SHERBINY, 2009; YU et al., 2009). A estrutura da quitosana é muito similar a celulose, porém é mais usada como biomaterial por suas características e propriedades como: baixa toxicidade, alta biodegradabilidade e biocompatibilidade, biofuncionalidade associada à presença dos grupos hidroxilas e grupos aminos. Devido aos seus abundantes grupos amino ela pode ser facilmente modificada quimicamente (BERGER et al., 2004; LI et al., 2005; TIAINEM et al., 2007; LEE et al., 2007; DUAN et al., 2008; MUN et al., 2008; DUTTA et al., 2009).

Como citado anteriormente, a quitosana é derivada da quitina, que é o componente estrutural primário do exoesqueleto dos crustáceos. Entretanto, a mesma também é encontrada em insetos e em fungos. A forma estrutural mais comumente disponível deste biopolímero é a α -quitina (**Figura 1**), obtida dos dejetos das cascas dos camarões, das lagostas, dos caranguejos e das conchas marinhas (ROBERTS, 1992; SHEPHERD; READER; FALSHAW, 1997; MUN et al., 2008; WESKA et al., 2007b; KRISHNA RAO; CHUNG; HA, 2008; ADALI; YILMAZ, 2009; SONAJE et al., 2009).

Na forma mais comum do biopolímero (conformação α), as cadeias individuais são arranjadas em formas antiparalelas (**Figura 1**). Assim, as cadeias adjacentes são orientadas em direções opostas (MOURYA; INAMDAR, 2008).

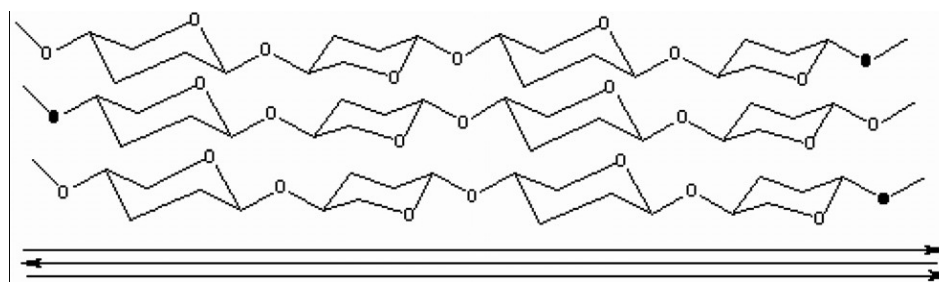


Figura 1) Forma da cadeia antiparalela arranjada em α -quitina.
 Fonte: adaptado de MOURYA e INAMDAR (2008).

Existe também a forma menos comum conhecida por forma de conformação β , que corresponde à unidade onde as cadeias são arranjadas em formas paralelas. As cadeias adjacentes são orientadas na mesma direção (MOURYA; INAMDAR, 2008). E embora pouco utilizada, existe a forma de conformação γ , onde duas cadeias paralelas retêm em associação uma cadeia antiparalela. Essa forma pode ser considerada como uma variante da forma α (MUN et al., 2008; DUAN et al., 2008; MOURYA; INAMDAR; 2008).

A quitina (**Figura 2A**) é substancialmente composta de N-acetil-D-glucosamina, formadas por ligações β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina e β -(1 \rightarrow 4)-N-acetil-D-glucosamina. O grau de desacetilação da quitina pode ser tão baixo como <10% e o peso molecular do polissacarídeo pode ser entre $1-2,5 \times 10^6$ g/mol. Na quitosana (**Figura 2B**), o grau de desacetilação varia de 40% a 98% e seu peso molecular varia entre 5×10^4 a 2×10^6 g/mol (KITUR et al., 2002; BERGER et al., 2004; MEERA; ABRAHAM, 2006; MOURYA; INAMDAR, 2008; MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009; DUTTA et al., 2009; EL-SHERBINY, 2009).

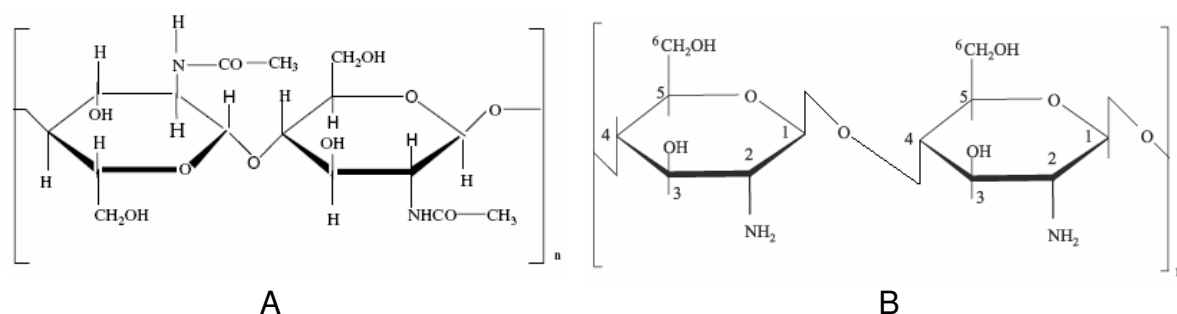


Figura 2) Representação estrutural esquemática da quitina (A) e quitosana (B).
 Fonte: (A) SEOUDI e NADA (2007) e (B) WANG et al. (2007)

A quitosana tem recebido muita atenção nas últimas décadas por suas propriedades especiais como baixa toxicidade, ser biodegradável, biocompatível, biofuncional, apresentarem propriedades de absorção, habilidade em formar filmes e propriedades para formação de bioadesivos, considerando o baixo custo tecnológico de obtenção e que apresenta abundantes recursos de matéria prima disponíveis (NISHIMURA; KOHGO; KURITA, 1991; CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001)

Desde então, muitas aplicações da quitosana vêm sendo desenvolvidas nos campos da engenharia biomédica, entre eles, cosmetologia, farmacologia, biotecnologia, medicina e agricultura, além de estarem presentes nas indústrias têxteis, de tratamento de água e nas indústrias de papéis. Na área farmacêutica, a quitosana é aplicada em formas de liberação controlada para as vias oral, parenteral, nasal, ocular e na terapia genética. A quitina e a quitosana surgiram como uma nova classe de materiais fisiológicos com funções altamente sofisticadas devido as suas versáteis atividades biológicas como excelente biocompatibilidade e completa biodegradabilidade combinada com baixa toxicidade (DODANE; VILIVALAM, 1998; MOURYA; INAMDAR, 2008; DI COLO et al.; 2004; JOSHI; SINHA, 2007; MOURYA; INAMDAR, 2008; SONAJE et al., 2009).

Para obter a quitosana, primeiramente as cascas de crustáceos são desproteínas e desmineralizadas pelo tratamento sequencial ácido e base. Posteriormente, a quitina é desacetilada por hidrólise alcalina em alta temperatura para se obter a quitosana. Essa maneira de produção é fácil e de baixo custo (WUOLIJOKI; HIRVELA; YLITALO, 1999; RHAZI et al., 2000).

Para explorar as propriedades únicas desses polímeros e entender todo o potencial desses polissacarídeos, existem tentativas de derivatizá-los, devido aos vários problemas acerca do uso industrial da quitina e da quitosana, como dificuldade em dissolvê-las em água ou em pH neutro. Estudos têm sido realizados para obter derivados solúveis em água através de modificações químicas, e a quitosana é um promissor candidato a estas modificações devido à presença do grupo amino livre na cadeia principal (MIRANDA et al., 2006; MOURYA; INAMDAR, 2008; SONAJE et al., 2009).

3.2 Derivados de quitosana

Como citado anteriormente, um dos principais problemas da quitosana é a sua solubilidade em pH neutro. Esse problema vem sendo objeto de estudo, a fim de obter modificações químicas para aumentar as aplicações do produto. Várias já são possíveis, entre elas, a copolimerização, a sulfonação, a quaternização, a hidroxilação e a carboximetilação (CHEN; PARK, 2003; DI COLO et al., 2004; BEPPU et al., 2007).

A parcial solubilidade da quitosana em soluções aquosas deve-se aos grupos amino, que são bases fracas protonadas quando em pH menor que o $pK_a \approx 6,5$, auxiliando na solubilidade do biopolímero somente em soluções ácido diluídas. Entretanto, a baixa solubilidade da quitosana quando em $pH > 6,5$ é uma das desvantagens da aplicação desse material, por isso, a preparação de derivados de quitosana tem sido prevista para superar estes limites de solubilidade em meio aquoso (CAMPANA FILHO; ABREU, 2005).

A carboximetilação da quitosana é um caminho para a conversão em uma forma hidrossolúvel. A última década tem presenciado um crescimento interessante na modificação química da quitosana e seus derivados para melhorar suas propriedades e conseqüentemente expandir suas potenciais aplicações (EL-SHERBINY, 2009).

Entre as várias técnicas de modificações químicas como *N* ou *O*-carboximetilação (MUZZARELLI et al., 1982; DI COLO et al., 2004; MIRANDA et al., 2006; LAMIN et al., 2006; BEPPU et al., 2007; EL-SHERBINY, 2009; YU et al., 2009) e o enxerto por copolimerização (*graft-copolymerization*) de monômeros é muito atrativo, pois é um útil método de introdução de propriedades desejadas nas cadeias laterais do polímero (MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009; EL-SHERBINY, 2009).

3.2.1 Derivados *N* ou *O*-carboximetilados

Devido as suas propriedades especiais já citadas a quitosana e seus derivados *N* e/ou *O*-CMQ apresentam inúmeras aplicações em diversos campos, como por exemplo, em tratamentos de água, na agricultura, indústria farmacêutica, cosmética e de alimentos (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001; SUN et al.,

2006; WESKA et al., 2007a; WESKA et al., 2007a; DUAN et al., 2008; MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009; EL-SHERBINY, 2009), assim como, na indústria de alimentos, como agentes clarificantes, antioxidantes e filme antimicrobiano para recobrir vegetais e frutas frescas (CAMPANA FILHO; ABREU, 2005; WESKA et al., 2007a; ZHU et al., 2007; DUTTA et al., 2009)

Um método aplicado para a modificação da quitosana é a *N*-carboximetilação. A carboximetilquitosana (N-CMQ) é um importante derivado da quitosana demonstrando boa solubilidade e biocompatibilidade (YU et al., 2009). A transformação da quitosana em N-CMQ é um método fácil, conhecido como sendo a reação dos grupos amino livres com o grupo aldeído do ácido glicóxico formando N-CMQ (**Figura 3A**). Posteriormente, utiliza-se borohidreto de sódio para fazer a redução do derivado imino e obter o derivado amino. Esse procedimento é simples e não requer aquecimento, usando-se reagentes comerciais. Ao término da reação, a *N*-carboximetilquitosana contém grupos acetil, carboximetil e grupos amino livres, em proporções controladas, de acordo com o grau de acetilação e o peso molecular da quitosana e a quantidade de ácido glicóxico usado (MUZZARELLI et al., 1982; DI COLO et al., 2004; MIRANDA et al., 2006; LAMIN et al., 2006; BEPPU et al., 2007; EL-SHERBINY, 2009; YU et al., 2009).

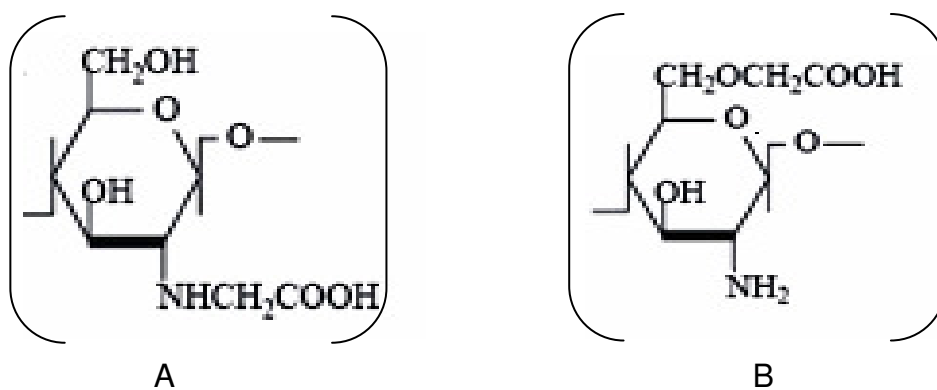


Figura 3) Estrutura esquemática química do monômero da *N*-carboximetilquitosana (A) e *O*-carboximetilquitosana (B)
Fonte: PETER, 1995

Nos últimos anos despertou-se um interesse maior na *O*-Carboximetilquitosana (O-CMQ) (**Figura 3B**), pois esta molécula apresentou boa solubilidade em água e é um promissor candidato para aplicações no carregamento de fármacos (ZHU et al., 2002; CHEN; PARK, 2003).

As propriedades e aplicações da O-CMQ são fortemente dependentes das características estruturais, principalmente da média do grau de substituição e da substituição na quitosana do grupo amino ou hidroxil. O procedimento e as condições da reação junto com o tempo da reação é que dão as características da O-CMQ (AMIJI, 1995; ZHU et al., 2002; CHEN; PARK, 2003; CAMPANA FILHO; ABREU, 2005; BEPPU et al., 2007).

A O-CMQ é melhor obtida quando a reação ocorre em temperatura ambiente, junto com uma suspensão de isopropanol/água (9:1,v/v) na presença de ácido monocloroacético e hidróxido de sódio. Entretanto, essa reação produz, além do O-CMQ, N-CMQ e N,O-CMQ se for realizada em temperatura elevada (CAMPANA FILHO; ABREU, 2005; BEPPU et al., 2007).

3.2.2 Derivados copolimerizados por enxerto (*Graft copolymerization*)

Com o avanço das pesquisas, o interesse na modificação dos vários polímeros, naturais e sintéticos, cresceu significativamente. Um dos métodos mais utilizados é a copolimerização por enxerto, a qual ocorre pela formação de redes híbridas de polímeros, através de *grafting*, que podem produzir as propriedades desejadas (AHN; CHOI; CHO, 2001; YU et al., 2004).

O estudo dessas modificações em materiais poliméricos por copolimerização por enxerto, ou em inglês *graft copolymerization*, está sendo muito difundido entre vários autores porque esse método pode fornecer materiais com propriedades desejadas através da escolha adequada das características moleculares da cadeia que se quer fazer o enxerto (BERGER et al., 2004; WESKA et al., 2007a; JOSHI; SINHA, 2007). É uma técnica muito atrativa de modificação das propriedades químicas e físicas da quitina e da quitosana aumentando suas possibilidades de uso (MOURYA; INAMDAR, 2008).

Tais sistemas híbridos poliméricos são interessantes porque combinam estrutura e propriedades físico-químicas de materiais tanto naturais como sintéticos. Comparado com polímeros não reticulados essas nanopartículas reticuladas demonstram excelentes propriedades como melhor incorporação do fármaco, proteção contra degradação enzimática, coeficiente de expansão térmica diminuído, permeabilidade de gás reduzida e condutividade iônica realçada (YU et al., 2004).

As propriedades dos resultados de copolimerização por enxerto são de um modo geral controladas pelas características do tamanho da cadeia, incluindo estrutura molecular, comprimento e número de cadeias. Até hoje, um grande número de trabalhos de pesquisa tem sido desenvolvidos para estudar os efeitos dessas variáveis nos parâmetros de enxerto e nas propriedades dos polímeros de quitosana enxertados. Existem vários tipos de enxerto, entre eles os copolímeros são preparados pelo método de polimerização de radicais, onde radicais livres são gerados primeiro nas cadeias do biopolímero e depois esses radicais servem como macro-iniciadores para o monômero vinil ou acrílico. A geração do radical pode ser alcançada pela iniciação química ou radiação (MOURYA; INAMDAR, 2008).

A relação dos diversos monômeros que podem ser utilizados na formação de redes híbridas com quitosana incluem o metilmetacrilato, acrilamida, 2-hidroxietilmetacrilato, *N,N*-dimetilaminaetilmetacrilato, polimetacrilato, ácido hialurônico, colágeno entre outros. Porém entre esses vários agentes para a formação de redes híbridas, o ácido acrílico foi o mais estudado, pois tem um custo menor e é mais facilmente polimerizado a um polímero de maior peso molecular (BLAIR et al., 1987; AHN; CHOI; CHO, 2001; YAZDANI-PEDRAM; LAGOS; RETUERT, 2002; HUACAI; WAN; DENGKE, 2006; YU et al., 2004; YIN et al., 2007).

Entre a variedade de reagentes químicos usados para iniciar a polimerização na quitina e/ou quitosana destaca-se o nitrato sérico de amônia, o persulfato de potássio e o persulfato de amônia (MOURYA; INAMDAR, 2008).

Os parâmetros do enxerto como a porcentagem e a eficiência são enormemente influenciadas pelo tipo e concentração do biopolímero, a concentração do monômero, a temperatura de reação e o tempo. Os enxertos obtidos podem ser avaliados em alguns parâmetros como otimização das condições de reações e propriedades como solubilidade, absorção de água, intumescimento, dependência de pH etc. (MOURYA; INAMDAR, 2008).

A quitosana tem dois tipos de grupos reativos que podem ser modificados por enxerto; o grupo amino na unidade desacetilada e o grupo hidroxil em carbonos 3 e/ou 6 também da unidade desacetilada (BERGER et al., 2004; WESKA et al., 2007a; JOSHI; SINHA, 2007; MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009).

Enxertos de quitosana permitem a formação de derivados funcionais por ligação covalente da molécula. Recentes estudos demonstraram ainda que, após a derivatização primária seguida de enxerto de copolímeros, o produto obtido

melhorou muito a sua solubilidade em água e a sua bioatividade, como as propriedades bactericida, bacteriostática, antioxidante, quelante e de formar complexos, além do efeito de adsorver outros compostos (BAYRAMOGLU; SAHINTURK, 2007; JOSHI; SINHA, 2007; DUAN et al., 2008; MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009; YU et al., 2009).

Embora o enxerto na quitosana modifique suas propriedades, é possível manter algumas características como a sua mucoadesividade, biocompatibilidade e biodegradabilidade (BAYRAMOGLU; SAHINTURK, 2007; JOSHI; SINHA, 2007). A quitosana enxertada tem uma grande variedade de aplicações. As aplicações potenciais da quitosana enxertada são em sistemas para liberação controlada de fármacos, biomedicina e engenharia de tecidos (BAYRAMOGLU, SAHINTURK; 2007; JOSHI; SINHA, 2007; MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009). No polímero enxertado com materiais acrilados, como ácido acrílico, acrilonitrila, dimetilaminoetil metacrilato, acrilamida, entre outros, constatou-se uma melhora nas propriedades químicas e físicas como sua capacidade de intumescimento e sua solubilidade em água (DUAN et al., 2008; MUN et al., 2008; ADALI; YILMAZ, 2009).

Na **Figura 4** pode ser observado a reação de copolimerização de ácido acrílico em quitosana.

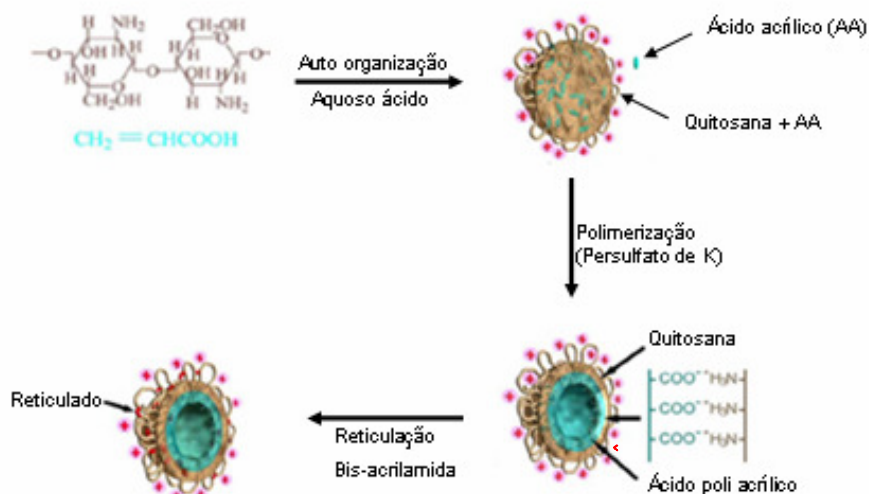


Figura 4) Reação de *graft-copolymerization* de ácido acrílico em quitosana, por interação iônica seguido de reticulação com bis-acrilamida
Fonte: adaptado de HU et al., 2002

Na **Figura 4** a etapa chave na síntese de nanopartículas esféricas é que a solução de quitosana em meio ácido pode ser dissolvida na solução aquosa de ácido acrílico e ligada eletrostaticamente dissociada na forma negativa para formar

conjuntos de núcleos rígidos. Desde que o grau de ionização das moléculas da quitosana seja maior do que as moléculas de ácido acrílico em pH 4,1, os conjuntos quitosana-ácido acrílico são estabilizados pela carga positiva das cadeias nos núcleos (HU et al., 2002).

Progressivamente (**Figura 4**), tais interações realçadas com a copolimerização, fazem com que as estruturas frouxas do núcleo transformem-se gradualmente em uma estrutura esférica densa e que conduza a uma diminuição no tamanho das nanopartículas. Esse processo experimenta dois tipos de força: uma força atrativa eletrostática entre quitosana e ácido poliacrílico e uma força repulsiva eletrostática na membrana carregada positivamente. O equilíbrio resultante dessas duas forças opostas é a formação da cavidade no centro das nanoesferas (HU et al., 2002). Neste caso foi utilizado como agente iniciador o persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$) (BAYRAMOGLU, SAHINTURK; 2007; JOSHI; SINHA, 2007; WANG et al., 2007).

Apesar da *graft copolymerization* ser na maioria dos artigos uma reação quase que exclusivamente iônica, com formação de ligações cruzadas quando ocorre a reticulação com bisacrilamida, em alguns casos, como publicado por Huacai, Wan e Dengke (2006), o enxerto é covalente (**Figura 5**), em uma reação com Ce^{4+} em micro-ondas durante mais de 30 minutos.

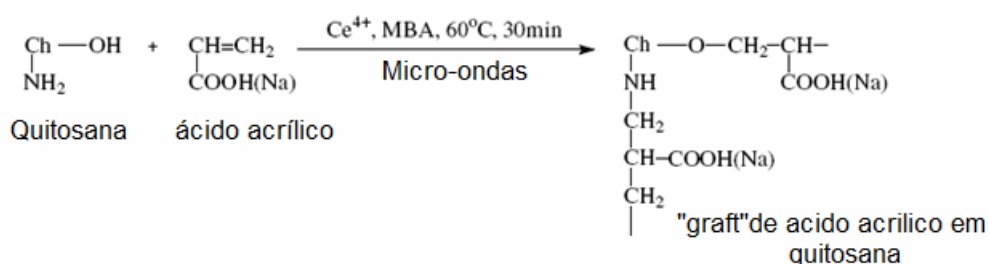


Figura 5) Reação de *graft-copolymerization* por enxerto covalente de ácido acrílico na quitosana
Fonte: HUACAI; WAN; DENGKE (2006).

Os sistemas reticulados formados por enxerto polimérico podem ser divididos em três tipos em relação a sua estrutura: quitosana reticulada com ela mesma (**Figura 6A**), redes híbridas do polímero (**Figura 6B**) e redes semi ou totalmente interpenetradas do polímero (**Figura 6C**).

A estrutura mais simples de quitosana reticulada apresentada na **Figura 6A**, envolve duas unidades estruturais que podem ou não pertencer à mesma cadeia polimérica de quitosana. A estrutura final desse hidrogel pode ser considerada como

uma rede reticulada dissolvida em uma segunda rede formada por cadeias de quitosana de mobilidade restrita (BERGER et al., 2004; SINHA et al., 2004; LABHASETWAR, 2005; YIN et al., 2007).

Nos hidrogéis formados por uma rede híbrida de polímeros (**Figura 6B**), a reação de copolimerização ocorre entre a unidade estrutural de uma cadeia de quitosana e uma unidade estrutural de uma cadeia polimérica de outro tipo. Isso conduz a formação de uma rede de quitosana reticulada por ligações não covalentes (semi-rede), mostrado na **Figura 6B**. É possível também promover a ligação transversal deste polímero a fim de se obter duas redes reticuladas (rede-total) cujas propriedades sejam completamente diferentes da sua semi-rede correspondente, mostrado na **Figura 6C** (van NOSTRUM; HENNINK, 2002; BERGER et al., 2004; SINHA et al., 2004; LABHASETWAR, 2005; YIN et al., 2007).

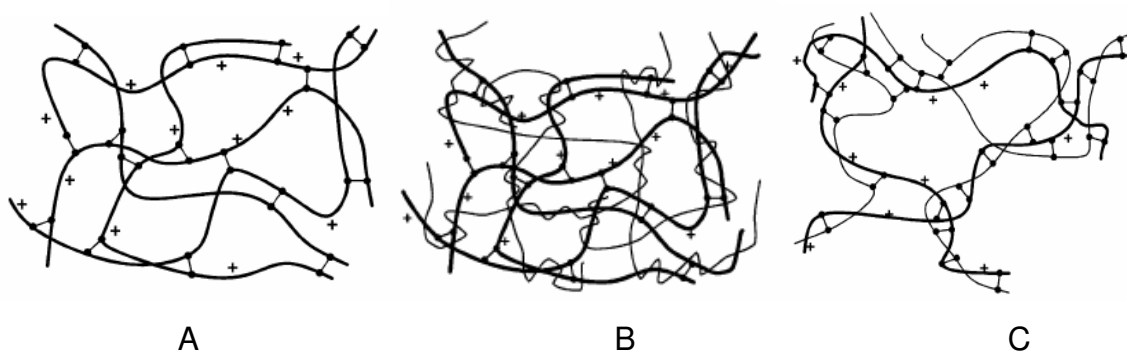


Figura 6) A) Quitosana reticulada monopolimérica, B) Redes híbridas (Semi-rede). C) Redes híbridas reticuladas (Rede total)
Fonte: BERGER et al., 2004.

Em cada uma das três estruturas, as ligações covalentes são as interações que dão forma as redes, porém outras interações não podem ser excluídas, pois ocorrem ligações como de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre as unidades acetiladas de quitosana, bem como interações iônicas (BERGER et al., 2004; SINHA et al., 2004; LABHASETWAR, 2005; YIN et al., 2007).

3.3 Sistemas nanoparticulados

O desenvolvimento de sistemas eficientes de liberação de fármacos é um dos maiores desafios dos cientistas devido às exigências da terapia clínica. O sistema apropriado de liberação para esses fármacos deveria protegê-los do ambiente

biológico, enquanto facilitaria seu transporte através da barreira biológica. As vantagens mostradas pelas nanopartículas como uma possível forma de administração de fármacos já foram muito discutidas (WU et al., 2006; BRAVO-OSUNA; PONCHEL; VAUTHIER, 2007).

As nanopartículas poliméricas de quitosana podem apresentar diversas características, como as já citadas: baixa toxicidade, biodegradabilidade, entre outras, que lhes fazem candidatos apropriados para o desenvolvimento de sistemas de liberação eficientes. Elas também podem conter fármacos protegidos contra degradação ácida e enzimática *in vivo* e podem aumentar a permeabilidade intestinal. São sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a um micrômetro (μm) (BRAVO-OSUNA; PONCHEL; VAUTHIER, 2007; WANG et al., 2007).

O termo nanopartícula compreende as nanocápsulas e as nanoesferas, as quais diferem entre si pela organização estrutural e pela composição, podendo ser observado na **Figura 7**. As nanocápsulas são formadas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, em que o fármaco pode estar dissolvido nesse núcleo ou adsorvido a parede polimérica. Já as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICH et al., 2003a).

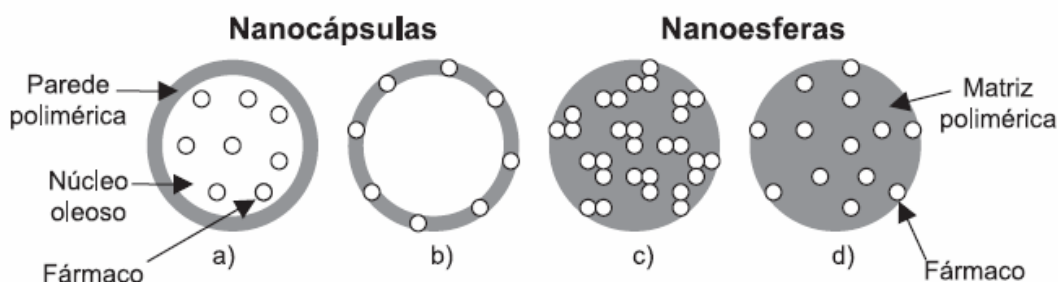


Figura 7) Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas: a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido a parede polimérica; c) fármaco retido na matriz polimérica; d) fármaco adsorvido ou disperso na matriz polimérica.

Fonte: SCHAFFAZICH et al., 2003a.

Esses sistemas têm sido desenvolvidos visando inúmeras aplicações terapêuticas, porém as administrações mais planejadas são a parenteral, a oral e a oftálmica, sendo que uma das áreas mais promissoras das nanopartículas é a vetorização de fármacos anticancerígenos e antibióticos para almejar uma

distribuição mais seletiva dos mesmos e, conseqüentemente, um aumento no índice terapêutico (SCHAFFAZICH et al., 2003a).

Embora as nanopartículas poliméricas ofereçam a flexibilidade da administração através de várias vias, a administração oral ainda é a preferida (SCHAFFAZICH et al., 2003b; PANDEY et al., 2005).

No desenvolvimento de sistemas carreadores para administração oral das nanopartículas, os estudos estão mais voltados para a diminuição dos efeitos colaterais dos antiinflamatórios não-esteroidais, como exemplo o diclofenaco, o qual causa irritação na mucosa gástrica na maioria das pessoas e na proteção de fármacos degradáveis no trato gastrintestinal, como peptídeos e hormônios. Na administração oftálmica, procura-se o controle da liberação do fármaco, o aumento na biodisponibilidade ocular e a diminuição dos efeitos colaterais (SCHAFFAZICH et al., 2003a; HANSEN; JANKOVA; HVILSTED, 2007).

3.4 Polímeros bioadesivos e bioadesividade

Polímeros bioadesivos são macromoléculas sintéticas ou naturais as quais tem a capacidade de unirem-se as superfícies de mucosas (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTONE, 2005). O conceito de polímeros bioadesivos foi introduzido na literatura farmacêutica a mais de 40 anos e hoje em dia aceita-se como uma promissora estratégia para se prolongar o tempo de residência e para aumentar a especificidade de sistemas de liberação de fármacos. Até hoje, um número considerável de trabalhos são realizados para verificar as propriedades bioadesivas de uma larga escala de materiais poliméricos (PEPPAS; SAHLIN, 1996; GRABOVAC; GUGGI; BERNKOP-SCHNURCH, 2005; TAKEUCHI et al., 2005; SZUCS et al., 2008).

A fim de se desenvolver ou melhorar materiais mucoadesivos é essencial compreender as forças e os mecanismos que conduzem a uma ligação eficaz entre um polímero e uma camada mucosa (SERRA, 2009). Várias classes de polímeros vêm sendo investigadas por apresentarem os mecanismos de bioadesão como os derivados da celulose (metil, hidroxipropil e carboximetilcelulose), ácido poliacrílico e quitosana (SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005; SOKKER et al., 2008; SZUCS et al., 2008)

Geralmente o processo envolvido no fenômeno da bioadesão pode ser descrito em três etapas: primeiro ocorre o intumescimento do polímero para permitir um contato com o tecido, depois acontece a interpenetração do polímero na camada mucosa e finalmente, a formação das ligações químicas com a mucosa (SERRA; DOMENECH; PEPPAS, 2009). Entretanto, outras teorias podem ser utilizadas a fim de explicar os mecanismos de polímeros bioadesivos como a adsorção, fratura e difusão etc. (PEPPAS; SAHLIN, 1996; SALAMAT-MILLER; CHITTCHANG; JOHNSTON, 2005)

De acordo com a teoria da adsorção, a formação de uma ligação bioadesiva é o resultado das forças de Van der Waals com ligações de pontes de hidrogênio. A teoria do intumescimento é aplicada principalmente em sistemas bioadesivos semisólidos e líquidos, e está relacionada com a habilidade de um polímero bioadesivo se ligar sobre um tecido. Esta teoria usa as tensões de superfície para calcular o coeficiente de espalhamento, que é um parâmetro indicativo das propriedades da bioadesão do polímero (PEPPAS; SAHLIN, 1996; SALAMAT-MULLER; SERRA, 2009).

A teoria da fratura, onde se avalia a força envolvida na separação da superfície do polímero com a superfície biológica após a adesão e é relacionada com a capacidade bioadesiva do polímero avaliado (PEPPAS; SAHLIN, 1996; SALAMAT-MULLER; SERRA, 2009).

A última teoria, a teoria da difusão é baseada na difusão e interpenetração de cadeias macromoleculares. Quando o polímero bioadesivo entra em contato com a mucosa, pela diferença de concentração entre a superfície mucosa e o interior do muco, provoca a difusão espontânea das cadeias do polímero no muco (SERRA, 2009; PEPPAS; SAHLIN, 1996; SALAMAT-MULLER; SERRA, 2009).

Os parâmetros cinéticos de bioadesão de sistemas bioadesivos no trato digestório são: quantidade máxima aderida (Q_{max}), que é quantidade máxima de partículas aderidas e é relacionada com a capacidade do material em desenvolver interações adesivas, a taxa de eliminação ou taxa de esvaziamento (K_{ads}), que é a taxa de eliminação da fração aderida na mucosa gastrintestinal e o tempo de residência (MRT), que é a duração da interação entre o sistema de liberação particulado e o meio biológico (ARBOS et al.; 2003)

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Purificação e caracterização da quitosana

A quitosana utilizada foi obtida comercialmente da empresa Purifarma, Lote: K041120338. Foram dispersos 10 g de quitosana em 1,5 litros de solução de ácido acético 0,5 % e agitado por 24 horas. Posteriormente foi realizada filtração a vácuo por membrana 0,22 µm (Millipore). A solução filtrada foi precipitada com 2 volumes de etanol, e seca em estufa a 40 °C e mantida em dessecador.

4.1.1 Determinação do grau de desacetilação da quitosana

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada através do teor de grupos amino (NH_2) presentes na molécula, utilizando-se o método de Broussignac (1968). Foram dispersas 250 mg de quitosana em 50 mL de HCl 0,1M e deixadas em agitação durante 24 h. Posteriormente, a dispersão foi titulada com NaOH 0,1M. Com os resultados do volume gasto e do pH, foi plotado no gráfico dois pontos de inflexão, dos quais foi calculada a primeira derivada em relação ao pH, a fim de determinar os dois picos (V_1 e V_2) em relação ao volume. O NaOH proporciona certeza na concentração da base. O grau de substituição foi determinado pela equação 1:

$$\% \text{NH}_2 = \frac{16,1 \times (V_2 - V_1) \times M}{m} \quad (\text{equação 1})$$

onde:

% NH_2 = grau de desacetilação da quitosana;

16,1 = relativo a massa molar da glicosamina;

V_1 = corresponde ao 1º pico do gráfico, referente ao volume (mL) de neutralização do ácido forte utilizado como solvente (HCl);

V_2 = corresponde ao 2º pico do gráfico, referente ao volume (mL) de neutralização do grupo NH_3^+ do polímero;

M = molaridade da base utilizada como titulante;

m = massa da amostra de polímero em solução (g).

4.2 Síntese e secagem da *N*-carboximetilquitosana (N-CMQ)

Para realizar a reação de *N*-Carboximetilação foram utilizados 1,0 L da dispersão de quitosana a 1,5 mg/mL (item 4.1). Foi medido o pH da dispersão de quitosana, o qual foi acidificado para pH ~ 4,0 com ácido acético 0,1 M. Posteriormente, foi adicionado gota a gota, utilizando funil de separação, 6,6 mL de ácido glioxílico 50%, seguido de agitação por 24 horas em temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). O pH foi ajustado para ~ 6,0 com hidróxido de sódio 0,1 M e posteriormente 200 mL de borohidreto de sódio a 5% foram adicionados, com o auxílio do funil de separação. O sistema foi mantido em agitação por mais 24 horas. A dispersão teve seu pH ajustado para 8,0 e posteriormente filtrada por membrana de 0,22 μm .

Foram sintetizados 3 lotes (lotes 1, 2 e 3) e cada lote submetido a três processos de secagem em escala laboratorial utilizando-se: atomizador (*spray-dryer* Büchi 290); liofilizador (Thermo Eletron Corporation modelo Micromodulyo) – 115 e precipitação com 2 volumes de álcool etílico comercial (96 °GL) seguido por secagem em estufa a 40 °C. Estas etapas foram realizadas pela Bolsista do PIBIC Anadiesa Guimarães, conforme descrito abaixo:

4.2.1 Precipitação com etanol

Para um volume de 100 mL de N-CMQ foi adicionado 200 mL de etanol, em agitador magnético QUIMIS – IQ221, com a amostra sob agitação magnética durante a adição de etanol. O sistema foi refrigerado a 5 °C por 2 horas, centrifugado a 1.000 xg por 10 min, descartado o sobrenadante, lavados com etanol 95 °GL e novamente centrifugados a 1.000 xg por 1 min. Posteriormente as amostras foram secas em estufa por 24 h, a 35 °C.

4.2.2 Liofilização

Para um volume de 100 mL dos lotes 1, 2 e 3, as amostras foram congeladas a -80 °C, *overnight* e liofilizadas por 48 horas em liofilizador (Thermo Eletron Corporation modelo Micromodulyo-115).

4.2.3 Atomização ou *spray-dryer*

Os Lotes 1, 2 e 3, foram secos por atomização em Spray Dryer Büchi 290, utilizando-se 200 mL dos lotes citados, nas condições abaixo descritas:

Tabela 1: Condições de Secagem por atomização dos lotes 1, 2 e 3.

Lotes	TE (°C)	TS (°C)	Pump (%)	Pi no filtro de saída	Pf no filtro de saída
1	170	77	20	- 40	- 58
2	171	81	20	- 45	- 70
3	170	85	20	- 45	- 55

TE = temperatura de entrada; TS = temperatura de saída; Pump 20 % = 7 mL/min; Pump 10 % = 3,5 mL/min. Pi = pressão inicial; Pf = pressão final. Fluxo do ar atomizador correspondente a 40 mm. Aspiração do ar em 90 %.

4.2.1 Determinação do grau de carboximetilação da N-CMQ

A determinação do grau de carboximetilação foi realizada para a N-CMQ através do método potenciométrico. Com esta técnica determinou-se o percentual de grupamentos carboximetil inseridos na quitosana através da derivatização. Foi dissolvido 0,2 g da amostra de N-CMQ em 40 mL de água destilada. Ajustou-se o pH da solução para aproximadamente 2, adicionando ácido clorídrico 0,1 M. Titulou-se a solução de N-CMQ com NaOH 0,1 M e anotou-se simultaneamente o valor de pH e volume de titulante consumido em mL. Foi calculada a primeira derivada, e os volumes referentes ao primeiro e segundo ponto de inflexão foram determinados como V_1 e V_2 , que representam o volume do titulante gasto para consumir o excesso de HCl e os grupamentos ácidos introduzido na molécula da N-CMQ, respectivamente. Usando a equação 2 foi calculado a porcentagem de carboximetilação (%CM) (PUSHPAMALAR et al., 2006).

$$\%CM = \frac{[(V_2 - V_1) \times 0,058 \times 100]}{m} \quad (\text{equação 2})$$

m

onde:

% CM = porcentagem de carboximetilação

5,8 = relativo à massa molar do grupamento carboximetil;

V_1 = neutralização do ácido utilizado como solvente (HCl) pelo NaOH

V_2 = neutralização do ácido da N-CMQ pelo NaOH

m = representa a quantidade de amostra em g.

4.3 Obtenção de nanopartículas de N-CMQ por polimerização (N-CMQ_A) e por reticulação (N-CMQ_R) com ácido acrílico

As nanopartículas de N-CMQ com ácido poliacrílico foram obtidas pela polimerização “in situ” do ácido acrílico. A N-CMQ foi dispersa em 50 mL de uma solução de ácido acrílico a 3 mmol, em relação molar de 1:1 (unidades aminoglicosídicas livres : ácido acrílico) em agitação magnética, até que a solução se tornasse límpida. Posteriormente, adicionou-se a solução, sob agitação constante, 0,1 mmol (60 mg) de persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$). O valor de pH do sistema foi mantido aproximadamente em 4,0. A polimerização foi realizada a 70 °C sob fluxo de nitrogênio (20 mL/min) e agitação magnética. Quando a suspensão apresentou-se opaca, o sistema de reação foi refrigerado, e a suspensão opaca foi filtrada com papel filtro para remover qualquer agregação macroscópica. Finalmente, o monômero residual foi removido por diálise, em uma solução tampão de PBS (pH = 4,5) por 24 horas usando membrana de diálise (HU et al., 2002; HU et al., 2005; FU et al., 2006). As nanopartículas obtidas por este método foram denominadas de N-CMQ_A.

A copolimerização de redes totais híbridas foi realizada utilizando-se o mesmo processo de síntese utilizado acima, entretanto após a adição de persulfato de potássio, adicionou-se ainda 2,7 mmol (400 mg) de N,N-metileno-bis-acrilamida, onde a reação tornou-se opaca. Após ficar opaco, o sistema de reação foi resfriado até 60 °C onde ficou em agitação magnética por mais 60 a 100 minutos. Essa suspensão opaca também foi filtrada com papel filtro para remover qualquer agregação macroscópica e depois realizada a diálise em uma solução tampão de PBS (pH = 4,5) por 24 horas usando uma membrana de diálise para remoção do

monômero residual. As nanopartículas obtidas por este método foram denominadas de N-CMQ_R (HU et al., 2005).

4.3.1 Avaliação da acrilção da N-CMQ em tempo real

A N-CMQ foi dispersa em 50 mL de uma solução de ácido acrílico, em relação molar 2:1 (unidades aminoglicosídicas livres: ácido acrílico) em agitação magnética, até que a solução se tornasse límpida. Posteriormente, adicionou-se a solução, sob agitação constante 0,1 mmol (60 mg) de persulfato de potássio (K₂S₂O₈). O valor de pH do sistema foi mantido aproximadamente em 4,0. A polimerização foi realizada a 70 °C sob fluxo de nitrogênio (20 mL/min) e agitação magnética.

Durante a reação, utilizando-se uma bomba Shimadzu LC-20AT alíquotas foram removidas do reator, a um fluxo de 1 mL/min, seguido por fluxo para os detectores de espalhamento de luz multi-angulos (Brookhaven BI-MwA), um detector de índice de refração (Waters RI) e um capilar viscosimétrico (Brookhaven viscometer). O espalhamento de luz dinâmico foi acompanhado em equipamento BI-90 plus (Brookhaven), a 90° de detecção, utilizando-se pequenas alíquotas (1 mL) removidas do reator.

4.4 Formação dos derivados e nanopartículas fluorescentes

A formação de derivados e nanopartículas fluorescentes foi adaptada da metodologia de Zhang et al. (2008), onde 300 mg de partículas N-CMQ_A e N-CMQ_R, foram dispersos em 150 mL de água e o pH foi ajustado para 7,0. Posteriormente, 21 mg de isotiocianato de fluoresceína (FITC) foi adicionado ao sistema reacional, mantendo-se em agitação por 24 horas e feito diálise por 48 horas contra água destilada. Os derivados, aqui denominados de N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC foram utilizados sem prévia secagem, e armazenados a -20 °C até o momento do experimento.

A quantificação da incorporação de FITC nos derivados N-CMQ-FITC, N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC foi realizada utilizando-se uma curva padrão de 0,03 a 30 mg de isotiocianato de fluoresceína, com excitação em 480 nm e emissão em 540 nm, com leitura em leitor de Microplacas Genius Pro, com uma equação de reta $Y = -6739 + 8171X$, $n=5$, $r=0,99$. A fluorescência das partículas foram determinadas

para quantificar o teor de fluoresceína incorporado, bem como quantificar a massa de partículas aderidas no trato digestório de ratos Wistar, com correção das diluições aplicadas.

4.5 Caracterização dos polímeros e partículas

4.5.1 Caracterização por espectroscopia de infravermelho (IV)

As amostras foram caracterizadas por análise de espectroscopia de infravermelho, realizadas em um aparelho espectrômetro Hartmann e Braum MB-serie, usando KBr como suporte em uma faixa de varredura de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 2 cm^{-1} . Foram utilizados 2 mg das amostras e 100 mg de KBr para a confecção das pastilhas.

4.5.2 Caracterização por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear ^{13}C

Os espectros de ^{13}C RMN foram obtidos utilizando-se instrumento Bruker AVANCE – DRX – 400, utilizando amostras a 20 mg/mL em D_2O com ácido acético deuterado ou DMSO deuterado como solvente, temperatura de 70 $^{\circ}\text{C}$, e os deslocamentos químicos em ppm. Estes resultados foram obtidos no Departamento de Bioquímica da UFPR, em colaboração com a prof. Dr^a. Carmen Lúcia Petkowitz (UFPR)

4.5.3 Espalhamento de luz dinâmico

Foi utilizado um aparelho de espalhamento de luz multi-ângulos da marca Brookhaven Instruments Co., modelo BI 9000 com um laser He-Ne de 632,8 nm. Um erro menor que 0,3% foi considerado satisfatório para as análises. As soluções das amostras, em concentrações de aproximadamente 1 mg/mL, em água purificada por MilliQ[®], foram filtradas (0,22 μm) diretamente em um vial cilíndrico de 25 milímetros no diâmetro, que é imerso em um banho de decalina ($\text{C}_{10}\text{H}_{18}$), na temperatura de 25

°C. A análise foi feita em 25 °C usando o ângulo de 90 °C como referência. As amostras foram realizadas diretamente após a síntese dos derivados, ou por ressuspensão dos polímeros ou partículas em concentrações de 1 mg/mL em água foram dissolvidas em água purificada por MilliQ® ou NaCl 0,1 M, e filtradas ou não por membranas de 0,22 µm. Os resultados foram avaliados pelo software do fabricante (Brookhaven) e pelo método de Contin (WANG et al., 2007).

4.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliar a morfologia e o tamanho aparente das partículas foi utilizado Microscópio Eletrônico de Varredura Marca Philips, modelo XL30. Para a análise microscópica as amostras foram recobertas com ouro (350 Å) sob vácuo. Este experimento foi realizado na UFSC, com colaboração da prof.^a Daisy J. Aguilar Netz.

4.5.5 Analise termogravimétrica (TG) e de varredura diferencial de temperatura (DSC)

Os experimentos termogravimétricos e de varredura diferencial de temperatura foram realizados em equipamento Netzsch Preteus Thermal em taxa de aquecimento de 10 K/min em rampa dinâmica de 30 a 600 °C, utilizando cadinho de alumina e atmosfera inerte de N₂ como gás de purga (50 mL/min) e proteção (20 mL/min).

4.5.6 Avaliação da Biocompatibilidade com células L929

As células de fibroblastos L929 foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (*RJCB Collection*). As células cresceram em meio MEM (*minimum essential medium*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino e 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina em estufa a 37 °C, com 5 % de CO₂ e 95 % de ar.

As amostras de polímeros ou nanopartículas em estudo, em concentrações crescentes de 0,1 a 1000 µg/mL, foram dissolvidas em meio de cultura e suplementado com L-glutamina e esterilizadas por filtração por 0,22 µm.

Foram plaqueadas 20.000 células/poço, com suspensão celular padronizada por contagem em câmara de Neubauer, utilizando corante vital azul de tripan 0,4%, e posteriormente as células foram incubadas por 24 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após este período, ao meio de cultura (180 µL) foi adicionado 20 µL das amostras e incubadas por 24 horas, em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após este período o meio contendo as amostras em estudo foi removido e substituído por 200 µL de MEM sem soro fetal bovino. Em seguida, foi adicionado 20 µL da MTT estéril, filtrado em solução tampão PBS, pH 7,4 (5 mg/mL), para gerar concentração final de 0,5 mg MTT/mL. Após 4 horas, o corante não reativo foi removido, e os cristais de formazan insolúveis foram dissolvidos em 200 µL/poço de DMSO. A determinação foi realizada espectrofotometricamente a 550 nm utilizando leitora de microplaca Asys Hitech (INVITTOX/ERGATTE/FAME, 1990).

A viabilidade relativa das células relacionadas ao controle foi calculada como:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Absorbância das Amostras}}{\text{Absorbância Controle Negativo (meio MEM)}} \times 100 \text{ (equação 3)}$$

4.5.7 Ensaios de bioadesão

4.5.7.1 Delineamento experimental

Para os experimentos de bioadesão das nanopartículas N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC, por gavagem, foram utilizados ratos machos Wistar. Os animais foram mantidos no laboratório de farmacologia da UNIVALI, mantidos em sala com controle de temperatura 22 ± 2 °C e luminosidade artificial com ciclo de 12 h claro-12h escuro. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e à alimentação antes do experimento. Durante o experimento os animais foram mantidos em jejum por 16h. Durante este trabalho as normas do Nacional Research Council – NRC (NRC, 2003) foram atendidas. O presente projeto foi aprovado no comitê de ética em pesquisa (CEP) da UNIVALI sob número 492/08 de 21/11/2008.

4.5.7.2 Grupos de animais estudados

A pesquisa foi realizada com três grupos de animais, com cinco animais por grupo, para cada nanopartícula (N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC) mais o controle, para os tempos de 1 h, 5,5 h e 8 h. Os animais receberam por via oral (gavagem), um mL em dose única.

4.5.7.3 Procedimento de administração das partículas e coleta do trato digestório

As amostras de N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC foram preparadas na hora do uso, dispersas em água, e preparadas na concentração de 10 mg/mL. Após a dissolução (agitação por 16 h) as partículas foram sonicadas por 5 min em banho de ultrassom.

A administração das nanopartículas foi realizada por gavagem, com auxílio de sonda metálica acoplada a uma seringa plástica de 1 mL.

O trato digestório foi obtido após decaptação dos animais nos tempos de 1 h, 5,5 h e 8 h, sem prévia anestesia. O trato digestório foi removido e lavado com um volume de PBS de 40 mL estômago (3X) e 60 mL intestino (3X). Posteriormente o trato digestório foi dividido em estômago, intestino inicial ou duodeno (15 cm), intestino médio ou jejuno (30 cm) e intestino final ou íleo (15 cm). Após a separação do estômago, duodeno, jejuno e íleo, as amostras foram segmentadas em unidades de 2 cm, e realizada a digestão com 3, 5, 10 e 5 mL de NaOH 3N, respectivamente. Após 24 h de incubação a temperatura ambiente, os tecidos foram misturados em vortex com um volume de 2X metanol, centrifugado a 1.000 xg/10 min, e aliquoteado, protegido da luz, a -20 °C, e essa solução extrativa foi utilizada para análise por fluorescência.

4.5.7.4 Quantificação da bioadesão

As nanopartículas de N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC foram quantificadas por espectrofluorimetria (GENIUS Pro) em comprimento de onda de excitação (480 nm) e emissão (538 nm), a temperatura de 25 °C, utilizando-se placa de 96 poços *black*, com 200 µL da solução extrativa.

4.5.7.5 Análise não-compartmental da bioadesão

Os parâmetros cinéticos da bioadesão das nanopartículas N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC foram realizadas utilizando-se a metodologia descrita por Arbós et al. (2002) e Arbós et al. (2003), a partir dos perfis de massa total de nanopartículas aderidas no trato digestório por tempo, com auxílio do programa Origin[®] 5.0.

A k_{ads} foi determinada pelo gráfico de logaritmo de massa total de nanopartículas aderidas em função do tempo, sendo referente a:

$$k_{ads} = - (\text{coeficiente angular}) \times 2,303 \quad (\text{Equação 4})$$

onde:

k_{ads} = constante de adsorção no trato digestório (h^{-1}).

Para determinação dos parâmetros de bioadesão, foram utilizadas as curvas de massa de nanopartículas aderidas *versus* tempo e a área sob a curva do tempo zero até a última concentração determinada (ASC_{0-t}) foi calculada pelo método trapezoidal. A $ASC_{0-\infty}$ obtida pela somatória de ASC_{0-t} com a última concentração/ k_{ads} . A área sob a curva no primeiro momento ($ASMC_{0-t}$) foi calculada pelo método trapezoidal, considerando concentração *versus* tempo. A $ASMC_{0-\infty}$ foi obtida pela somatória da $ASMC_{0-t}$ com a última concentração/ k_{ads} . Utilizando-se as razões de $ASMC_{0-\infty}$ por $ASC_{0-\infty}$ fornece o tempo de residência médio (MRT).

$$MRT = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad (\text{Equação 5})$$

4.5.7.6 Análise microscópica da bioadesão

Para as análises microscópicas, um animal controle, um animal para as partículas N-CMQ_A-FITC e um para as partículas N-CMQ_R-FITC foram mantidos em jejum de ração por 24 horas, com posterior administração de 1 mL, por gavagem, das nanopartículas a 10 mg/mL. Para o controle foi administrado 1 mL de tampão acetato pH 6. Após uma hora, os animais foram mortos em câmara de CO₂. O tecido (estômago) foi removido, lavados três vezes com tampão salino fosfato 0,1 M (pH 7,4).

As amostras foram fixadas em solução de p-formaldeído 4% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4, por 15 min e posteriormente transferidas, sequencialmente, para soluções de glicose 10, 20, 30% em tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por 8 horas cada, em geladeira. Foram realizados cortes do estômago, e em porções de 0,5 cm da 1^a, 2^a e 3^a porção do intestino delgado.

Os cortes foram realizados por criomicrotomia, orientando-se a superfície do corte de maneira transversal. Após a identificação das lâminas, os cortes foram fixados no porta objeto com TISSUE TEK e realizados os cortes em criomicrotomo com espessura de 20 µm. As lâminas foram avaliadas por microscopia de fluorescência para identificação da bioadesão, utilizando-se Microscópio Óptico fluorescência Olympus CKX41. Os testes foram realizados com auxílio da técnica Ana Paula Souza, no Laboratório de Histologia do Curso de Odontologia da UNIVALI.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese, secagem e caracterização dos derivados da N-CMQ

Previamente aos estudos de modificação química da quitosana (QS), a mesma foi dispersa em ácido acético e filtrada por membranas 0,22 µm para remoção de material particulado insolúvel e agregados macroscópicos. Posteriormente, o filtrado foi tratado com etanol, seguido de secagem do precipitado em estufa a 40 °C.

A QS processada, foi caracterizada pelo grau de desacetilação (GA) por titulação potenciométrica. O grau de desacetilação apresentado foi de 85 %. Resultados semelhantes foram obtidos por Felicio e colaboradores (2008), com um GA de $87,3 \pm 1,4\%$. Já Miranda e colaboradores (2006) obtiveram um grau de desacetilação de 90,2%.

A N-CMQ, obtida a partir da QS processada e seca por precipitação etanólica, foi sintetizada em três lotes independentes (Lote 1, 2 e 3) e posteriormente seca por três diferentes processos: precipitação etanólica, atomização ou *spray-dryer* e liofilização.

O rendimento da síntese foi de aproximadamente 100 % para a precipitação etanólica e superior a 100% para a secagem por atomização e liofilização. Sugere-se que um rendimento tão elevado está relacionado com a co-secagem de reagentes utilizados na síntese, como o NaOH utilizado para ajuste de pH por exemplo. Para esta amostra não foi realizado diálise.

A microscopia de varredura das amostras secas por atomização (**Figura 8A**); precipitação etanólica (**Figura 8B**) e liofilização (**Figura 8C**) é apresentada na figura 8.

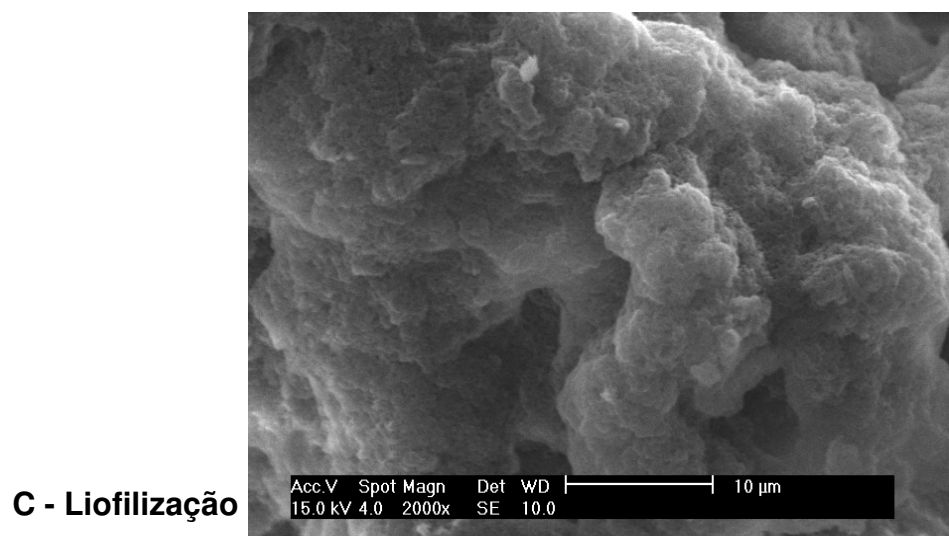
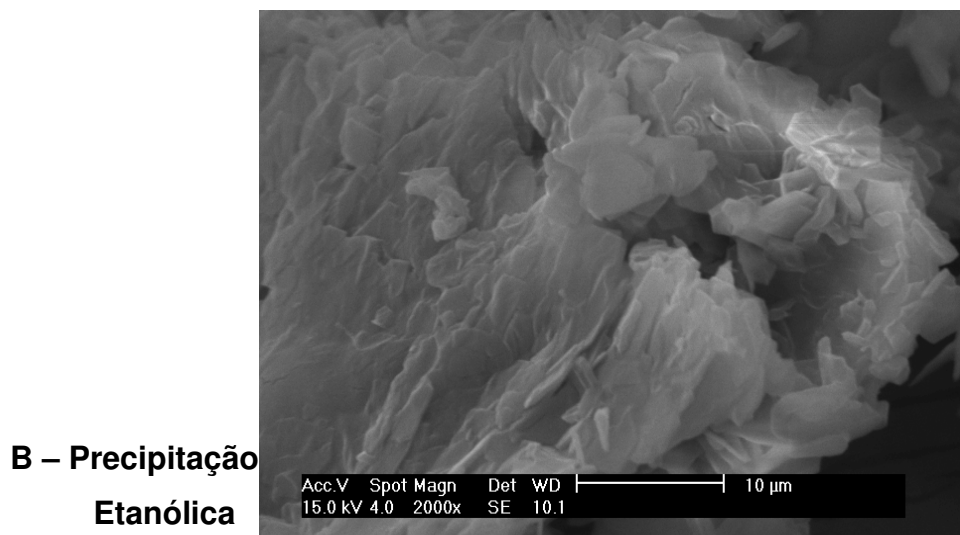
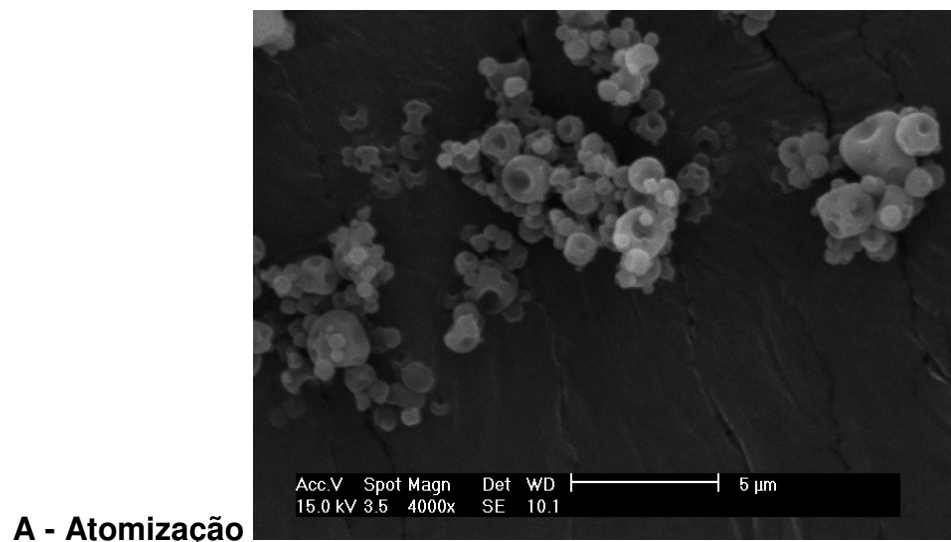


Figura 8) Micrografia eletrônica de varredura das amostras de N-CMQ secas por A) atomização em aumento de 4.000X; B) precipitação etanólica em aumento de 2000X e C) liofilização em aumento de 2000X.

Como observado, a secagem por atomização gerou partículas esféricas, deformadas quando submetidas ao vácuo durante as análises microscópicas (**Figura 8A**). O derivado precipitado com etanol apresentou um aspecto escamoso (**Figura 8B**), e material seco por liofilização um material denso-compacto (**Figura 8C**).

A *N*-carboximetilação da quitosana (N-CMQ) foi confirmada por espectrometria de infravermelho, comparando-se o espectro da QS (**Figura 9 A**) com os espectros da N-CMQ secas por liofilização (**Figura 9 B**), atomização ou *spray-dryer* (**Figura 9 C**) e precipitação etanólica (**Figura 9 D**).

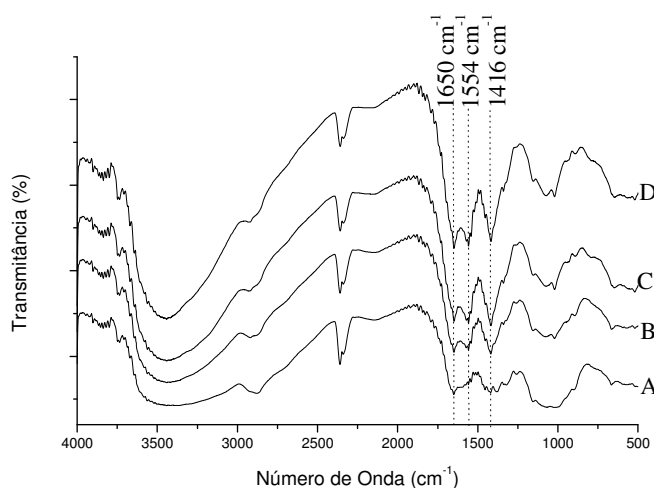
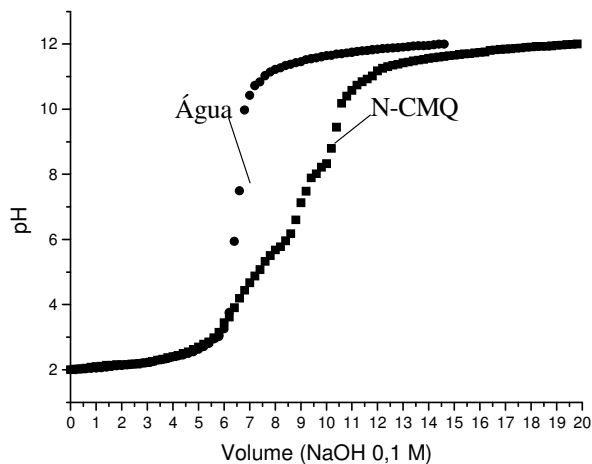


Figura 9) Espectro de infravermelho das amostras de A) QS; B) N-CMQ seca por liofilização; C) N-CMQ seca por atomização e D) N-CMQ seca por precipitação etanólica. As pastilhas foram preparadas com 2 mg das amostras e 100 mg de KBr. Para a N-CMQ foi utilizado o lote 1 para a confecção das pastilhas.

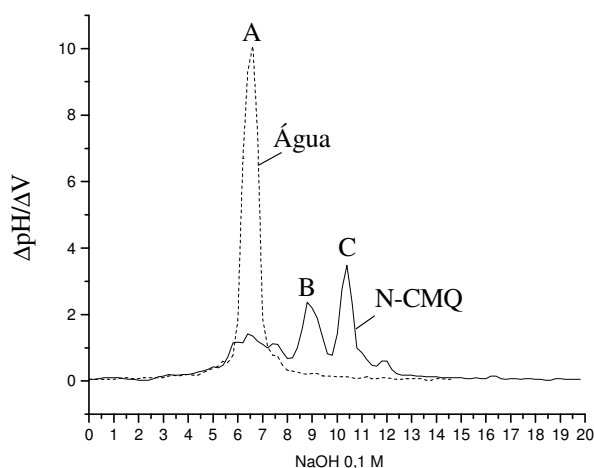
O íon carboxilato, apresenta duas bandas características, uma banda forte assimétrica, entre 1650 e 1550 cm^{-1} , e uma fraca, devido a estiramento próximo a 1400 cm^{-1} . Um estiramento em 1650 cm^{-1} pode estar também ao estiramento de carbonila, com elevada interação intermolecular por pontes de hidrogênio (SILVERSTEIN; BASSLER; MORRILL, 1991).

Após a caracterização da carboximetilação por espectroscopia de infravermelho, foi determinado a porcentagem de carboximetilação (CM%) da N-CMQ. Entretanto, devido à contaminação das amostras atomizadas e liofilizadas

com subprodutos das sínteses, o CM% foi determinado apenas para o produto seco por precipitação etanólica (**Figura 10A e B**).



1



2

Figura 10) Titulação potenciométrica (1) e primeira derivada ($\Delta\text{pH}/\Delta\text{V}$) (2) para o derivado de N-CMQ seco por precipitação etanólica, utilizando-se 200 mg do derivado, em 40 mL de água, pH inicial ~2 e pH final ~11, utilizando-se como titulante o NaOH 0,1 M. Como controle foi utilizado 40 mL de água, pH inicial ~2 e pH final ~11.

Na curva de titulação potenciométrica foram observados em **A** (**Figura 10-2**) o evento relacionado a neutralização do ácido forte, utilizado como solvente, em **B** a neutralização do ácido fraco e em **C** o grupo amino remanescente da quitosana. A porcentagem de CM% foi de 60%, resultado praticamente igual à de Felício e colaboradores (2008). Já Miranda e colaboradores (2006) demonstraram um grau de carboximetilação de 18,5%.

Apesar da presença de sais no sistema submetidos a diferentes processos de secagem, com propósito de caracterização das amostras foi determinado o raio hidrodinâmico da N-CMQ, conforme apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Média e desvio padrão do raio hidrodinâmico (nm) das amostras de N-CMQ secas por processos de precipitação etanólica, liofilização e *spray dryer* dispersas a 1mg/mL em NaCl 0,1 M por 24 horas.

Amostras	Raio hidrodinâmico (nm)
Precipitação Etanólica	
Lote 1	68,5
Lote 2	70,5
Lote 3	89,5
Média \pm DP	76,2 \pm 11,6
Liofilização	
Lote 1	98
Lote 2	177
Lote 3	Indisperssível
Média \pm DP	137,5 \pm 55,8
Atomização	
Lote 1	68,9
Lote 2	70,8
Lote 3	83,3
Média \pm DP	74,4 \pm 7,8

Observa-se na **Tabela 2**, que o processo de secagem por liofilização pode gerar polímeros mais agregadas que a precipitação etanólica e atomização. O Lote 3 da secagem por liofilização foi praticamente indisperssível, sugerindo novamente a formação de sistemas altamente agregados.

O raio hidrodinâmico (R_h) para o polímero seco por precipitação etanólica foi de 76,2 nm, semelhante ao obtido por Felicio e colaboradores (2008) para um derivado N-CMQ com grau próximo de carboximetilação, seco por precipitação etanólica, com um R_h de 78 nm.

A agregação observada por espalhamento de luz dinâmico da N-CMQ seca por diferentes métodos foi confirmada através da determinação da dimensão fractal (D_f) (**Figura 11**).

Os sistemas poliméricos apresentam concentrações poliméricas alteradas, uma vez que não há presença apenas de polímeros no produto seco por atomização e liofilização e por isso foi utilizada a técnica de espalhamento de luz estático para determinar as dimensões fractais (D_f) e conseqüentemente o grau de agregação gerado pelo processamento. Matematicamente isso é possível pois o raio de giro (R_g) utilizado para calcular a dimensão fractal independe de concentração, permitindo assim uma comparação da agregação dos sistemas, mesmo em meios onde a concentração é desconhecida (ROSS-MURPHY, 1994).

$$N \sim R_g^{D_f} \quad (\text{Equação 6})$$

$$I(q) \sim q^{-D_f} \quad (\text{Equação 7})$$

Onde: N é o numero de moléculas no agregado, R_g é o raio de giração em nanômetros determinado por espalhamento de luz estático e D_f é a dimensão fractal. O $I(q)$ é a intensidade de luz espalhada em função do vetor de onda (q). Os resultados dessa equação estão apresentados na **Figura 11**.

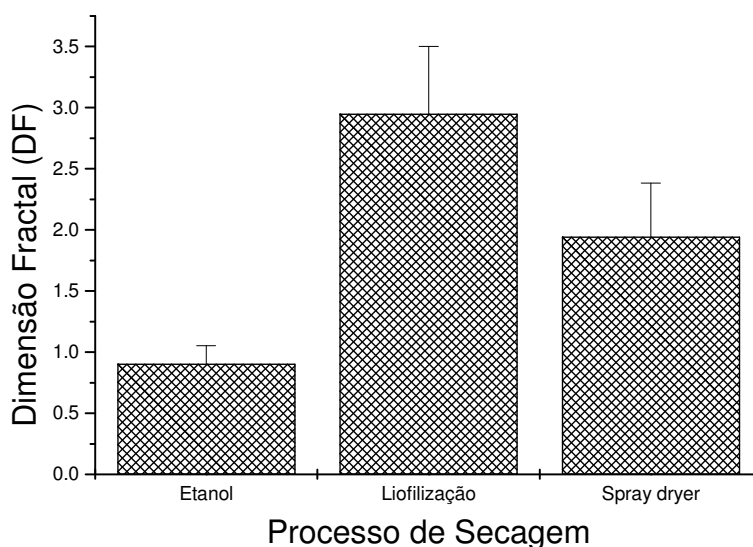


Figura 11) Dimensão fractal das amostras de N-CMQ secas por etanol, liofilização e *spray dryer*, dispersas em NaCl 0,1 M a 1mg/mL, filtradas por 0,22 μm (filtro millipore[®]).

As dimensões fractais apresentadas na **Figura 11** devem estar dentro dos domínios de espaço, ou seja maior que um e menor que três. Como pode-se observar, a amostra seca em etanol apresenta uma dimensão fractal de 1, o que indica ausência de agregados. Geometricamente, um D_f de 2, como para a amostra seca por atomização, representa uma superfície curvada ou superfície circular, indicando agregados com geometria esférica ou cilíndrica. Para agregados com D_f de 3, o espaço está completamente ocupado pelo agregado, representando que o mesmo comporta-se como um corpo único, sólido ou partícula. Tais agregados compactos foram observados para as amostras secas por liofilização (YIN et al., 2008).

Os resultados de agregação sugerem a utilização do polímero obtido por precipitação alcoólica, devido a um rendimento mais coerente (~100%), sugerindo menor contaminação por resíduos dos reagentes utilizados durante a síntese da N-CMQ, bem como pelo menor grau de agregação das partículas apresentado. Desta forma, o termo N-CMQ utilizado a partir de agora será relacionado ao polímero precipitado com etanol.

5.2 Síntese, secagem e caracterização dos derivados N-CMQ acrilados e reticulados

Utilizando-se o derivado N-CMQ com CM de 60% e obtido por precipitação etanólica, foram sintetizados os derivados N-CMQ acrilados (N-CMQ_A) e N-CMQ reticulados (N-CMQ_R).

Primeiramente, a N-CMQ foi dispersa em água e ao sistema foi adicionado ácido acrílico, em uma relação molar igual (1:1) ou a metade (1:2) aos de N-CMQ. O pH ácido, pH ~ 4,0, gerado pela adição de ácido acrílico ao reator, é essencial para protonação dos grupos amino e formação da interação iônica com ácido acrílico (contra íons). Tal organização iônica permite que após a adição de persulfato de potássio, ocorra a polimerização do ácido acrílico em ácido poliacrílico, utilizando como molde a estrutura ionizada dos grupos amino livres remanescentes da N-CMQ (**Figura 12**).

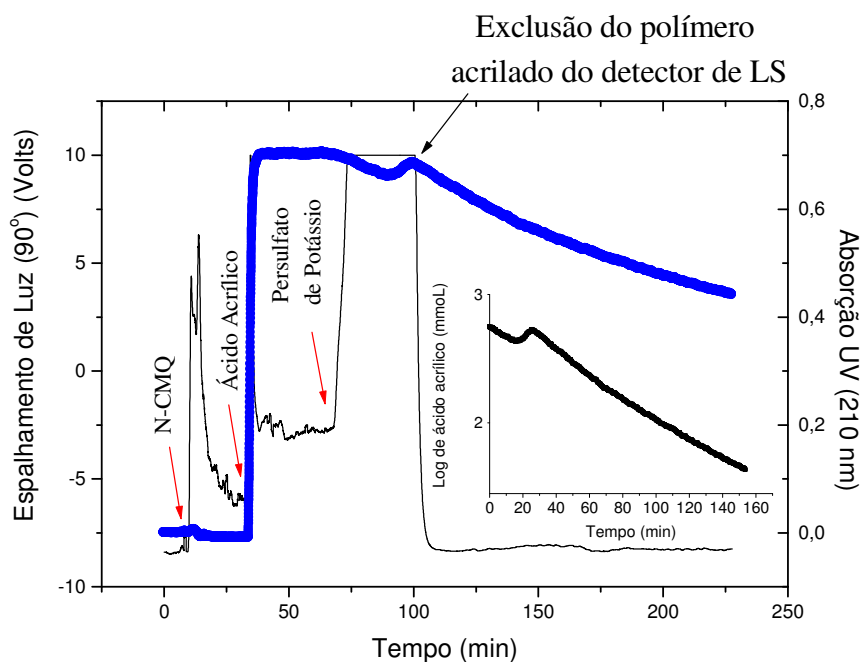


Figura 12) Espalhamento de luz (90°) e Absorção no UV a 210 nm durante a síntese do híbrido N-CMQ com ácido acrílico. Utilizando-se N-CMQ em água (5,55 mmol), ácido acrílico (2,57 mmol), e persulfato de potássio (0,1 mmol). O meio reacional foi mantido a 70°C , sob fluxo constante de nitrogênio. **Inserto:** Conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico em função do tempo, considerando-se tempo zero o momento da adição de 0,1 mmol de persulfato de potássio. Concentração de N-CMQ (5,55 mmol), temperatura de 70°C , fluxo de nitrogênio (20 mL/min).

A adição de persulfato de potássio (**Figura 12**) gerou imediatamente a polimerização do ácido acrílico na molécula de N-CMQ, transformando em ácido poliacrílico. Houve a exclusão da partícula formada pelo detector de espalhamento de luz, uma vez que um filtro de proteção de $0,22\ \mu\text{m}$ foi adicionado ao sistema de bombeamento, com posterior redução da intensidade de espalhamento após 100 min. Entretanto, o detector de ultravioleta, monitorou a queda da absorbância do monômero do ácido acrílico, sendo que esta foi utilizada para determinar a taxa de conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico (**Figura 12- inserto**).

Utilizando um modelo matemático de primeira ordem (**Figura 12- inserto**), foi possível determinar a constante de conversão ($k_{\text{conversão}}$) de ácido acrílico em ácido poliacrílico na presença de N-CMQ como de $3,2 \times 10^{-3} \pm 4,0 \times 10^{-6}$ mmol/min ($R = -0,99$, $n = 7500$, $p < 0,0001$).

A proporção ácido acrílico:N-CMQ utilizada foi de 1:1 ou 1:2, uma vez que em proporções maiores de ácido acrílico o mesmo polimerizava-se com formação de

partículas mensuráveis por espalhamento de luz estático e com precipitação de um material esbranquiçado durante a reação. A relação proposta também é justificada para a N-CMQ, uma vez que a mesma apresenta 60% dos grupos amino carboximetilados, o que não justifica a utilização de uma relação molar superior.

Na **Figura 13** foi observada a polimerização do ácido acrílico em ácido poliacrílico na ausência do derivado N-CMQ.

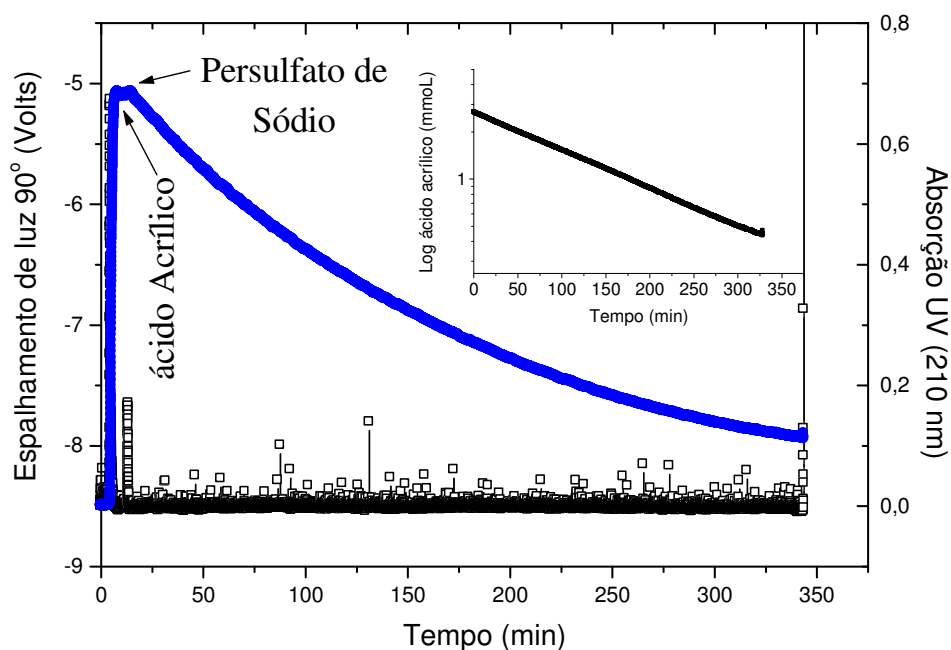


Figura 13) Espalhamento de luz (90°) e Absorção no UV a 210 nm durante a síntese do de ácido poliacrílico. Utilizando-se ácido acrílico (2,57 mmol), e persulfato de potássio (0,1 mmol). O meio reacional foi mantido a 70°C , sob fluxo constante de nitrogênio.

Uma interessante observação é a de que, ocorre um discreto aumento do espalhamento de luz em função do tempo, durante a reação de polimerização, indicando a formação de cadeias poliméricas de baixa massa molar, diferentemente do observado na presença de N-CMQ.

A $k_{\text{conversão}}$ de ácido acrílico para ácido poliacrílico, na ausência de N-CMQ foi de $5,5 \times 10^{-3} \pm 5,82e^{-7}$ mmol/min ($R = -0,999$, $n = 7400$, $p < 0,0001$). Desta forma, em termos estatísticos, pode-se afirmar que a reação de conversão é 1,59 vezes superior para o ácido acrílico isoladamente ($p < 0,001$) (**Figura 13 inserto**), sugerindo que a conversão não é necessariamente facilitada pela presença da N-CMQ, mas que a organização dos contra-íons de ácido acrílico pela N-CMQ auxilia na formação

do polímero ácido poliacrílico, uma vez que para o sistema reacional utilizando apenas ácido acrílico, nenhum acréscimo de massa molar foi observado por espalhamento de luz estático (**Figura 13**).

A confirmação da formação de sistemas particulados para a N-CMQ_A foi também confirmada por espalhamento de luz dinâmico com um aumento de diâmetro da partícula em função do tempo reacional (**Figura 14**). Para o sistema com polimerização do ácido acrílico isolado para formação de ácido poliacrílico (APA), observaram-se partículas apenas em 280 min, com a formação de uma estrutura com 120 nm de diâmetro (**Figura 14**).

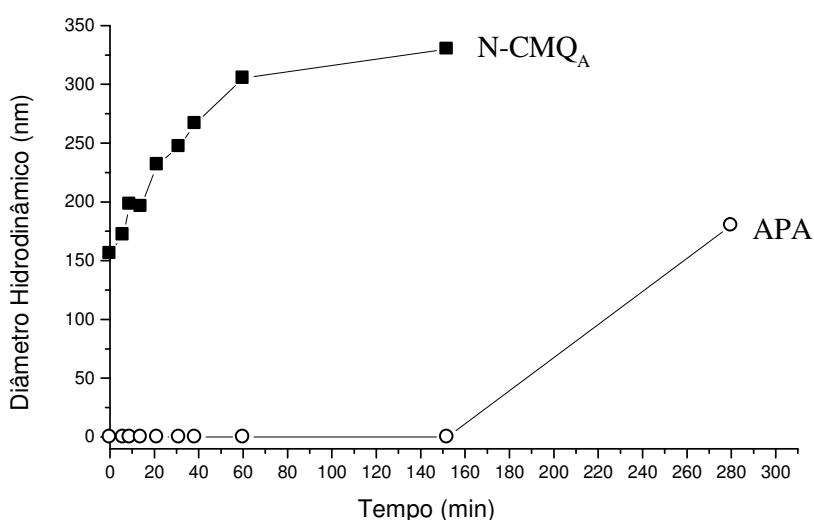


Figura 14 Diâmetro hidrodinâmico (nm) em função do tempo de reação para conversão de ácido acrílico em ácido poliacrílico, para o sistema híbrido N-CMQ e ácido poliacrílico (N-CMQ_A) e para ácido poliacrílico isolado. Considera-se tempo zero o momento da adição de 0,1 mmol de persulfato de potássio. Concentração de N-CMQ (5,55 mmol), temperatura de 70°C sob fluxo de nitrogênio.

Em trabalhos como o de Hu e colaboradores (2002), os resultados mostraram que o diâmetro hidrodinâmico foi menor que 300 nm, para o híbrido quitosana-ácido poliacrílico. Além disso, o diâmetro de distribuição das nanopartículas foi o menor quando a relação quitosana:ácido acrílico foi igual a 1:1. Este resultado sugere que a relação de quitosana com ácido acrílico tem influência no tamanho médio da partícula, uma vez que relações maiores geraram nanopartículas com diâmetros maiores.

Posteriormente as partículas de N-CMQ acriladas foram tratadas com *N,N*-metileno-bis-acrilamida, a fim de formar os derivados N-CMQ reticulados (N-CMQ_R), que após um processo de diálise em uma solução tampão de PBS (pH = 4,5) por 24

horas foram secas por *spray-dryer*. Devido a formação de sistemas agregados, após a síntese, ocorreu a filtração das amostras por papel de filtro, para remoção de grandes agregados.

Na **Figura 15**, mostra-se uma foto ilustrativa da aparência dos sistemas de N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R.

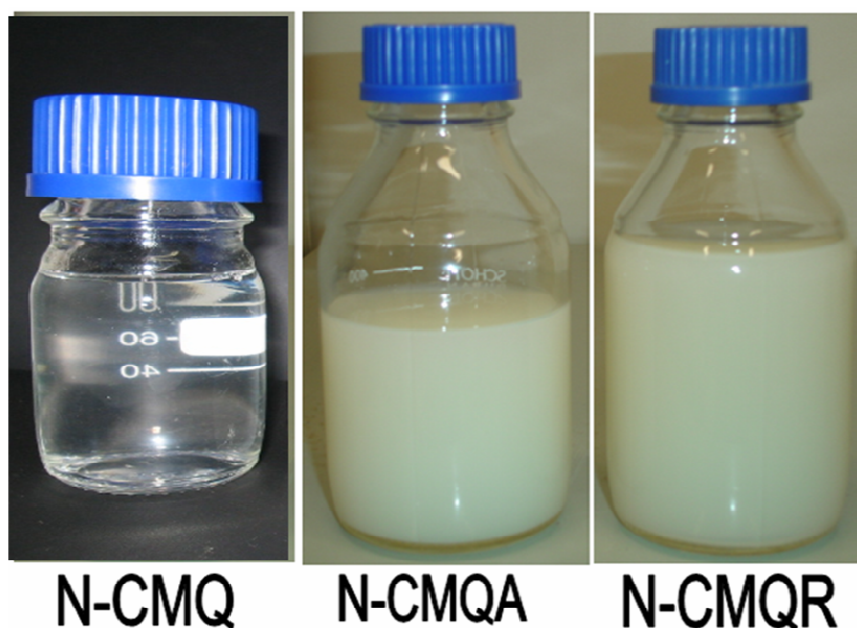


Figura 15) Foto ilustrativa da aparência das dispersões poliméricas para N-CMQ, N-CMQ acrilada (N-CMQ_A) e N-CMQ reticulada (N-CMQ_R).

Os produtos secos por atomização foram caracterizados por infravermelho, conforme **Figura 16**. O estiramento próximo a 1650 cm^{-1} aumenta para os derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R, o que pode estar relacionado ao estiramento da carbonila, com elevada interação intermolecular por pontes de hidrogênio (SILVERSTEIN, BASSLER, MORRILL, 1991), confirmando o enxerto polimérico com ácido poliacrílico. Também se observa uma redução da deformação angular de amina em 1550 cm^{-1} , bem como em 1410 cm^{-1} .

Hu e colaboradores (2002) sintetizaram sistemas híbridos de quitosana com ácido poliacrílico avaliaram os resultados por espectroscopia de infravermelho. Os autores observaram para a quitosana bandas de deformação angular de amina em 1586 cm^{-1} e de amino protonado em 1410 cm^{-1} . Segundo os mesmos, ocorre um decréscimo dessas bandas quando estão em complexo de quitosana com o ácido poliacrílico, com aumento da intensidade de bandas relativas ao grupo carboxil em 1628 cm^{-1} .

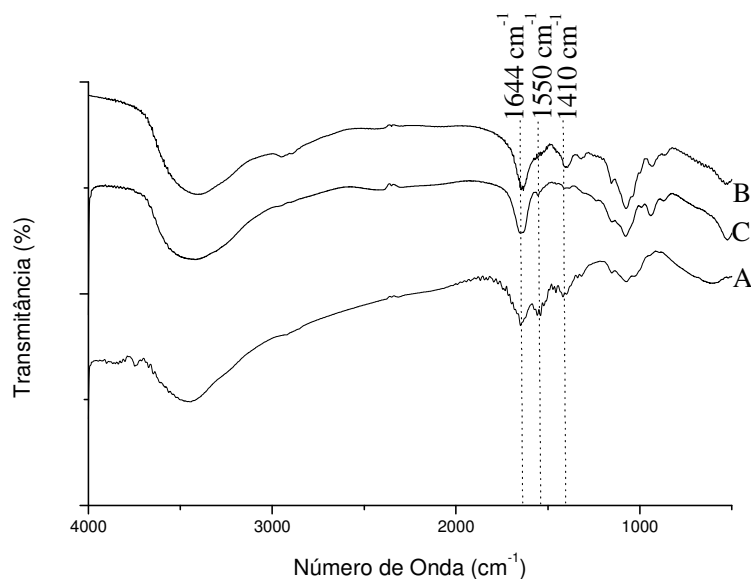


Figura 16) Espectro de infra-vermelho das amostras de A) N-CMQ, B) N-CMQ_A e C) N-CMQ_R. As pastilhas foram preparadas com 2 mg das amostras e 100 mg de KBr.

As modificações químicas de *N*-carboximetilação e de acilação e reticulação também foram confirmadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ¹³C, conforme apresentado na **Figura 17**.

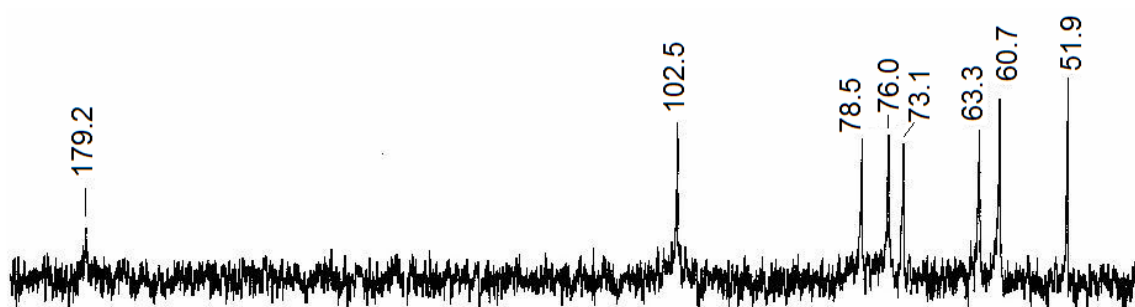


Figura 17) Espectro de ¹³C-RMN de N-CMQ a 20 mg/mL, em D₂O como solvente, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.

Os deslocamentos químicos apresentados no espectro de ¹³C-RMN para N-CMQ, em 179,2 e 51,9 ppm foram relacionados aos grupos COO⁻ e carbonos metilênicos, respectivamente. Em aproximadamente 60,7 ppm pode-se observar a presença do C-2 não carboximetilado. Os deslocamentos em 102,5; 78,5; 76; 73,1 e 63,3 ppm foram relacionados aos carbonos 1, 4, 5, 3 e 6. Resultados semelhantes

foram observados por Bauman e Faust (2001); Chen e Park (2003); Miranda e colaboradores (2006) e Felício e colaboradores (2008).

Os espectros de ^{13}C -RMN das partículas N-CMQ_A e N-CMQ_R são apresentadas na **Figura 18**.

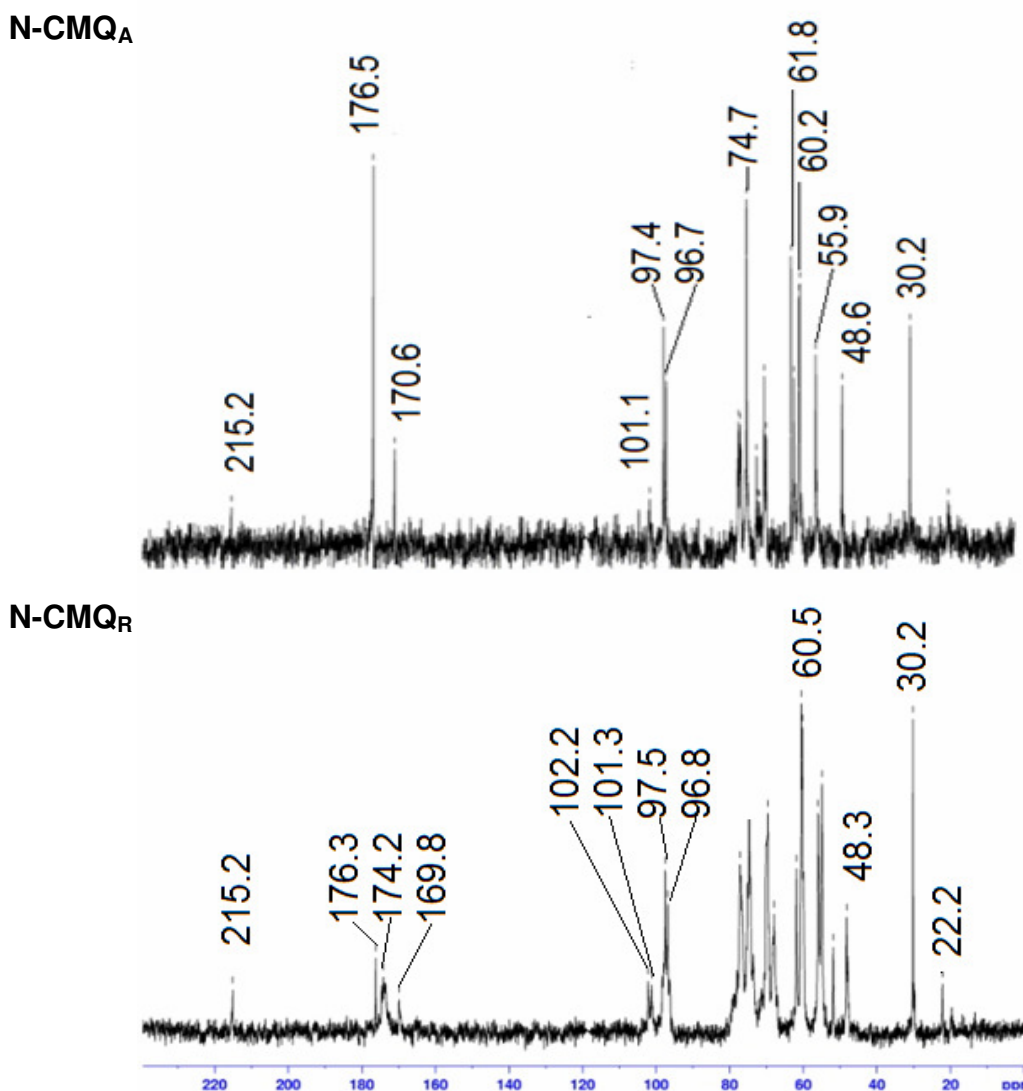


Figura 18) Espectro de ^{13}C -RMN de N-CMQ_A e N-CMQ_R a 20 mg/mL, em D₂O com 0,1% de ácido acético deuterado como solvente, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.

Como o melhor solvente para as análises de RMN para as partículas N-CMQ_A e N-CMQ_R foi o D₂O com 0,1% de ácido acético deuterado, os deslocamentos químicos do ácido acético foram determinados em aproximadamente 176 e 20 ppm

(dados não apresentados). Silverstein, Bassler, Morrill (1991) descrevem os mesmos deslocamentos químicos para o ácido acético.

Em campo de baixa frequência, observa-se mais que um deslocamento químico, possivelmente referente ao grupo $-\text{COOH}$ do ácido poliacrílico, além do apresentado na N-CMQ. Em 215,2 ppm tem-se, possivelmente sistema saturado ácido-salino, que pode estar relacionado a interação intermolecular entre o ácido poliacrílico e o grupo amino livre da N-CMQ.

Para o derivado N-CMQ_A a carbonila em meio ácido da estrutura da N-CMQ deslocou-se para 170 ppm, o novo deslocamento químico em 174 ppm, para o derivado N-CMQ_R, foi atribuído a carbonila do reticulante, a bisacrilamida.

Em 30,2 ppm observa-se o deslocamento químico referente ao $-\text{CH}_2$ da estrutura do ácido poliacrílico observada para o N-CMQ_A e N-CMQ_R. Em 48 ppm tem-se o deslocamento químico referente ao $-\text{CH}$ do ácido poliacrílico (BRAR; SUNITA, 1991).

O deslocamento de 30,2 ppm, bem como o deslocamento em 51 ppm, atribuído ao $-\text{CH}_2$ do grupo amino substituído da N-CMQ foram confirmados por DEPT (**Figura 19 inserto**). Em 54,9 ppm, possivelmente tem-se um sinal invertido referente ao $-\text{CH}_2$ da bisacrilamida (**Figura 19**). Tal conclusão deve-se ao fato de que para o derivado acrilado não foi observado no DEPT inversão de sinal em mesmo deslocamento, apenas para o reticulado.

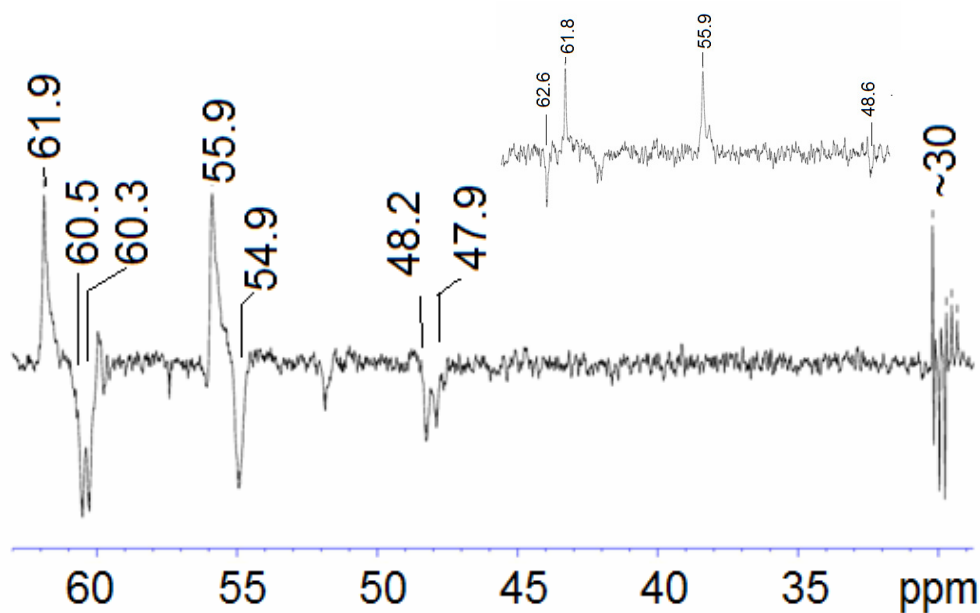


Figura 19) Espectro de DEPT-135 de N-CMQ_A (inserto) e N-CMQ_R a 20 mg/mL, em D₂O com 0,1% de ácido acético deuterado como solvente, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos são expressos em ppm.

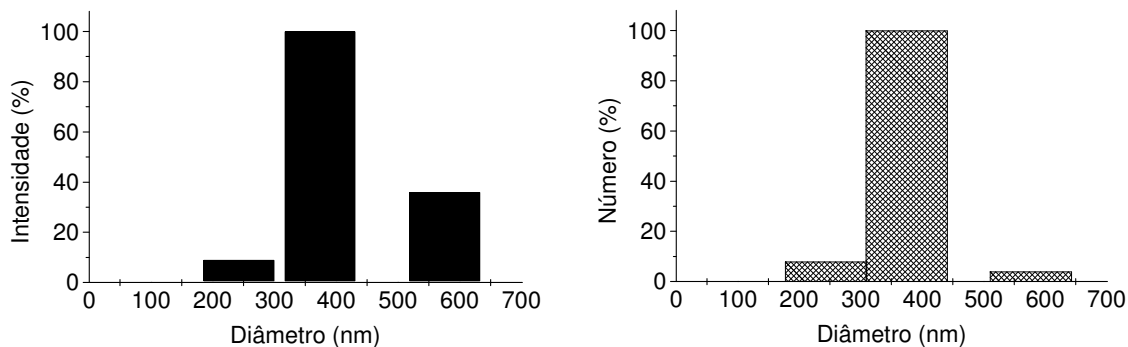
A caracterização dos derivados híbridos de N-CMQ_A e de N-CMQ_R em dispersão aquosa, antes do processo de secagem, demonstrou a formação de nanopartículas com baixa variação relativa, mostrando um sistema praticamente monodisperso, também observado nas fotos dos sistemas, mostradas na **Figura 20**. Em ambos os modos, analisando-se o número de nanopartículas espalhantes de luz ou a intensidade de espalhamento (onde teoricamente as nanopartículas maiores geram maior influência no resultado), foi obtido o mesmo diâmetro hidrodinâmico.

Conforme apresentado na **Figura 20 (A)** o derivado N-CMQ apresenta um diâmetro médio de nanopartículas de 417 e 374 nm, quando avaliados em termos de intensidade e número de partículas, respectivamente. O grau de polidispersão foi <0,05, indicando sistemas com baixo grau de polidispersão.

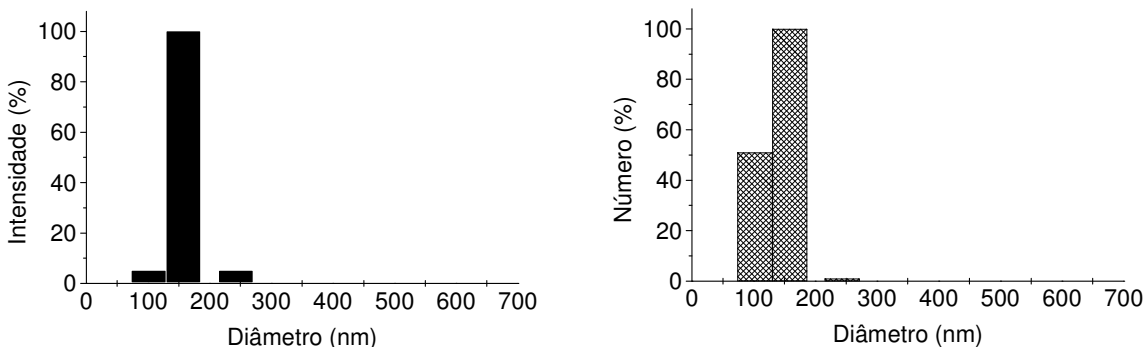
Para o derivado acrilado N-CMQ_A (**Figura 20 B**) foi encontrado um diâmetro médio de partículas de 159 e 147 nm quando avaliados em termos de intensidade e número de nanopartículas, com grau de polidispersão <0,04. Já para o derivado reticulado N-CMQ_R, como mostra a (**Figura 20 C**), encontramos um diâmetro de 376 e 374 nm, relacionado a intensidade e número, respectivamente, com polidispersão <0,05.

Quando submetido à filtração por $0,22\ \mu\text{m}$ o derivado N-CMQ_R apresentou redução de agregados nanoparticulados (**Figura 20 C- inserto**). Não foram observadas diferenças quando as partículas N-CMQ_A foram filtradas em termos de diâmetro hidrodinâmico.

A



B



C

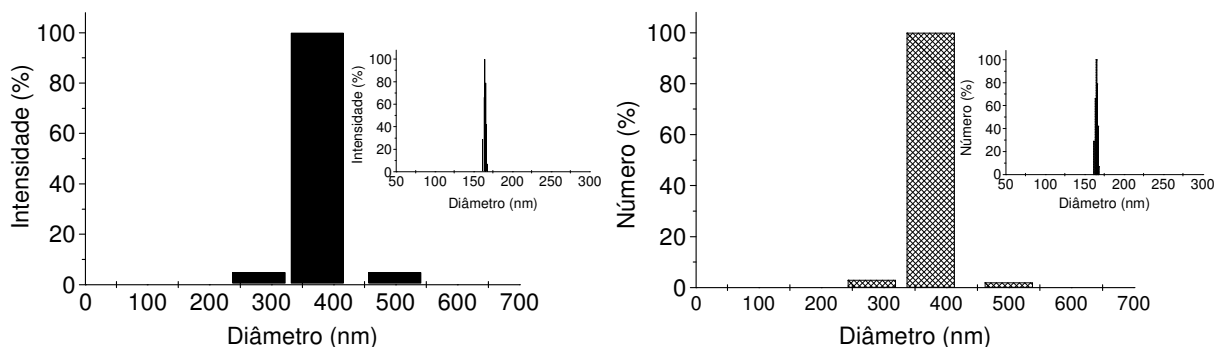


Figura 20) Diâmetro das nanopartículas determinadas por espalhamento de luz dinâmico para o derivado: A) N-CMQ; B) N-CMQ_A e C) N-CMQ_R, avaliando-se a intensidade e o número de partículas espalhantes. Amostras avaliadas sem filtração prévia, em ângulo de 90° , temperatura de 25°C . **Inserto em C:** Nanopartículas de N-CMQ_R após filtração por membrana de $0,22\ \mu\text{m}$.

O efeito do pH sobre as nanopartículas foi avaliado para as partículas N-CMQ_A e N-CMQ_R, conforme apresentado na **Figura 21**.

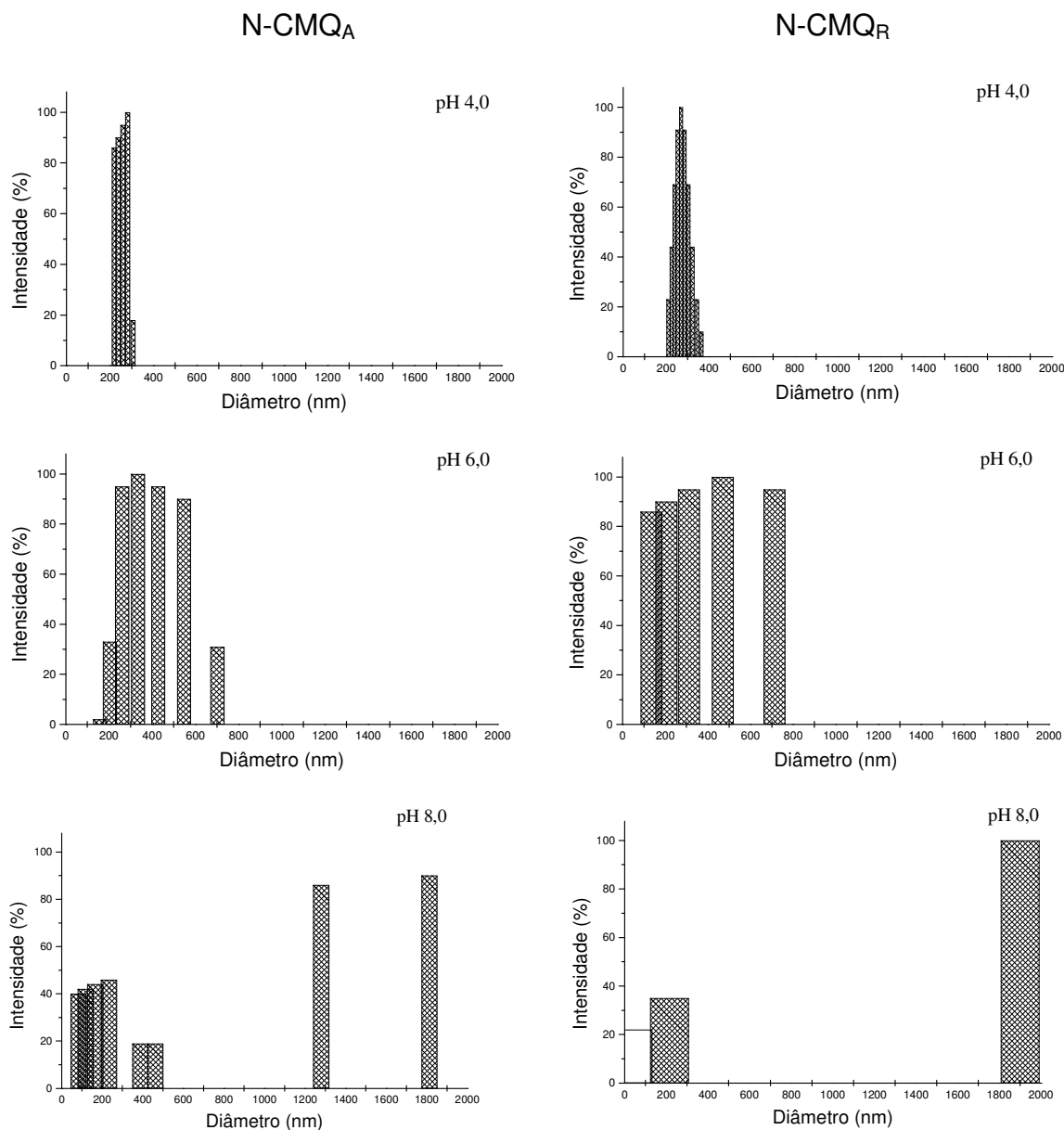


Figura 21) Diâmetro das nanopartículas, determinadas por espalhamento de luz dinâmico para o derivado N-CMQ_A e N-CMQ_R, avaliando-se a intensidade de espalhamento de luz, em ângulo de 90°, temperatura de 25 °C, em pH de 3 a 8. O pH foi ajustado com adição de NaOH 0,5 M.

Com aumento do pH de 4 para 6, observa-se um aumento diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas N-CMQ_A e N-CMQ_R, em média de 1,7 X. Tal fato é relacionado com aumento da ionização do ácido poliacrílico e da N-carboximetilquitosana e com a consequentemente expansão das cadeias

poliméricas por repulsão eletrostática. Com o aumento do pH para 8 também foi observado uma redução da turbidez do sistema, passando de uma solução branco-leitosa para translúcido com precipitados.

As nanopartículas de N-CMQ_A e N-CMQ_R também foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura, após a secagem das mesmas por atomização, conforme **Figura 22**.

Fica evidente a forma esférica das nanopartículas, tanto N-CMQ como os derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R, de caráter polidisperso, em faixas de micrômetro a nanômetro. Em um aumento de 4000 X das nanopartículas N-CMQ_A e N-CMQ_R, onde observa-se uma superfície lisa em ambas as partículas. A reticulação foi obtida com bisacrilamida e fez com que ocorressem também ligações intra-nanopartículas, conforme observado na N-CMQ_R, confirmando os efeitos gerados para estas partículas quanto à filtração por 0,22 µm em espalhamento de luz dinâmico.

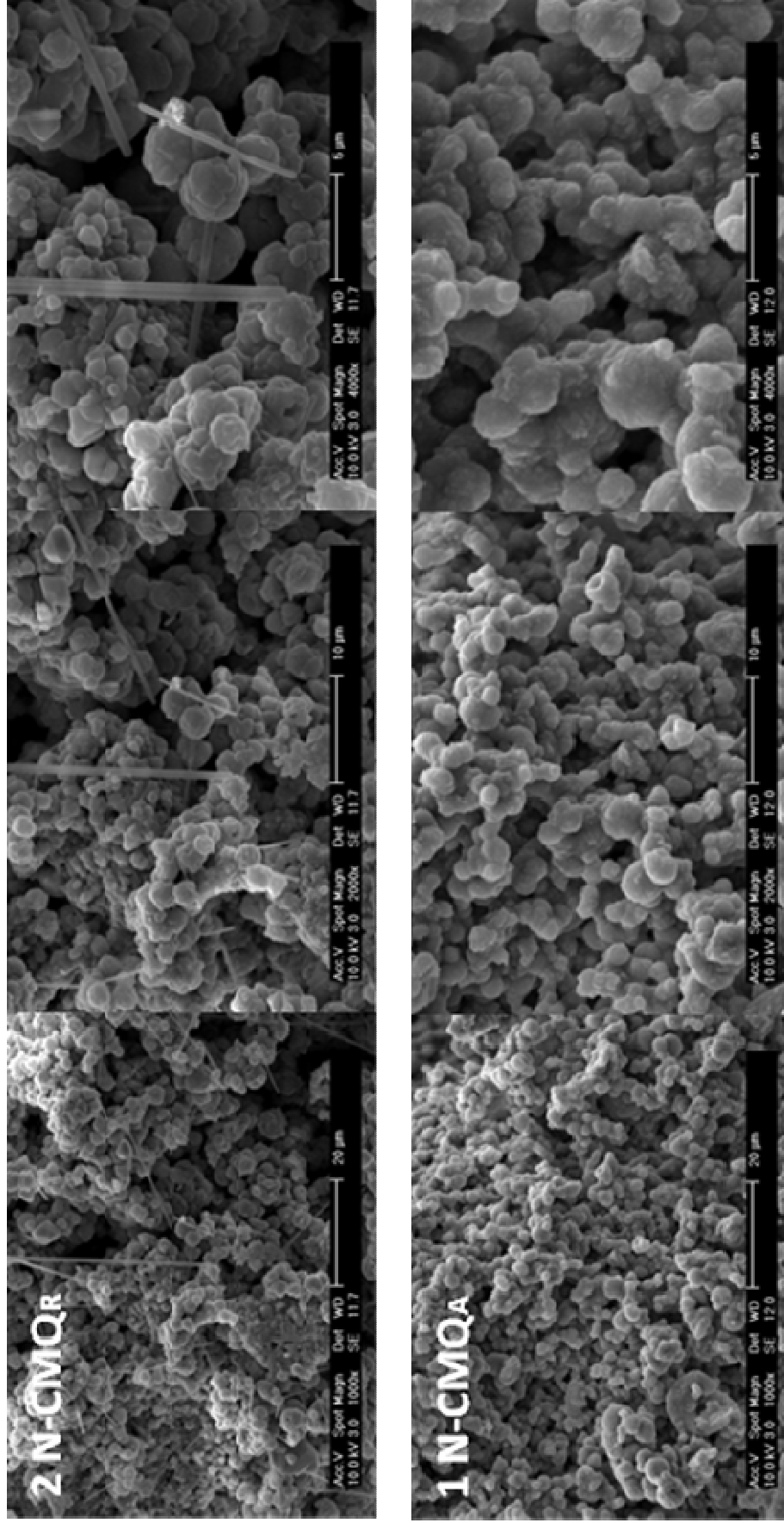


Figura 22) Microscopia eletrônica de varredura para as amostras de: 1 – N-CMQ_A e 2 – N-CMQ_R, em aumentos de 1000 e 2000 e 4000x.

A fim de confirmar as interações entre os sistemas poliméricos (N-CMQ e APA) na formação das nanopartículas, foi avaliado o comportamento térmico da N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R por análises termogravimétricas (TGA) e de varredura diferencial de temperatura (DSC).

Na **Figura 23**, tem-se a curva de perda de massa da N-CMQ e N-CMQ_A e N-CMQ_R, a uma taxa de aquecimento de 10 K/min, sob fluxo de nitrogênio, em temperatura de 25 a 600 °C.

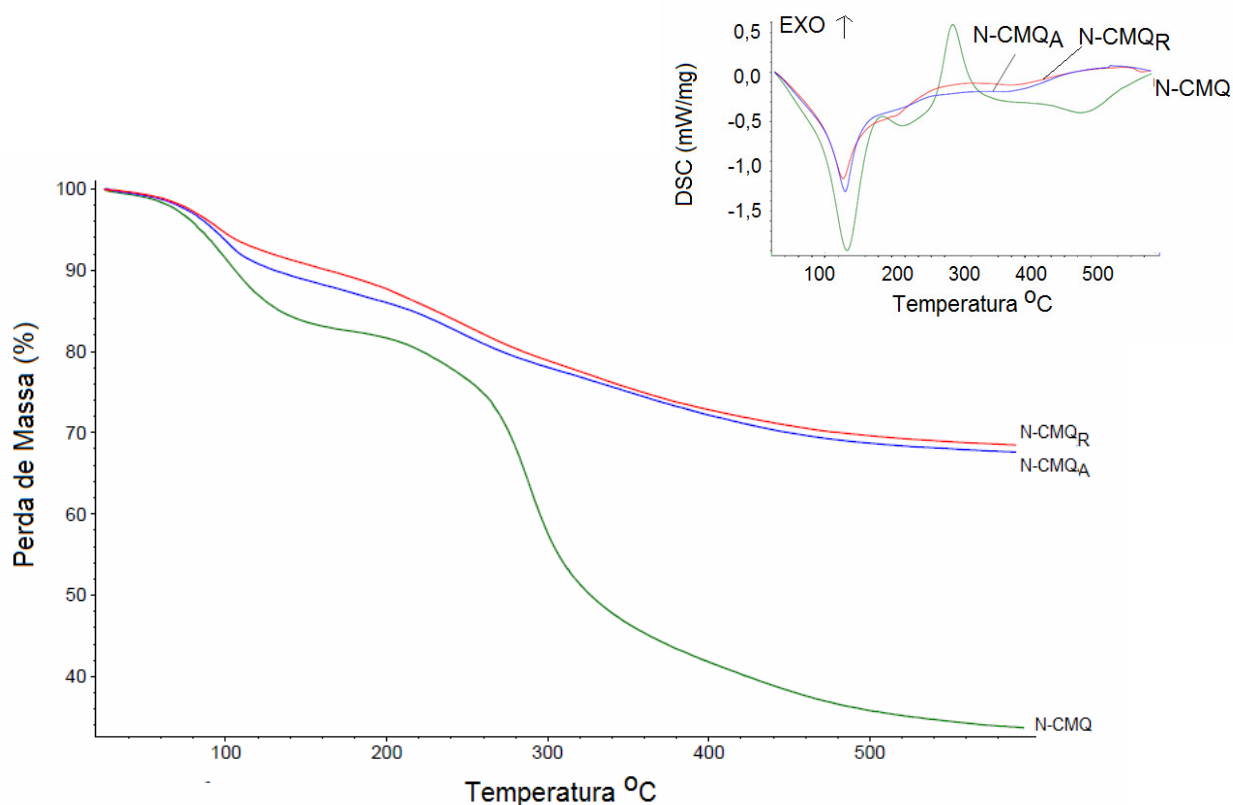


Figura 23) Curva de perda de massa (%) e DSC (inserto) para as amostras de N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R, de 25 a 600°C, a 10K/min, sob fluxo de nitrogênio (50 mL/min).

Os derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R apresentaram redução significativa de degradação, com ausência de pico exotérmico característico da degradação polimérica da N-CMQ, com uma redução da perda de massa por degradação térmica de até 2,45X (**Figura 23** e **Tabela 3**). Os teores de umidade, referentes aos eventos até 175 °C foram de 17% para a N-CMQ e de 11 e 13 % para a N-CMQ_A e N-CMQ_R, respectivamente (**Tabela 3**).

Ocorreu um deslocamento do início da degradação polimérica (T_{on}), temperatura média (T_m) e temperatura final (T_f), para temperaturas mais elevadas,

com concomitante redução do evento exotérmico (**Figura 23 – inserto**), para a N-CMQ_A e N-CMQ_R, quando comparados a N-CMQ.

Tabela 3. Temperatura de degradação e perda de massa para a N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R, em uma taxa de aquecimento de 10K/min em atmosfera de N₂ (50 mL/min).

Amostra	Perda de massa % (175°C a 600°C)	T _{on} (°C)	T _m (°C)	T _f (°C)
N-CMQ	49	261,2	291	319
N-CMQ _A	21	320	390	465
N-CMQ _R	20	280	383	459

Miranda e colaboradores (2006) observaram para a N-CMQ, com grau de carboximetilação de 18%, um T_m de 256 °C, com perda de massa de 60% em temperatura de 700 °C. Kittur e colaboradores (2002) também observaram um pico exotérmico, por DSC, em temperatura de 300 °C, semelhante ao evento exotérmico observado na **Figura 23 - inserto**, de 291 °C.

Segundo Brito e Campana-Filho (2007) na degradação da quitosana, várias reações ocorrem simultaneamente e seguem processos específicos, o que inviabiliza a aplicação de um único modelo cinético para descrever o processo todo. Uma discussão semelhante pode ser esperada para a N-CMQ, e possivelmente, a participação dos grupos amino livres são importantes para a estabilidade térmica do polímero, uma vez que a sua interação iônica com o ácido poliacrílico reduziu consideravelmente a degradação térmica.

Segundo Eisenberg, Yokoyama e Sambalido (1969), durante a degradação térmica do ácido poliacrílico, que se inicia em aproximadamente 160 °C, ocorre a formação de anidrido por uma via intramolecular, e os autores observaram que a desidratação e descarboxilação (**Figura 24**). Tais reações são de primeira ordem e ocorrem sequencialmente, com reações mais lentas para última que para a primeira.

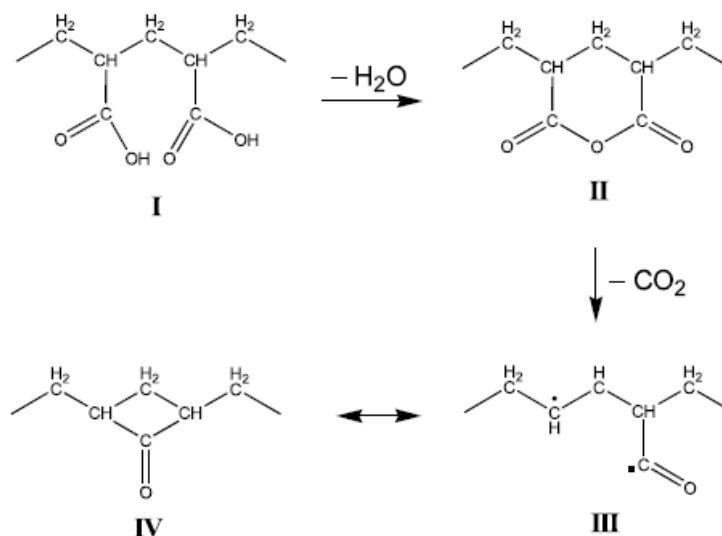


Figura 24) Degradação térmica do ácido poliacrílico por desidratação e descarboxilação.
Fonte: Lattimer (2003)

Assim, aparentemente a participação dos grupos amino-livres da N-CMQ associado aos grupos ácidos livres do ácido poliacrílico, ambos que podem funcionar como iniciadores do processo de degradação polimérica, por estarem em interação iônica nos híbridos poliméricos (N-CMQ_A e N-CMQ_R), ocasionam a redução da degradação de ambos os polímeros.

5.3 Estudos de biocompatibilidade utilizando células L929

Os derivados de N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R não demonstraram efeitos citotóxicos, mesmo em concentrações elevadas, de 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo que estatisticamente nenhuma das amostras apresentou toxicidade superior ao do controle negativo (Meio de Cultura). Apenas o controle positivo com DMSO gerou ação citotóxica apreciável (**Figura 25**). Resultados semelhantes foram observados para a N-CMQ desenvolvida por Felício e colaboradores (2008) e por Amorim (2009), confirmando a baixa toxicidade da N-CMQ e de seus derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R.

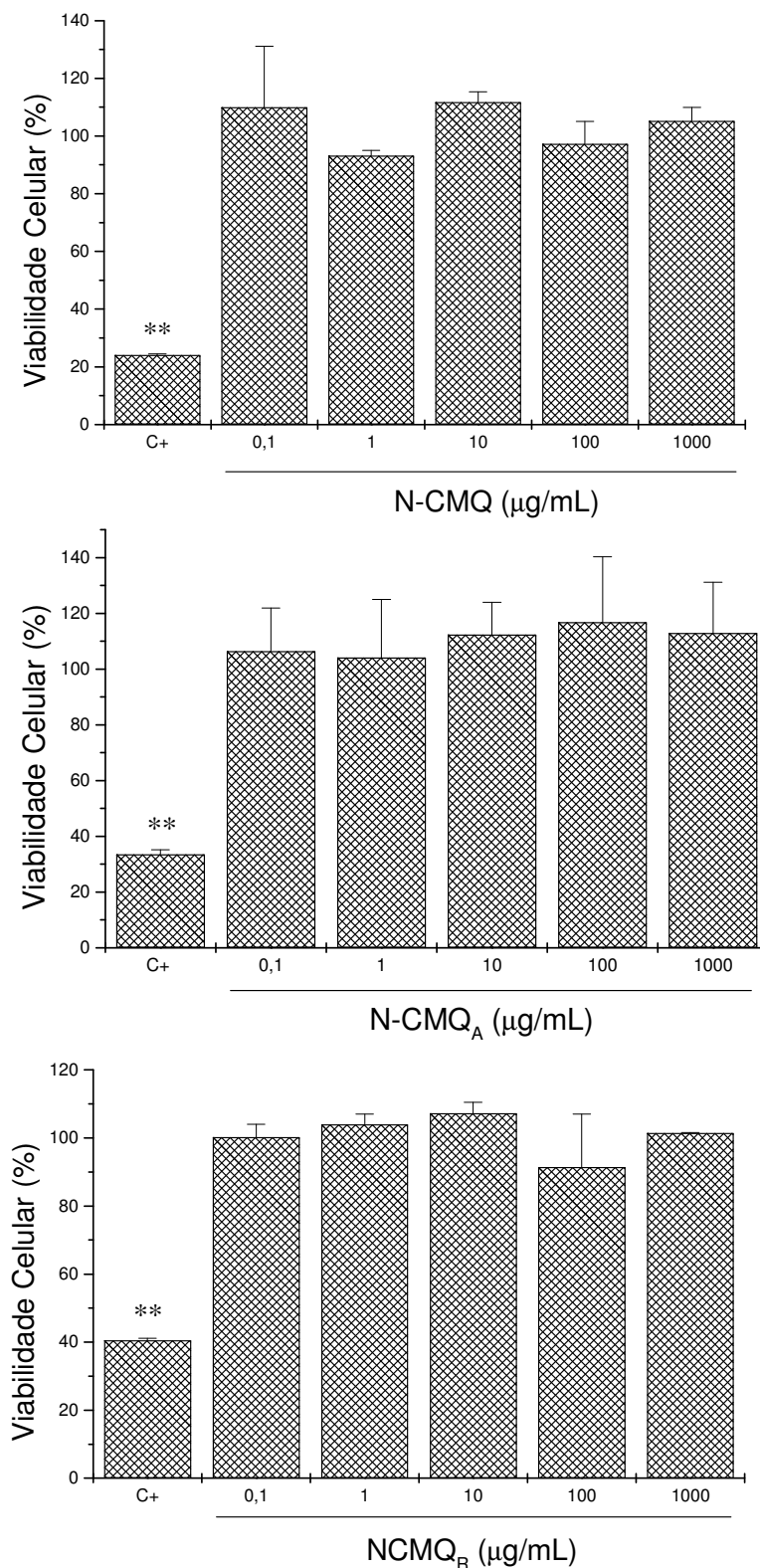


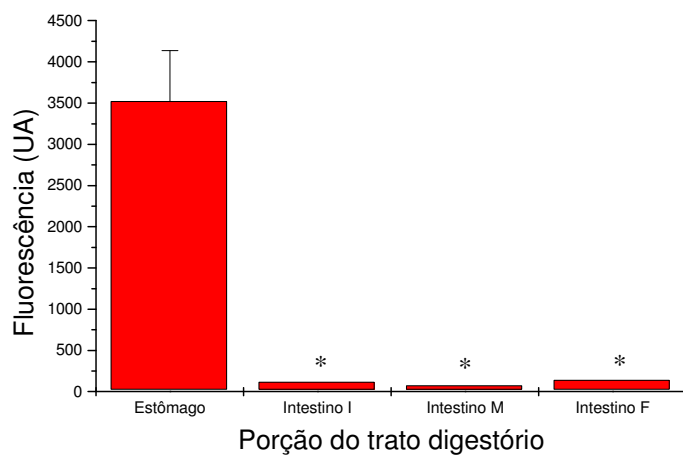
Figura 25) Viabilidade celular em células L929, para as amostra N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R, de 0,1 a 1000 µg/mL, após 24 horas de cultivo em estufa com 5% de CO₂/37°C. Como controle positivo (C+) foi utilizado o DMSO, concentração final 10%, e como controle negativo o meio MEM. One-Way ANOVA, com análise posterior por Tukey (**p<0,05).

5.4 Estudos de bioadesão

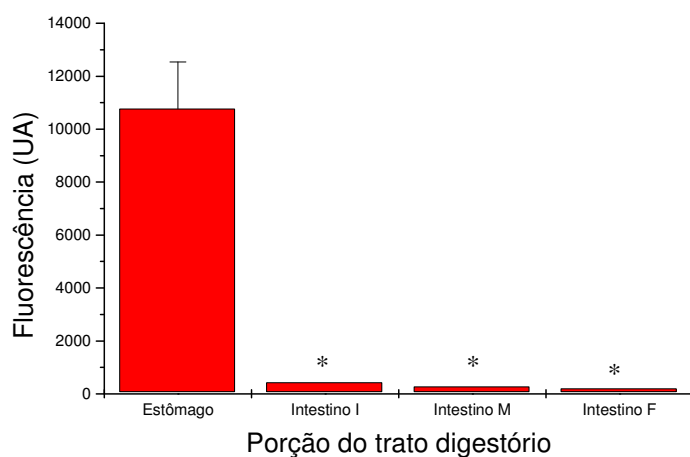
A via oral é uma via de primeira escolha para fins farmacológicos, entretanto muitos fármacos são pouco biodisponíveis por esta via, relacionados à baixa resistência ao suco gástrico e a baixa solubilidade e/ou permeabilidade, assim como baixa estabilidade no trato digestório (ARBOS et al., 2002). Uma possibilidade de aumento da biodisponibilidade é a incorporação de fármacos em nanopartículas biodegradáveis e bioadesivas, aumentando assim a biodisponibilidade do fármaco (ARBOS et al., 2002).

Com o propósito de avaliar se as nanopartículas de N-CMQ_A e N-CMQ_R apresentam potencial bioadesivo, foram realizados experimentos avaliando-se a adsorção das nanopartículas em mucosa do trato digestório de ratos Wistar, em tempos de 1 hora, 5,5 horas e 8 horas, utilizando-se as nanopartículas N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC, que foram previamente modificadas com isotiocianato de fluoresceína.

Observa-se na **Figura 26** que uma hora após a administração das nanopartículas por via oral, estatisticamente ocorreu uma maior retenção das mesmas em nível estomacal, tanto para o derivado acrilado como reticulado com ácido poliacrílico. Em estudos semelhantes de bioadesão realizados por Salman e colaboradores (2005), após 1 hora da administração de nanopartículas produzidas com um extrato de *Salmonella* e Gantex[®], uma grande concentração de nanopartículas foi observada no íleo (30%), com evolução para 63% após 3 horas de administração.



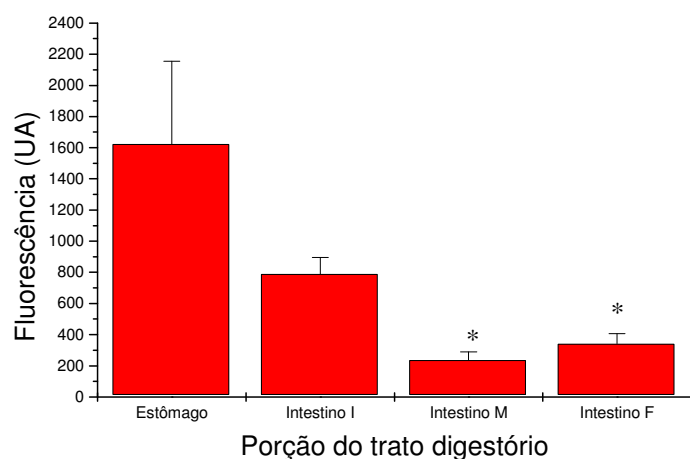
1



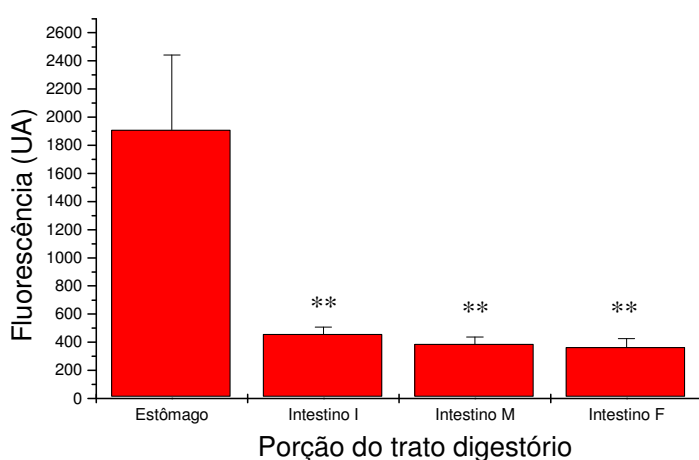
2

Figura 26) Fluorescência para as amostra de 1 – NCMQ_A-FITC e 2 – NCMQ_R-FITC no estômago, intestino inicial, médio e final após 1 hora (One way ANOVA seguido de Tukey p* <0,05 em relação ao estômago).

Para a e N-CMQ_R-FITC foi observado uma bioadesão de 85% no estômago após 1 hora. Para a nanopartícula N-CMQ_A-FITC a bioadesão foi de 31,3%, ou seja a reticulação da nanopartícula aumentou em 63% a bioadesão.



1

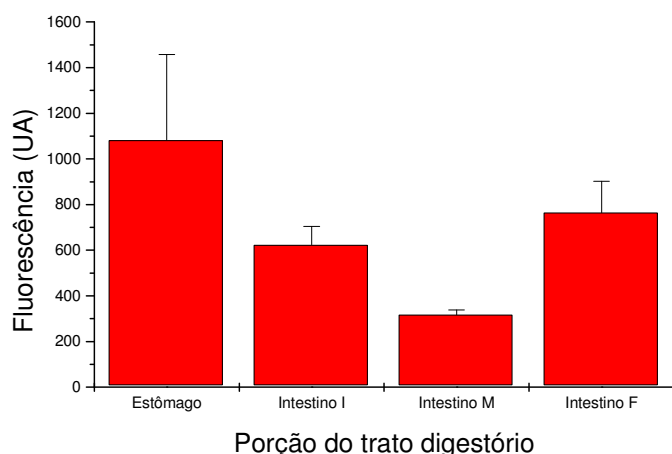


2

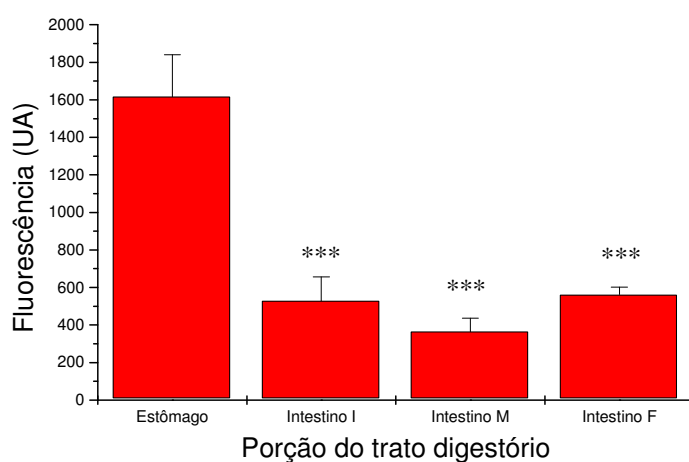
Figura 27) Fluorescência em para as amostra de 1 – NCMQ_A-FITC e 2 – NCMQ_R-FITC no estômago, intestino inicial, médio e final após 5 horas e 30 min (One way ANOVA seguido de Tukey $p^* < 0,05$ em relação ao estômago).

Na **Figura 27(1)** pode-se observar que após 5,5 horas, um acúmulo de partículas N-CMQ_A-FITC ainda foi observado no estômago, seguido pelo duodeno, porém sem diferença estatística entre esses dois primeiros. Apenas no jejuno e íleo pode-se observar uma diferença estatística significativa em relação ao estômago ($p < 0,05$). Entretanto, na **Figura 27(2)**, as partículas N-CMQ_R-FITC apresentaram após o mesmo tempo de contato, em termos estatísticos ($p < 0,01$) uma maior retenção no estômago.

Os resultados observados nas **Figuras 27 (1 e 2)** foram diferentes do observado por Arbós e colaboradores (2002), onde ao utilizar nanopartículas de poli – (anidrido metilvinil éter-co-maleico ou PVM/MA), revestidas com lectina de *Sambucus nigra* (SNA-NP) ou albumina bovina (BSA-NP), observaram uma bioadesão após 1 hora principalmente no estômago, e após 3 horas distribuições iguais no estômago e intestino delgado (jejuno e íleo).



1



2

Figura 28) Fluorescência em para as amostra de: 1 – N-CMQ_A-FITC e 2 – N-CMQ_R-FITC no estômago, intestino inicial, médio e final após 8 h (One way ANOVA seguido de Tukey p* <0,05 em relação ao estômago).

Conforme observado na **Figura 28 (1)**, após 8 horas, não há diferenças estatisticamente significativas entre as nanopartículas aderidas nas porções do trato digestório, com uma tendência para maior ligação das nanopartículas no estômago e intestino delgado (íleo). Entretanto, para o derivado reticulado, a ligação ao estômago após 8 horas de incubação ainda apresentou diferenças estatísticas em relação às demais porções do trato digestório (**Figura 28 (2)**), seguindo um perfil semelhante ao mesmo derivado no tempo de 5,5 horas.

Em trabalhos publicados por Arbós e colaboradores (2002, 2003) e Salman e colaboradores (2005), uma bioadesão em nível estomacal não foi observada, com retenção estomacal máxima de 30 min. Desta foram, sugere-se que o sistema nanoparticulado N-CMQ reticulado apresenta uma capacidade bioadesiva estomacal única, sugerindo sua aplicação na liberação de fármacos com potencial para o

tratamento de úlceras, gastrites, e doenças infecciosas e inflamatórias gerais do estômago.

Na **Figura 29** está representado a fração total de N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC aderida ao trato digestório dos animais.

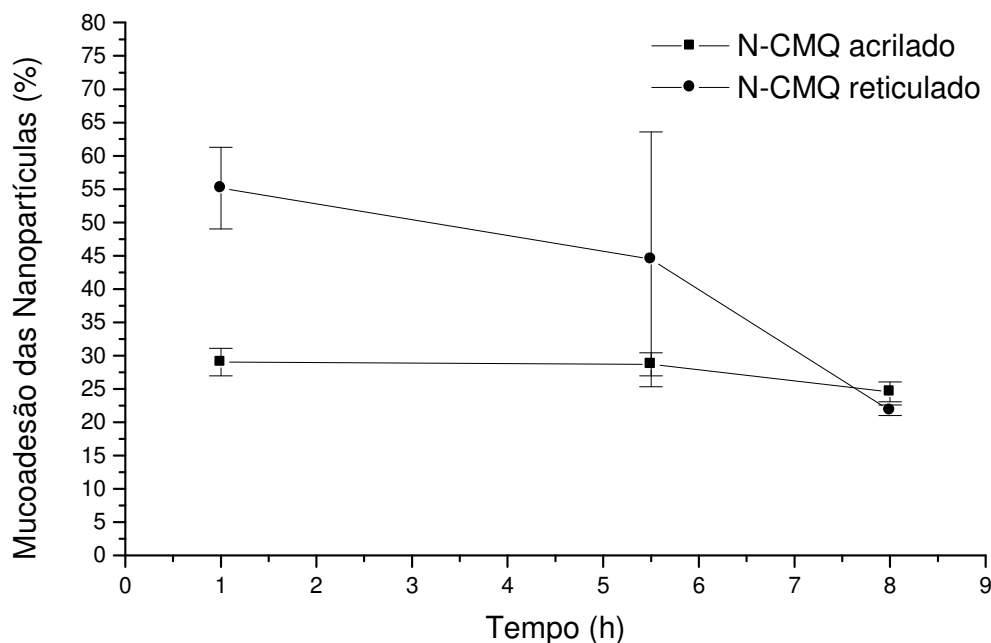


Figura 29) Mucoadesão das nanopartículas (%) no trato digestório em função do tempo (h) para os derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R.

O Q_{max} , que representa a quantidade máxima de nanopartículas aderidas, para a partícula N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC foi de $2,9 \pm 0,21$ mg e $5,7 \pm 0,63$ mg, respectivamente no tempo de 1 h, o que resulta em uma bioadesão aproximadamente 2 X maior para as partículas reticuladas de N-CMQ com ácido poli-acrílico.

A taxa ou constante de eliminação, também chamada de taxa de esvaziamento (k_{ads}) foi determinada como de $0,024 \text{ h}^{-1}$ ($r = 0,83$) e $0,133 \text{ h}^{-1}$ ($r = 0,99$), para o derivado N-CMQ_A-FITC e N-CMQ_R-FITC, respectivamente, indicando uma cinética de eliminação dos derivados reticulados 5,5 X superior a dos derivados acrilados. Arbós e colaboradores (2003) observaram que nanopartículas de PVM/MA revestidas de albumina apresentaram constantes de adsorção (k_{ads}) de $0,25 \text{ h}^{-1}$, relatadas como uma baixa taxa de eliminação, com um MRT_{ads} de 9,7 horas. As partículas de N-CMQ acrilado e reticulado apresentaram uma afinidade ainda mais pronunciada pelo trato digestório.

Com relação ao MRT_{ads} (h) que representa a duração da interação entre sistema nanoparticulado e o meio biológico, pode-se observar que o tempo médio total de interação foi de 4,4 e 4,0 horas para o derivado acrilado e reticulado, respectivamente. Apesar das k_{ads} diferentes, a maior concentração de partículas aderidas no derivado reticulado contribuiu para que o tempo médio de interação com o sistema biológico seja praticamente o mesmo.

Arbós e colaboradores (2002) observaram para nanopartículas de PVM/MA que o MRT (h) ficou entre 4,58 a 5,16 h, semelhantes aos resultados observados para os derivados de quitosana com ácido acrílico. Salman e colaboradores (2005) apresentaram MRT de 3,0 a 3,45 h.

A bioadesão também foi confirmada por microscopia de fluorescência, para o derivado N-CMQ_R-FITC, após 1 hora de administração em ratos Wistar, em corte da região do fundo do estômago (**Figura 30**). Para o derivado N-CMQ_A-FITC, devido a menor quantidade de partículas bioaderidas no estômago, não foi possível determinar a fluorescência por microscopia de fluorescência, sendo que os resultados não foram apresentados.

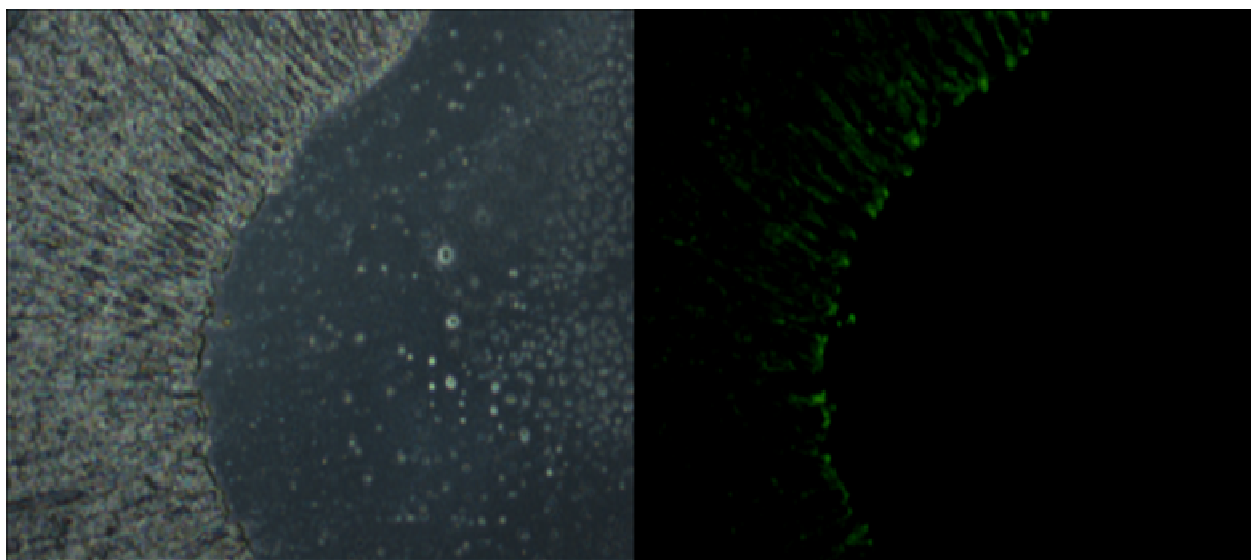


Figura 30) Micrografia de fluorescência para o derivado N-CMQ_R-FITC após 1 hora de administração em ratos Wistar. O corte refere-se ao fundo do estômago, em aumento de 100X.

6 CONCLUSÕES

- A N-CMQ sintetizada, a partir da quitosana purificada (GA de 85%), e seca por liofilização, atomização e precipitação etanólica, apresentou para este último processo de secagem uma menor agregação ($D_f \sim 1$) e R_h de 76,2 nm. O processo de liofilização foi responsável por estruturas agregadas e com problemas de solubilização ($D_f \sim 3$). A atomização gerou estruturas esféricas pouco densas, com $D_f \sim 2$.

- Bandas características da N-CMQ infravermelho em 1650cm^{-1} foram encontradas para os derivados, indicando a presença de estiramento da carbonila, com uma porcentagem de carboximetilação de 60%.

- A análise em tempo real da síntese do derivado N-CMQ_A apresentou uma constante de conversão ($k_{\text{conversão}}$) de $3,2 \times 10^{-3} \text{ mmol/min}^{-1}$ de ácido acrílico em ácido poliacrílico (APA). A $k_{\text{conversão}}$ de ácido acrílico em APA isoladamente, na ausência de N-CMQ, mostrou-se como um processo 1,6 X com maior taxa de conversão do monômero/polímero, porém sem formação de sistemas nanoparticulados verificáveis por espalhamento de luz estático e dinâmico.

- As modificações químicas por enxerto de ácido acrílico, nos derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R, foram caracterizadas por aumento de banda de absorção, por espectrometria do infravermelho, com aumento de bandas em 1650 cm^{-1} e redução da banda em 1410 cm^{-1} . As modificações químicas também foram observadas por ^{13}C RMN.

- Os derivados N-CMQ_A e N-CMQ_R apresentaram diâmetro médio das partículas de 159 e 156 nm, respectivamente, com relação a intensidade de partículas espalhantes, após filtração para o derivado reticulado para eliminação de agregados. O diâmetro hidrodinâmico das partículas foi alterado pelo aumento do pH, com precipitação em pH 8 do material polimérico.

- Uma estrutura esférica foi observada para os derivados, após secagem por atomização, por microscopia eletrônica de varredura.

- As análises termogravimétricas demonstraram que, devido a interação iônica entre os grupos amino livres da N-CMQ e o ácido poliacrílico, ocorre uma redução de até 2,45 X da perda de massa pela nanopartícula híbrida, quando comparada o polímero N-CMQ.

- Os derivados N-CMQ, N-CMQ_A e N-CMQ_R, não apresentaram ação citotóxica em células L929, após 24 horas de cultivo, mesmo em elevadas concentrações.

- Os ensaios de mucoadesão demonstraram que as nanopartículas N-CMQ_R ficaram retidas em maior quantidade no estômago (85%) após uma hora da administração oral em ratos. A N-CMQ_A apresentaram uma bioadesão de 31,3%, mostrando que a reticulação aumentou em 63% a bioadesão das nanopartículas. Para o tempo de 5,5 h foi observado uma maior concentração de N-CMQ_A e N-CMQ_R no estômago, seguido do intestino, porém sem diferença estatística para o primeiro. Após 8h, a partícula N-CMQ_R apresentou, em termos estatísticos, maior bioadesão ao estômago.

A quantidade máxima de nanopartículas aderidas foi de $2,9 \pm 0,21$ mg para a N-CMQ_A e de $5,7 \pm 0,63$ mg para a N-CMQ_R. A constante de eliminação (K_{ads}) foi determinada como de $0,024 \text{ h}^{-1}$ para N-CMQ_A e $0,133 \text{ h}^{-1}$ para N-CMQ_R, indicando uma eliminação dos derivados reticulados 5,5 vezes maior que dos derivados acrilados.

Os estudos realizados neste trabalho mostram que as nanopartículas híbridas de N-CMQ e ácido poliacrílico têm uma alta afinidade pela região gástrica do trato digestório, sendo viável sua utilização em mais experimentos que envolvam liberação de fármacos para tratamentos de úlceras, gastrites e doenças inflamatórias e infecciosas do estômago.

REFERÊNCIAS

- ADALI, T., YILMAZ, E. Synthesis, characterization and biocompatibility studies on chitosan-graft-poly(EGDMA). **Carbohydrate Polymers**. v.77, p.136-141, 2009.
- AHN, J.S.; CHOI, H.K.; CHO, C.S. A novel mucoadhesive polymer prepared by template polymerization of acrylic acid in the presence of chitosan. **Biomaterials**. v.22, p.923-928, 2001.
- AKTAS, Y.; ANDRIEUX, K.; ALONSO, M.J.; CALVO, P.; GURSOY, R.N.; COUVREUR, P.; CAPAN, Y. Preparation and in vitro evaluation of chitosan nanoparticles containing a caspase inhibitor. **International Journal of Pharmaceutics**, v.298, p.378-383, 2005.
- AMIJI, M.M. Pyrene fluorescence study of Chitosan self-association in aqueous solution. **Carbohydrate Polymers**, v.26, p.211-213, 1995.
- AMORIM, C.M. **Nanopartículas de quitosana e N-carboximetilquitosana na incorporação do antioxidante idebenona**, f. 120. Dissertação (Mestrado) – Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas. Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2009 .
- ARBÓS, P.; ARANGO, M. A.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Quantification of the bioadhesive properties of protein-coated PVM/MA nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, n. 1-2, p.129-136, 2002.
- ARBÓS, P.; CAMPANERO, M. A.; ARANGO, M. A.; RENEDEO M. J.; IRACHE, J. M. Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties. **Journal of Controlled Release**. v.89, p.19-30, 2003.
- BAUMAN, H.; FAST, V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetil and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. **Carbohydrate Research**, v. 331, p. 43-57, 2001.
- BAYRAMOGLU, M.; SAHINTURK, H. Higher order regularized trace formula for the regular Sturm–Liouville equation contained spectral parameter in the boundary condition. **Applied Mathematics and Computation**, v.186, p.1591-1599, 2007.
- BEPPU, M.M.; VIEIRA, R.S.; AIMOLI, C.G.; SANTANA, C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption. **Journal of Membrane Science**, v.301, n.1-2, p.126-130, 2007.
- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked Chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19-34, 2004.
- BERNKOP-SCHNURCH, A. Thiomers: A new generation of mucoadhesive polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 57, p.1569-1582, 2005.

BLAIR, H.S.; GUTHRIE, J.; LAW, T.; TURKINGTON, P. Chitosan and modified chitosan membranes I. Preparations and characterization. **Journal Appl. Polymer Science**. v.33, p.641-656, 1987.

BRAR, A.S.; SUNITA. Determination by ¹³C NMR spectroscopy of the microstructure of copolymers of acrylic acid with vinyl acetate. **European Polymer Journal**. v. 27, n.1, p. 17-20, 1991.

BRAVO-OSUNA, I.; PONCHEL, G.; VAUTHIER, C. Tuning of shell and core characteristics of chitosan-decorated acrylic nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.30, p.143-154, 2007.

BRITO, D.; CAMPANA-FILHO, S.P. Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica Acta**, v. 465, p. 73-82, 2007.

BROUSSIGNAC, P. **Chim Ind Gen Chim**. v.99, p.1241, 1968.

BUGAMELLI, F.; RAGGI, M.A.; ORIENTI, I.; ZECHI, V. **Arch Pharm. Med. Chem.**, v.331, p.133, 1998.

CAMPANA FILHO, S.P.; ABREU, F.R. Preparation and Characterization of Carboxymethylchitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.2, p.79-83, 2005.
CARRILO, A.N.; PEDRAM, M.Y.; RETUERT, J.; DOSQUE, M.D.; GALLOIS, S.; ARIAS, J.L. Selective crystallization of calcium salts by poly(acrylate)-grafted chitosan. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.286, p.134-141, 2005.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

CHEN, X.G.; PARK, H.J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p.355-359, 2003.

DI COLO, G.; ZAMBITO, Y.; BURGALASSI, S.; NARDINI, I.; SAETTONI, M.F. Effect of chitosan and of N-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. **International Journal of Pharmaceutics**. v.273, p.37-44, 2004.

DODANE, V.; VILIVALAM, V.D.; Pharmaceutical applications of chitosan. **PSTT**. v.1, n.6, September 1998.

DUAN, W.; CHEN, C.; JIANG, L.; LI, G.H. Preparation and characterization of the graft copolymer of chitosan with poly[rosin-(2-acryloyloxy)ethyl ester]. **Carbohydrate Polymers**. v.73, p.582-586, 2008.

DUTTA, P.K.; TRIPATHI, S.; MEHROTRA, G.K.; DUTTA, J. Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. **Food Chemistry**. v.114, p.1173-1182, 2009.

EISENBERG, T.; YOKOYAMA, T.; SAMBALIDO, E. Dehydration kinetics and glass transition of poly(acrylic acid). **Journal Polymer Science [A1]**, v. 7, p. 1717-1728, 1969.

EL-SHERBINY, I.M. Synthesis, characterization and metal uptake capacity of a new carboxymethyl chitosan derivative. **European Polymer Journal**. v.45, p.199-210, 2009.

FELICIO, S.G.F.P. **Nanopartículas hidrodispersíveis de N-carboximetilquitosana com potencial para incorporação de camptotecina**. p.118, Santa Catarina, 2008. Dissertação em Ciências Farmacêuticas, UNIVALI.

FELICIO, S.G.P.; SIERAKOWSKI, M. R.; PETKOWICZ, C.L.O.; SILVEIRA, J.L.M.; LUBAMBO, A.F.; FREITAS, R.A. Spherical aggregates obtained from N-carboxymethylation and acetylation of chitosan. **Colloid and Polymers Science**. v.286, p. 1387-1394, 2008.

FROMTLING, R.A. Overview of medically important antifungal azole derivatives. **Clin Microbiol**, Rev. 1, p.187-217, 1988.

FU, G.; LI, H.; YU, H.; LIU, L.; YUAN, Z.; HE, B. Synthesis and lipoprotein sorption properties of porous chitosan beads grafted with poly(acrylic acid). **Reactive & Functional Polymers**. v.66, p.239-246, 2006.

FU, G.; ZHAO, J.; YU, H.; LIU, L.; HE, B. Bovine serum albumin-imprinted polymer gels prepared by graft copolymerization of acrylamide on chitosan. **Reactive and Functional Polymers**, v.67, p.442-450, 2007.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**. v.114, p.1-14, 2006.

GUIBAL, E. Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. **Progress in Polymer Science**. v.30, pag.71-109, 2005.

GRABOVAC, V.; GUGGI, D.; BERNKOP-SCHNURCH. Comparison of the mucoadhesive properties of various polymers. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.1713-1723, 2005.

HANSEN, N.M.L.; JANKOVA, K.; HVILSTED, S. Fluoropolymer materials and architectures prepared by controlled radical polymerizations. **European Polymer Journal**, v.43, p.255-293, 2007.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.43, p.3-12, 2002.

HU, Y. CHEN, Y.; CHEN, Q.; ZHANG, L.; JIANG, X.; YANG, C. Synthesis and stimuli-responsive properties of chitosan/poly(acrylic acid) hollow nanospheres. **Polymer**. v.46, p.12703-12710, 2005.

HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y.; YANG, C. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. **Biomaterials**. v.23, p.3193-3201, 2002.

HUACAI, G.; WAN, P.; DENGKE, L. Graft copolymerization of chitosan with acrylic acid under microwave irradiation and its water absorbency. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.372-378, 2006.

INVITTOX/ERGATT/FRAME. MTT citotoxicity test protocol, 1990

JOSHI, J.M.; SINHA, V.K. Ceric ammonium nitrate induced grafting of polyacrylamide onto carboxymethyl chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 427-435, 2007.

KANG, H.M.; CAI, Y.L.; LIU, P.S. Synthesis, characterization and thermal sensitivity of chitosan-based graft copolymers. **Carbohydrate Research**, v.341, p.2851-2857, 2006.

KAZUHIRO, I.; YOSHIBARU, M.; TAKANORI, S.; TSUNEJI, N. **Drug Design and Delivery**, v.4, p.55, 1989.

KITTUR, F.S.; PRASHANTH, K.V.H.; SANKAR, K.U.; THARANATHAN, R.N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydrate Polymers**, v.49, p.185-193, 2002.

KRISHNA RAO, K.S.V., CHUNG, I., HA, C.S. Synthesis and characterization of poly(acrylamidoglycolic acid) grafted onto chitosan and its polyelectrolyte complexes with hydroxyapatite. **Reactive & Functional Polymers**. v.68, p.943-953, 2008.

LABHASETWAR, V.; Nanotechnology for drug and gene therapy: the importance of understanding molecular mechanisms of delivery. **Currente Opinion in Biotechnology**, v.16, p.674-680, 2005.

LAMIM, R.; FREITAS, R.A.; RUDEK, E.L.; WILHELM, H.M.; CAVALCANTI, O.A.; BRESOLIN, T.M.B. Films of chitosan and N-carboxymethylchitosan. Part II: Effect of plasticizers on their physicochemical properties. **Polymer International**, v. 55, p. 970-977, 2006.

LARANJEIRA, M.C.M.; JOSUÉ, A.; FÁVERE, V.T.; KIMURA, I.Y. Liberação Controlada da Eosina Impregnada em Microesferas de Copolímero de Quitosana e Poli(ácido acrílico). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.10, n.3, p.116-121, 2000.

LATTIMER, R.P. Pyrolysis mass spectrometry of acrylic acid polymer. **Journal of Analytical Applied Pyrolysis**, v. 68-69, p. 3-14, 2003.

LEE, Y.S.; PARK, I.H.; YOO, J.S.; CHUNG, S.Y.; LEE, Y.C.; CHO, Y.S.; AHN, S.C.; KIM, C.M.; CHOI, Y.L. Cloning, purification and characterization of chitinase from *bacillus* sp. DAU101. **Bioresource Technology**, v.98, p.2734-2741, 2007.

LI, Y.; LIU, L.; SHEN, X.; FANG, Y. Preparation of chitosan/poly(butyl acrylate) hybrid materials by radiation-induced graft copolymerization based on phthaloylchitosan. **Radiation Physics and Chemistry**, v.74, p.297-301, 2005.

MAO, H.Q.; ROY, K.; TROUNG-LE, V.L.; JANES, K.A.; LIN, K.Y.; WANG, Y.; AUGUST, J.T.; LEONG, K.W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal Control Release**, v.70, p.399-421, 2001.

MEERA, G.; ABRAHAM, T.E. Polyonic hydrocolloids for the intestinal delivery of pretein drugs: Alginate and chitosan – a review. **Journal of Controlled Release**, v.114, p.1-14, 2006.

MIRANDA, M.E.S.; MARCOLLA, C.; RODRIGUES, C.A.; WILHELM, H.A.; SIERAKOWSKI, M.R.; BRESOLIN, T.M.B.; FREITAS, R.A. Chitosan and *N*-carboxymethylchitosan: I. The Role of *N*-carboxymethylation of chitosan in the thermal stability and dynamic mechanical properties of its films. **Polymer International**, v.55, p.961-969, 2006.

MONTEIRO JR, O.A.C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.119-128, 1999.

MOURYA, V.K.; INAMDAR, N.N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive & Functional Polymers**. v.68, p.1013-1051, 2008.

MUN, G.A.; NURKEEVA, Z.S.; DERGUNOV, S.A.; NAM, I.K.; MAIMAKOV, T.P.; SHAIKHUTDINOV, E.M.; LEE, S.C.; PARK, K. Studies on graft copolymerization of 2-hydroxyethyl acrylate onto chitosan. **Reactive & Functional Polymers**. v.68, p.389-395, 2008.

MUZZARELLI, R.A.A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M.; MARIOTTI, S. *N*-(caboxymethylidene) Chitosans: Novel Chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate **Carbohydrate Research**, v.107, p.199-214, 1982.

NISHIMURA, S.I.; KOHGO, O.; KURITA, K. Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: synthesis of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective chemical modifications. **Macromolecules**, v.24, p.4745-4748, 1991.

NISHIYAMA, N.; KATAOKA, K. Currente state, achievements, and future prospects of polymeric micelles as nanocarriers for drug and gene delivery. **Pharmacology & Therapeutics**. v.112, p.630-648. 2006.

PANDEY, R.; AHMAD, Z.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Nano-encapsulation of azole antifungals: Potential applications to improve oral drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.301, p.268-276, 2005.

PEPPAS, N.A.; SAHLIN, J.J. Hydrogels as mucoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v. 17, p. 1553-1561, 1996.

PETER, M. G. Aplicações and environmental aspects of chitin and chitosan. **Journal of Macromoleculare Science Pure and Applied Chemistry**, v. 32, p. 629, 1995.

PUSHPAMALAR, V.; LANDFORD, S. J.; AHMAD, M.; LIM, Y. Y. Optimization of reaction conditions for preparing carboxymethyl cellulose from sago waste. **Carbohydrate Polymers**. v.64, p.312-318, 2006.

RHAZI, M.; DESBRIÈRES, A.; TOLAMAITE, A.; ALAGUI, A.; VOTTERO, P. Investigation of different natural sources of chitin: influence of the source deacetylation processo on the physicochemical characteristics of chitosan. **Polymer International**, v.49, p.337-344, 2000.

ROBERTS, G.A.F. Chitin Chemistry. V.1-110, p.274-315, The Mac Millan Press, London, 1992.

ROSS-MURPHY, S.B. **Physical techniques for the study of food biopolymers**. Ed. By 2.b. Ross-Murphy, Editora Chapman & Hall, Ireland, 1994, 450p.

SALAMAT-MILLER, N.; CHITTCHANG, M.; JOHNSTON, T.P. The use of mucoadhesive polymers in bucal drug delivcery. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.1666-1691, 2005.

SALMAN, H.H.; GAMAZO, C.; CAMPANERO, M.A.; IRACHE, J.M. *Salmonella*-like bioadhesive nanoparticles. **Journal of Controlled Release**. v.106, p.1-13, 2005.

SALMAN, H. H.; GAMAZO, C.; AGUEROS, M.; IRACHE, J. M. Bioadhesive capacity and immunoadjuvant properties of thiamine-coated nanoparticles. **Vaccine**. v. 25, p. 8123-8132, 2007.

SCHAFFAZICH, S.R.; GUTERRES, S.S.; FREITAS, L.L.; POHLMANN, A.R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003a.

SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; DALLA-COSTA, T.; GUTERRES, S.S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.56, p.501-505, 2003b.

SEOUDI, R.; NADA, A.M.A. Molecular structure and dielectric properties studies of chitin and its treated by acid, base and hypochlorite. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n.4, p. 728-733, 2007.

SERRA, L.; DOMENECH, J.; PEPPAS, N.A. Engineering design and molecular dynamics of mucoadhesive drug delivery systems as targeting agents. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.71, p.519-528, 2009.

SHEPHERD, R.; READER, S.; FALSHAW, A. Chitosan functional properties. **Glycoconj Journal**, v.14, p.535-542, 1997.

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

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. Editora John Wiley & Sons, INC., New York, 5^a edição, 1991, 419p.

SINGH, B.N.; KIM, K.H. Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. **Journal of Controlled Release**. v.63, p.235-259, 2000.

SINHA, V.R.;SINGLA, A.K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; BANSAL, K.; DHAWAN, S. Chitosan microspheres as a potencial carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**. v.274, p.1-33, 2004.

SOKKER, H.H.; ABDEL GHAFAR, A.M.; GAD, Y.H.; ALY, A.S. Synthesis and characterization of hydrogels based on grafted chitosan for the controlled drug release. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p.222-229, 2008.

SONAJE, K.; LIN,Y.H.; JUANG, J.H.; WEY, S.P.; CHEN, C.T.; SUNG, H.W. *In vivo* evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. **Biomaterials**. v.30, p.2329-2339, 2009.

SRIUPAYO, J.; SUPAPHOL, P.; BLACKWELL, J.; RUJIRAVANIT, R. Preparation and characterization of α -chitin whisker-reinforced chitosan nanocomposite films with or without heat treatment. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n.2, p. 130-136, 2005.

SUN, H.X.; ZHANG, L.; CHAI, H.; CHEN, H.L. Surface modification of poly(tetrafluoroethylene) films via plasma treatment and graft copolymerization of acrylic acid. **Desalination**, v.192, p.271-279, 2006.

SZUCS, M.; SANDRI, G. BONFERONI, M.C.; CAMELLA, C.M.; VAGHI, P.; SZABO-REVESZ, P.; EROS, I. Mucoadhesive behavior of emulsions containing polymeric emulsifier. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.34, p.226-235, 2008.

TAKEUCHI, H.; THONGBORISUTE, J.; MATSUI, Y.; SUGIHARA, H.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Novel mucoadhesion tests for polymers and polymer-coated particles to design optimal mucoadhesive drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.57, p.1583-1594, 2005.

TIAINEM, P.; GUSTAVSSON, P.E.; MANSSON, M.O.; LARSSON, P.O. Plasmid purification using non-porous anion-exchange silica fibres. **Journal of Chromatography**, v.1149, p.158-168, 2007.

van NOSTRUM, C.F.; HENNINK, W.E. Novel crosslinking methods to design hydrogels. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.54, p.13-36, 2002.

- WANG, T.; ZHANG, Z.; GE, X.; FANG, Y. Grafting of polymers from clay nanoparticles via high-dose gamma-ray irradiation. **Materials Letters**, v.61, p.3723-3727, 2007.
- WESKA, R.F.; MOURA, J.M.; BATISTA, L.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: Use of response surface methodology. **Journal of Food Engineering**. v.80, p.749-753, 2007a.
- WESKA, R.F.; MOURA, J.M.; RIZZI, J.; PINTO, L.A.A. Obtenção de quitosana a partir de carapaças de siri. **Revista brasileira de tecnologia agroindustrial**, v.1, n.1, p.48-52, 2007b.
- WU, Y.; GUO, J.; YANG, W.; WANG, C.; FU, S. Preparation and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) polymer magnetic microspheres. **Polymer**. v.47, p.5287-5294, 2006.
- WUOLIJOKI, E.; HIRVELA, T.; YLITALO, P. Decrease in serum LDL cholesterol with microcrystalline chitosan. **Methods Find Exp Clinical Pharmacology**, v.21, p.357-361, 1999.
- YAZDANI-PEDRAM, M.; LAGOS, A.; RETUERT, J.P. Study of the effect of reaction variables on grafting of polyacrylamide onto chitosan. **Polymer Bulletin**, v.48, p.93-98, 2002.
- YIN, Y.; ZHANG T.; YANG F.; QIU, X. Geometric conditions for fractal super carbon nanotubes with strict self-similarities. **Chaos, Solitons and Fractals**, v. 37, p. 1257-1266, 2008.
- YIN, L.; FEI, L.; CUI, F.; TANG, C.; YIN, C. Superporous hydrogels containing poly(acrylic acid-co-acrylamide)/O-carboxymethyl chitosan interpenetrating polymer networks. **Biomaterials**. v.28, p.1258-1266, 2007.
- YONCHEVA, K.; GUEMBE, L.; CAMPANERO, M. A.; IRACHE, J. M. Evaluation of bioadhesive potential and intestinal transport of pegylated poly(anhydride) nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 334, p. 156-165, 2007.
- YU, C.; YUN-FEI, L.; HUI-MIN, T.; JIAN-XIN, J. Synthesis and characterization of a novel superabsorbent polymer of N,O-carboxymethyl chitosan graft copolymerized with vinyl monomers. **Carbohydrate Polymers**. v.75, p.287-292, 2009.
- YU, L.; LI, L.; WEI'AN, Z.; YUE'E, F. A new hybrid nanocomposite prepared by graft copolymerization of butyl acrylate onto chitosan in the presence of organophilic montmorillonite. **Radiation Physics and Chemistry**. v.69, p.467-471, 2004.
- ZHANG, J.; WANG, Q.; WANG, A. Synthesis and characterization of chitosan-g-poly(acrylic acid)/attapulgit superabsorbent composites. **Carbohydrate Polymers**. v.68, p.367-374, 2007.

ZHU, A.; JIN, W.; YUAN, L.; YANG, G.; YU, H.; WU, H. *O*-Carboxymethylchitosan-based novel gatifloxacin delivery system. **Carbohydrate Polymers**. v.68, p.693-700, 2007.

ZHU, H.; JI, J.; LIN, R.; GAO, C.; FENG, L.; SHEN, J. Surface engineering of poly(D,L-lactic acid) by entrapment of Chitosan based derivatives for the promotion of chondrogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, p.532-539, 2002.

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](#)