UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

ADRIANA PAVINATTO

**EFEITOS ESTRUTURAIS, DE CONFORMAÇÃO E ORIENTACIONAIS
NA INTERAÇÃO DE QUITOSANA COM MODELOS DE MEMBRANA
CELULAR**

SÃO CARLOS
2014

ADRIANA PAVINATTO

**EFEITOS ESTRUTURAIS, DE CONFORMAÇÃO E ORIENTACIONAIS
NA INTERAÇÃO DE QUITOSANA COM MODELOS DE MEMBRANA
CELULAR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Química do Instituto de Química de São Carlos, da
Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho
Co-Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr.

Exemplar Revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

SÃO CARLOS
2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Adriana Pavinatto*
Data: 24/02/2014

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Pavinatto, Adriana

Efeitos estruturais, de conformação e orientacionais na interação de quitosana com modelos de membrana celular / Adriana Pavinatto. – São Carlos, 2014.
156 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Carlos, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho
Coorientador: Prof. Dr. Osvaldo Novais De Oliveira Junior

1. Quitosana. 2. O-acilquitosana. 3. Fosfolípidios. 4. Monocamadas de Langmuir. 5. Filmes de Langmuir-Blodgett. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

*Dedico este trabalho a Deus,
que é o Senhor da minha vida
e a Jesus Cristo, meu Salvador.*

AGRADECIMENTOS

Aos Profs. Dr. Sérgio Paulo Campana-Filho e Dr. Osvaldo Novais de Oliveira Jr. (Chu) pela orientação, ensinamentos, incentivo, dedicação e amizade.

Aos que diretamente contribuíram para este trabalho com discussões e/ou experimentos: Adriano L. Souza, Débora T. Balogh, Felipe J. Pavinatto, Jorge A. M. Delezuk, Diogo Volpati, Silvia Motti, Wilson Carvalho e ao professor Paulo Miranda. Agradeço o essencial auxílio e também pela amizade.

Ao meu esposo Mardoqueu, pelo amor e companheirismo. Ter seu amor, apoio e carinho faz toda diferença na minha vida. Te amo muito.

Aos meus pais Antonio Tadeu e Maria Benedita pela educação, incentivo aos estudos e amor incondicional. Ao meu irmão Felipe e cunhada Thatyane pelo carinho e apoio sempre. A minha sobrinha Alice, por alegrar minha vida com seu sorriso e ser a “flor mais linda do jardim”. Aos meus avós Zé, Nena e Maria, pelo incentivo e amor. Aos meus sogros Gabriel e Ana Maria, cunhados Micael e Miguel, cunhada Dani e sobrinhos Thayná e Elyabner pelo carinho e união. A todos os meus familiares pelo apoio.

Aos amigos do Grupo de Polímeros Bernhard Gross e em especial aos da sala 18C: Analine, Alexandre, Andrey, Josiane, Juliana, Leo, Livia, Rafaela, Val, Vana, Washington e Yurica, pelos momentos de trabalho, distração e pelas festinhas surpresa de aniversário; vocês são especiais. Ao nosso amigo André Brisolari (em memória) que se foi de forma brusca deixando imensas saudades, sua alegria permanece viva em nossos corações.

Aos amigos do grupo de Físico-Química Orgânica: Anderson, Bruno, Cristina, Daniela, Daniele, Érika, Fernando, Joice, Rachel, Tonimar, Virgínea e a professora Elisabete Frollini. Apesar de não convivermos diariamente, sempre me acolheram com carinho e amizade. Agradeço também pelos bolos com café.

As minhas amigas Luiza, Néia, Dilleys e Sandra Vales, por compartilharem momentos de alegria, trabalho e por sempre torcerem por mim. A Anahi por ser uma criança adorável.

A Rosângela, Simone, Níbio, Bertho, Ademir, Felipe, Débora e Bruno pelo indispensável apoio técnico e amizade.

A USP pela excelente infraestrutura e a FAPESP pelo apoio financeiro.

A Deus e Jesus Cristo pela vida, direção, força, proteção e sustentação.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

“Esforça-te e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes, porque o Senhor, teu Deus, é contigo, por onde quer que andares.”

Josué 1:9

RESUMO

PAVINATTO, A. **Efeitos estruturais, de conformação e orientacionais na interação de quitosana com modelos de membrana celular**. 2014. 156 p. Tese (doutorado em Ciências – área de concentração físico-química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Muitas aplicações biológicas da quitosana dependem de sua interação com membranas celulares, cujo mecanismo não é conhecido em nível molecular. Nesta tese, empregam-se filmes de Langmuir dos fosfolipídios dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA) para mimetizar a membrana, e é avaliada a influência dos grupos hidroxila e amino de quitosana nas propriedades dos filmes. Para tanto, *O*-acilquitosanas foram produzidas por meio de reação de acilação, gerando os derivados 3,6 - *O,O'*- dietanoilquitosana (DEQUI) e 3,6 - *O,O'*- dipropanoilquitosana (DPPQUI) solúveis em solução aquosa ácida, e 3,6 - *O,O'*- dimiristoilquitosana (DMQUI) e 3,6 - *O,O'*- dipalmitoilquitosana (DPQUI), solúveis em clorofórmio. DEQUI e DPPQUI afetam mais fortemente as isotermas de pressão de superfície e elasticidade dos filmes do que quitosana, sendo os efeitos de DPPQUI (mais hidrofóbico) maiores do que para DEQUI. Isso indica que ligações hidrogênio envolvendo as hidroxilas da quitosana não são essenciais na interação. Espectros no infravermelho com modulação de polarização (PM-IRRAS) confirmaram interações hidrofóbicas, com penetração dos derivados entre as moléculas de fosfolipídio. DEQUI causa mais ordenamento das cadeias do fosfolipídio, enquanto o efeito de DPPQUI é oposto. DMQUI e DPQUI formam filmes de Langmuir altamente compactados com agregação de moléculas, inferida das isotermas de pressão e potencial de superfície. Os resultados sobre a influência dos grupos amino foram inconclusivos, pois o comportamento atrativo entre os materiais pode ser devido tanto à existência de grupos com cargas opostas, quanto interações hidrofóbicas. Quitosanas com diferentes massas moleculares (alta - QAMM e baixa - QBMM) foram utilizadas para obter informações sobre a orientação dos grupos químicos da quitosana e fosfolipídios e conformação do polímero em solução. Espectros PM-IRRAS indicam maior efeito de QBMM em monocamadas de DPPG, provocando diminuição na intensidade e deslocamento para maiores números de onda das bandas de CH, inversão na orientação do grupo P=O do DPPG e maior intensidade da banda amida II, sugerindo maior densidade desses grupos na interface. Os espectros de geração de soma de frequência (SFG) mostraram diminuição na ordenação/compactação das caudas de DPPG, aumento do espaçamento entre as moléculas e de defeitos *gauche*. Conclui-se que derivados *O*-acilados de quitosana têm maior efeito sobre modelos de membrana, principalmente devido às forças hidrofóbicas, sendo mais adequados em aplicações biológicas que dependam dessa interação. Também favorece a interação com a membrana a atração eletrostática, com efeitos mais relevantes para quitosanas de menores massas moleculares.

Palavras-chave: quitosana, *O*-acilquitosana, fosfolipídios, monocamadas de Langmuir, filmes de Langmuir-Blodgett.

ABSTRACT

PAVINATTO, A. **Structural, conformational and orientational effects on the chitosan interaction with cell membrane models**. 2014. 156 p. Tese (doutorado em Ciências –área de concentração físico-química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Many biological applications of chitosan depend on its interaction with cell membranes, whose mechanism at the molecular level is not known. In this thesis, Langmuir films from the phospholipids dipalmitoyl phosphatidyl choline (DPPC), dipalmitoyl phosphatidyl glycerol (DPPG) and dimyristoyl phosphatidic acid (DMPA) were used to mimic the cell membrane, and effects from the hydroxyl and amine groups in chitosan on the film properties were evaluated. For this, *O* - acylchitosans were produced by acylation reaction, resulting in the derivatives 3,6 - *O*, *O'* - diacetylchitosan (DECT) and 3,6 - *O*, *O'*- dipropionylchitosan (DPPCT), which are soluble in acidic aqueous solution, and 3,6 - *O*, *O'*- dimyristoylchitosan (DMCT) and 3,6 - *O*, *O'*- dipalmitoylchitosan (DPCT), soluble in chloroform. DECT and DPPCT affect the surface pressure and elasticity of the films more strongly than chitosan, especially DPPCT that is more hydrophobic. This indicates that hydrogen bonds involving the hydroxyl groups from chitosan are not essential for the interaction. Polarization-modulated infrared reflection absorption (PM-IRRAS) spectra confirmed hydrophobic interactions with penetration of derivatives between the phospholipid molecules. DECT induces ordering in the chains, while the opposite occurs for DPPCT. DMCT and DPCT form highly compressed films with aggregation, as shown by surface pressure and surface potential isotherms. The results on the importance of amino groups were inconclusive because the attractive behavior between materials may be due to either the oppositely charged groups or hydrophobic interactions. Chitosans with different molecular weights (high - CHMW and low - CLMW) were used to obtain information about the chitosan and phospholipids chemical groups orientation and polymer conformation in solution. PM-IRRAS spectra indicate greater effect from QBMM on DPPG monolayers, causing a decrease in intensity and shift to higher wavenumbers of the CH bands, inversion in the orientation of the P=O group from DPPG and greater intensity of the amide II band, suggesting greater density of these groups at the interface. The sum-frequency generation (SFG) spectra showed a decrease in ordering/packing of the DPPG chains, increased spacing between molecules and *gauche* defects. Overall, the *O*-acyl derivatives of chitosan have greater effect on cell membrane models, owing to hydrophobic forces, being therefore more suitable for biological applications that depend on this interaction. Also important for the interaction is the electrostatic attraction, with more relevant effects observed with low-molecular weight chitosans.

Keywords: chitosan, *O*-acylchitosan, phospholipids, Langmuir monolayers, Langmuir-Blodgett films.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas primárias idealizadas de quitina (A) e quitosana (B), onde n é o grau de polimerização.	32
Figura 2 - Microscopia eletrônica da membrana plasmática - Mp - (a). Modelo de mosaico fluido para membranas celulares, proposto em 1972 por Singer e Nicolson (b).	35
Figura 3 - Modelo de mosaico fluido da membrana celular atualizado, proposto por Nicolson em 2013.	36
Figura 4 - Representação esquemática de um lipossomo e da bicamada lipídica.	38
Figura 5 - Estrutura molecular do ácido esteárico representada por fórmula (a) por modelo de preenchimento espacial (b) e por símbolo (c).	40
Figura 6 - Esquema da Cuba de Langmuir: 1 - Reservatório de água; 2 - Barreiras móveis; 3 - Eletrobalança com sensor de Wilhelmy; 4 - Prova de potencial Kelvin (capacitor vibrante); 5 - Poço para deposição de filme LB.	40
Figura 7 - Estágios da formação do filme, fase gasosa (a), fase líquido-expandida (b) fase líquido-condensada (c) e colapso (d).	41
Figura 8 - Isoterma de π -A para o ácido esteárico e os diferentes graus de compactação das moléculas.	42
Figura 9 - Arranjo experimental da placa de Wilhelmy: (a) vista frontal; (b) vista lateral.	43
Figura 10 - Representação de um capacitor de três camadas para uma monocamada de material anfifílico na interface ar/água.	45
Figura 11 - Esquema de formação de um filme Langmuir-Blodgett (LB).	46
Figura 12 - Esquema da distribuição das moléculas em filmes de Langmuir multicomponentes. (a) componentes miscíveis, filme misto homogêneo; (b) componentes miscíveis, filme misto heterogêneo; (c) componentes imiscíveis, separação completa.	48
Figura 13- Esquema da reação de <i>O,O'</i> - acilação de quitosana, com R= -CH ₃ (derivado DEQUI); -CH ₂ CH ₃ (derivado DPPQUI); -(CH ₂) ₁₂ CH ₃ (derivado DMQUI) e - (CH ₂) ₁₄ CH ₃ (derivado DPQUI).	54

Figura 14 - Estruturas idealizadas dos derivados <i>O,O'</i> - DEQUI (a), <i>O,O'</i> - DPPQUI (b), <i>O,O'</i> - DMQUI (c) e <i>O,O'</i> - DPQUI (d).....	55
Figura 15 - Espectros no infravermelho para a quitosana purificada (a), DEQUI (b), DPPQUI (c), DMQUI (d) e DPQUI (e), em pastilha de KBr.....	59
Figura 16 - Espectro de RMN ^1H da quitosana purificada	60
Figura 17 - Espectros de RMN ^1H para as amostras DEQUI (a), DPPQUI (b), DMQUI (c) e DPQUI (d).	61
Figura 18 - Cromatogramas de distribuição de massas para as amostras DEQUI (a), DPPQUI (b), DMQUI (c) e DPQUI (d).	64
Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica da quitosana.	65
Figura 20 - Cuba de Langmuir Kibron funcionando como tensiômetro.....	69
Figura 21 - Foto da cuba de Langmuir mini da KSV Instruments.....	71
Figura 22 - Foto do equipamento de PM-IRRAS acoplado à cuba de Langmuir.....	72
Figura 23 - Estrutura química dos fosfolipídios DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c).	73
Figura 24 - Espectros no infravermelho para os fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA.	74
Figura 25 - Isotermas de pressão e potencial de superfície para os fosfolipídios DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) em subfase de tampão TS, pH 3,0.	75
Figura 26 - Cinética de adsorção dos derivados DEQUI (a) e DPPQUI (b) em interface limpa.	77
Figura 27 - Cinética de adsorção dos derivados DEQUI (a) e DPPQUI (b) na concentração de $0,0025 \text{ mg mL}^{-1}$ sob monocamada de DMPA.....	78
Figura 28 - Isotermas de pressão de superfície para monocamadas de DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) sobre subfase TS (pH 3,0) contendo DEQUI e DPPQUI em diferentes concentrações indicadas no encarte. Desvio padrão médio de $\pm 1 \text{ \AA}^2$ em área molecular média e $\pm 1,7, \pm 1,8$ e $\pm 1,5 \text{ mN m}^{-1}$ na pressão de superfície para isotermas de DPPC, DPPG e DMPA, respectivamente, contendo os derivados na subfase.....	79
Figura 29 - Comparação da área molecular média de fosfolipídio (DPPC, DPPG e DMPA), na pressão de 30 mNm^{-1} , em função da concentração de DEQUI (a) e DPPQUI (b).	81

Figura 30 - Isotermas de pressão de superfície para DMPA puro em subfase tampão TS (pH 3,0) contendo quitosana, DEQUI e DPPQUI na concentração de 0,05 mg mL ⁻¹ . A isoterma para quitosana foi feita em duplicata, sendo o desvio padrão médio de $\pm 1 \text{ \AA}^2$ em área por molécula e $\pm 1,3 \text{ mN m}^{-1}$ para pressão de superfície.	82
Figura 31 - Isotermas de potencial de superfície de monocamadas de DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) puro sobre subfase contendo DEQUI e DPPQUI na concentração de 0,05 mg mL ⁻¹ .	84
Figura 32 - Módulo de elasticidade no plano para filmes de Langmuir de DPPC, DPPG e DMPA sobre subfases contendo DEQUI (a) e DPPQUI (b) em diferentes concentrações.	86
Figura 33 - Comparação dos efeitos no módulo de elasticidade no plano para filmes de Langmuir de DMPA sobre subfases contendo quitosana, DEQUI e DPPQUI na concentração de 0,05 mg mL ⁻¹ .	87
Figura 34 - Espectro de infravermelho para DMPA (em janela de fluoreto de cálcio) e DMPA/DPPQUI filme LB.	89
Figura 35 - Espectros de PM-IRRAS para monocamada de Gibbs formada por solução de 0,1 mgmL ⁻¹ de DEQUI (a) e DPPQUI (b) em tampão TS, em 30 mN m ⁻¹ .	90
Figura 36 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC pura e formadas sobre subfase tampão TS contendo 0,05 mg mL ⁻¹ de DEQUI e DPPQUI, em 30 mN m ⁻¹ . As diferentes regiões do espectro são mostradas: região de vibração do N-H (a), região de vibração C-H (b) e região de vibração P=O (c).	92
Figura 37 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DMPA pura e formadas sobre subfase tampão TS contendo 0,05 mg mL ⁻¹ de DEQUI e DPPQUI, em 30 mN m ⁻¹ . As diferentes regiões do espectro são mostradas: região de vibração do N-H (a), região de vibração C-H (b) e região de vibração P=O (c).	94
Figura 38 - Isotermas de pressão de superfície e potencial de superfície do derivado DMQUI (a) e DPQUI (b) em subfase tampão TS, pH 3,0.	101
Figura 39 - Isotermas de pressão de superfície para o derivado DMQUI puro e misto com DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) para diferentes proporções NH ₃ ⁺ :PO ₄ ⁻ .	104
Figura 40 - Isotermas de pressão de superfície para o derivado DPQUI puro e misto com DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) para diferentes proporções NH ₃ ⁺ :PO ₄ ⁻ .	105
Figura 41 - Área extrapolada em função da composição para monocamadas mistas de DMQUI e DPQUI e os fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA.	107

Figura 42 - Comparação das isotermas de potencial de superfície dos derivados DMQUI (a) e DPQUI (b) e DMPA puro e para monocamada mista na proporção de 1:1 de $\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$.	109
Figura 43 - Espectros PM-IRRAS de filmes LB de DMQUI e DPQUI puros e mistos com DMPA. As diferentes regiões do espectro são mostradas: região de vibração do N-H e C=O (a e b) e região de vibração C-H (c e d).	110
Figura 44 - Imagens de AFM e rugosidade média quadrática dos filmes LB de DMQUI (a), DPQUI (b), DMQUI/DMPA (c) e DPQUI/DMPA (d).	112
Figura 45 - Imagens de MEV dos filmes LB de DMQUI (a), DPQUI (b), DMQUI/DMPA (c) e DPQUI/DMPA (d).	114
Figura 46 - Interação de feixes para geração de soma de frequências.	119
Figura 47 - Esquema do equipamento de SFG.	120
Figura 48 - Dependência da razão de Rayleigh com a concentração de uma solução de partículas, com dimensão menor que $\lambda/20$.	124
Figura 49 - Diagrama de espalhamento de luz pela solução de macromoléculas, denominado diagrama de Zimm.	125
Figura 50 - Espectros de PM-IRRAS de monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) em vários estágios de compressão, na região de vibração do C-H.	127
Figura 51 - Espectros de PM-IRRAS de monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) formadas sobre subfase tampão TS contendo $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de QAMM e QBMM, em 20 mN m^{-1} , na região de vibração do C-H.	128
Figura 52 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) formadas sobre subfase tampão TS contendo $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de QABMM e QBMM, em 20 mN m^{-1} , na região de vibração do P=O.	129
Figura 53 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) formadas sobre subfase tampão TS contendo $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de QABMM e QBMM, em 20 mN m^{-1} , na região de vibração angular N-H (amida II).	130
Figura 54 - Espectros de SFG na região de vibração de C-H para filmes de Langmuir de DPPG puro e sobre subfase contendo QAMM e QBMM na concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, em 20 mN m^{-1} .	132
Figura 55 - Comparação entre o raio hidrodinâmico (R_h) e o raio de giro (R_g) para duas cadeias poliméricas representando conformação novelo (esquerda) e cadeia estendida (direita).	133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Áreas de aplicação da quitosana.....	33
Tabela 2 - Massa recuperada em gramas para cada reação de síntese dos derivados e o rendimento médio em porcentagem.	58
Tabela 3 - Resumo das características dos derivados acilados de quitosana e da quitosana de partida.....	67
Tabela 4 - Taxa de transferência média dos filmes LB produzidos	110
Tabela 5 - Razão entre R_g/R_h e a relação com a conformação das cadeias [135].....	133
Tabela 6 - Raio hidrodinâmico (R_h) das amostras QAMM, QBMM e PAH em várias concentrações.	134
Tabela 7 - Espalhamento de luz estático (SLS) das amostras QAMM, QBMM e PAH em várias concentrações.	135

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DEQUI - 3,6 - *O,O'* - dietanoilquitosana

DPPQUI - 3,6 - *O,O'* - dipropanoilquitosana

DMQUI - 3,6 - *O,O'* - dimiristoilquitosana

DPQUI - 3,6 - *O,O'* - dipalmitoilquitosana

DPPC - dipalmitoil fosfatidil colina

DPPG - dipalmitoil fosfatidil glicerol

DMPA - ácido dimiristoil fosfatídico

QAMM - Quitosana com alta massa molecular

QBMM - Quitosana com baixa massa molecular

GlcNAc - 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose

GlcN - 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose

$\overline{GA}$ - Grau médio de acetilação

$\overline{M}_v$ - Massa molecular média viscosimétrica

$\overline{M}_n$ - Massa molecular média numérica

$\overline{M}_w$ - Massa molecular média ponderal

$\overline{M}_w / \overline{M}_n$ - Polidispersividade

GPC - Cromatografia de permeação em gel

FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho

RMN ^1H - Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

Cs^{-1} - Módulo de compressibilidade

PM-IRRAS - Espectroscopia de reflexão e absorção no infravermelho com modulação da polarização

SFG - Espectroscopia de geração de soma de frequências

AFM - Microscopia de força atômica

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

LB - Langmuir-Blodgett

TR - taxa de transferência

SUMÁRIO

Apresentação	27
Motivação e objetivos	29
1 Capítulo 1 - Introdução e Revisão Bibliográfica	31
1.1 Quitosana e seus derivados.....	31
1.2 Membrana Celular e modelos que a mimetizam	34
1.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)	39
1.3.1 Interações utilizando monocamadas uni ou multicomponentes.....	47
1.4 Quitosana interagindo com membranas reais e modelos	49
1.4.1 Aplicações em que quitosana interage com membranas celulares reais	49
1.4.2 Quitosana e modelos de membrana celular.....	50
2 Capítulo 2- Síntese dos derivados O,O' - acilquitosana	53
2.1 Procedimento experimental.....	53
2.1.1 Matéria-prima.....	53
2.1.2 Síntese dos derivados solúveis em solução aquosa ácida	53
2.1.3 Síntese dos derivados solúveis em clorofórmio	54
2.1.4 Caracterização da matéria-prima e dos derivados O-acilados	55
2.2 Resultados e discussão	57
2.2.1 Rendimento de reação	57
2.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).....	58
2.2.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H)	59
2.2.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)	63
2.2.5 Titulação Condutimétrica.....	65
2.2.6 Viscosimetria.....	66
2.3 Conclusões.....	67
3 Capítulo 3 - Interação dos derivados 3,6 - O,O' - dietanoilquitosana (DEQUI) e 3,6 - O,O' - dipropanoilquitosana (DPPQUI) com modelos de membrana celular	69
3.1 Procedimento Experimental	69
3.1.1 Cinética de adsorção dos derivados DEQUI e DPPQUI.....	69
3.1.2 Interação de DEQUI e DPPQUI com monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA	69
3.1.3 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)	71
3.2 Resultados e Discussão	73
3.2.1 Isotermas dos filmes de Langmuir dos fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA.....	73
3.2.2 Cinética de adsorção dos derivados DEQUI e DPPQUI.....	76
3.2.3 Isotermas de pressão de superfície	79
3.2.4 Isotermas de potencial de superfície	83
3.2.5 Elasticidade no plano	85
3.2.6 Filmes Langmuir-Blodgett(LB)	87
3.2.7 PM-IRRAS.....	89
3.3 Conclusões.....	96

4 Capítulo 4 - Interação dos derivados 3,6 - <i>O,O'</i>- dimiristoilquitosana (DMQUI) e 3,6 - <i>O,O'</i>- dipalmitoilquitosana (DPQUI) com modelos de membrana celular	99
4.1 Procedimento Experimental.....	99
4.1.1 Formação de filmes de Langmuir dos derivados DMQUI e DPQUI e interação com monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA	99
4.1.2 Filmes Langmuir-Blodgett (LB).....	99
4.2 Resultados e Discussão	100
4.2.1 Formação de filmes de Langmuir puros dos derivados DMQUI e DPQUI	100
4.2.2 Interação de DMQUI e DPQUI com monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA	102
4.2.3 Filmes Langmuir-Blodgett (LB).....	109
4.3 Conclusões	115
5 Capítulo 5 - Estudos sobre a orientação e conformação dos fosfolipídios e quitosana	117
5.1 Procedimento Experimental.....	117
5.1.1 PM-IRRAS	117
5.1.2 Espectroscopia de geração de soma de frequências (SFG)	118
5.1.3 Espalhamento de luz	120
5.2 Resultados e discussão	126
5.2.1 PM IRRAS.....	126
5.2.2 Espectroscopia de geração de soma de frequências (SFG)	130
5.2.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS)	132
5.3 Conclusões	136
Conclusões Finais e Perspectivas	139
Referências Bibliográficas	143

Apresentação

Este trabalho de doutorado foi realizado no período entre março de 2010 a fevereiro de 2014 (48 meses). O trabalho experimental foi realizado no grupo de Polímeros Bernhard Gross do Instituto de Física de São Carlos e no grupo de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos, com exceção das análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) de derivados de quitosana solúveis em clorofórmio e das imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que foram realizadas na Universidade Federal de São Carlos sob supervisão do Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira e no Laboratório de Caracterização Estrutural (LEC), respectivamente, e das medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS), realizadas no grupo de biofísica molecular (IQSC-USP) sob a supervisão do Prof. Dr. Marcel Tabak, professores aos quais agradecemos pela colaboração.

A tese está dividida em 5 Capítulos além da motivação e objetivos, conclusões finais e perspectivas. Os capítulos incluem: 1) introdução e revisão bibliográfica sobre os principais assuntos abordados no trabalho; 2) a produção e caracterização dos derivados *O,O'*-acilquitosana; 3) estudo da influência dos grupos hidroxila da quitosana nas interações do polímero com modelos de membrana celular; 4) estudo da influência dos grupos amino da quitosana nas interações do polímero com modelos de membrana celular e 5) estudo da conformação da quitosana em solução e da orientação desta quando adsorve nos modelos de membrana celular. Pretende-se com o capítulo 1 dar ao leitor suporte teórico para entendimento do trabalho; os demais capítulos compreendem em detalhes o procedimento experimental, resultados, discussões e conclusões específicas dos tópicos em questão. Ao final é feita uma conclusão geral do trabalho e são apontadas perspectivas.

Motivação e objetivos

Quitosana é um biopolímero com aplicações em diversas áreas, destacando-se sua ação como agente antimicrobiano, o uso na entrega controlada de drogas, na transfecção, na redução no colesterol e peso, e na engenharia de tecidos [1-3]. Em aplicações internas ao corpo humano, ou como agente bactericida, a quitosana certamente interage com membranas celulares sugerindo que sua ação nas membranas pode governar a atividade. O mecanismo de interação da quitosana com as membranas celulares, entretanto, não é completamente conhecido. Nesse contexto, estudos em nível molecular com quitosana em membranas celulares são importantes para detalhar seu mecanismo de ação e, conseqüentemente, aplicações.

Devido à grande dificuldade de realizar experimentos *in vivo* com membranas celulares, recorre-se a modelos. Embora o uso desses modelos seja de grande ajuda no entendimento da ação de quitosanas em nível molecular, poucos trabalhos são encontrados na literatura nesse sentido. Nos últimos anos, grandes esforços foram feitos no Grupo de Polímeros Bernhard Gross/IFSC-USP na investigação da ação/interação de quitosana com modelos de membrana [4-12]. Alguns dos projetos, incluindo o desta tese, foram desenvolvidos em colaboração com o Grupo de Físico-Química Orgânica/IQSC-USP. Os modelos de membrana celular simplificados foram mimetizados com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB) de fosfolipídios ou um pouco mais complexos com a inserção de outros componentes da membrana celular, como colesterol e proteínas.

Utilizando modelos simplificados de membranas apenas com fosfolipídios, verificou-se atividade induzida da quitosana pelas monocamadas de fosfolipídios neutros (DPPC - dipalmitoil fosfatidil colina) [6] ou negativamente carregados (DPPG - dipalmitoil fosfatidil glicerol e DMPA - ácido dimiristoil fosfatídico) [5, 6], ou mesmo por monocamadas fosfolipídicas contendo colesterol [4]. A adsorção da quitosana nas monocamadas lipídicas indica forte interação entre os materiais, e através da deposição de filmes LB observou-se que quitosana permanece na interface interagindo com as monocamadas mesmo em altas pressões de superfície (40 mN m^{-1}). Em estudos com sistemas mais complexos (filmes de Langmuir de fosfolipídios/proteína) [7, 8] observou-se que quitosana remove a β -lactoglobulina (proteína do leite) e mucina (glicoproteína constituinte do muco) de monocamadas lipídicas negativamente carregadas. A remoção é devida, provavelmente, à complexação da quitosana com a proteína; o mesmo comportamento não foi observado em monocamadas de fosfolipídio neutro e de colesterol. Ainda em sistemas mais complexos (fosfolipídio/colesterol) [12]

observou-se que o colesterol age como mediador na atividade da quitosana em filmes de Langmuir e LB, regulando a penetração do polissacarídeo nas monocamadas lipídicas. Em todos os trabalhos realizados, as atrações eletrostáticas desempenham papel importante na interação entre os modelos de membrana e a quitosana. Porém, mostrou-se que essa não é a única força na interação, e que o fato de a quitosana ser um polímero é essencial para sua ação [10]. Essa ideia foi reforçada [11] com a constatação que quitosana com baixa massa molecular afeta mais fortemente as monocamadas lipídicas do que as de alta massa molecular. Esta última observação se deve à maior facilidade no acesso a monocamadas pelas cadeias de menor tamanho, com menor impedimento causado por enovelamento das cadeias em solução.

Embora os estudos já realizados forneçam uma visão geral sobre o modo de ação de quitosana, há ainda vários aspectos a serem considerados para determinar sua ação. Neste trabalho, em particular, o objetivo é avaliar a influência dos grupos hidroxila e amino da quitosana na interação com modelos de membrana celular. Pretende-se, também, avaliar a conformação/estrutura das cadeias do polímero em solução e a orientação dos seus grupos químicos quando adsorve nas monocamadas lipídicas. Para tanto, a obtenção de derivados *O,O'*- acilquitosana com diferentes tamanhos de cadeias laterais inseridas, a saber, etanoil (2C), propanoil (3C), miristoil (14C) e palmitoil (16C), é almejada para posterior estudo na interação com filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de fosfolipídios.

1 Capítulo 1 - Introdução e Revisão Bibliográfica

1.1 Quitosana e seus derivados

Quitosana é um polímero natural encontrado nas paredes celulares e em esporos de algumas espécies de fungos (ordem: *Mucor*, classe: *Zygomycetes*) [13, 14]. Entretanto, a principal forma de obtenção da quitosana é a partir da reação de desacetilação de quitina, polímero que possui alguns importantes limitantes em aplicações, especialmente por sua baixa solubilidade e reatividade. A quitina é um polissacarídeo abundante na natureza, principalmente em exoesqueletos de invertebrados (insetos, crustáceos e moluscos) e nas paredes celulares de fungos e algas, onde é produzida por biossíntese [1, 3]. A produção de quitosana por essa via, i.e., por desacetilação de quitina, é interessante, pois a quitosana apresenta melhor solubilidade, menor cristalinidade e maior acessibilidade para modificações químicas, devido aos grupos altamente reativos que possui em suas unidades repetitivas, principalmente os grupos amino.

Obtém-se quitosana a partir de quitina por meio da hidrólise dos grupos acetamido das unidades acetiladas das cadeias de quitina, dando origem a grupamentos amina. A Figura 1 mostra as estruturas de quitina e quitosana. A hidrólise pode ser realizada tanto em condições ácidas quanto alcalinas [1], mas o meio ácido não é comumente empregado, pois as ligações glicosídicas também podem sofrer hidrólise, causando despolimerização. Assim, os procedimentos mais utilizados na desacetilação de quitina, tanto em laboratórios quanto indústrias, empregam meios alcalinos. Além da hidrólise alcalina convencional, outros processos para produzir quitosana incluem o uso de irradiação de ultrassom [15], de microondas [16], de agentes redutores [17] e tratamentos sucessivos de desacetilação [18, 19], sendo ainda possível promover a desacetilação enzimática de quitina.

A quitina, polissacarídeo de cadeia linear, é formada predominantemente por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) unidas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$, enquanto nas cadeias de quitosana predominam unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) unidas pelo mesmo tipo de ligação [1]. Na obtenção da quitosana raramente a desacetilação da quitina é completa e, assim, a diferenciação entre esses dois polissacarídeos é feita pelo conteúdo de unidades GlcNAc (ou GlcN), e pelas diferentes solubilidades que quitina e quitosana apresentam, sendo que o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) expressa o teor médio de unidades GlcNAc por cadeia polimérica. O valor do parâmetro $\overline{GA}$ permite a

distinção entre quitina e quitosana e também afeta fortemente as propriedades físico-químicas e aplicações desses polímeros. O produto da desacetilação da quitina é denominado quitosana somente se a porcentagem média de unidades GlcNAc for menor ou igual a 40% ($\overline{GA} \leq 40\%$) [1], e se o polímero for solúvel em soluções diluídas de ácidos. O grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e a massa molecular média são características importantes da quitosana que, juntamente com a distribuição das unidades GlcN e GlcNAC nas cadeias, têm efeito marcante sobre sua solubilidade [20].

Figura 1 - Estruturas primárias idealizadas de quitina (A) e quitosana (B), onde n é o grau de polimerização.

A quitina é um polissacarídeo com solubilidade limitada a alguns poucos solventes, como *N,N*-dimetilacetamida/LiCl. Já a quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos inorgânicos como ácido clorídrico, bromídrico, iodídrico e nítrico, assim como em soluções de ácidos orgânicos como o ácido acético e fórmico. Sua solubilidade em soluções ácidas é devida aos grupos amino primários das unidades GlcN, cujo pK_a é $\cong 6,3$. De fato, em meios aquosos moderadamente ácidos (pH<6), a maioria dos grupos aminos das unidades GlcN está em sua forma protonada (NH₃⁺), tornando a quitosana um polieletrólito catiônico solúvel nesses meios. Sendo o valor de pK_a dependente do grau de acetilação, a solubilidade da quitosana depende da quantidade de grupos aminos protonados na cadeia polimérica [21].

A quitosana possui propriedades que a diferenciam de outros polímeros, pois é obtida a partir de fontes renováveis, é biocompatível, biodegradável e exibe baixa toxicidade. Além disso, quitosana apresenta atividade antimicrobiana e é um dos raros polímeros catiônicos

naturais, sendo que a densidade de carga positiva depende do $\overline{GA}$ [1-3]. Os grupos positivamente carregados de quitosana conferem ao polímero a capacidade de interagir com espécies carregadas negativamente, tais como superfícies celulares, poliânions, proteínas, pesticidas e corantes. Além disso, quitosana exibe afinidade por íons metálicos, radioisótopos e lipídios e possui versatilidade na manipulação, podendo ser utilizada em forma de pó, fibra, géis de viscosidade controlada, filmes, membranas e nanopartículas. As características e propriedades de quitosana favorecem seu emprego na indústria de cosméticos, na medicina, na indústria alimentícia, no tratamento de águas, em biotecnologia, na agricultura e na indústria têxtil [2, 22, 23]. A Tabela 1 resume algumas das aplicações.

Tabela 1- Áreas de aplicação da quitosana.

Área	Aplicação
Agricultura	Recobrimento de frutas [24], estimulante do crescimento de plantas (fertilizantes) [25], liberação controlada de agroquímicos [26].
Biotecnologia	Imobilização de enzimas e células em biossensores, eletrodos para detecção de glicose [27, 28].
Cosméticos	Creme dental [29], cremes hidratantes para o corpo, rosto e cabelos, hidrogéis e sabonetes.
Indústria Alimentícia	Remoção de pigmentos, sólidos e substâncias ácidas de sucos de laranja, maçã e cenoura.
Indústria Têxtil	Impregnação em tecidos (roupas e toalhas), visando à atividade antimicrobiana [30].
Medicina	Lentes de contato, curativos, tratamento de acne, pele artificial e em pomadas contra queimaduras e dispositivos para liberação controlada de drogas [31].
Tratamento de águas	Remoção de contaminantes de efluentes industriais [32, 33], como agente floculante, remoção de metais pesados [34], na filtração.

Assim como a quitosana é obtida da quitina para melhorar características visando a aplicações, derivados de quitosana são produzidos com o intuito de gerar novas propriedades,

melhorar as já existentes ou obter novas funcionalidades [35]. As modificações estruturais visam conferir novas propriedades sem alterar a estrutura da cadeia principal do polímero, sendo feitas modificações químicas nos grupos reativos das unidades de quitosana, a saber, hidroxilas alcólicas, grupos amino e acetamida. Dentre as principais derivatizações, destacam-se: alquilação, acilação, quaternização, hidroxialquilação, carboximetilação, tiolação, sulfonação, fosforilação e modificações enzimáticas. Além das modificações na cadeia lateral, oligômeros de quitosana também são obtidos por despolimerização das cadeias até atingir massa molecular ($\overline{Mw} \leq 10\,000\text{ g mol}^{-1}$) [36].

Os oligômeros de quitosana são produtos de despolimerização decorrentes de reações enzimáticas, químicas ou de processos físicos. Os quitooligossacarídeos têm a vantagem da excelente solubilidade e, em alguns casos, apresentam propriedades antibacterianas superiores às da quitosana de partida [37, 38]. Já as reações de alquilação, acilação, carboximetilação, tiolação e sulfonação de quitosana permitem inserir grupos funcionais nos sítios reativos do polímero e podem gerar derivados *O*-substituídos, *N*-substituídos e *N,O*-substituídos, dependendo dos reagentes empregados e da rota sintética adotada. Muitas derivatizações com inserção de grupos químicos na cadeia da quitosana visam a alterar sua solubilidade, restrita a meios aquosos moderadamente ácidos. A reação de carboximetilação, por exemplo, resulta em derivado hidrossolúvel em meios neutro e alcalino, que pode ser empregado na interação com fluídos biológicos de $\text{pH} \approx 7,6$ [39]; a alquilação ou acilação da quitosana, com agente reacional com longas cadeias de hidrocarbonetos, gera derivados anfifílicos de quitosana que exibem solubilidade em solventes orgânicos, como clorofórmio ou tetrahidrofurano (THF) [40-44]. Já a reação de quaternização é um caso específico de alquilação extensiva dos átomos de nitrogênio dos grupos amino das unidades GlcN, gerando o derivado *N,N,N*-trimetilquitosana, solúvel em ampla faixa de pH e concentração [45].

1.2 Membrana Celular e modelos que a mimetizam

A diferenciação entre os seres vivos, com relação a sua formação celular, é feita em organismos procariotos e eucariotos. Os procariotos são organismos constituídos por células que não possuem membrana interna delimitando o núcleo celular; já os organismos eucariotos são constituídos por células eucariotas, que possuem membrana delimitando o núcleo celular e, além disso, possuem diversas organelas no citoplasma (como a mitocôndria, responsável pela respiração celular) não existentes nas células procariotas. A maioria dos animais e plantas são seres eucariotos, incluindo o ser humano, sendo organismos pluricelulares. Os

procariotos são geralmente bactérias e algas. A membrana plasmática, por sua vez, é a membrana que delimita o citoplasma - interior da célula constituído por organelas e núcleo - do meio externo [46].

Singer e Nicolson propuseram em 1972 um modelo estrutural para a membrana celular, denominado modelo de mosaico fluido [47], ilustrado na Figura 2b. Os autores afirmam que o modelo de mosaico fluido é o único aceitável levando-se em conta os resultados experimentais disponíveis (até então) e as restrições impostas pela termodinâmica. Segundo o modelo, a estrutura da membrana celular é composta por proteínas integrais globulares embebidas em uma bicamada lipídica, de maneira que seus grupos iônicos ou altamente polares estão voltados para a fase aquosa (exterior da membrana) e os grupos não polares no interior hidrofóbico da bicamada. A maior parte dos fosfolipídios, os principais componentes lipídicos da membrana celular, está em um sistema fluido, embora haja algumas interações específicas destes com as proteínas, que podem difundir de maneira lateral e rotacional [48].

Figura 2 - Microscopia eletrônica da membrana plasmática - Mp - (a). Modelo de mosaico fluido para membranas celulares, proposto em 1972 por Singer e Nicolson (b).

Fonte: Disponível em: <http://www.biomania.com.br/bio/conteudo.asp?cod=1264>. Acesso em: 13 jan. 2014 (a). Disponível em <http://www.zonagratis.com/enciclopedia/biologia/celula/a-imagens/membrana-celular.jpg>. Acesso em: 13 jan. 2014(b).

Recentemente, Nicolson publicou um artigo de revisão trazendo as principais atualizações e alterações no modelo de 1972 [49]. O trabalho reúne os principais avanços e descobertas dos últimos 40 anos sobre a estrutura, dinâmica e organização dos componentes e suas relações com a função da membrana celular. Dentre as alterações do modelo original, ressaltamos a importância da formação de domínios (aglomerações de componentes iguais) na membrana celular, como asjangadas de lipídios e os complexos de proteínas e glicoproteínas na microestruturação, assim como a associação entre a membrana, o citoesqueleto e a matriz celular, que se mostram essenciais na limitação da difusão lateral e na amplitude da movimentação dos componentes da membrana, na descrição da macroestrutura. Apesar de serem feitas importantes alterações no modelo proposto inicialmente, o autor afirma que o modelo básico continua relevante para descrever a variada estrutura da membrana celular de células de plantas e animais, sendo apenas adicionada complexidade no modelo atualizado. O novo modelo é mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Modelo de mosaico fluido da membrana celular atualizado, proposto por Nicolson em 2013.

Fonte: Nicolson, G.L., The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **BBA – Biomembranes**, 2013, doi: 10.1016/j.bbamem.2013.10.019 [49].

Os componentes mais abundantes das membranas celulares são os lipídios e as proteínas. Os polissacarídeos aparecem em menor porcentagem, geralmente ligados covalentemente aos outros constituintes. Nas células animais, a porcentagem desses constituintes varia de acordo com o tipo de célula, podendo conter de 30% a 80% de lipídios, de 20% a 60% de proteínas e de 0% a 10% de polissacarídeos [50]. A razão lipídio/proteína é também variável em diferentes tipos de membranas. Os lipídios incluem ácidos graxos, glicolipídios (glicosil-diacilgliceróis), esfingolipídios, esteróis, lipopolissacarídeos (LPS), além dos fosfolipídios.

A enorme diversidade de lipídios é marcante em membranas biológicas. Dentre eles se destacam os fosfolipídios, que também variam em tipos e composições dependentes da célula. Os fosfolipídios mais encontrados na membrana plasmática, por exemplo, são fosfatidilcolina – PC - (39%), fosfatidiletanolamina - PE - (23%), fosfatidilserina - PS - (9%) e fosfatidilinositol - PI - (8%) [50, 51]. Aparecem em menores proporções os ácidos fosfatídicos (PA), cardiolipinas (CL), lisoglicerofosfolipídios (LGP), esfingomielinas (SM) e colesterol. As proteínas, importantes componentes das membranas, podem ser de dois tipos, as integrais ou transmembrana que, por possuírem domínios hidrofóbicos, se inserem na parte externa e hidrofóbica da bicamada fosfolipídica, atravessando-a; e as periféricas, que possuem baixo caráter hidrofóbico e se localizam na parte polar da bicamada, a parte externa mostrada na Figura 2.

A espessura da membrana celular é de aproximadamente 7 nm - 10 nm, variando de acordo com as proteínas integrais e periféricas e com a presença de lipopolissacarídeos e glicopolissacarídeos. A disposição dos constituintes afeta a fluidez da membrana, como é o caso do colesterol [50, 52]. As interações entre a célula e seu ambiente externo são reguladas por processos que dependem da membrana plasmática, e essa dependência está relacionada aos tipos de lipídios na membrana cuja especialização e diversidade desempenham papel importante na funcionalidade e diferenciação celular.

Devido à dificuldade em caracterizar células diretamente e esclarecer as interações moleculares na membrana, surgiram sistemas que mimetizam uma membrana celular. Vários são hoje utilizados, incluindo as dispersões esféricas multi ou unilamelares (lipossomos) e as monocamadas de Langmuir e Langmuir-Blodgett [53].

Lipossomo é o nome utilizado para vesículas com volume aquoso no interior da bicamada lipídica. A estrutura forma-se espontaneamente quando lipídios são aquecidos acima da temperatura crítica em meio aquoso, tendo tamanho entre 10 nm e 10 µm. Os diferentes tamanhos e número de lamelas são definidos pelo método de preparação dos

lipossomos, classificados em: vesículas com apenas uma lamela, compreendendo as vesículas unilamelares pequenas (*SUVs - small unilamellar vesicles*) com diâmetro de até 50 nm, vesículas unilamelares grandes (*LUVs - large unilamellar vesicles*) com diâmetro de 50 nm a 500 nm e vesículas unilamelares gigantes (*GUVs - giant unilamellar vesicles*) com diâmetro de até 1 μm , e as vesículas multilamelares (*MLVs - multilamellar vesicles*) constituídas por cinco ou mais lamelas, com diâmetro de até 10 μm [48]. A Figura 4 mostra a representação esquemática de um lipossomo unilamelar e da bicamada lipídica. A formação estrutural dos lipossomos mimetiza a membrana celular por meio da formação de bicamadas, permitindo estudar a interação com polímeros, proteínas, peptídeos e drogas. Eles podem também ser usados para simular fenômenos de transporte de material através da membrana [50].

Figura 4 - Representação esquemática de um lipossomo e da bicamada lipídica.

Fonte: Disponível em: <http://djalmasantos.files.wordpress.com/2011/02/lipo1.jpg>. Acesso em: 15 jan. 2014.

Monocamadas lipídicas têm sido usadas como modelos de membrana [54, 55], como as de Langmuir e os filmes LB [56, 57], alternativos aos modelos de bicamadas. Os filmes de Langmuir, em especial, não mimetizam toda a membrana, mas modelam apenas metade dela. Suas principais vantagens como modelos de membrana são: i) permitem controle rigoroso da

composição das membranas; ii) permitem controle do estado de compactação, e assim da estruturação da monocamada, e; iii) há planaridade, que se aproxima ao formato de uma superfície celular, ao contrário de lipossomos que têm grande curvatura na superfície. Porém, a formação de monocamadas traz desvantagens como a inviabilidade de estudos de transporte através da membrana e no carregamento de moléculas. Há correlações importantes entre as monocamadas e bicamadas [58, 59]. Diversos grupos de pesquisa usam filmes de Langmuir e filmes LB para estudar as interações de membranas com biomoléculas, tais como peptídeos [54], enzimas [60] e polieletrólitos naturais ou modificados [57]. Os filmes de Langmuir e LB foram utilizados neste trabalho como modelos de membrana celular e, por isso, detalhes sobre sua formação e caracterização são descritos no tópico a seguir.

1.3 Filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett (LB)

Os primeiros experimentos de formação de filmes lipídicos na interface da água foram realizados em 1765 por Benjamim Franklin, espalhando óleo em água. Apesar dos experimentos iniciais datarem do século XVIII, somente em 1913 William Hardy afirmou que o filme monomolecular era formado por moléculas anfifílicas, moléculas constituídas por uma parte apolar hidrofóbica (cauda hidrofóbica) e outra parte polar hidrofílica (cabeça hidrofílica) e que assim as moléculas se auto-organizam na interface com a parte polar voltada para a água e a parte apolar voltada para o ar. A Figura 5 mostra a estrutura de uma molécula anfifílica, o ácido esteárico. Em 1917, o cientista norte-americano Irving Langmuir (1881-1957) confirmou essa orientação espontânea das moléculas e estudou os fenômenos interfaciais para formar esses filmes, hoje conhecidos como filmes de Langmuir. As contribuições de Irving Langmuir sobre fenômenos interfaciais renderam-lhe o Prêmio Nobel de Química em 1932 [61, 62].

Figura 5 - Estrutura molecular do ácido esteárico representada por fórmula (a) por modelo de preenchimento espacial (b) e por símbolo (c).

As monocamadas de Langmuir são formadas ao espalhar uma pequena quantidade de solução de um material anfifílico e insolúvel em água, solubilizado em solvente volátil, na interface ar-água, dando origem a um filme de espessura monomolecular [63]. Os filmes são produzidos em recipientes conhecidos como cubas de Langmuir, feitas de material inerte, geralmente Teflon. A Figura 6 mostra um esquema da cuba de Langmuir.

Figura 6 - Esquema da Cuba de Langmuir: 1 - Reservatório de água; 2 - Barreiras móveis; 3 - Eletrobalança com sensor de Wilhelmy; 4 - Prova de potencial Kelvin (capacitor vibrante); 5 - Poço para deposição de filme LB.

As cubas de Langmuir são equipadas com barreiras móveis, que permitem a diminuição da área ocupada (compressão dos filmes), sensores de pressão e do potencial de superfície (ver detalhes do esquema na Figura 6). Através do fechamento de barreiras móveis, e diminuição da área ocupada pelo filme, altera-se o grau de compactação da monocamada, e então as propriedades do filme podem ser estudadas por diversas técnicas nos diferentes estágios da compressão. A Figura 7 mostra os três estágios principais da formação do filme (em diferentes graus de compressão) e o colapso. No estágio inicial, o filme está no que é conhecida como fase gasosa, a área é máxima e as moléculas não “sentem” a presença umas das outras (Figura 7a). Com a compressão, a área é diminuída até que se atinja a fase líquido-expandida, na qual as moléculas começam a interagir, “sentindo” a presença umas das outras (Figura 7b). Com a subsequente diminuição da área, as moléculas são forçadas a se organizar, formando um arranjo regular em um filme condensado, na fase conhecida como líquido-condensada. É o ponto de máxima compressão onde se obtém o filme monomolecular (Figura 7c). A partir desse ponto, persistindo a compressão as moléculas começam a se agrupar desordenadamente, ocorrendo o colapso do filme (Figura 7d).

Figura 7 - Estágios da formação do filme, fase gasosa (a), fase líquido-expandida (b) fase líquido-condensada (c) e colapso (d).

As técnicas de caracterização de monocamadas mais empregadas são as medidas de pressão (π) e potencial (ΔV) de superfície. A pressão de superfície (π) é a diminuição da tensão de superfície da subfase aquosa devido à presença do filme, ou seja: $\pi = \gamma_0 - \gamma$, onde γ é a tensão de superfície com a presença do tensoativo, e γ_0 é a tensão de superfície da água pura. Uma curva característica de pressão-área, obtida para o ácido esteárico (um ácido graxo), é mostrada na Figura 8. Os estados da monocamada podem ser analisados a partir do perfil da curva bidimensional de pressão de superfície *versus* área por molécula e interpretados de forma análoga aos estados tridimensionais da matéria (gasoso, líquido, sólido). A relação entre as regiões da isoterma de $\pi \times A$ com a compactação das moléculas do filme também é mostrada na Figura 8. Além de ácidos graxos, fosfolipídios são moléculas ideais para a formação de filmes de Langmuir, pois têm em sua estrutura química partes apolares e polares bem definidas, favorecendo a auto-organização na interface e a formação do filme.

Figura 8 - Isotherma de π -A para o ácido esteárico e os diferentes graus de compactação das moléculas.

A técnica de Wilhelmy é a mais usada para determinar a pressão de superfície de monocamadas de Langmuir. A pressão de superfície é obtida medindo-se a força por unidade de comprimento em uma placa de Wilhelmy, feita de material hidrofílico inerte ao composto formador da monocamada. A placa é suspensa perpendicularmente à interface (inserida na monocamada) presa em uma balança sensível, conforme mostra a Figura 9. As forças atuantes

na placa são a força peso (massa x aceleração da gravidade), tensão de superfície (γ) e força de empuxo, devido à água deslocada para cima. A resultante líquida (F) é dada pela Equação 1:

$$F = \rho_w g l w t + 2\gamma(t + w)\cos\theta - \rho_L g t w h \quad (\text{Equação 1})$$

onde l , w e t são as dimensões de uma placa retangular, ρ_w é a densidade do material da placa imersa em uma profundidade h e ρ_L é a densidade do líquido. Geralmente, escolhe-se uma placa de Wilhelmy que seja totalmente umedecida pela subfase (papel de filtro), fazendo com que o ângulo $\theta = 0$, e pode-se medir a alteração em F para uma placa estacionária. A variação de força, ΔF , está relacionada à variação na tensão de superfície $\Delta\gamma$ (considerando $t \ll w$) pela Equação 2 [64].

$$\Delta\gamma = \frac{\Delta F}{2w} \quad (\text{Equação 2})$$

Figura 9 - Arranjo experimental da placa de Wilhelmy: (a) vista frontal; (b) vista lateral.

O potencial de superfície pode ser medido por uma prova Kelvin ou do capacitor vibrante, na qual uma das placas do capacitor vibra milímetros acima da superfície aquosa. O potencial de superfície (ΔV) é a diferença de potencial entre a superfície e a subfase com

(ΔV_2) e sem tensoativo (ΔV_1), ou seja, $\Delta V = \Delta V_2 - \Delta V_1$. O valor da diferença de potencial de superfície ΔV é obtido pela Equação 3, seguindo o modelo proposto por Demchak e Fort (DF) [65], onde a monocamada é tratada como um capacitor de 3 camadas, cada qual com um momento de dipolo efetivo e uma constante dielétrica local.

$$\Delta V = \frac{n}{\varepsilon_0} \left(\frac{\mu_1}{\varepsilon_1} + \frac{\mu_2}{\varepsilon_2} + \frac{\mu_3}{\varepsilon_3} \right) + \psi_0 \quad (\text{Equação 3})$$

onde n é a densidade de superfície de dipolos (número de moléculas por unidade de área), ε_0 é a permissividade do vácuo ($\varepsilon_0 = 8,854 \times 10^{-12} \text{ F m}^{-1}$) e μ é o momento de dipolo total que inclui contribuições do dipolo elétrico da cabeça polar da molécula (μ_1), da cauda hidrocarbônica associada com o grupo CH_3 terminal (μ_2), e das moléculas de água da superfície (μ_3). Ψ_0 é a contribuição da dupla camada de Gouy-Chapman [66], que aparece quando se forma uma dupla camada para filmes total ou parcialmente ionizados [67]. A Figura 10 ilustra os dipolos elétricos (μ) da molécula localizada na interface, que contribuem para o valor de ΔV . A interface ar-água é naturalmente polarizada devido à orientação espontânea das moléculas de água nas proximidades da interface, com os átomos de oxigênio voltados para o ar e os átomos de hidrogênio voltados para a água, originando uma diferença de potencial na interface. Essa diferença de potencial varia com a presença da monocamada e depende da componente normal à interface do momento de dipolo médio das moléculas do filme, e também da reorientação e polarização das moléculas da subfase próximas à interface [64].

Figura 10 - Representação de um capacitor de três camadas para uma monocamada de material anfifílico na interface ar/água.

Outras técnicas mais sofisticadas podem ser empregadas para caracterizar os filmes de Langmuir, incluindo microscopias, como a do ângulo de Brewster e fluorescência, e técnicas espectroscópicas como a de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS) e geração de soma de frequências (SFG).

Testes de transferência dos filmes de Langmuir para substratos sólidos iniciaram-se em 1930, primeiramente introduzidos por Irving Langmuir e aplicados por Katherine Blodgett, deram origem ao que é conhecido hoje como filmes Langmuir-Blodgett (LB) [64, 68]. Os filmes LB são obtidos atravessando-se um suporte sólido perpendicularmente à interface ar-água, como ilustrado na Figura 11. Em cada imersão, ou emersão, na subfase aquosa uma camada é transferida para o suporte sólido, e assim os filmes podem ser construídos com o número de camadas (e espessura) controlado, tendo alto grau de orientação molecular. Para permitir a transferência, a monocamada deve estar razoavelmente compactada, e por isso as deposições são geralmente feitas em pressões entre $20 - 40 \text{ mN m}^{-1}$, em que a monocamada apresenta estágio de compactação da fase líquido-expandida ou líquido-condensada (sólida) [64].

A forma de deposição determina o tipo de filme LB, sendo os três tipos principais ilustrados na Figura 11. O tipo mais comum é o Y, onde a monocamada é depositada tanto na imersão quanto na emersão do substrato hidrofílico. A primeira camada é transferida enquanto o substrato é retirado da subfase (o substrato é imerso na subfase antes do espalhamento da monocamada) e o padrão de filme formado é cauda-cauda, cabeça-cabeça. Os filmes LB de tipos X e Z são fabricados com transferência apenas na imersão ou emersão do substrato, respectivamente. Filmes tipo X sobre substrato hidrofóbico formam padrão cauda-cabeça, e os filmes tipo Z sobre substrato hidrofílico têm padrão cabeça-cauda [64]. Pode-se monitorar a

formação dos filmes LB medindo-se a taxa de transferência (TR), determinada pela razão entre a diminuição da área ocupada pela monocamada (em pressão constante) e a área do substrato recoberta pelo filme, sendo assim, o valor ideal para a TR é 1,0.

Figura 11 - Esquema de formação de um filme Langmuir-Blodgett (LB).

Os filmes de Langmuir servem para estudos de interação em nível molecular, mas possuem limitações oriundas do fato de estarem na interface ar-água. Nesse aspecto, a maior vantagem dos filmes LB é que podem ser caracterizados com um número maior de técnicas espectroscópicas e ópticas, além de permitirem a construção de dispositivos para óptica, fotônica, eletrônica, sensores e biossensores [69]. Outra vantagem é que a massa de material depositada por camada, usualmente na ordem de nanogramas, pode ser estimada com uma microbalança de cristal de quartzo (QCM), e sua morfologia pode ser estudada por técnicas microscópicas como microscopia eletrônica de varredura (MEV), de transmissão (TEM), de tunelamento e microscopia de força atômica (AFM), entre outras.

1.3.1 Interações utilizando monocamadas uni ou multicomponentes

Nos filmes de Langmuir usados para estudar interações no nível molecular [12, 70-72], dois tipos de sistemas se destacam: os uni componentes, monocamadas com apenas um material anfifílico, ou os multicomponentes (monocamadas mistas). Nos sistemas uni componentes, monocamadas de fosfolipídios são as mais usadas porque mimetizam metade de uma membrana celular [55, 56], uma vez que os fosfolipídios são os mais abundantes constituintes de uma biomembrana. Compostos solúveis em soluções aquosas, como fármacos, polissacarídeos, proteínas, entre outros, podem ser adicionados à subfase contendo as monocamadas de fosfolipídios e os efeitos causados por estes (interações) sobre os modelos de membrana celular podem ser avaliados. Por exemplo, a alteração das isotermas de pressão de superfície de monocamadas puras pela adição de material solúvel (subfase) sugere adsorção e/ou sua penetração nas monocamadas, sendo que os efeitos causados podem ser de expansão ou condensação das monocamadas. Geralmente, a área mínima ($A_{\min}$) por molécula de um filme monomolecular anfifílico é determinada pela área ocupada pela secção transversal das caudas hidrofóbicas desse material [64]. No caso da expansão das monocamadas, a $A_{\min}$ é deslocada para áreas maiores sugerindo a penetração do composto entre as moléculas ou interação com as cabeças polares, provocando distanciamento das mesmas. No caso da condensação, o mais provável é a interação com as cabeças polares, eliminando possível repulsão entre elas e possibilitando maior aproximação. Para o potencial de superfície, contribuições positivas ou negativas no potencial elétrico indicam interação, atribuídas a mudanças na orientação/ordenamento das moléculas e consequentemente do dipolo elétrico.

Em sistemas multi componentes, uma mistura de dois ou mais componentes anfifílicos é usada na interface ar-líquido [44, 73]. Em geral os componentes isolados formam filmes, mas suas propriedades interfaciais podem ser afetadas pela interação, que é estudada quanto à estabilidade e miscibilidade. A estabilidade é avaliada observando-se a pressão de colapso: se essa pressão para a mistura for maior do que a dos componentes puros, o filme é mais estável. As diferenças na pressão de colapso são também indicativos de miscibilidade. Segundo a literatura, uma verdadeira mistura deve ter somente um colapso e provavelmente em pressão diferente da pressão para os componentes puros [44]. Quando os compostos da monocamada forem miscíveis, podem formar misturas homogêneas ou heterogêneas, e isso é ilustrado no esquema da Figura 12 [74].

Figura 12 - Esquema da distribuição das moléculas em filmes de Langmuir multicomponentes. (a) componentes miscíveis, filme misto homogêneo; (b) componentes miscíveis, filme misto heterogêneo; (c) componentes imiscíveis, separação completa.

Outra maneira de investigar a miscibilidade é calcular a diferença em área (área de excesso - A_e) por molécula da monocamada mista [74, 75] em relação à área que seria obtida se os compostos fossem imiscíveis: $A_e = A_{12} - (A_{ideal})$, sendo A_{ideal} calculado utilizando-se a Equação 4.

$$A_{ideal} = x_1 A_1 + x_2 A_2 \quad (\text{Equação 4})$$

onde A_1 e A_2 são as áreas para cada componente puro (A_1 = área para o composto 1 puro e A_2 = área para o composto 2 puro), x_1 e x_2 são as frações molares dos componentes, e A_{12} é a área medida para o filme misto. Todos os valores devem ser tomados numa pressão fixa (π). Por definição, $A_e = 0$ indica imiscibilidade entre os componentes, e o gráfico de A_{12} versus concentração de um dos componentes da monocamada será uma reta. $A_e > 0$ sugere interações repulsivas entre os componentes e miscibilidade e $A_e < 0$ sugere interações atrativas entre os componentes e miscibilidade. Pode haver forças atrativas entre as cadeias hidrocarbonáticas dos materiais, resultando na formação de agregados e/ou forças envolvendo a parte polar dos

materiais (cabeça) que devido a sua natureza, aniônica, catiônica ou não iônica, acarreta em atração ou repulsão entre os grupos polares dos compostos [74, 76].

1.4 Quitosana interagindo com membranas reais e modelos

1.4.1 Aplicações em que quitosana interage com membranas celulares reais

O objetivo deste trabalho é investigar os mecanismos de ação da quitosana em modelos de membrana, motivados pelas aplicações em que quitosana interage com biomembranas, como as comentadas a seguir.

Agente bactericida - a atividade antibacteriana da quitosana é comprovada na literatura, pois pode eliminar e/ou impedir o crescimento de bactérias como *Esterichia coli* (*E.coli*) e *Stafilococos aureus* (*S aureus*). São três as principais hipóteses para essa ação: i) quitosana recobre a célula (membrana celular) das bactérias impedindo trocas gasosas ou alterando sua permeabilidade, levando-as à morte [77], ii) quitosana rompe a membrana celular [78, 79] e iii) quitosana penetra (atravessa) a célula, liga-se ao DNA causando disfunção da célula [80].

Entrega controlada de fármacos - Quitosana pode ser utilizada, pois apresenta compatibilidade com células (membranas), proteínas, DNA e RNA, além de mucoadesividade (capacidade de aderir ao tecido de revestimento da cavidade interna do corpo). Carreadores de fármacos para administração oral (em forma de nanopartículas) [81, 82] e tópica (o que requer atravessar a parede epitelial [83]) têm sido produzidos com quitosana e derivados, não causando rejeição e sendo eliminados naturalmente. Apesar disso, a quitosana não foi ainda aprovada pelo órgão regulamentador americano de administração de drogas como carreador (U.S.FDA - *United States Food and Drugs Administration*) por não ser inerte - característica requerida para um bom carreador - já que possui atividade biológica.

Transfecção - A transfecção consiste na modificação de uma célula por meio da administração de DNA ao seu núcleo. Os vetores/carreadores mais usados são os vírus, mas quitosana e principalmente derivados de quitosana passaram a ser explorados [84]. Nessa aplicação, complexa-se a quitosana, ou derivado de quitosana, ao DNA para a entrega de material genético no núcleo das células.

Redução de absorção de colesterol e de ganho de massa - uma das aplicações mais conhecidas é como agente redutor de peso (gordura) e colesterol. Embora não haja consenso

na literatura sobre essa ação da quitosana, vários suplementos comerciais dietéticos utilizam quitosana. Relatos de testes clínicos em animais e seres humanos indicaram eficácia da quitosana na redução da absorção de lipídios, mas, principalmente no caso de seres humanos, a eficácia não ocorre na totalidade dos indivíduos (não havendo explicação para isso). Há pelo menos três hipóteses para o mecanismo da possível ação [85-88]. Na primeira, a quitosana é ingerida e solubiliza no estômago devido ao meio ácido, formando uma emulsão e complexando com gorduras e colesterol de alimentos que estariam sendo processados. O complexo segue para o intestino onde gelifica devido ao meio básico, impedindo a absorção do colesterol e gorduras pelo organismo. A segunda hipótese sugere complexação da quitosana com sais da bile, que são responsáveis pela emulsificação das gorduras e colesterol preparando-os para atuação enzimática, a complexação dificulta o processamento e então a absorção das gorduras e colesterol. A terceira hipótese sugere complexação da quitosana com lipases (enzimas digestivas), impedindo-as de agir nos lipídios, dificultando sua absorção. Experimentos da interação de quitosana com modelos de membrana, principalmente as contendo componentes como colesterol e enzimas, podem ajudar no entendimento da ação de quitosana nesta aplicação.

Engenharia de tecidos - o foco é na regeneração e manutenção de tecidos vivos, em que a quitosana é usada para cicatrizar feridas, na regeneração óssea, de cartilagens e de córnea [89-92]. Além de ser biocompatível e biodegradável, a quitosana promove a homeostasia - ativação das plaquetas para estabilização do sistema interno - e angiogênese de tecidos epiteliais - crescimento de novos vasos sanguíneos. Pode ser utilizada em forma de pó, fibra, membrana, compósito, filme ou gel [92]. O principal componente do tecido epitelial é a N-acetilglucosamina, que também é componente da quitosana. Na cicatrização, as cadeias poliméricas de quitosana são facilmente quebradas por lisozimas (enzimas que clivam carboidratos) e os monômeros são utilizados na reconstrução do epitélio, sendo que, feridas tratadas com quitosana levam a menor grau de fibroplasia (cicatriz mais lisa) [88].

1.4.2 Quitosana e modelos de membrana celular

Na literatura há poucos trabalhos sobre quitosana e modelos de membrana celular, provavelmente porque a quitosana é solúvel em soluções aquosas levemente ácidas, sem atividade de superfície em regimes diluídos (concentração abaixo de 1 mg mL^{-1}) [93]. Além dos trabalhos citados na parte de Motivação e objetivos [4-12], outros obtidos com filmes de Langmuir devem ser destacados, por se assemelharem ao estudo desta tese. Parra-Barraza et

al. relatam a expansão das monocamadas (isotermas) de ácido esteárico e colesterol quando interagem com quitosana. A expansão é dependente do tipo de quitosana (alta e média massa molecular) e concentração do polissacarídeo e faz com que as monocamadas sejam mais compressíveis [94]. Quatro artigos da Universidade de Cracóvia, Polônia, corroboram os nossos estudos. Wydro et al. verificaram que a quitosana expande as monocamadas de ácidos graxos, saturados (esteárico) e insaturados (oleico, linoleico e α -linoleico) e colesterol. A expansão aumenta com a concentração de quitosana até atingir saturação, e o mecanismo de interação se dá por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações hidrogênio [95]. Krajewska et al. relataram o efeito da massa molecular da quitosana e do pH (3,5, 4,75 e 6,0) da subfase na interação com modelos de DPPC, DPPG e colesterol, concluindo que a interação é independente do pH para monocamadas de DPPC e colesterol, e tem maior efeito em pH 3,5 para DPPG. Além disso, concluiu-se que a quitosana de mais baixa massa molecular tem maior efeito devido à maior facilidade nas interações [96]. Krajewska et.al. verificaram que a temperatura da subfase afeta a interação de quitosana com monocamadas de DPPG, mas não com DPPC e colesterol [97, 98]. As interações entre os fosfolipídios e colesterol com a quitosana não devem ser somente eletrostáticas, mas também hidrofóbicas e ligações hidrogênio.

Alguns trabalhos abordam lipossomos e vesículas contendo quitosana, mas nenhum teve como foco principal a mimetização de uma membrana celular. Eles tratam da influência da quitosana sobre o formato, carga superficial, tamanho e adesão dos lipossomos [99-101]. As forças de interação e a organização das cadeias de quitosana são mencionadas em estudos de titulação calorimétrica, potencial zeta e espalhamento de luz dinâmico, em que é apresentado um modelo para o efeito da quitosana na estrutura das vesículas [99].

Há ainda trabalhos sobre monocamadas de quitosanas modificadas [40, 41, 44, 102-104]. Os derivados de quitosana, que devem ser solúveis em solventes orgânicos, possibilitando a formação dos filmes, podem ser obtidos pela inserção no anel glicosídico de grupos laterais como ftaloil, trimetilsilil, betaina e tosil, ou por aminação reductiva utilizando etil, butil, heptil ou lauril aldeído e boridreto de sódio. As cadeias hidrocarbônicas longas são inseridas através de reações químicas que podem ocorrer tanto nos grupos hidroxilas quanto nos grupos amina da quitosana, sendo que as reações podem ser regiosseletivas, resultando em derivados de quitosana *N*- ou *O*-substituídos. Embora todos os processos de inserção de cadeias hidrofóbicas em quitosana confirmem solubilidade em solventes orgânicos como o dimetilsulfóxido (DMSO), a piridina e a dimetilacetamida (DMAc), uma maior solubilidade em clorofórmio só é conseguida pela inserção de longas cadeias de hidrocarbonetos via

reações de acilação ou alquilação. Dessas alternativas, a acilação por meio da reação de quitosana com cloreto de acila é a maneira mais simples de produzir derivados de quitosana [42-44].

2 Capítulo 2- Síntese dos derivados *O,O'* - acilquitosana

2.1 Procedimento experimental

2.1.1 *Matéria-prima*

A quitosana de partida para as sínteses dos derivados *O,O'*-acilados, obtida comercialmente da Galena Química e Farmacêutica (Campinas - Brasil), foi purificada e caracterizada como segue. Cerca de 40g de quitosana foram suspensos em 4L de solução aquosa 1,5% de ácido acético glacial (Carlo Erba Reagents) e a suspensão foi mantida em agitação por 1 dia à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada em papel para a exclusão de insolúveis e impurezas. Após filtração da solução, a quitosana foi precipitada por adição de solução de NaOH 1 mol L⁻¹ (QHEMIS). O precipitado foi isolado por centrifugação em centrífuga Sorvall (7000 rpm/ 10 minutos) e lavado abundantemente com água deionizada até que a água de lavagem atingisse pH $\approx$ 7,0, sendo que a última lavagem foi feita com isopropanol 80%. A quitosana purificada foi seca em estufa a vácuo a 30°C durante 5 dias e triturada em moinho de facas (Micromoinho Marconi MA 048).

2.1.2 *Síntese dos derivados solúveis em solução aquosa ácida*

Os derivados *O,O'* - acilados de quitosana solúveis em solução ácida, a saber, 3,6 - *O,O'*- dietanoilquitosana (DEQUI) e 3,6 - *O,O'*- dipropanoilquitosana (DPPQUI), foram sintetizados baseando-se no procedimento da literatura [42]. Aproximadamente 2g de quitosana foram solubilizados em 20 mL de ácido metanossulfônico (MeSO₃H) e a solução ficou sob agitação constante por 1 h à temperatura ambiente em balão tampado por septo. Em seguida o reagente acilante foi adicionado na razão molar 10:1 (agente acilante:quitosana). A adição foi feita em aproximadamente 10 minutos, a reação procedeu por 5 h, sendo interrompida quando o meio reacional foi vertido em 50 mL de gelo. A solução resultante foi colocada em membrana de diálise com limite de exclusão 6000-8000 g mol⁻¹ (Fisher Scientific) e a diálise foi feita contra água deionizada por 1 dia para retirar o excesso de ácido. Em seguida, a solução foi retirada da membrana e neutralizada com solução de bicarbonato de sódio. Foi feita nova diálise em membrana com limite de exclusão 6000-8000 g mol⁻¹ durante 3 dias, sendo que a água foi trocada a cada 3 h (durante período diurno). A solução foi retirada da membrana e o produto foi recuperado por liofilização (equipamento Liobras). O

emprego dos reagentes acilantes cloreto de acila ou de etanoíla (Aldrich) e cloreto de propanoíla (Aldrich) gerou os derivados DEQUI e DPPQUI, respectivamente. O esquema geral da reação de acilação é mostrado na Figura 13.

2.1.3 Síntese dos derivados solúveis em clorofórmio

As amostras de *O,O'*- acilquitosanas solúveis em clorofórmio, a saber, 3,6 - *O,O'*- dimiristoilquitosana (DMQUI) e 3,6-*O,O'*- dipalmitoilquitosana (DPQUI) foram sintetizadas baseando-se no procedimento descrito por Tong e colaboradores [44]. Aproximadamente 2,5g de quitosana foram solubilizadas em 50 mL de ácido metanossulfônico (MeSO_3H) e a solução ficou sob agitação constante por 1 h à temperatura ambiente em balão tampado por septo. Em seguida o reagente acilante foi adicionado na razão molar 2:1 agente acilante:quitosana. A adição foi feita em aproximadamente 10 minutos, a reação procedeu por 2,5 h e foi interrompida quando o meio reacional foi vertido em 500 mL de água e gelo (1:1), resultando na precipitação do produto. O precipitado foi filtrado em funil de Buckner, lavado por agitação com bicarbonato de sódio 5% (Synth), novamente filtrado e lavado com água deionizada até que a água de lavagem atingisse $\text{pH} \approx 7,0$. O produto foi dissolvido em 200 mL de tetrahydrofurano (THF), precipitado por adição da solução a 1L de álcool etílico e então o sólido foi filtrado e seco ao ar. Os derivados DMQUI e DPQUI foram preparados, respectivamente, pelo emprego de cloreto de miristoíla (Aldrich) e cloreto de palmitoíla (Aldrich) como agentes acilantes. As estruturas idealizadas para os derivados são mostradas na Figura 14.

Figura 13- Esquema da reação de *O,O'* - acilação de quitosana, com $\text{R} = -\text{CH}_3$ (derivado DEQUI); $-\text{CH}_2\text{CH}_3$ (derivado DPPQUI); $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$ (derivado DMQUI) e $-(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$ (derivado DPQUI).

Figura 14 - Estruturas idealizadas dos derivados *O,O'* - DEQUI (a), *O,O'* - DPPQUI (b), *O,O'* - DMQUI (c) e *O,O'* - DPQUI (d).

2.1.4 Caracterização da matéria-prima e dos derivados *O*-acilados

A quitosana purificada foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), titulação condutimétrica, cromatografia de permeação em gel (GPC) e viscosimetria capilar. Os derivados acilados foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e cromatografia de permeação em gel (GPC). Os espectros no infravermelho foram obtidos com equipamento Thermo Nicolet Nexus 470 com transformada de Fourier, com acúmulo de 48 varreduras, no intervalo de $4000\text{--}500\text{ cm}^{-1}$. A amostra foi preparada na forma de pastilha segundo a proporção 1:100, quitosana/KBr, sendo que tanto o KBr como o polímero foram previamente secos em estufa a vácuo a 30°C por 24 h e depois misturados e triturados em gral de ágata. Para os derivados também foram adquiridos espectros em janela de fluoreto de

cálcio sendo que uma solução do derivado em clorofórmio foi preparada e em seguida 10 gotas da solução foram depositadas sobre a superfície da janela para obter um filme.

O espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) foi medido em espectrômetro BRUKER AC200 a 80°C, o pulso utilizado foi de 8,2 ms (90°), acumulando 16 varreduras e o parâmetro LB foi de 0,2 Hz. A cada 10 mg de quitosana purificada, ou dos derivados solúveis em solução ácida (DEQUI e DPPQUI), foi adicionado 1 mL de $\text{DCI/D}_2\text{O}$ 20% e a suspensão foi mantida sob agitação magnética constante, a 70°C, durante 18 h. As soluções para os derivados solúveis em clorofórmio (DMQUI e DPQUI) foram preparadas com adição de 0,6 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3) a 10 mg de amostra, sob agitação magnética constante da suspensão, durante 6h. As soluções resultantes foram transferidas para tubo de vidro ($\phi = 5$ mm) para a aquisição dos espectros. Os derivados DMQUI e DPQUI foram analisados em espectrômetro BRUKER Avance III 600, equipado com trocador automático de amostra, à temperatura ambiente. O equipamento foi utilizado no laboratório de ressonância magnética nuclear, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (UFSCAR).

A titulação condutimétrica foi feita em condutivímetro modelo Handylab LF1 e titulador automático titronic Universal, ambos da Schott-Gerate. A quitosana purificada (aproximadamente 100mg) foi previamente seca em estufa a vácuo a 30°C e então solubilizada em 50 mL de solução aquosa de HCl $0,05\text{g mol}^{-1}$ por agitação magnética constante durante 24h à temperatura ambiente. A solução foi então transferida para balão volumétrico de 110 mL e o seu volume foi ajustado com água destilada. Alíquotas de 50 mL da solução resultante foram tituladas com solução de hidróxido de sódio $0,1\text{g mol}^{-1}$, previamente padronizado com biftalato de potássio. As medidas de condutividade foram feitas à temperatura de $25^\circ\text{C} \pm 0,1^\circ\text{C}$.

As análises de cromatografia de permeação em gel (GPC) da quitosana e derivados solúveis em solução ácida (DEQUI e DPPQUI) foram executadas em sistema cromatográfico Agilent Serie 1100, com detecção por índice de refração. As condições para as análises foram: Pré-coluna Shodex Ohpak SB-G (50 X 6 mm) (10μ) + Shodex Ohpak SB-803-HQ (8mm DI x 300mm) (6μ) + Shodex Ohpak SB-805-HQ (8mm DI x 300mm) (13μ), fase estacionária: gel de poli hidroximetacrilato. O eluente foi tampão ácido acético $0,3\text{g mol}^{-1}$ /acetato de sódio $0,2\text{g mol}^{-1}$ (pH 4,5), fluxo de $0,6\text{ mL min}^{-1}$ e temperatura de 35°C. A concentração da solução de quitosana purificada foi de 4 mg mL^{-1} em tampão ácido acético $0,3\text{g mol}^{-1}$ /acetato de sódio $0,2\text{g mol}^{-1}$. A curva de calibração das colunas foi construída a partir da injeção de soluções de padrões monodispersos de polimaltotriose (pullulan) de massas molares 1.600.000, 788.000,

404.000, 212.000, 112.000, 47.300, 22.800, 11.800, 5.900, 738, 342 e 180g mol⁻¹. As análises GPC dos derivados solúveis em clorofórmio (DMQUI e DPQUI) foram executadas no mesmo sistema cromatográfico, equipado com colunas Waters com faixa de exclusão de 50.000 - 4 x 10⁶ (HR5), 5.000 - 600.000 (HR4), 500 - 30.000 (HR3) e 500 Ângstrons em série. O eluente utilizado foi tetrahidrofurano (THF), fluxo de 1 mL min⁻¹ e temperatura de 35°C. A concentração das soluções injetadas no cromatógrafo foi de 4 mg mL⁻¹ em THF. A curva de calibração das colunas foi construída a partir da injeção de soluções padrões de poliestireno de 160 a 3 x 10⁶ g mol⁻¹.

A viscosidade intrínseca foi determinada a partir das medidas adquiridas em viscosímetro modelo AVS-350 acoplado a módulo diluidor automático AVS-20, ambos da Schott-Gerate. A quitosana purificada ($\approx$ 20 mg) foi dissolvida em 25 mL de solução de ácido acético 0,6M por agitação magnética durante 24h à temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 25 mL de acetato de sódio 0,4g mol⁻¹ e a solução permaneceu em agitação por mais 24h. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro de poros de 0,45µm (Millipore - White SCWP). Alíquotas de 15 mL desta solução foram transferidas para um viscosímetro capilar de vidro (Ubbelohde, $\phi=0,530$ mm). A viscosidade foi medida a 25,00 $\pm$ 0,01°C e as sucessivas diluições foram feitas por adição de tampão ácido acético 0,3g mol⁻¹/acetato de sódio 0,2g mol⁻¹, de modo a assegurar que a força iônica das soluções fosse mantida constante. Os tempos de escoamento correspondem à média de três determinações independentes.

2.2 Resultados e discussão

2.2.1 Rendimento de reação

Ao final do processo de purificação foram obtidos 29g de quitosana, correspondente a 73% de rendimento, sendo a perda de material atribuída à presença de material insolúvel e/ou por manipulação. As sínteses dos derivados de quitosana foram realizadas repetidas vezes, tanto para verificar a reprodutibilidade do processo de síntese, quanto para aumentar a massa de produto disponível para as etapas posteriores do trabalho, principalmente nos estudos de interação com os filmes de Langmuir (modelos de membrana celular). A Tabela 2 mostra o rendimento em gramas para cada reação e o rendimento médio em porcentagem.

Tabela 2 - Massa recuperada em gramas para cada reação de síntese dos derivados e o rendimento médio em porcentagem.

Derivado	Massa (g)	Rendimento médio
DEQUI 1	0,62	47%
DEQUI 2	1,06	
DEQUI 3	1,12	
DPPQUI 1	0,63	39%
DPPQUI 2	1,00	
DPPQUI 3	0,80	
DPPQUI 4	0,80	
DPPQUI 5	0,55	
DMQUI 1	2,26	96%
DMQUI 2	2,57	
DPQUI 1	1,63	90%
DPQUI 2	2,86	

Na maioria dos casos, o valor da massa recuperada não representa ganho em gramas de material, pois embora a reação de inserção de grupos nas unidades de quitosana resulte em ganho de massa, a ocorrência de reações colaterais, inclusive despolimerização, associadas ao baixo grau de substituição dos derivados e às perdas nas etapas de manipulação, podem justificar os baixos rendimentos nos casos dos derivados DEQUI e DPPQUI.

2.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros no infravermelho de quitosana purificada e derivados acilados, mostrados na Figura 15, apresentam as principais bandas da quitosana: a) 1670 - 1650 cm^{-1} deformação axial C=O de amida I (-C=O-NH₂), b) 1600 - 1500 cm^{-1} deformação angular N-H de amida II (-C=O-NH₂), c) 1320 - 1300 cm^{-1} banda de deformação axial amida III (-C=O-NH₂), d) 3500 - 3300 cm^{-1} deformações axiais de O-H, e) 1380 - 1370 cm^{-1} deformação axial do grupo NH-C(O)-CH₃ e f) 1070-1060 cm^{-1} deformações angulares de C-O. As atribuições estão em concordância com a literatura [105]. Além das bandas da quitosana aparecem bandas dos grupos inseridos na reação de acilação: a) 2980 -2920 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} atribuídas à deformação axial de grupos C-H e b) 1740 cm^{-1} banda referente à deformação axial da carbonila de éster, formado na acilação (R-CO-OR). Portanto, os espectros confirmam as modificações pretendidas, com a presença dos principais grupos funcionais da quitosana e dos derivados *O*-acilados, principalmente a banda em 1740 cm^{-1} do éster formado na acilação.

Figura 15 - Espectros no infravermelho para a quitosana purificada (a), DEQUI (b), DPPQUI (c), DMQUI (d) e DPQUI (e), em pastilha de KBr.

2.2.3 Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

No espectro de RMN ¹H da quitosana purificada na Figura 16, observam-se os sinais característicos da quitosana: a) 2,0 ppm, hidrogênios metílicos do grupo acetamida, b) 3,0 - 4,2 ppm, hidrogênios ligados aos carbonos 2 a 6 do anel de glicopiranosose e c) 4,9 ppm, sinais do hidrogênio ligado ao carbono 1.

Figura 16 - Espectro de RMN ^1H da quitosana purificada

Com a integração das bandas e utilizando a Equação 5, determinou-se o grau médio de acetilação da amostra ($\overline{GA}$) = 19%.

$$\% \overline{GA} = \frac{\frac{ACH_3}{3}}{AHC_2} \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

onde ACH_3 corresponde à área da banda em 2 ppm e AHC_2 é a área do sinal próximo a 3 ppm, referente ao hidrogênio ligado ao carbono 2.

Nos espectros de RMN ^1H das amostras DEQUI e DPPQUI da Figura 17a e b), observam-se os sinais: a) 1,5 - 2,5 ppm, hidrogênios referentes ao grupo metila (CH_3), b) 2,5 - 3,0 ppm, hidrogênios referentes ao carbono 2 ligado ao resíduo GlcN, c) sinais dos hidrogênios referentes ao CH_2 do grupo alquila inserido (CH_2CO) em 3,0 e 3,5 ppm (DPPQUI), d) 3,5 ppm (DEQUI) e em 4,0 ppm (DPPQUI), hidrogênios ligados ao carbono 2 da quitosana, e) 3,5 - 5,0 ppm, hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 da quitosana, f) 4,5 - 5,5 ppm, hidrogênio do carbono 1 da estrutura da quitosana em unidades glucosamida (acetiladas) e g) 5,0 - 6,0 ppm, referente ao hidrogênio do carbono 1 da estrutura da quitosana em unidades glucosamina (desacetiladas).

Os espectros das amostras DMQUI e DPQUI, da Figura 17c e d) mostramos seguintes sinais: a) 0,5 - 1,0 ppm, hidrogênios referentes ao grupo metila (CH_3), b) 1,0 - 1,5 ppm, hidrogênios dos grupos alquila inseridos $(\text{CH}_2)_n$, c) 1,5 - 2,0 ppm, hidrogênios referentes ao 2°CH_2 dos grupos alquila inseridos ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$), d) 2,0 - 2,5 ppm, hidrogênios do 1°CH_2 dos grupos alquila inserido (CH_2CO), e) 2,5 - 3,0 ppm, hidrogênios do grupamento amina

(NH₂), f) 3,0 - 3,5 ppm, hidrogênios ligados ao carbono 2 da quitosana, g) 3,5 - 4,0 ppm, hidrogênios ligados ao carbono 6 da quitosana, h) 4,25 ppm, hidrogênio do carbono 1 da estrutura da quitosana em unidades glucosamida (acetiladas) e i) 5.0 ppm, hidrogênio do carbono 1 da estrutura da quitosana em unidades glucosamina (desacetiladas).

Figura 17 - Espectros de RMN ¹H para as amostras DEQUI (a), DPPQUI (b), DMQUI (c) e DPQUI (d).

(a)

(b)

(c)

(d)

Os espectros de RMN ^1H também foram úteis para determinar o grau médio de substituição dos derivados DEQUI e DPPQUI [42], e DMQUI e DPQUI [44]. Para DEQUI e DPPQUI o grau de substituição ($\overline{GS}$) foi calculado da razão entre a integral dos sinais em δ 1,9-2,5 (referentes aos grupos CH_3) e em δ 3,2-4,2 (referentes aos hidrogênios dos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 da quitosana), obtendo-se $\overline{GS} = 0,5$ (17%) para DEQUI e $\overline{GS} = 0,9$ (30%) para DPPQUI. Para os derivados DPQUI e DMQUI o grau de substituição foi calculado da razão entre a integral dos sinais em $\delta \approx 0,8$ (referente ao grupo CH_3) e dos sinais em δ 3,2 - 5,2 (referentes aos hidrogênios dos carbonos 2, 3, 4, 5 e 6 da quitosana), resultando em $\overline{GS} = 1,3$ (43%) para DMQUI e $\overline{GS} = 0,8$ (27%) para DPQUI.

Embora a rota sintética minimize a substituição nos grupamentos amina das unidades GlcN de quitosana, visto que foram protonados pelo ácido metanossulfônico, ocorreu *N*-substituição em todos os casos. A partir dos espectros de RMN ^1H calculou-se o grau de substituição nos grupamentos amina, com a Equação 6:

$$\overline{GS}(\text{NH}_2) = \frac{AHC(2)\text{GlcN}}{AHC(2)\text{GlcNac} + AHC(3,4,5,6)\text{GlcN} + \text{GlcNac}} \quad (\text{Equação 6})$$

onde $\overline{GS}(\text{NH}_2)$ é o grau médio de substituição no grupamento amina, $AHC(2)\text{GlcN}$ é a integral do sinal do hidrogênio do carbono 2 da quitosana em unidades glucosamina, $AHC(2)\text{GlcNac}$ é a integral para o hidrogênio do carbono 2 em unidades acetilglucosamina e $AHC(3, 4, 5, 6)\text{GlcN} + \text{GlcNac}$ são as integrais dos sinais referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos 3, 4, 5 e 6 em unidades glucosamina e acetilglucosamina. Foi obtido $\overline{GS}(\text{NH}_2) = 0,05, 0,13, 0,15$ e $0,3$ para DEQUI, DPPQUI, DMQUI e DPQUI, respectivamente, os quais expressam os conteúdos de grupos aminas que não sofreram reação de substituição como 94%, 84%, 81% e 63% para DEQUI, DPPQUI, DMQUI e DPQUI, respectivamente. Assim, é importante ressaltar que embora tenha ocorrido *N*-acilação, essa se deu em baixa extensão e os teores de grupos amino que não reagiram são elevados, de modo que os derivados têm natureza anfifílica.

2.2.4 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A análise de GPC da quitosana forneceu a massa molecular numérica média ($\overline{Mn}$) = 113.000 g mol $^{-1}$, massa molecular ponderal média ($\overline{Mw}$) = 479.000 g mol $^{-1}$ e a polidispersividade (PDI) = 4,2. As curvas de distribuição de massas dos derivados de quitosana são mostradas na Figura 18, sendo fornecidos no encarte os valores de $\overline{Mw}$, $\overline{Mn}$ e o índice de polidispersividade (PDI).

Figura 18 - Cromatogramas de distribuição de massas para as amostras DEQUI (a), DPPQUI (b), DMQUI (c) e DPQUI (d).

Ressalte-se que as curvas de distribuição de DMQUI e DPQUI correspondem às frações solúveis em THF das amostras, não representando senão uma parte da massa de produto recuperado após derivatização. A fração solúvel corresponde, provavelmente, à fração de menor massa molecular, já que $\overline{M}_w$ e $\overline{M}_n$ são baixos, principalmente no caso de DMQUI, quando comparados com a quitosana de partida (quitosana purificada). Observa-se que a quitosana de partida sofreu severa despolimerização durante a síntese, devido, provavelmente, ao meio reacional ácido empregado (ácido metanossulfônico) que hidrolisa as ligações glicosídicas da quitosana e, conseqüentemente, leva à despolimerização.

2.2.5 Titulação Condutimétrica

Outra técnica para determinar o grau de acetilação da quitosana foi a titulação condutimétrica, usando-se uma mistura de ácido forte/ácido fraco (quitosana em HCl) e uma base forte como titulante. Na curva típica de titulação, mostrada na Figura 19, o primeiro ponto de equivalência indica o volume necessário (V1) para neutralizar o ácido clorídrico, adicionado em excesso para garantir a solubilização da quitosana. Nessa etapa os íons H^+ do ácido clorídrico são neutralizados e a solução fica rica em íons Na^+ (do NaOH), com brusca redução da condutividade da solução. Assim, no ponto V1 há neutralização total do ácido clorídrico em excesso. Continuando a adição do hidróxido de sódio, inicia-se a neutralização dos grupos amônio (NH_3^+), resultando em ligeiro aumento na condutividade do meio (de V1 até V2). Esse aumento é devido ao aumento da concentração de íons Na^+Cl^- em solução. Em V2 há total neutralização dos grupos amônio e, em seguida, a adição de excesso de base resulta no aumento da concentração de íons hidroxila na solução e na elevação brusca da condutividade.

Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica da quitosana.

A partir dos volumes nos pontos de equivalência (V1 e V2), o grau médio de acetilação foi determinado com a Equação 7:

$$\% \overline{GA} = \left(1 - \frac{161 \cdot (V2 - V1) \cdot [NaOH]}{m} \right) * 100 \quad (\text{Equação 7})$$

onde:

$\% \overline{GA}$ = Grau médio de acetilação;

161 = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (g mol^{-1});

$(V2 - V1)$ = Volume de solução de hidróxido de sódio consumido para neutralizar a quitosana (mL);

$[\text{NaOH}]$ = Concentração da solução de hidróxido de sódio (M);

m = Massa de quitosana na alíquota titulada (g).

Da média aritmética dos resultados da titulação, feita em duplicata, obteve-se o grau médio de acetilação da amostra ($\overline{GA}$) = 21%. Há, portanto, boa concordância entre o valor de $\overline{GA}$ determinado por RMN ^1H ($\overline{GA}$ = 19%).

2.2.6 Viscosimetria

Em soluções de polieletrólitos, a massa molecular viscosimétrica é função do valor de viscosidade intrínseca e da concentração, quando não ocorrerem interações macromoleculares (sistema diluído) e com excesso de sal. Nessas condições a relação de Huggins [106] pode ser usada, segundo a Equação 8:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (\text{Equação 8})$$

onde $\frac{\eta_{sp}}{C}$ é viscosidade reduzida (mL/g), $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (mL g^{-1}), k_H é a constante de Huggins, C é a concentração da solução (g mL^{-1}). A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida *versus* concentração (Equação 8). A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink, na Equação 9, permitindo-se determinar a massa molar média viscosimétrica (M_v) do polieletrólito.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad (\text{Equação 9})$$

onde K' e α são constantes para um dado solvente e temperatura [107].

A massa molecular média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) de quitosana foi determinada com a equação de Mark-Houwink, com as constantes de Mark-Houwink (α e K) propostas por

Rinaudo e colaboradores [107], a partir dos valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e de grau médio de acetilação da amostra. A quitosana purificada teve a massa molecular viscosimétrica média ($\overline{Mv}$) = 73.000 g mol⁻¹.

Nos polímeros em que o índice de polidispersividade (PDI) se aproxima de um, os valores de massas moleculares média ponderal e viscosimétricas são próximos. Isso ocorre porque o PDI indica a diversidade nos tamanhos das cadeias poliméricas em determinada amostra; assim, se a distribuição de tamanhos for mais uniforme, as cadeias contribuem igualmente para o volume hidrodinâmico e a massa molecular viscosimétrica se aproxima da ponderal. As massas viscosimétrica e ponderal para a quitosana purificada são muito diferentes (73.000 g mol⁻¹ e 479.000 g mol⁻¹, respectivamente), devido provavelmente à alta polidispersividade da amostra, 4,2. Além disso, o valor de $\overline{Mv}$ para a amostra é inferior ao valor de $\overline{Mn}$, o que não ocorre geralmente. Tal fato pode estar associado à utilização de padrão (Pullulan) não ideal para quitosana na análise GPC, refletindo em valores de distribuição de massas ($\overline{Mn}$ e $\overline{Mw}$) não absolutos. A Tabela 3 resume as principais características para a quitosana e cada derivado.

Tabela 3 - Resumo das características dos derivados acilados de quitosana e da quitosana de partida.

Derivado	% massa média recuperada nas reações	$\overline{GS}$	$\overline{GS}(NH_2)$	% unidades GlcN(NH ₂)	$\overline{Mw}$ (g mol ⁻¹)	$\overline{Mn}$ (g mol ⁻¹)	PDI
Quitosana	—	—	—	80	479.000	113.000	4,2
DEQUI	47	0,5	0,05	75	17.800	12.200	1,5
DPPQUI	39	0,9	0,13	67	18.100	11.800	1,5
DMQUI	96	1,3	0,15	65	4.500	3.500	1,3
DPQUI	90	0,8	0,30	50	29.000	6.800	4,3

2.3 Conclusões

As sínteses e caracterizações dos quatro derivados propostos foram concluídas com êxito. Estas foram reproduzidas para assegurar material suficiente para as próximas etapas. As caracterizações confirmam a obtenção dos derivados com inserções de grupos acila nas cadeias de quitosana (2C, 3C, 14C e 16C), especialmente nos grupamentos hidroxila. Os

espectros de RMN mostraram a substituição nos grupamentos amina (minoritariamente), dos quais calcularam-se os graus de *O*- e *N*-substituição. As massas moleculares foram obtidas com análises de GPC. DEQUI e DPPQUI são solúveis em solução aquosa ácida, enquanto DMQUI e DPQUI são solúveis em clorofórmio.

Embora as caracterizações demonstrem a produção dos derivados *O*-acilados e, que estes são solúveis no meio desejado, indica também o baixo grau de substituição, a substituição no grupamento amina e, principalmente, a despolimerização da quitosana de partida. O baixo rendimento, especialmente para os derivados DEQUI e DPPQUI, pode ser devido às reações colaterais e às perdas nas etapas de manipulação. O grau de substituição dos derivados DMQUI e DPQUI foi suficiente para solubilização em clorofórmio em regime diluído (ideal para formação de filmes de Langmuir), mas o limite de solubilidade se mostrou bem baixo, podendo ser relacionado ao grau de substituição, ou seja, a quantidade de cadeias laterais acila inseridas. O meio reacional ácido empregado (ácido metanossulfônico) não se mostrou completamente eficaz na proteção dos grupamentos amina das unidades GlcN de quitosana, sendo ainda responsável pela severa despolimerização das cadeias, hidrolisadas pelo ácido.

3 Capítulo 3 - Interação dos derivados 3,6 - O,O'-dietanoilquitosana (DEQUI) e 3,6 - O,O'-dipropanoilquitosana (DPPQUI) com modelos de membrana celular

3.1 Procedimento Experimental

3.1.1 Cinética de adsorção dos derivados DEQUI e DPPQUI

Os testes de adsorção dos derivados foram realizados em cuba de Langmuir Kibron funcionando como tensiômetro, ilustrada na Figura 20. As soluções dos derivados foram preparadas com tampão Theorell-Stenhagen (TS), pH 3,0 e força iônica $\mu = 0,03 \text{ g L}^{-1}$. O tampão TS é produzido com NaOH, ácido cítrico, ácido bórico, ácido fosfórico em água Milli-Q (resistividade $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}$) e HCl 2 g mol^{-1} para ajustar o pH. As amostras de DEQUI e DPPQUI foram dissolvidas em concentrações entre $0,05$ a $0,500 \text{ mg mL}^{-1}$. A cinética foi acompanhada medindo-se a pressão de superfície (π) *versus* tempo (segundos), das soluções em interface limpa, até que esta atingisse o equilíbrio termodinâmico, ou seja, quando a adsorção dos derivados na interface estivesse completa.

Figura 20 - Cuba de Langmuir Kibron funcionando como tensiômetro.

3.1.2 Interação de DEQUI e DPPQUI com monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA

Os fosfolipídios utilizados para formar filmes de Langmuir (modelos de membrana) foram dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC), dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) ou ácido dimiristoil fosfatídico (DMPA), obtidos comercialmente (Sigma Chemical Co) e usados sem purificação adicional, foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho (FTIR). Os filmes foram produzidos em cuba de Langmuir mini KSV (KSV Instruments) em

sala limpa classe 10.000 a $20 \pm 1^\circ\text{C}$. A classificação 10.000 indica o grau de controle de partículas no ambiente, sendo que nesta classe para partículas com dimensões $\geq 0,5\mu\text{m}$, o controle é de cerca de 350.000 partículas/ m^3 . A cuba mini KSV é equipada com sensor de pressão de superfície (Wilhelmy) e prova Kelvin de potencial de superfície (Figura 21). Um volume de 30 μL de solução 0,80 mg mL^{-1} de fosfolipídios (DPPC, DPPG ou DMPA) em clorofórmio, grau espectroscópico (pureza $\geq 99,9\%$), foi espalhado em subfase tampão TS, pH 3,0, e as monocamadas foram comprimidas sob velocidade constante de 10 mm min^{-1} . As soluções dos derivados de quitosana foram injetadas na subfase, sob monocamada de fosfolipídio, em concentrações variando de 0,0025 a 0,05 mg mL^{-1} . Após a injeção, esperou-se o tempo de adsorção completa - ao atingir o equilíbrio - e então as isotermas de pressão de superfície (π) e potencial de superfície (ΔV) *versus* área foram adquiridas. As isotermas de pressão de superfície contendo derivados na subfase foram feitas em duplicata e o desvio padrão médio foi calculado.

O módulo de elasticidade compressional (Cs^{-1}) foi calculado a partir das isotermas de pressão usando $\text{Cs}^{-1} = -A (\partial\pi/\partial A)$, onde π é a pressão de superfície e A é a área molecular média [108].

Filmes Langmuir-Blodgett (LB) dos derivados DEQUI e DPPQUI na concentração 0,05 mg mL^{-1} na subfase com o fosfolipídio DMPA foram depositados em janelas de fluoreto de cálcio (CaF_2). Os filmes, do tipo Y, foram transferidos à pressão de 30 mN m^{-1} com velocidade do dipper em 5 mm min^{-1} na subida e 10 mm min^{-1} na descida. Os filmes foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho em equipamento Thermo Nicolet Nexus 470 com transformada de Fourier.

Figura 21 - Foto da cuba de Langmuir mini da KSV Instruments.

3.1.3 Espectroscopia de reflexão-absorção na região do infravermelho com modulação da polarização (PM-IRRAS)

O método de PM-IRRAS é um tipo de espectroscopia sensível a interfaces, e que pode ser aplicado tanto a filmes sólidos quanto a filmes sobre a superfície da água. Com essa técnica, um espectro vibracional da interface (filme de Langmuir ou LB) pode ser obtido em poucos minutos, e uma análise da composição química das moléculas pode ser feita [109, 110]. Além disso, devido à modulação da luz incidente entre as polarizações *s* e *p* com uma alta frequência (50 kHz), os espectros para ambas as polarizações são medidos simultaneamente, o que permite inferir sobre a orientação de dipolos moleculares (e consequentemente de grupos químicos) [109, 111]. De modo resumido, o PM-IRRAS combina a espectroscopia de reflexão no infravermelho por transformada de Fourier com modulação de polarização rápida do feixe incidente (idealmente entre os estados lineares *p* e *s*) e dois canais eletrônicos de processamento do sinal detectado, obtendo-se a refletividade diferencial da Equação 10:

$$\frac{\Delta R}{R} = \frac{R_p - R_s}{R_p + R_s} \quad (\text{Equação 10})$$

onde R_p corresponde à refletividade polarizada na direção paralela e R_s na direção perpendicular ao plano de incidência. A soma é o espectro de referência [110]. A absorção do feixe de luz polarizado paralelo ao plano de incidência é sensível principalmente aos dipolos

orientados perpendicularmente à interface, enquanto o feixe polarizado perpendicularmente é sensível aos dipolos orientados paralelos à interface. Desse modo, a diferença fornece informação sobre a orientação dos dipolos constituintes das moléculas na interface. Como os espectros são obtidos simultaneamente (polarização *s* e *p*) e sua intensidade é dividida pela do espectro correspondente da subfase, o efeito do vapor de água é bastante reduzido na técnica PM-IRRAS [12].

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas em um espectrofotômetro da KSV Instruments, modelo PMI550, acoplado a uma cuba de Langmuir modelo mini. Uma foto do equipamento é mostrada na Figura 22. O ângulo de incidência da luz na monocamada foi de 80° e as bandas do espectro orientadas para cima indicam dipolos moleculares orientados paralelos à interface, enquanto bandas negativas indicam dipolos perpendiculares à interface [111]. Os espectros foram obtidos para monocamadas puras dos fosfolipídios DPPC e DMPA (subfase TS) e em subfase contendo os derivados DEQUI e DPPQUI na concentração de 0,05 mg mL⁻¹. As soluções dos derivados foram injetadas na subfase, sob a monocamada de fosfolipídios e após a estabilização da adsorção os espectros foram obtidos. Foram também obtidos espectros para os derivados DEQUI e DPPQUI (injetados na subfase na concentração de 0,1 mg mL⁻¹) adsorvidos na interface limpa, formando filmes de Gibbs [112, 113].

Figura 22 - Foto do equipamento de PM-IRRAS acoplado à cuba de Langmuir.

3.2 Resultados e Discussão

3.2.1 Isotermas dos filmes de Langmuir dos fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA

Foi estudada a interação dos derivados *O*-substituídos de quitosana em monocamadas de três fosfolipídios: DPPC, DPPG e DMPA, cujas estruturas químicas são mostradas na Figura 23. Os fosfolipídios DPPC e DPPG foram escolhidos, pois são importantes componentes das membranas celulares de mamíferos e bactérias, respectivamente. Já DMPA, um fosfolipídio sintético, foi escolhido para propiciar a deposição de filmes em substrato sólido (formação de filmes LB).

Figura 23 - Estrutura química dos fosfolipídios DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c).

As principais diferenças entre os fosfolipídios são: i) número de átomos de carbono da cauda hidrofóbica e ii) cargas na cabeça polar. DPPC e DPPG possuem cadeia carbônica saturada contendo 16 carbonos (palmitoil), já DMPA possui cadeia carbônica saturada com 14 carbonos (miristoil). O grupo fosfato é comum na estrutura polar (cabeça) dos fosfolipídios, sendo que em DPPC está ligado ao grupo colina (sal quaternário de etilamina), em DPPG está ligado a um grupo glicerol e em DMPA se apresenta na forma ácida (ácido fosfatídico). Quanto a cargas, DPPC é eletricamente neutro (*zwitterionic*) com grande momento dipolo iônico devido às cargas opostas em diferentes átomos da sua estrutura. DPPG e DMPA são

carregados negativamente. Essas cargas se mantêm nos experimentos realizados, visto que a constante de ionização (pKa) do grupo fosfato é de aproximadamente 1,7, este permanecerá negativamente carregado no pH usado nos experimentos (solução tampão TS - pH 3,0). O grupo colina se mantém com carga positiva em pH abaixo de 11,0.

A Figura 24 mostra os espectros de infravermelho para os fosfolipídios comerciais, em que aparecem suas bandas principais características: 2954 cm^{-1} estiramento assimétrico do grupo CH_3 , 2915 e 2848 cm^{-1} , estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 , 1735 cm^{-1} estiramento do grupo carboxila ($\text{C}=\text{O}$) de éster, 1467 cm^{-1} bandas de dobramento de CH_2 , 1255 e 1054 bandas de CH_2 . Duas bandas menos intensas ocorrem em 1415 cm^{-1} e 1380 cm^{-1} , devidas ao modo de dobramento de δ (CH_2) ligados a grupos $\text{C}=\text{O}$ ou $\text{P}=\text{O}$ e $\delta(\text{CH}_3)$, respectivamente [114].

Figura 24 - Espectros no infravermelho para os fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA.

A análise da interação entre os derivados de quitosana e as monocamadas dos fosfolipídios foi realizada através da comparação das isotermas de pressão e potencial de superfície das monocamadas puras de fosfolipídio com as que contêm diferentes concentrações de derivados na subfase. Por isso, determinou-se inicialmente a isoterma de pressão e potencial de superfície dos fosfolipídios puros em subfase água e TS (pH 3,0), a $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. As isotermas foram feitas em triplicata e a média destas curvas é apresentada na Figura 25 (a), (b) e (c). O erro corresponde ao desvio padrão médio incluindo todos os pontos, sendo $\pm 1\text{ }\text{\AA}^2$ em área por molécula e $\pm 0,5$, $\pm 0,6$ e $1,4\text{ mN m}^{-1}$ em pressão de superfície para as monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA, respectivamente.

Figura 25 - Isotermas de pressão e potencial de superfície para os fosfolipídios DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) em subfase de tampão TS, pH 3,0.

(a)

(b)

(c)

As isotermas de pressão e potencial de superfície para os fosfolipídios puros em TS são consistentes com a literatura [5, 6]. Pequenos deslocamentos na área extrapolada (de 1 a 3 Å²) e no perfil das isotermas de pressão são observados na comparação entre água e o tampão para DPPC, DPPG e DMPA. A principal diferença está no perfil da curva de DPPG, que em tampão TS apresenta transição de fase da líquido-expandida para a líquido-condensada, como observado em outros trabalhos [5]. Isso se deve provavelmente à presença de íons no tampão TS e à diferença de pH da subfase (de $\approx 6,0$ para água pura e 3,0 para o tampão TS), uma vez que as isotermas são afetadas por alterações de temperatura e/ou de pH da subfase [115-117]. Por outro lado, a pressão de colapso das monocamadas não é alterada, sendo praticamente a mesma para os fosfolipídios na água ou em tampão TS.

Para as isotermas de potencial o perfil das curvas é mantido independentemente da subfase. A principal alteração ocorre para os fosfolipídios negativamente carregados DPPG e DMPA, que apresentam potencial negativo ($\approx -0,03\text{V}$ para DPPG e $\approx -0,06\text{V}$ para DMPA) para grandes áreas por molécula (fase líquido-expandida) em água, devido à dissociação dos seus grupos polares, e potencial positivo ($\approx 0,06\text{V}$ para DPPG e $\approx 0,05\text{V}$ para DMPA) em subfase tampão TS, devido à neutralização das cargas em pH 3,0. Nos estudos de interação entre os derivados de quitosana e os modelos de membrana desta tese, somente as isotermas dos fosfolipídios em subfase tampão TS serão consideradas, pois esta foi a subfase utilizada para os derivados.

3.2.2 Cinética de adsorção dos derivados DEQUI e DPPQUI

Os derivados DEQUI e DPPQUI foram obtidos inserindo-se caudas hidrofóbicas na cadeia da quitosana, gerando as estruturas idealizadas da Figura 14. Como essas cadeias afetam as propriedades físico-químicas da quitosana, estudou-se a cinética de adsorção em interface limpa. O objetivo foi verificar se as cadeias promovem atividade de superfície, uma vez que a quitosana não possui atividade na faixa de concentração empregada [93]. As concentrações de soluções no estudo das cinéticas de adsorção variaram no intervalo 0,05-0,5 mg mL⁻¹. A Figura 26 mostra que ambos DEQUI (a) e DPPQUI (b) têm atividade de superfície nas concentrações de 0,1 a 0,5 mg mL⁻¹, mas não para 0,05 mg mL⁻¹. Em 0,4 mg mL⁻¹ para DEQUI e 0,5 mg mL⁻¹ para DPPQUI as pressões atingem valores altos ($\approx 10\text{ mN m}^{-1}$). O tempo de adsorção dos derivados varia, com a adsorção de DPPQUI atingindo equilíbrio em menor tempo que DEQUI (cerca de 1000 segundos a menos). Este resultado era esperado, pois a cadeia hidrocarbônica em DPPQUI é maior do que a em DEQUI (maior

hidrofobicidade), além de que DPPQUI tem maior grau de substituição (Tabela 3). A completa adsorção, ou a estabilidade da curva, sugere que o equilíbrio termodinâmico foi atingido.

Figura 26 - Cinética de adsorção dos derivados DEQUI (a) e DPPQUI (b) em interface limpa.

O intervalo de concentração escolhido (0,05 - 0,5 mg mL⁻¹) foi usado em trabalhos anteriores, em que não se observou atividade de superfície de quitosana em interface limpa, mas apenas atividade induzida por monocamada de fosfolipídios [5, 6]. Para obter uma comparação direta, empregamos no estudo da interação dos derivados DEQUI e DPPQUI com monocamadas de fosfolipídios, concentrações menores que 0,05 mg mL⁻¹ (concentrações em que não houve atividade de superfície na interface limpa). Houve atividade de superfície induzida em todas as concentrações na subfase (0,0025 mg mL⁻¹ - 0,05 mg mL⁻¹) para ambos os derivados, gerando aumentos na pressão e no potencial de superfície. A Figura 27 mostra a cinética de adsorção de DEQUI e DPPQUI na menor concentração na subfase, 0,0025 mg mL⁻¹, sob monocamada de DMPA.

Figura 27 - Cinética de adsorção dos derivados DEQUI (a) e DPPQUI (b) na concentração de 0,0025 mg mL⁻¹ sob monocamada de DMPA.

A adsorção é mais rápida para o DPPQUI, com maior aumento na pressão e potencial de superfície. Isto é devido a sua natureza mais hidrofóbica do que a de DEQUI, semelhante ao ocorrido nos experimentos com a interface limpa. Conforme as moléculas dos derivados adsorvem na interface a pressão é aumentada e há contribuição positiva no potencial de superfície. Comportamento similar foi observado em todas as concentrações dos dois derivados, para os três fosfolipídios.

Para todos os experimentos realizados, o valor inicial de pressão de superfície foi nulo, sendo a variação de pressão, $\Delta\pi$, obtida com a adsorção dos derivados nas monocamadas lipídicas, o valor da pressão de equilíbrio na qual o equilíbrio termodinâmico é atingido. No geral, $\Delta\pi$ aumentou com a concentração de DEQUI ou DPPQUI na subfase. Para uma mesma concentração de derivado na subfase, por exemplo, para 0,0025 mg mL⁻¹ de DPPQUI na subfase, $\Delta\pi$ foi 7 mN m⁻¹, 9 mN m⁻¹ e 10 mN m⁻¹ para monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA, respectivamente. A maior variação na pressão ($\Delta\pi$) para monocamadas negativamente carregadas (DPPG e DMPA), do que para DPPC, sugere que a força motriz na adsorção são interações eletrostáticas entre os derivados de quitosana e cabeça polar dos fosfolipídios. A contribuição no potencial de superfície é praticamente a mesma, independentemente da concentração, indicando saturação das cargas adsorvidas na monocamada.

3.2.3 Isotermas de pressão de superfície

As isotermas de pressão de superfície de DPPC, DPPG e DMPA foram expandidas para maiores áreas após a incorporação dos derivados, como mostra a Figura 28. A expansão ocorre para isotermas com ambos os derivados na subfase e aumenta com a concentração. Mesmo para a menor concentração usada, $0,0025 \text{ mg mL}^{-1}$, as monocamadas contendo DEQUI e DPPQUI na subfase são expandidas para maiores áreas. A expansão confirma a interação dos derivados com as monocamadas lipídicas, que pode ser atribuída às interações eletrostáticas e forças hidrofóbicas [5, 6, 10]. Em todas as monocamadas, a expansão causada por DPPQUI é maior do que por DEQUI. Provavelmente, as interações hidrofóbicas são mais pronunciadas na interação do derivado DPPQUI, devido à cadeia hidrofóbica mais longa e maior grau de substituição (maior inserção de caudas hidrofóbicas).

Figura 28 - Isotermas de pressão de superfície para monocamadas de DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) sobre subfase TS (pH 3,0) contendo DEQUI e DPPQUI em diferentes concentrações indicadas no encarte. Desvio padrão médio de $\pm 1 \text{ \AA}^2$ em área molecular média e $\pm 1,7$, $\pm 1,8$ e $\pm 1,5 \text{ mN m}^{-1}$ na pressão de superfície para isotermas de DPPC, DPPG e DMPA, respectivamente, contendo os derivados na subfase.

(b)

(c)

A expansão das monocamadas dos fosfolipídios devida à presença dos derivados de quitosana na subfase pode ser mais bem visualizada na Figura 29 com curvas de área *versus* concentração para pressão de 30 mN m⁻¹. A pressão fixa é correspondente à de uma biomembrana real ($\pi = 30\text{--}35$ mN m⁻¹[118]), e portanto os resultados têm relevância biológica. A expansão aumenta com a concentração do derivado na subfase. A presença de DEQUI na subfase resulta em efeito muito semelhante independentemente da monocamada de fosfolipídio, pois os valores de expansão são próximos, sendo a variação em área de 14 Å², 18 Å² e 20 Å² para monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA, respectivamente. Já DPPQUI causa maior expansão em DPPC (43 Å²) e DPPG (34 Å²) do que em DMPA (20 Å²). Os valores da variação foram calculados pela diferença em área molecular média para as monocamadas sob concentração de 0,05 mg mL⁻¹ de derivados.

Os efeitos mais pronunciados sobre as monocamadas foram provocados por DPPQUI, o que está em concordância com os resultados de Mori et al. [119], que observaram que um grupo CH_3 adicional (da timina, comparada com a uracila) causa maiores efeitos de expansão em monocamadas de colesterol modificados com triazacilclononano. Os autores estimaram a expansão adicional como sendo devida ao volume ocupado pelo grupo CH_3 . Além disso, os resultados de expansão maiores causados por DPPQUI em monocamadas de DPPC (eletricamente neutro) e valores de expansão semelhantes na monocamada de todos os fosfolipídios provocadas por DEQUI sugere que as interações hidrofóbicas predominam na expansão das monocamadas, embora as interações eletrostáticas também devam contribuir. Ou seja, as interações eletrostáticas são importantes na adsorção dos derivados nas monocamadas, como mostrado pelos resultados de cinética de adsorção, mas a expansão das isotermas de pressão de superfície parece ser mais dependente das forças hidrofóbicas.

Figura 29 - Comparação da área molecular média de fosfolipídio (DPPC, DPPG e DMPA), na pressão de 30 mNm^{-1} , em função da concentração de DEQUI (a) e DPPQUI (b).

Duas características específicas podem ser investigadas ao avaliar a interação entre os derivados e modelos de membrana celular representados por monocamadas de Langmuir: i) o papel de ligações hidrogênio envolvendo os grupos hidroxila da quitosana e as cabeças polares dos fosfolipídios e ii) o papel das interações hidrofóbicas. Isto foi feito comparando-se os efeitos causados pelos derivados com aqueles causados pela quitosana. Assim, neste trabalho parte dos grupos OH da quitosana foi acilada e não podem realizar ligações hidrogênio. A Figura 30 mostra a comparação dos efeitos da quitosana e dos derivados DEQUI e DPPQUI sobre a monocamada de DMPA.

Figura 30 - Isotermas de pressão de superfície para DMPA puro em subfase tampão TS (pH 3,0) contendo quitosana, DEQUI e DPPQUI na concentração de 0,05 mg mL⁻¹. A isoterma para quitosana foi feita em duplicata, sendo o desvio padrão médio de $\pm 1 \text{ \AA}^2$ em área por molécula e $\pm 1,3 \text{ mN m}^{-1}$ para pressão de superfície.

A importância das forças hidrofóbicas é corroborada por uma comparação direta com os efeitos causados pela quitosana. A Figura 30 mostra maior expansão das monocamadas de DMPA quando DPPQUI e DEQUI se encontram na subfase em comparação com quitosana. Outra conclusão inferida da comparação dos efeitos de quitosana e derivados *O*-acilados é que as contribuições das ligações hidrogênio dos grupos hidroxila são de menor importância do que as interações hidrofóbicas de grupos etanoil e propanoil, inseridos como substituintes via reações de *O*-acilação. Mais uma vez, isto é corroborado pelo maior efeito dos derivados de quitosana sobre os modelos de membranas, pois esses derivados permitem maior interação hidrofóbica, em detrimento do estabelecimento de ligações hidrogênio, visto que parte dos grupos hidroxila foi acilada.

É importante ressaltar que os diferentes efeitos não podem ser atribuídos a diferenças de massa molecular ou índice de polidispersividade, que são semelhantes para as três amostras: DEQUI ($M_w = 17.800 \text{ g mol}^{-1}$ e $PDI = 1,5$), DPPQUI ($M_w = 18.100 \text{ g mol}^{-1}$ e $PDI = 1,5$) e quitosana ($M_w = 23.500 \text{ g mol}^{-1}$ e $PDI = 2,7$) e que a comparação com os resultados para quitosana é direta pois a mesma condição experimental foi utilizada.

3.2.4 Isotermas de potencial de superfície

O potencial de superfície também é afetado pelos derivados na subfase, como mostra a Figura 31. O potencial de superfície depende da carga das monocamadas ou de cargas incorporadas/adsorvidas na subfase [120]. O efeito da incorporação dos derivados no potencial de superfície das monocamadas é semelhante para os fosfolipídios utilizados. Um grande aumento no potencial de superfície das monocamadas lipídicas é observado em grandes áreas por molécula (fase líquido-expandida) quando os derivados estão na subfase, variando no intervalo $\approx 0,2 - 0,4V$. O aumento do potencial induzido pelos derivados deve-se, provavelmente, à contribuição das cargas positivas do grupo amino dos derivados de quitosana, os quais são protonados em pH 3,0. Por outro lado, o potencial de superfície para pequenas áreas, no estado líquido-condensado, é menor do que para a monocamada pura de fosfolipídio, indicando que mesmo em altas pressões (estado condensado) os derivados permanecem na interface interagindo com as monocamadas, e contribuindo negativamente para o potencial de superfície. Entretanto, no mesmo estado de compactação das monocamadas (condensado), a pressão de superfície das curvas com ambos os derivados é menor do que no caso da monocamada pura, o que pode ser atribuído a perdas ou a mudanças de elasticidade da monocamada, indicando provável expulsão do derivado da interface. No geral, o derivado DPPQUI contribui mais fortemente para o potencial de superfície do que DEQUI (para todos os fosfolipídios), sugerindo novamente maior interação/incorporação nas monocamadas devido ao seu caráter mais hidrofóbico, favorecendo interações hidrofóbicas e/ou maior ordenamento das moléculas, contribuindo positivamente para o potencial de superfície.

Figura 31 - Isotermas de potencial de superfície de monocamadas de DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) puro sobre subfase contendo DEQUI e DPPQUI na concentração de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$.

(a)

(b)

(c)

3.2.5 Elasticidade no plano

As isotermas de pressão e potencial de superfície sugerem que DEQUI e DPPQUI afetam as propriedades mecânicas das monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA. Os grandes efeitos causados foram confirmados pela análise do módulo de compressão (C_s^{-1}), conhecido como elasticidade no plano (Figura 32). A compressibilidade bidimensional (C_s) de uma monocamada com uma área qualquer (A) pode ser calculada utilizando-se a Equação 11:

$$C_s = - \frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T \quad (\text{Equação 11})$$

Entretanto, nas discussões de propriedades de filmes, é mais conveniente e usual o cálculo do módulo de compressão (C_s^{-1}) que pode ser obtido diretamente pela inclinação da curva de π -A (isoterma de pressão de superfície *versus* área). O valor de C_s^{-1} indica o estado em que a monocamada tem compressibilidade máxima (maior valor para C_s^{-1}), além de permitir identificar os outros estágios de compactação da monocamada e transições de fase. Os estados de compactação podem ser classificados com base nos valores de C_s^{-1} : de 12,5 - 50,0 mN m⁻¹ fase líquido-expandida, de 100,0 - 250,0 mN m⁻¹ fase líquido-condensada e para valores > 250,00 mN m⁻¹ fase sólida [108].

Os derivados afetam a elasticidade das monocamadas, com a diminuição do pico de elasticidade para todas as concentrações de DEQUI e DPPQUI na subfase. Para monocamadas de DPPC, concentrações de derivados de quitosana na subfase acima de 0,01 e 0,05 mg mL⁻¹ são necessárias para expressiva diminuição da elasticidade. Além da diminuição, o máximo se desloca para áreas maiores, indicando expansão. Para a maior concentração (0,05 mg mL⁻¹) a diminuição é de ≈ 150 mN m⁻¹ (monocamada pura) para ≈ 75 mN m⁻¹ no caso de DEQUI, e para ≈ 25 mN m⁻¹ no caso de DPPQUI. Para monocamadas de DPPG, mesmo em concentrações baixas de derivados na subfase pode-se observar importante diminuição da elasticidade, semelhante à provocada por concentrações mais elevadas. Já para DMPA diferenças podem ser observadas no efeito dos derivados sobre as monocamadas. Ambos os derivados diminuem a elasticidade das monocamadas, de ≈ 350 mN m⁻¹ (monocamada pura de DMPA) para ≈ 100 mN m⁻¹ com DEQUI na subfase e ≈ 50 mN m⁻¹ quando DPPQUI está na subfase, na maior concentração (0,05 mg mL⁻¹). A diminuição do módulo de elasticidade das monocamadas provocadas pelos derivados as torna mais flexíveis (mais compressíveis/mais fluidas) que para o fosfolipídio puro. No geral,

DPPQUI causa maiores efeitos do que DEQUI, indicando maior interação com as monocamadas de fosfolipídios.

Figura 32 - Módulo de elasticidade no plano para filmes de Langmuir de DPPC, DPPG e DMPA sobre subfases contendo DEQUI (a) e DPPQUI (b) em diferentes concentrações.

As propriedades mecânicas da monocamada de DMPA são também afetadas pela quitosana, como mostra a Figura 33. O módulo de compressão diminui na presença do polissacarídeo, o que torna a monocamada mais flexível, corroborando os dados da literatura [5, 11]. O mesmo efeito é observado para monocamadas de DPPC e DPPG [6, 10]. A comparação dos efeitos indica que, em uma mesma concentração ($0,05 \text{ mg mL}^{-1}$), DPPQUI afeta mais fortemente as propriedades mecânicas de DMPA do que DEQUI que causa maiores efeitos do que quitosana. A diminuição indica que a monocamada afetada pela presença de quitosana ou seus derivados na subfase torna-se mais flexível do que a monocamada pura, e, sendo a elasticidade das biomembranas uma importante propriedade [118], tais resultados são relevantes para a compreensão da bioatividade de quitosana e derivados.

Figura 33 - Comparação dos efeitos no módulo de elasticidade no plano para filmes de Langmuir de DMPA sobre subfases contendo quitosana, DEQUI e DPPQUI na concentração de $0,05 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.2.6 Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

Fosfolipídios têm sido usados para formar filmes LB, mas é difícil obter multicamadas [121] devido à maior afinidade das cabeças polares dos fosfolipídios com a subfase do que com o substrato sólido. Da literatura observou-se ser difícil depositar DPPC [122, 123], e por isso fabricam-se filmes mistos de DPPC e DPPA (ácido dipalmitoil fosfatídico) [124], pois DPPA é adequado para formar filmes LB do tipo Y [125, 126]. Também neste trabalho não se

obteve sucesso na formação de filmes de DPPC e DPPG puros ou mistos com os derivados na subfase, mas foi possível fabricar filmes LB de DMPA misto com os derivados de quitosana, com um número de camadas suficiente para possibilitar a caracterização por espectroscopia FTIR.

Os resultados das isotermas indicam que os derivados de quitosana, tanto DEQUI quanto DPPQUI, permanecem na interface mesmo em altas pressões, em todas as interações de fosfolipídios/derivados. Isso pode ser inferido da diferença das isotermas de pressão e, principalmente, do potencial de superfície em altas pressões (pequenas áreas por molécula). Assim, filmes LB de fosfolipídio/derivado de quitosana foram depositados para confirmar a presença destes na interface em altas pressões. A transferência foi feita para filmes de DMPA mistos com DEQUI e DPPQUI, na pressão de 30 mN m^{-1} , e estes foram caracterizados por espectroscopia na região do infravermelho. Foram obtidos filmes LB do tipo Y com oito monocamadas e taxa de transferência (TR) média de $\approx 1,14 \pm 0,03$ para DEQUI/DMPA e $\approx 1,04 \pm 0,03$ para DPPQUI/DMPA.

A Figura 34 mostra o espectro do filme LB de DMPA misto com DPPQUI, que contém as principais bandas do DMPA: 2956 cm^{-1} estiramento assimétrico do grupo CH_3 , 2929 e 2871 cm^{-1} estiramento assimétrico e simétrico do grupo CH_2 , 1724 cm^{-1} estiramento do grupo carboxila (C=O) de éster, 1452 cm^{-1} bandas de dobramento de CH_2 , 1255 e 1076 bandas de CH_2 e 1376 cm^{-1} banda devida a modo de dobramentos de $\delta(\text{CH}_3)$. Notam-se também bandas em 3438 cm^{-1} referentes ao estiramento de grupos OH da quitosana (pode estar sobreposto também estiramento de NH) e em 1600 cm^{-1} e 1666 cm^{-1} referentes à deformação do grupo NH. Estas últimas confirmam a presença de DPPQUI. O espectro para DEQUI/DMPA é semelhante ao de DPPQUI/DMPA.

Figura 34 - Espectro de infravermelho para DMPA (em janela de fluoreto de cálcio) e DMPA/DPPQUI filme LB.

3.2.7 PM-IRRAS

A atividade de superfície de DEQUI e DPPQUI em altas concentrações na subfase foi confirmada com espectros PM-IRRAS na Figura 35. As principais bandas foram: em 1332/1334 cm^{-1} atribuídas à deformação axial (amida III) e em 1540-1560 cm^{-1} atribuída à deformação angular N-H (amida II). Essas bandas são relacionadas às unidades GlcNAc que já estavam na cadeia da quitosana de partida. As bandas em 1504 cm^{-1} e 1531/1535 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação simétrica e assimétrica dos grupos amino protonados das unidades GlcN [7, 12, 127], e as bandas em 1720-1750 cm^{-1} são atribuídas à carbonila (C=O) de éster. A banda larga e intensa em 1620-1720 cm^{-1} é atribuída ao estiramento das ligações O-H de água, sendo o resultado da diferença de refletividade entre as superfícies cobertas e descobertas [128]. As bandas em 1408-1412 cm^{-1} e 1460-1467 cm^{-1} são devidas a deformações angulares de CH_2 e as bandas em 2876/2884 cm^{-1} e 2955/2967 cm^{-1} são atribuídas aos modos de estiramento simétrico e assimétrico dos grupos metila terminais (CH_3). As bandas do espectro orientadas para cima indicam dipolos moleculares orientados paralelos à interface, enquanto bandas negativas indicam dipolos perpendiculares à interface. Sendo assim, as bandas positivas devidas aos grupos carbonila (1720-1740 cm^{-1}) e banda de amida II (1540-1560 cm^{-1}) indicam que os grupos C=O e N-H estão orientados de preferência paralelos à superfície da monocamada e perpendiculares às cadeias acila ordenadas [7].

Figura 35 - Espectros de PM-IRRAS para monocamada de Gibbs formada por solução de 0,1 mgmL⁻¹ de DEQUI (a) e DPPQUI (b) em tampão TS, em 30 mN m⁻¹.

Para filmes de Langmuir, a espectroscopia PM-IRRAS é útil na investigação da incorporação de materiais adsorvidos na interface ar/água a partir da subfase. Os principais tipos de informações que podem ser obtidos são: i) possível penetração das moléculas hóspedes nas caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios; ii) interação com as cabeças polares e iii) orientação de grupos moleculares, o que pode ser determinado pelo menos qualitativamente. As Figura 36 e Figura 37 mostram os espectros de DEQUI e DPPQUI em monocamadas de DPPC e DMPA, respectivamente, em pressão de 30 mN m⁻¹. A incorporação de DEQUI e DPPQUI nas monocamadas é evidente a partir do aparecimento das bandas em 1530-1540 cm⁻¹ devidas à deformação assimétrica de grupos amino protonados e de bandas em 1540-1560 cm⁻¹ atribuídas à deformação angular N-H (amida II). As bandas em 1737/1739 cm⁻¹ são atribuídas à carbonila (C = O) de éster.

No caso de DPPC, em particular, a Figura 36b mostra alterações nas bandas de 2844-2851 cm⁻¹, 2890 cm⁻¹ e 2914-2918 cm⁻¹, atribuídas ao estiramento simétrico de CH₂, estiramento simétrico de CH₃ e estiramento assimétrico de CH₂, respectivamente. Isto indica que tanto DEQUI e DPPQUI penetram na região da cadeia hidrofóbica de DPPC. O deslocamento das bandas para energias mais altas está associado à desordem das cadeias de fosfolipídios, provavelmente causada pelo aumento da distância entre cadeias e pela mobilidade da cadeia mediante a penetração das moléculas de derivados. Por outro lado, o deslocamento das bandas para menores energias está associado à ordenação. A incorporação

de DEQUI deslocou a banda de estiramento simétrico de CH₂ para um número de onda menor, enquanto que a banda de estiramento assimétrico de CH₂ foi ligeiramente deslocada para maiores números de onda. Como o deslocamento foi mais pronunciado para o estiramento simétrico, conclui-se que a penetração de DEQUI causa ordenação nas cadeias da monocamada. Diferentemente, DPPCT desloca tanto as bandas de estiramento simétrico, quanto assimétrico de CH₂ para maiores números de onda, e, portanto, sua incorporação causa desordem nas cadeias das monocamadas, corroborando o observado na interação de medicamentos anti-inflamatórios com monocamadas de fosfoglicerídeos [71].

As bandas positivas devidas ao estiramento de CH₂ na Figura 36b, a deformação da carbonila de éster e a deformação angular de amida II na Figura 36a em monocamadas contendo DEQUI e DPPQUI, indicam que os grupos C=O e N-H dos derivados estão preferencialmente paralelos à superfície do filme, ou seja, perpendiculares às cadeias ordenadas. Por outro lado, a banda negativa em 1531 cm⁻¹, atribuída à deformação assimétrica de grupos amina protonados na monocamada contendo DEQUI, indica que os grupos NH₃⁺ estão orientados perpendicularmente à superfície da água e paralelamente às cadeias acila [7]. O efeito mais acentuado de DEQUI parece estar relacionado com a indução na mudança de orientação dos grupos fosfato, apresentando banda negativa em 1250 cm⁻¹, referente à vibração assimétrica de P=O, o que indica que a orientação deste grupo é preferencialmente paralela às cadeias acila (Figura 36c), em oposição ao que é observado para a monocamada de DPPC pura e contendo DPPQUI (grupo P=O orientado perpendicularmente às cadeias acila e paralelo à interface).

Figura 36 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC pura e formadas sobre subfase tampão TS contendo 0,05 mg mL⁻¹ de DEQUI e DPPQUI, em 30 mN m⁻¹. As diferentes regiões do espectro são mostradas: região de vibração do N-H (a), região de vibração C-H (b) e região de vibração P=O (c).

(a)

(b)

(c)

Os espectros de PM-IRRAS da Figura 37 das monocamadas de DMPA mostram que os derivados de quitosana se encontram na interface ar / água, com efeitos mais fortes do que aqueles observados no caso de DPPC, especialmente os causados por DPPQUI. A Figura 37a mostra que quando DEQUI (ou DPPQUI) está presente, as bandas em 1506 cm^{-1} e 1533 cm^{-1} , atribuídas à deformação simétrica e assimétrica de grupos amina protonados, respectivamente, e a banda em 1737 cm^{-1} atribuída à deformação de carbonila de éster (C=O), têm o sentido que indicam os dipolos correspondentes como orientados perpendicularmente à interface da água e paralelamente às cadeias acila. Grandes alterações são observadas na Figura 37b para as bandas de CH. As bandas atribuídas às deformações axiais simétricas e assimétricas de CH_2 são deslocadas para maiores números de onda, de 2848 cm^{-1} para 2856 cm^{-1} e de 2920 cm^{-1} para 2948 cm^{-1} , respectivamente, para monocamadas contendo DPPQUI na subfase. O deslocamento da banda de deformação de CH_2 para menores números de onda, devido à incorporação de DEQUI, é semelhante ao efeito produzido sobre a monocamada de DPPC.

Enquanto DEQUI induz a ordenação das cadeias de DMPA, DPPQUI induz desordem tendo efeito mais pronunciado. Foi observada também a diminuição da intensidade das bandas de CH_2 (deformações simétrica e assimétrica) para monocamadas com os derivados na subfase, em comparação com monocamadas de DPPC e DMPA puras. Isto é devido, provavelmente, à interpenetração dos derivados entre as caudas acila e a diminuição da densidade de superfície das moléculas de fosfolípidios. A Figura 37c mostra que não houve inversão nas bandas atribuídas à deformação de P=O ; entretanto, tanto DEQUI quanto

DPPQUI deslocam a banda para maiores números de onda. Tal deslocamento pode ser explicado pela desidratação dos grupos P=O, devido à incorporação de DEQUI e DPPQUI, sendo que o oposto foi observado por Moreno et al. [129], os quais atribuíram o deslocamento da banda para menores números de onda à hidratação, devido à incorporação de anti-inflamatórios não-hormonais em monocamadas de fosfolipídios. Estes resultados podem ser comparados com os efeitos de quitosana sobre as monocamadas de DMPA [12], sendo que quitosana promove a ordenação nas cadeias de DMPA e hidratação da cabeça polar, com a banda de deformação P=O sendo deslocada para menores números de onda.

Figura 37 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DMPA pura e formadas sobre subfase tampão TS contendo 0,05 mg mL⁻¹ de DEQUI e DPPQUI, em 30 mN m⁻¹. As diferentes regiões do espectro são mostradas: região de vibração do N-H (a), região de vibração C-H (b) e região de vibração P=O (c).

(b)

(c)

No geral, os dados PM-IRRAS indicaram que DEQUI e DPPQUI afetam tanto a cabeça polar quanto as caudas hidrofóbicas das moléculas de fosfolípidios, com efeitos relativamente mais fortes para o DMPA, carregado negativamente. Além disso, enquanto DEQUI promove ordenamento ao penetrar a região hidrofóbica, o contrário foi observado para DPPQUI. Este desordenamento pode explicar os maiores efeitos causados por DPPQUI na elasticidade e expansão das monocamadas, inferidas a partir das isotermas de pressão de superfície.

3.3 Conclusões

Os derivados DEQUI e DPPQUI possuem atividade de superfície no intervalo de concentração de 0,1 a 0,5 mg mL⁻¹. Em concentrações abaixo de 0,05 mg mL⁻¹ (até 0,0025 mg mL⁻¹) esses possuem atividade de superfície induzida pelas monocamadas dos fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA. A adsorção na monocamada é mais rápida no caso do derivado DPPQUI, com maior aumento na pressão e potencial de superfície. Isto é devido a sua natureza mais hidrofóbica. O aumento na pressão de superfície causado pelos derivados em monocamadas de DPPG e DMPA é maior que em DPPC, devido à atração eletrostática entre as cargas negativas das cabeças polares dos fosfolipídios e os grupos amina positivamente carregados dos derivados. Os derivados afetam fortemente as monocamadas de fosfolipídios, expandindo as isotermas de pressão de superfície, efeito que aumenta com o aumento da concentração do derivado na subfase. O potencial de superfície também é afetado pela presença dos derivados. As grandes alterações tanto na pressão quanto no potencial de superfície indicam que DEQUI e DPPQUI interagem fortemente com os modelos de membrana. A partir das curvas de área molecular média *versus* concentração, em 30 mN m⁻¹, observou-se que DPPQUI causa maior expansão do que DEQUI. Quanto ao efeito sobre o potencial de superfície, DPPQUI causa contribuição positiva mesmo em pequenas áreas, indicando a presença do derivado em altas pressões de superfície. DEQUI leva a praticamente a mesma expansão das monocamadas independentemente do fosfolipídio utilizado ($\pi = 30$ mN m⁻¹). Entretanto, DPPQUI provoca maior expansão nas monocamadas de DPPG e DPPC do que em DMPA. A diminuição da elasticidade no plano, e consequente aumento na flexibilidade das monocamadas promovida pelos derivados, confirma a interação dos derivados de quitosana com os modelos de membrana, sendo este resultado importante para a compreensão da bioatividade de quitosana e derivados.

Filmes LB de DEQUI e DPPQUI/DMPA caracterizados por espectroscopia de infravermelho confirmam a presença dos derivados mesmo em altas pressões de superfície ($\pi = 30$ mN m⁻¹), demonstrando que estes permanecem incorporados nas monocamadas em pressão semelhante à de uma biomembrana.

Os resultados da interação dos derivados com os modelos de membrana de fosfolipídios indicam que há atração eletrostática na adsorção destes nas monocamadas lipídicas. Mas, uma vez adsorvidos, as interações hidrofóbicas tornam-se predominantes na expansão das monocamadas. Essas interações são mais favorecidas no caso dos derivados de quitosana do que com a própria quitosana devido às suas características estruturais,

principalmente a presença de substituintes hidrofóbicos que interagem com as caudas dos fosfolipídios. As reações de acilação ocorreram predominantemente nos grupamentos hidroxila e, portanto, estes se tornam indisponíveis para estabelecimento de ligações hidrogênio com os fosfolipídios. Por isso, conclui-se que as ligações hidrogênio envolvendo grupamentos hidroxila da quitosana não são essenciais para sua interação em modelos de membrana, visto que a expansão das monocamadas promovida pelos derivados *O*-acilados de quitosana é maior do que aquela provocada por quitosana na mesma concentração. Além disso, DPPQUI apresentou maior grau médio de substituição ($\overline{DS}$) nas hidroxilas do que DEQUI, ou seja, embora suas cadeias possuam menos grupos hidroxilas disponíveis para interações do tipo ligações hidrogênio, DPPQUI tem maior efeito sobre as monocamadas. Além das interações hidrofóbicas, que se tornaram mais pronunciadas com a utilização dos derivados, pode haver efeitos de conformação da cadeia de quitosana e das caudas inseridas nos derivados.

Com os experimentos de PM-IRRAS foi possível determinar que DEQUI e DPPQUI interagem tanto com as cabeças polares quanto com as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios. Após a penetração na região hidrofóbica, DEQUI causa ordenação das cadeias de fosfolipídio, de forma semelhante à quitosana, enquanto que DPPQUI causa desordenamento. Tais efeitos foram mais pronunciados sobre a monocamada de DMPA, provavelmente porque a adsorção é favorecida por atração eletrostática. No que diz respeito às implicações biológicas, os resultados indicam que os derivados DEQUI e DPPQUI tendem a ser mais eficientes do que a quitosana em aplicações onde interagem com membranas celulares.

4 Capítulo 4 - Interação dos derivados 3,6 - O,O'-dimiristoilquitosana (DMQUI) e 3,6 - O,O'-dipalmitoilquitosana (DPQUI) com modelos de membrana celular

4.1 Procedimento Experimental

4.1.1 Formação de filmes de Langmuir dos derivados DMQUI e DPQUI e interação com monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA

Filmes de Langmuir dos derivados DMQUI e DPQUI foram obtidos espalhando-se 50 e 40 μL , respectivamente, de solução $0,8 \text{ mg mL}^{-1}$ do derivado em clorofórmio em subfase de tampão TS, pH 3,0 e força iônica $\mu = 0,03 \text{ g mol}^{-1}$. As curvas foram feitas em triplicata para verificar sua reprodutibilidade. Os filmes foram caracterizados por isotermas de pressão (π) e potencial de superfície (ΔV) *versus* área. Filmes mistos dos derivados DMQUI e DPQUI com os fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA foram produzidos variando a proporção de grupamentos amina - NH_2 - de DMQUI e DPQUI (protonados na subfase pH 3,0 - NH_3^+) e fosfato - P=O - dos fosfolipídios (negativamente carregados - PO_4^-) em proporções de 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3 ($\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$). Os filmes foram caracterizados por isotermas de pressão (π) e potencial de superfície (ΔV) *versus* área.

4.1.2 Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

Filmes LB do tipo Y dos derivados puros e mistos na proporção 1:1 ($\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$) com o fosfolipídio DMPA foram depositados em lâminas de vidro e vidro recoberto com ouro. Os filmes foram transferidos na pressão de 30 mN m^{-1} com velocidade do dipper em 5 mm min^{-1} na emersão e 10 mm min^{-1} na imersão do substrato. Foram obtidos filmes com 1 camada (substrato de vidro recoberto com ouro) e 31 camadas (substrato vidro) que foram caracterizados por microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e PM-IRRAS, respectivamente. As imagens de AFM foram adquiridas em equipamento Bruker Dimension ICON, com cantilever e ponta de silício operando no modo de contato intermitente, frequência de ressonância de 330 kHz e taxa de varredura de 1 Hz. As imagens MEV foram obtidas com microscópio modelo XL30 FEG, do Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) da Universidade Federal de São Carlos.

4.2 **Resultados e Discussão**

4.2.1 *Formação de filmes de Langmuir puros dos derivados DMQUI e DPQUI*

Os derivados DMQUI e DPQUI foram produzidos inserindo-se covalentemente cadeias hidrofóbicas, com 14 e 16 carbonos, respectivamente, como substituintes nos grupos hidroxila da quitosana. A estrutura idealizada dos derivados foi apresentada na Figura 14 e um resumo das caracterizações encontra-se na Tabela 3.

A análise da interação entre os derivados DMQUI e DPQUI e as monocamadas dos fosfolipídios foi realizada através da comparação das isotermas de pressão e potencial de superfície das monocamadas puras dos fosfolipídios e dos derivados com as monocamadas mistas que contêm diferentes proporções dos mesmos. Por isso, determinou-se inicialmente a isoterma de pressão e o potencial de superfície dos derivados em subfase TS (pH 3,0), a 20 ± 1 °C. As isotermas foram feitas em triplicata e a média destas curvas é apresentada na Figura 38 (a) e (b). O erro corresponde ao desvio padrão médio calculado incluindo todos os pontos, sendo $\pm 1 \text{ \AA}^2$ em área por molécula e $\pm 0,5$ e $\pm 0,8 \text{ mN m}^{-1}$ em pressão de superfície para isotermas de DMQUI e DPQUI, respectivamente.

Figura 38 - Isotermas de pressão de superfície e potencial de superfície do derivado DMQUI (a) e DPQUI (b) em subfase tampão TS, pH 3,0.

As isotermas de pressão de superfície de DMQUI e DPQUI mostram a formação de filme de Langmuir altamente compactado. A compactação resulta em áreas extrapoladas de 22 $\text{\AA}^2$ para DMQUI e 32 $\text{\AA}^2$ para DPQUI, muito menores do que a área ocupada pela unidade repetitiva da quitosana (predominantemente unidades GlcN) que é cerca de 50 $\text{\AA}^2$ [44]. Assim, é provável que os derivados não formem monocamada verdadeira na interface ar-água, e consequentemente as unidades repetitivas da quitosana (GlcN) podem estar sobrepostas em mais de uma camada, provavelmente agregadas. As isotermas de potencial de superfície também indicam a formação de agregados do polímero na interface. O potencial inicial é positivo, $\approx 0,15$ V (fase líquido-expandida) nas monocamadas de ambos os derivados.

Ressalte-se que um potencial inicial não nulo é indicador de agregação das moléculas mesmo na fase expandida [67]. O valor de potencial aumenta com a compressão dos filmes até $\approx 0,45$ V, quando se dá o colapso.

As isotermas de pressão e potencial de superfície de materiais não anfífilos são mais difíceis de analisar por vários motivos. Para a pressão de superfície, a principal dificuldade é a não formação de um filme monomolecular (monocamada verdadeira) devido à tendência de agregação. Especialmente para polímeros, há tendência de enovelamento das cadeias na superfície da água, resultando na adoção de conformação bem diferente das moléculas anfífilas. A análise também é prejudicada pelos diferentes tamanhos das cadeias (polidispersividade) e estruturas terminais das cadeias, o que resulta em sistema não homogêneo. A análise do potencial de superfície também é prejudicada pela formação de agregados, pois se torna difícil conhecer a orientação dos grupos que contribuem para o momento de dipolo [67]. Apesar da dificuldade de análise quantitativa, as isotermas foram utilizadas na comparação entre monocamadas mistas de fosfolipídio e derivados de quitosana (DMQUI e DPQUI), de modo a se obter informações sobre a interação entre os materiais.

4.2.2 Interação de DMQUI e DPQUI com monocamadas de DPPC, DPPG e DMPA

Os derivados *O*-acilados de quitosana, nomeadamente DMQUI e DPQUI, foram sintetizados com o propósito de serem empregados para formar filmes de Langmuir puros e, principalmente, estudar as suas interações com os fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA por meio da formação de monocamadas mistas, com foco no estudo das interações eletrostáticas. A importância das forças eletrostáticas entre os grupamentos amina positivamente carregados em pH 3,0 da quitosana (NH_3^+) e os grupos fosfato negativamente carregados dos fosfolipídios (PO_4^-) é evidente na interação entre os materiais [5, 6, 10], embora não seja a única existente. A formação de filmes de Langmuir dos derivados permite quantificar os grupamentos amina na interface, e conhecer a proporção equivalente aos grupamentos amina e fosfato. Tal quantificação não foi possível nos experimentos em que se utilizou quitosana e outros derivados solubilizados em subfase, já que apenas a adsorção do polímero pôde ser acompanhada. Assim, as monocamadas mistas tem a proporção em massa de derivado e fosfolipídio definida em relação aos grupos químicos amino (derivado) e fosfato (fosfolipídio), sendo o valor mostrado no encarte referente à proporção desses grupos. As discussões foram feitas para obter informações sobre as interações eletrostáticas entre esses grupos.

As Figura 39 e Figura 40 mostram isotermas de pressão de superfície para os derivados DMQUI e DPQUI, respectivamente, puros e mistos com diferentes proporções dos fosfolípidios. As monocamadas mistas foram feitas em duplicata sendo que o erro corresponde a $\pm 1 \text{ \AA}^2$ em área por molécula e $\pm 4,1$ e $\pm 3,5 \text{ mN m}^{-1}$ na pressão de superfície para monocamadas com DMQUI e DPQUI, respectivamente. As diferenças na pressão de colapso das monocamadas puras e mistas são o primeiro indício de miscibilidade, corroborado pela existência de apenas um colapso nas isotermas de pressão das misturas. Além disso, a estabilidade das monocamadas pode ser avaliada pela pressão de colapso dos filmes, sendo o filme mais estável o que tiver maior pressão de colapso. Para misturas entre DMQUI e DPPC ou DPPG a pressão de colapso aumenta com a proporção de fosfolípido. Para as misturas DMQUI/DMPA as pressões de colapso são maiores do que nas monocamadas puras, sugerindo formação de monocamada mais estável. Para DMQUI/DPPG as curvas de proporção 3:1 e 2:1 ($\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$) são semelhantes, sugerindo a ocorrência de saturação dos efeitos devidos aos grupamentos amina, ou seja, uma quantidade adicional de grupos amina não causaria deslocamento adicional. Para DMQUI/DMPA a proporção 3:1 ($\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$) apresenta curva muito semelhante à de DMQUI puro, também indicando saturação.

Figura 39 - Isotermas de pressão de superfície para o derivado DMQUI puro e misto com DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) para diferentes proporções $\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$.

(a)

(b)

(c)

Figura 40 - Isotermas de pressão de superfície para o derivado DPQUI puro e misto com DPPC (a), DPPG (b) e DMPA (c) para diferentes proporções $\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$.

(a)

(b)

(c)

Para as misturas entre DPQUI/DPPC na Figura 40 observa-se que com excesso de grupos fosfato (1:3), a isoterma tem área molecular mais próxima da do DPPC. Quando há excesso de grupamentos amina (3:1), a área molecular tem valor intermediário entre a de DPPC e DPQUI puros. Para monocamadas mistas DPQUI/DPPG e DPQUI/DMPA, o comportamento é semelhante. Para proporções com excesso de grupamentos amino (3:1 e 2:1), as curvas são semelhantes no perfil, área ocupada e pressão de colapso. O mesmo ocorre para as proporções com excesso de grupamentos fosfato (1:2 e 1:3). A semelhança dessas curvas indica possível saturação na diferença da proporção entre os grupos opostos. Em relação à pressão de colapso, as misturas DPQUI/DPPC não apresentam pressão de colapso maior do que para o DPPC puro, já para as misturas DPQUI/DPPG a maioria das proporções apresenta pressão de colapso semelhante à da monocamada de DPPG, sendo igualmente estáveis, e menores do que a do derivado puro. Para monocamadas de DPQUI/DMPA, a pressão de colapso para a proporção 1:1 é maior que a pressão de colapso para outras proporções formando monocamada mais estável. As diferenças na pressão de colapso são também um primeiro indicativo de miscibilidade entre os componentes da monocamada. Segundo a literatura, uma verdadeira mistura deve ter somente um colapso e provavelmente em pressão diferente da pressão para os componentes puros [44]. Isso ocorre para praticamente todas as monocamadas mistas indicando a miscibilidade entre os derivados e os fosfolipídios.

Informações adicionais sobre a miscibilidade e sobre as interações entre os materiais da monocamada mista podem ser obtidas plotando-se o gráfico de área extrapolada *versus* fração molar de um dos componentes. O valor da área ideal para monocamadas foi calculado a partir da Equação 4.

Figura 41 - Área extrapolada em função da composição para monocamadas mistas de DMQUI e DPQUI e os fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA.

Para as monocamadas mistas com DMQUI os valores de área são menores do que a área ideal, independentemente do fosfolipídio, indicando atração dos materiais e condensação da monocamada. Além disso, os valores diferentes dos ideais indicam miscibilidade entre os materiais. Para monocamadas mistas com DPQUI o comportamento depende do fosfolipídio. A maioria das misturas tem valores de área menores do que a ideal, indicando atração entre os

materiais e condensação da monocamada; porém, para a maioria das misturas com DPPC e proporção equivalente de grupamentos amina e fosfato (1:1) de DPPG/DPQUI, os valores de área são maiores do que o ideal. Ainda, algumas proporções apresentam valores de área semelhante à ideal, sugerindo imiscibilidade.

A origem das interações entre compostos para formar monocamadas mistas vem da estrutura química dos seus componentes. As estruturas dos derivados DMQUI e DPQUI e dos fosfolipídios utilizados foram apresentadas nas Figura 14 e Figura 23, respectivamente. A atração entre os compostos e consequente condensação das monocamadas pode ser devida a dois fatores principais: i) atração eletrostática entre grupos opostamente carregados ou ii) atração hidrofóbica entre cadeias alifáticas, formando agregados. A repulsão ou expansão das cadeias é devida principalmente à repulsão de cargas eletrostáticas de mesmo sinal. Com base nessas informações e nos resultados, podemos levantar hipóteses sobre as possíveis interações [74]. Para as misturas de DMQUI com o fosfolipídio DPPC, os valores de área indicam atração entre os componentes para todas as proporções de misturas, sugerindo que a interação é devida à atração entre as cadeias hidrofóbicas do material, visto que DPPC é zwitteriônico, não possuindo carga líquida. Para as misturas com DPPG e DMPA a análise é mais complexa e não conclusiva, pois dois fatores atuam e podem explicar a atração entre os materiais, a atração de cargas opostas ou mesmo a das cadeias hidrofóbicas. Para as misturas com DPQUI o comportamento de repulsão em misturas com o fosfolipídio DPPC e na proporção 1:1 com DPPG é surpreendente, sendo que a repulsão sugere existência de cargas de mesmo sinal. Uma possível explicação seria a existência de grande concentração pontual dessas cargas, uma vez que apenas a proporção de cargas que utilizamos na formação das monocamadas mistas é controlada, não sua disposição na interface. Assim, os casos de expansão provavelmente envolvem cargas de mesmo sinal que se encontram tão próximas a ponto de causar repulsão. De maneira semelhante ao observado com DMQUI, a atração entre os materiais é comportamento das misturas com DMPA e na maioria das misturas com DPPG, podendo ser atribuído às cargas de sinal oposto ou as interações hidrofóbicas.

Comparações entre as isotermas de potencial de superfície puras de DMPA, dos derivados e das misturas (Figura 42) mostram que DMQUI e DPQUI têm contribuição positiva de potencial sugerindo maior formação de agregados na interface do que a monocamada mista com os fosfolipídios. O mesmo ocorre para as isotermas de potencial de superfície das misturas entre os derivados e DPPC ou DPPG (resultados não mostrados). Para as misturas com o DMPA na proporção de 1:1 o valor de potencial de superfície é ≈ 0 V, semelhante ao da monocamada pura do fosfolipídio, já para as isotermas de DMQUI e

DPQUI puros o potencial tem valor inicial $\approx 0,15\text{V}$, fase expandida da monocamada. O valor de potencial para as três curvas no colapso é semelhante, $\approx 0,45\text{ V}$.

Figura 42 - Comparação das isotermas de potencial de superfície dos derivados DMQUI (a) e DPQUI (b) e DMPA puro e para monocamada mista na proporção de 1:1 de $\text{NH}_3^+:\text{PO}_4^-$.

4.2.3 Filmes Langmuir-Blodgett (LB)

Filmes LB de DMQUI e DPQUI puros e mistos na proporção 1:1 entre os grupamentos amônio (NH_3^+) dos derivados e fosfato (PO_4^-) do DMPA foram depositados na pressão de 30 mN m^{-1} . Os filmes são do tipo Y contendo 1 e 31 monocamadas depositadas com velocidade do dipper de $3\text{ e }10\text{ mm min}^{-1}$ na emersão e imersão do substrato, respectivamente. A taxa de transferência (TR) das monocamadas variou como mostra a Tabela 4. As taxas de transferência indicam formação de filmes heterogêneos (não recobrem toda a área), sendo considerados homogêneos filmes LB com taxa de transferência de $1,00 \pm 0,05$ [64].

Tabela 4 - Taxa de transferência média dos filmes LB produzidos

	TR média para filme LB com 1 monocamada	TR média para filme LB com 31 monocamadas
DMQUI	0,74	0,65
DPQUI	1,09	0,75
DMQUI/DMPA	1,31	0,84
DPQUI/DMPA	0,80	0,92

A análise de PM-IRRAS da Figura 43 identifica as principais bandas no infravermelho de DMQUI, DPQUI e DMPA: em 1255 cm^{-1} e 1076 cm^{-1} bandas de CH_2 , em 1387 cm^{-1} deformação angular do grupo CH_3 , em $1450\text{-}1475\text{ cm}^{-1}$ bandas de dobramento de CH_2 em compostos alifáticos, em $1540\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ deformação angular de amida II, em $1660\text{-}1670\text{ cm}^{-1}$ deformação axial de amida I, em $1730\text{-}1740\text{ cm}^{-1}$ estiramento do grupo carboxila (C=O) de éster, em $2850\text{-}2950\text{ cm}^{-1}$ estiramento axial simétrico e assimétrico de CH_2 e em $2950\text{ - }2990\text{ cm}^{-1}$ estiramento axial assimétrico do grupo CH_3 . As bandas positivas das vibrações de C-H, das vibrações de amida e carbonila indicam que as cadeias acilas estão preferencialmente perpendiculares ao substrato, enquanto os grupamentos N-H e C=O estão preferencialmente em paralelo [7, 12].

Figura 43 - Espectros PM-IRRAS de filmes LB de DMQUI e DPQUI puros e mistos com DMPA. As diferentes regiões do espectro são mostradas: região de vibração do N-H e C=O (a e b) e região de vibração C-H (c e d).

(b)

(c)

(d)

A caracterização por AFM foi feita com varredura em áreas distintas, de 2x2 μm e 10x10 μm , e a microscopia eletrônica de varredura (MEV) em aumento que variou de 1000x a

50000x. As imagens de AFM dos filmes em $2 \times 2 \mu\text{m}$ e MEV em aumento de 20000x estão na Figura 44, assim como a rugosidade média quadrática (Rms).

Figura 44 - Imagens de AFM e rugosidade média quadrática dos filmes LB de DMQUI (a), DPQUI (b), DMQUI/DMPA (c) e DPQUI/DMPA (d).

As imagens de AFM mostram filmes relativamente homogêneos, dos quais, aparentemente, o filme produzido com o derivado DPQUI puro apresenta maior homogeneidade. Com base nos valores de rugosidade média quadrática (Rms) observou-se que os filmes mistos formados por derivado/DMPA são mais rugosos do que para o derivado

puro. No caso dos filmes do derivado DPQUI o aumento foi mais significativo, passando de 6 nm do filme puro para 16 nm para o filme misto com DMPA. O aumento na rugosidade pode ser atribuído à interação entre os materiais formadores do filme. A maior rugosidade para os filmes mistos pode ser relacionada ao comportamento de atração entre os materiais verificados da área extrapolada *versus* fração de DMQUI/DPQUI (Figura 41). O comportamento de atração entre os materiais na interface parece ter sido mantido quando depositados em substrato sólido.

A formação de agregados foi sugerida pelos valores não nulos das isotermas de potencial de superfície para os derivados puros (Figura 42) mesmo em grandes áreas por moléculas. De fato, os filmes de derivado puro têm alto valor de rugosidade sugerindo agregação, corroborando os dados de potencial de superfície. Para os filmes mistos, observa-se que a rugosidade média é superior à dos filmes puros com o derivado. Entretanto, sua rugosidade é menor do que o filme LB de DMPA/quitosana não-modificada de trabalho anterior, em que a rugosidade média foi 25,8 nm [5], ao passo que para filme LB dos derivados com DMPA foi 14,3 nm e 16,0 nm para DMQUI e DPQUI, respectivamente. O trabalho reporta ainda imagens de AFM com grandes agregados (50-150 nm de altura) atribuídos à quitosana. Neste sentido, os derivados DMQUI e DPQUI possibilitam formar filmes LB mais homogêneos, sem grandes aglomerados, em comparação com a quitosana não modificada.

Nas imagens de MEV na Figura 45 para os filmes mistos (imagens c e d) observa-se uma ondulação que não aparece para derivados puros (a e b). Essa ondulação provavelmente é causada pelo aumento na rugosidade dos filmes, consequência da interação entre os materiais. A ondulação para filmes de DPQUI/DMPA parece ser maior do que para DMQUI/DMPA. Em particular, a imagem (a) mostra a formação de um grande agregado no filme do derivado DMQUI, que pode ser responsável pelo valor de potencial de superfície não nulo para DMQUI, mas o mesmo não foi observado para o filme de DPQUI.

Figura 45 - Imagens de MEV dos filmes LB de DMQUI (a), DPQUI (b), DMQUI/DMPA (c) e DPQUI/DMPA (d).

(a)

(b)

(c)

(d)

4.3 Conclusões

Os derivados acilados DMQUI e DPQUI formam filmes de Langmuir com boa reprodutibilidade. As isotermas de pressão de superfície demonstram a formação de monocamada altamente compactada, sendo que provavelmente não há formação de uma monocamada verdadeira. Tal comportamento é esperado para monocamadas de polímeros devidos à tendência ao enovelamento e polidispersividade. O potencial de superfície inicial (fase líquido-expandida) para os derivados é não nulo, indicando agregação das moléculas, o

que prejudica a análise, pois se torna difícil conhecer a orientação dos grupos que contribuem para o momento de dipolo elétrico.

A formação de monocamadas mistas dos derivados com os fosfolipídios indica que os compostos são miscíveis devido à diferença das pressões de colapso dos componentes puros e das misturas e também pela análise das curvas de área extrapolada *versus* fração do derivado. A análise da pressão de colapso levou a conclusões sobre a estabilidade das monocamadas. Os valores de área extrapolada menores do que a ideal para monocamadas mistas com o derivado DMQUI, para DPQUI/DMPA e a maioria das proporções DPQUI/DPPG indicam atração entre os materiais (condensação da monocamada). Já monocamadas mistas DPQUI/DPPC resultam, na maioria das misturas, em valores maiores para área extrapolada do que o ideal, indicando repulsão entre os materiais (expansão das monocamadas). Para monocamadas mistas formadas com o fosfolipídio DPPC, o comportamento de atração ou repulsão entre os materiais é devido, provavelmente, a forças hidrofóbicas entre as caudas alquílicas de DPPC e os substituintes presentes em DMQUI e DPQUI. Já os resultados analisados com foco em obter informações sobre as interações eletrostáticas analisando-se a formação de monocamadas mistas com fosfolipídios negativamente carregados (DPPG e DMPA) foram inconclusivos, uma vez que os efeitos de atração ou repulsão entre os materiais estão associados tanto a interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas.

Apesar de não obtermos informações conclusivas sobre as interações eletrostáticas entre os materiais, a produção dos derivados de quitosana DMQUI e DPQUI possibilitou formar filmes de Langmuir e filmes LB puros dos derivados e mistos com DMPA mais homogêneos do que os obtidos com quitosana. A estrutura química dos componentes dos filmes foi analisada por PM-IRRAS e sua morfologia por AFM e MEV. A produção de filmes LB possibilita a construção de dispositivos com aplicação em óptica, fotônica, eletrônica, em sensores e biossensores.

5 Capítulo 5 - Estudos sobre a orientação e conformação dos fosfolipídios e quitosana

Estudos anteriores mostraram que a disposição em cadeias poliméricas da quitosana é essencial na interação com os modelos de membrana de fosfolipídios e que quitosana com baixo grau de polimerização é mais eficaz na interação [11]. A partir desses resultados, supõe-se que a conformação e/ou orientação que as cadeias de quitosana adotam possibilite maior penetração e perturbação nas membranas. Pode-se afirmar ainda que as interações eletrostáticas entre quitosana e os fosfolipídios são importantes, mas não são as únicas [10]. De fato, interações hidrofóbicas foram confirmadas com interpenetração da quitosana na parte hidrofóbica do fosfolipídio, mesmo em altas pressões de superfície [5, 6, 9]. Por outro lado, nossos trabalhos mostraram que ligações hidrogênio não são fundamentais na interação com os modelos de membrana (resultados apresentados no Capítulo 2) [9].

Para comprovar hipóteses sobre conformação/orientação das cadeias e grupos químicos da quitosana, foram investigadas a orientação dos grupos funcionais envolvidos em interações eletrostáticas e hidrofóbicas (grupo P=O e C-H) com o fosfolipídio zwitteriônico (DPPC) e negativamente carregado (DPPG) com quitosanas de elevada massa molecular (QAMM - $\overline{M}_w = 479,000 \text{ g mol}^{-1}$ e $\overline{GA} \approx 20\%$) e de baixa massa molecular (QBMM - $\overline{M}_w = 23,500 \text{ g mol}^{-1}$ e $\overline{GA} \approx 10\%$), empregando medidas de PM-IRRAS e espectroscopia de geração de soma de frequências (SFG). Além disso, medidas de espalhamento dinâmico (DLS) e estático de luz (SLS) foram feitas para obter informação sobre a conformação das cadeias da quitosana (alto e baixo grau de polimerização) e do polieletrólito hidrocloreto de polialilamina (PAH - $\overline{M}_w = 15,000 \text{ g mol}^{-1}$) em solução. O PAH é um polieletrólito catiônico que possui grupamentos amino (semelhante à quitosana) em todas suas unidades constituintes. Este foi utilizado em estudos de interação com monocamadas de DMPA, demonstrando pouco efeito sobre as mesmas em comparação com a quitosana [10].

5.1 Procedimento Experimental

5.1.1 PM-IRRAS

As medidas de PM-IRRAS foram realizadas em um espectrofotômetro da KSV Instruments, modelo PMI550, acoplado a uma cuba de Langmuir modelo mini. Uma foto do equipamento foi mostrada na Figura 22. O ângulo de incidência da luz na monocamada foi de

80° e as bandas do espectro orientadas para cima indicam dipolos moleculares orientados paralelamente à interface, ao passo que bandas para baixo indicam dipolos perpendiculares à interface [111]. Os espectros foram obtidos para monocamadas puras dos fosfolipídios DPPC e DPPG (subfase TS) e em subfase TS contendo amostras de quitosanas QAMM e QBMM na concentração de 0,2 mg mL⁻¹. Os espectros foram obtidos nas pressões de 0, 10, 20 e 30 mN m⁻¹.

5.1.2 Espectroscopia de geração de soma de frequências (SFG)

A SFG é uma técnica óptica não-linear de segunda ordem em que se faz incidir dois feixes de laser, um na região do espectro visível (frequência ω_{vis}) e outro na região do infravermelho (frequência ω_{IR} sintonizável), que se superpõem na interface entre dois meios, e dão origem a um sinal de soma de frequência $\omega_{\text{SFG}} = \omega_{\text{vis}} + \omega_{\text{IR}}$. Como um processo de segunda ordem, ele é proibido em meios com simetria de inversão, na aproximação do dipolo elétrico, mas permitido em interfaces onde a simetria é quebrada. Isto permite detectar moléculas apenas da interface, discriminando-as do volume (*bulk*). Além da especificidade a interfaces, a técnica possibilita determinar a conformação de longas cadeias hidrofóbicas [130]. Quando o feixe de frequência na região do infravermelho se aproxima de um modo normal de vibração das moléculas da interface, por ressonância o sinal de SFG aumenta. No entanto, se as moléculas na interface adquirirem orientação aleatória, o sinal SFG é nulo. É preciso, portanto, que as moléculas possuam uma orientação média resultante para se obter um sinal de SFG [130, 131]. A Figura 46 ilustra a geometria dos feixes para o SFG.

Figura 46 - Interação de feixes para geração de soma de frequências.

As medidas de SFG foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Paulo Barbeitas Miranda no laboratório de espectroscopia não linear (LENI) do Instituto de Física de São Carlos. Foi utilizado um espectrômetro comercial (Ekspla, Lituânia) bombeado por um laser pulsado $\text{Nd}^{+3}:\text{YAG}$ que fornece um feixe fundamental em 1064 nm (28 ps de duração de pulso, 20 Hz de taxa de repetição). Uma unidade geradora de harmônicos produz 2º e 3º harmônicos (532 nm e 355 nm, respectivamente). O segundo harmônico é o feixe de luz visível que excita a amostra (pulso de energia $\approx 950 \mu\text{J}$) e o terceiro harmônico e o fundamental bombeiam um amplificador paramétrico óptico (OPA) com um estágio de diferença de frequência para gerar um feixe sintonizável ($1000\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$) no infravermelho (IR) (energia de pulso $\approx 30\text{-}150 \mu\text{J}$), que se superpõe ao feixe visível na amostra. O sinal de soma de frequência em função da frequência IR é coletado por uma fotomultiplicadora após filtragem espacial e espectral. A Figura 47 mostra um esquema do equipamento.

Figura 47 - Esquema do equipamento de SFG.

As interações entre quitosana e fosfolipídio foram avaliadas na cuba de Langmuir, sendo que os feixes incidiram na interface da cuba. Os espectros SFG foram obtidos combinando as polarizações SSP (S - para o feixe de soma de frequência gerado, S - feixe da luz visível e P - feixe do infravermelho) para monocamadas do fosfolipídio DPPG (subfase TS) e em subfase TS, pH 3,0, contendo amostras de quitosana com baixa (QBMM) e alta (QAMM) massa molecular, na concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$, pressão de superfície de 20 mN m^{-1} e temperatura em $21 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.1.3 Espalhamento de luz

O espalhamento de luz é resultado da interação da radiação eletromagnética com partículas suspensas em meio através do qual a radiação é transmitida [132]. Quando incide na partícula, parte da radiação é absorvida e outra parte é espalhada, sendo que a intensidade do espalhamento depende do tamanho da partícula. Em um meio perfeitamente homogêneo (situação ideal) a luz não seria espalhada; já em meios não homogêneos, a luz é espalhada em todas as direções. Soluções de macromoléculas são consideradas como meios não homogêneos, nos quais a mobilidade aleatória e difusa das macromoléculas gera regiões com diferentes concentrações e índices de refração diferentes das do fluido. São essas regiões que

servem de centros espalhadores de luz [133]. Por isso, a técnica de espalhamento de luz é usada para estudar polímeros e colóides, que têm dimensão entre 1 nm e 1mm.

As principais propriedades que podem ser determinadas por espalhamento de luz são: massa molecular média ponderada (M_w), raio de giração (R_g), raio hidrodinâmico (R_h), coeficientes de difusão, além dos coeficientes viriais estáticos (B_{est}) e dinâmicos (B_{din}) obtidos das interações entre as partículas e dessas com o solvente [132, 133]

5.1.3.1 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento dinâmico de luz (DLS, do inglês *Dynamic Light Scattering*) pode ser usado para determinar o perfil de distribuição do tamanho de partículas em suspensão, polímeros em solução e fluidos complexos [134]. O movimento molecular causa flutuações de concentração em dado volume da solução em função do tempo. No espalhamento de luz dinâmico, a intensidade de espalhamento é registrada como função do tempo, e flutuações nesta intensidade de espalhamento surgem das flutuações de concentração no volume de espalhamento [132]. A técnica permite obter o coeficiente de difusão de macromoléculas em solução, a partir da análise da distribuição de frequência das flutuações na intensidade de luz espalhada em uma direção fixa (ângulo de detecção fixo). As flutuações originam-se da variação do índice de refração no volume de espalhamento devido ao movimento browniano das partículas. Estão relacionadas com o vetor de direção do espalhamento e o coeficiente de difusão das moléculas pela Equação 12.

$$\Gamma = Dq^2 \quad (\text{Equação 12})$$

onde Γ é a constante de correlação ou relaxação, D é o coeficiente de difusão aparente e q é o módulo do vetor de onda do espalhamento.

A partir da correlação entre as flutuações temporais na intensidade de luz espalhada, obtém-se por transformada de Fourier o espectro de frequências de flutuação. A constante de correlação $G(\tau)$ é calculada com a Equação 13, de onde se estima o coeficiente de difusão.

$$G(\tau) = A + B \exp(-2Dq^2 \tau) \quad (\text{Equação 13})$$

onde A é o valor da linha base e B é o fator pré-exponencial contendo constantes ópticas do equipamento e da amostra.

As contribuições do coeficiente de difusão podem ser rotacionais e translacionais. Para obter o coeficiente de difusão translacional puro (D_0), intrínseco a diluições infinitas, é necessário extrapolar o coeficiente de difusão aparente ao vetor de onda de espalhamento zero. A extrapolação pode ser feita utilizando-se a Equação 14.

$$D = D_0 (1 + C < B_{din}^2 > q^2) \text{ (Equação 14)}$$

onde B_{din} é o coeficiente virial dinâmico e C representa a contribuição de movimentos internos ao coeficiente de difusão aparente e fornece informações sobre a flexibilidade no caso de estruturas em cadeia. Para estruturas em bastão, o valor C teórico é 0,033, aumentando com a flexibilidade das cadeias atingindo um valor teórico de 0,17 para estrutura em novelo aleatório [132]. O raio hidrodinâmico das partículas (R_h) é calculado com a equação de Stokes-Einstein (Equação 15) relacionando-se o valor do coeficiente de difusão D_0 , a constante de Boltzmann K_B , a viscosidade do solvente (η) e a temperatura (T).

$$R_h = \frac{K_B T}{6\pi\eta D_0} \text{ (Equação 15)}$$

5.1.3.2 Espalhamento de luz estático

A teoria do método de espalhamento de luz estático (SLS, do inglês *Static Light Scattering*) foi estabelecida por Lord Rayleigh em 1871. A razão entre a luz incidente e a luz espalhada, conhecida como razão de Rayleigh, é expressa pela Equação 16.

$$R_\theta = \frac{I_\theta}{I_0} \cdot r^2 \text{ (Equação 16)}$$

onde I_θ = luz espalhada, I_0 = luz incidente, r = distância entre a partícula e o observador (detector) e θ = ângulo entre a direção da luz incidente e da luz espalhada. Quando uma onda eletromagnética incide sobre uma partícula, induz a oscilação nas nuvens eletrônicas da matéria, que geram dipolos, em que os elétrons da partícula se alinham em um plano do campo eletromagnético. A intensidade do dipolo induzido pela interação é proporcional ao campo elétrico da radiação incidente. A constante de proporcionalidade é conhecida como polarizabilidade (α) da molécula, segundo a Equação 17.

$$\alpha = \frac{c \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)}{2\pi N} \quad (\text{Equação 17})$$

onde c e N são a concentração e o número de partículas espalhadoras, respectivamente. O termo $\partial n / \partial c$ é o incremento do índice de refração específico, que depende de alterações no índice de refração do meio devido à presença das partículas.

Para partículas pequenas, menores que $\lambda/20$, ou seja, $1/20$ do comprimento de onda de luz incidente, não há dependência angular da intensidade de luz espalhada. Tais partículas podem ser consideradas pontuais, espalhando a mesma intensidade de luz em todas as direções. A intensidade de luz espalhada, integrada por um período de tempo de segundos ou mais, varia com o ângulo de medida (θ) e concentração de acordo com a Equação 18.

$$\frac{Kc}{\Delta R_\theta} = \frac{1}{M_w P_\theta} + 2B_{est}c \quad (\text{Equação 18})$$

onde R_θ é a razão de intensidades de Rayleigh, P_θ é o fator de espalhamento de partículas, Kc é uma constante arbitrária, B_{est} é o coeficiente virial estático, C a concentração da solução e M_w a massa média ponderada. Para partículas pequenas, o fator P_θ tende a um, pois a intensidade de luz espalhada é a mesma em todas as direções independentemente do ângulo e a equação pode ser rearranjada para a Equação 19.

$$\frac{Kc / \Delta R_\theta}{c} = \frac{1}{M_w} + 2B_{est} \quad (\text{Equação 19})$$

Assim, fazendo-se medidas para diversas concentrações de soluto, os valores podem ser tratados plotando-se o gráfico de $Kc / \Delta R_\theta$ versus a concentração (Figura 48), obtendo-se, através dos coeficientes linear ($c \rightarrow 0$) e angular da reta, os valores de M_w^{-1} e $2B_{est}$, respectivamente.

Figura 48 - Dependência da razão de Rayleigh com a concentração de uma solução de partículas, com dimensão menor que $\lambda/20$.

Partículas com tamanhos maiores do que $\lambda/20$ não podem mais ser consideradas pontuais. Assim, a intensidade de luz espalhada não tem mais simetria, havendo interferência entre as radiações provenientes dos vários dipolos criados na partícula, devido à diferença de fase entre os raios espalhados. A intensidade de luz espalhada é então obtida utilizando-se a Equação 20 [132, 135].

$$\frac{Kc}{\Delta R_{\theta}} = \frac{1}{\overline{M_w}} \left[1 + \frac{16\pi^2 \langle R_g^2 \rangle}{3\lambda^2} \sin^2 \left(\frac{\theta}{2} \right) + \dots \right] + 2B_{din}C + 3AB_{din}C \dots (\text{Equação 20})$$

onde R_{θ} é a razão de intensidades de Rayleigh, C a concentração da solução, $\overline{M_w}$ a massa média ponderada, $\langle R_g^2 \rangle$ é a média quadrática do raio de giração e B_{din} é o coeficiente virial dinâmico. Para radiação incidente verticalmente polarizada a constante K é dada pela Equação 21.

$$K = \frac{4\pi^2 n_0^2 \left(\frac{\partial n}{\partial c} \right)^2}{\lambda^4 N_A} \quad (\text{Equação 21})$$

onde n_0 é o índice de refração do solvente, N_A o número de Avogadro e $\partial n / \partial c$ é o incremento do índice de refração específico. Assim, é elaborado um gráfico de Kc/R_{θ} versus

$\sin^2 \theta/2 + bc$, onde b é um fator de escala escolhido para que as curvas se apresentem separadas umas das outras. Tal gráfico é denominado diagrama de Zimm [132, 135] e um exemplo é mostrado na Figura 49.

Figura 49 - Diagrama de espalhamento de luz pela solução de macromoléculas, denominado diagrama de Zimm.

A intersecção das retas extrapoladas no diagrama de Zimm corresponde ao inverso da massa molecular média ponderal, M_w^{-1} , do soluto em estudo. A inclinação da reta na extrapolção do ângulo tendendo a zero ($\theta \rightarrow 0$) fornece o valor do segundo coeficiente virial (B_{est}). Já o raio de giração (R_g) pode ser obtido da Equação 22. As extrapolções são feitas no intuito de minimizar efeitos das interações (construtivas e destrutivas) dos campos elétricos das ondas luminosas (extrapolção para ângulo 0) e das interações interpartículas, por meio de diluição infinita (extrapolção para concentração 0) [133].

$$R_g^2 = \frac{3\lambda^2}{16\pi^2} (\text{inclinação/intercepto})_{C \rightarrow 0} \quad (\text{Equação 22})$$

Para obter informações sobre a conformação das cadeias da quitosana, medidas de espalhamento dinâmico (DLS) e estático de luz (SLS) foram feitas utilizando amostras de quitosana (alto e baixo peso molecular) e do polieletrólito hidrocloreto de polialilamina (PAH) em solução tampão TS pH 3,0, em concentrações que variaram de 0,025 a 0,3 mg mL⁻¹. As análises de DLS foram feitas em equipamento Malvern (Alemanha) modelo Zetasizer

Nano ZS com caminho óptico de 10 mm, comprimento de onda de emissão do laser em 633 nm, e detector posicionado em 173°. As análises SLS foram feitas em equipamento HITACHI modelo F-4500 (Japão), com caminho óptico de 1 cm, comprimento de onda de emissão do laser em 436 nm e 536 nm, e detector posicionado em 90°. As medidas foram obtidas a 25°C $\pm$ 1°C com as soluções em cubetas de poliestireno e quartzo para análises de DLS e SLS, respectivamente.

5.2 Resultados e discussão

5.2.1 PM IRRAS

O espectro de PM-IRRAS dos fosfolipídios DPPC e DPPG na Figura 50 mostra bandas de vibração na região típica de C-H em cadeias alifáticas, sendo as duas bandas intensas em 2911-2918 cm^{-1} e 2841-2848 cm^{-1} atribuídas às vibrações assimétrica e simétrica do grupo CH_2 , respectivamente. A banda menos intensa em 2950 cm^{-1} é atribuída às vibrações simétricas e assimétricas do grupo metil terminal (CH_3) [136]. Alguns deslocamentos nos números de onda são notados quando comparados os espectros adquiridos em diferentes pressões. No geral, as bandas de deformação do grupo CH_2 são deslocadas para maiores números de onda, quando comparadas as bandas em baixas pressões (0 e 10 mN m^{-1}) e altas pressões (20 e 30 mN m^{-1}), com exceção da banda de deformação assimétrica do CH_2 (2854 cm^{-1}), que é deslocada para menores números de onda. Esses deslocamentos foram também observados em outros trabalhos [12, 136] e são associados ao aumento do número de conformações *trans* ao longo da cauda fosfolipídicas e relacionadas ao aumento da ordem dessas cadeias, mediante compressão. A intensidade das bandas simétricas e assimétricas de CH_2 aumenta com a pressão de superfície devido à alta densidade das moléculas de fosfolipídio na superfície.

Figura 50 - Espectros de PM-IRRAS de monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) em vários estágios de compressão, na região de vibração do C-H.

A incorporação de quitosana nas monocamadas de DPPC e DPPG afeta o espectro de PM-IRRAS, como mostra a Figura 51. Alterações na região das bandas de C-H, compreendidas entre 2800-3000 cm^{-1} , são particularmente úteis no entendimento da interação uma vez que a frequência e a largura dessas bandas são sensíveis à conformação das cadeias dos fosfolipídios [136]. Com a incorporação, observam-se alterações tanto na frequência quanto na largura das bandas, sugerindo incorporação nas caudas hidrofóbicas de ambos os fosfolipídios, assim como mudanças na orientação das mesmas, de acordo com trabalhos anteriores [9, 12]. O deslocamento das bandas para energias mais altas está associado à desordem das cadeias de fosfolipídios, já o deslocamento das bandas para menores energias está associado à ordenação. A diminuição na intensidade das bandas sugere também a incorporação da quitosana nas monocamadas que, penetrando nas cadeias, diminui a densidade dos fosfolipídios e, conseqüentemente, a intensidade da banda. A comparação dos espectros com as diferentes quitosanas, QAMM - quitosana com alta massa molecular - e QBMM - quitosana com baixa massa molecular - indica que os efeitos são similares nas monocamadas de DPPC, sendo maiores aqueles causados por QBMM nas monocamadas de DPPG.

Figura 51 - Espectros de PM-IRRAS de monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) formadas sobre subfase tampão TS contendo $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de QAMM e QBMM, em 20 mN m^{-1} , na região de vibração do C-H.

Os espectros da Figura 52 apresentam bandas em 1240 cm^{-1} referentes às vibrações assimétricas do grupo P=O . Na literatura foram descritas bandas em menores energias para a vibração P=O de monocamadas de DPPG (1223 cm^{-1}) [136]; entretanto, nesse caso a monocamada foi formada em subfase água. O deslocamento das bandas de P=O para maiores números de onda pode ser associada à desidratação do grupo que, no caso do DPPG é favorecida pelo grupo glicerol em sua cadeia lateral. Como a subfase nesses experimentos é tampão TS, esse pode ser responsável pelo efeito de deslocamento para maior número de onda e desidratação do grupo em questão.

Os efeitos da quitosana sobre as monocamadas parecem, mais uma vez, ser maiores sobre o fosfolipídio DPPG, sendo que QAMM causa deslocamento da banda para menores números de onda (de 1248 para 1230 cm^{-1}), sugerindo hidratação do grupamento P=O , enquanto QBMM causa a inversão da orientação do grupo. As bandas do espectro orientadas para cima indicam dipolos moleculares orientados paralelos à interface, enquanto bandas negativas indicam dipolos perpendiculares à interface, sendo assim, as bandas positivas para os estiramentos de CH_2 e deformações do grupo fosfato indicam que o grupo P=O está preferencialmente orientado paralelo à superfície do filme e, portanto, perpendicular às cadeias ordenadas acila. Por outro lado, a banda negativa para monocamada de DPPG sobre QBMM indica que o grupo sofreu alteração em sua orientação, provavelmente causada pelo polímero e assim, se encontra orientada preferencialmente perpendicular à superfície da água e paralela às cadeias. A mudança na hidratação/desidratação do grupo P=O ou a alteração de sua orientação na interface causadas pela quitosana em monocamadas de DPPG pode ser

efeito da interação eletrostática entre esse grupo e os grupos amino da quitosana positivamente carregados, em pH 3,0.

Figura 52 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) formadas sobre subfase tampão TS contendo $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ de QABMM e QBMM, em 20 mN m^{-1} , na região de vibração do P=O.

A Figura 53 mostra o espectro na região de deformação angular N-H (amida II) da quitosana com banda centrada em $1550 - 1560 \text{ cm}^{-1}$. A presença dessa banda no espectro PM-IRRAS confirma a adsorção da quitosana na interface, tanto de alta como de baixa massa molecular. Podemos destacar, na comparação dos espectros, a alta intensidade da banda de QBMM, sugerindo maior densidade de grupamentos N-H na interface. As bandas positivas de estiramento de CH_2 e deformação angular de amida II indicam que os grupos N-H da quitosana (QAMM e QBMM) estão preferencialmente orientados paralelos à superfície do filme, portanto, perpendiculares às cadeias ordenadas.

Figura 53 - Espectros de PM-IRRAS para monocamadas de DPPC (a) e DPPG (b) formadas sobre subfase tampão TS contendo 0,2 mg mL⁻¹ de QABMM e QBMM, em 20 mN m⁻¹, na região de vibração angular N-H (amida II).

5.2.2 Espectroscopia de geração de soma de frequências (SFG)

Como os experimentos de PM-IRRAS indicaram efeitos maiores das quitosanas (alto e baixo grau de polimerização) em monocamadas do DPPG do que DPPC, e, que os maiores efeitos de quitosana com baixa molecular foram vistos em monocamadas de DMPA [11] (negativamente carregado, assim como DPPG) os estudos de SFG foram realizados utilizando apenas o DPPG. A Figura 54 mostra espectros do DPPG puro e sobre subfase contendo QAMM e QBMM na região de vibração C-H, sendo as principais bandas do espectro assim atribuídas: em 2858 cm⁻¹ devido ao estiramento simétrico de CH₂, em 2879 cm⁻¹ devido ao estiramento simétrico CH₃, em 2941 cm⁻¹ devido à ressonância de Fermi CH₃ e em 2953 cm⁻¹ devido ao estiramento simétrico CH₃. A ressonância de Fermi é relativa ao acoplamento das vibrações de estiramento e deformação angular do grupo terminal CH₃ [137]. Na espectroscopia SFG a intensidade das bandas do grupo terminal CH₃ indica o grau de ordem das cadeias acilas/alquilas do surfactante, sendo que a banda de estiramento simétrico de CH₂ aparece se houver defeitos *gauche*. A banda é praticamente ausente em monocamadas

altamente compactadas (caudas hidrofóbicas ordenadas) e sua intensidade é uma medida direta da desordem conformacional das cadeias hidrofóbicas dos lipídios [138].

A banda de estiramento simétrico de CH_2 (2858 cm^{-1}) não aparece no espectro da monocamada de DPPG e a banda associada aos estiramentos CH_3 é mais intensa que a da monocamada sobre a subfase contendo quitosana. As duas observações sugerem maior ordenamento das caudas hidrofóbicas do filme de DPPG puro. O aumento de intensidade da banda de estiramento simétrico de CH_2 , em 2858 cm^{-1} , no espectro da monocamada sobre subfase contendo quitosana sugere que tanto QAMM quanto QBMM aumentam a desordem nas caudas hidrofóbicas de DPPG. Um indicador útil do grau de ordem/desordem conformacional das caudas alquílicas é a razão entre a intensidade da banda de estiramento simétrico de CH_2 (em 2858 cm^{-1}) e CH_3 (2879 cm^{-1}) [139]. A relação de intensidade $\nu\text{CH}_3/\nu\text{CH}_2$ no espectro de DPPG é 12,6, sendo de 8,8 e 7,0 para DPPG/QAMM e DPPG/QBMM, respectivamente. Os elevados valores da razão para DPPG indicam que o filme está altamente empacotado e o número de defeitos *gauche* nas cadeias alifáticas é mínimo. Por outro lado, a diminuição da razão na presença de quitosana é evidência de que DPPG e quitosana interagem, o que provoca desordem no empacotamento das caudas alifáticas, evidenciado pelo aumento da intensidade da banda νCH_2 em consequência do aumento de defeitos *gauche* nas cadeias do fosfolipídio.

O aumento de defeitos *gauche* indica que as moléculas de DPPG estão mais afastadas umas das outras, como resultado da interação com quitosana, o que corrobora a expansão das isotermas de pressão de superfície das monocamadas [6, 10]. A diminuição da razão de intensidades é maior para a monocamada de DPPG contendo QBMM na subfase, indicando maior efeito da quitosana com baixa massa molecular sobre as monocamadas de fosfolipídio, o que também corrobora resultados de maior expansão das isotermas de pressão de superfície provocada por QBMM do que para QAMM [11]. O maior espaçamento das moléculas de DPPG causada por QBMM sugere maior acessibilidade sobre os fosfolipídios ou mesmo que suas cadeias, por serem menores, adotem conformação mais estendida entre as moléculas de DPPG.

Figura 54 - Espectros de SFG na região de vibração de C-H para filmes de Langmuir de DPPG puro e sobre subfase contendo QAMM e QBMM na concentração de 0,2 mg mL⁻¹, em 20 mN m⁻¹.

5.2.3 Espalhamento de luz dinâmico (DLS) e estático (SLS)

Associando-se informações obtidas pelas técnicas de espalhamento DLS e SLS é possível determinar a conformação das cadeias de polímeros em solução. Com experimentos de DLS obtém-se o raio hidrodinâmico médio ($\overline{R_h}$), enquanto os experimentos SLS permitem determinar o raio de giro (R_g) da molécula. A razão R_g/R_h fornece o parâmetro ρ cujo valor é sensível à conformação do polímero em solução, segundo a Tabela 5.

Tabela 5 - Razão entre R_g/R_h e a relação com a conformação das cadeias [135].

Conformação/estrutura	R_g/R_h
Esfera homogênea	0,778
Novelo linear, monodisperso	
condições θ	1,50
bom solvente	1,78
Novelo linear, polidisperso	
condições θ	1,73
bom solvente	2,05
Haste rígida	
monodispersa	> 2,0
polidispersa	> 2,0

O raio hidrodinâmico (R_h) de uma partícula é definido, de maneira hipotética, como o raio de uma esfera rígida que difunde com a mesma velocidade da partícula examinada. Conhecido também como raio de Stokes, o raio hidrodinâmico é o raio efetivo em solução levando-se em conta as moléculas de água na esfera de hidratação. Já o raio de giro (R_g) é definido como o raio de uma esfera oca de mesma massa e momento de inércia que a partícula analisada. A Figura 55 ilustra a diferença entre os dois tipos de raios obtidos com a técnica de espalhamento de luz.

Figura 55 - Comparação entre o raio hidrodinâmico (R_h) e o raio de giro (R_g) para duas cadeias poliméricas representando conformação novelo (esquerda) e cadeia estendida (direita).

Fonte: Mertins, O. Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana. 2008. 206p. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008 [140].

Foram obtidos os raios hidrodinâmicos das amostras QAMM, QBMM e PAH em concentrações de 0,025 a 0,300 mg mL⁻¹. A Tabela 6 mostra os raios hidrodinâmicos médios (R_{h1} , R_{h2} e R_{h3}) em cada concentração e a porcentagem média correspondente (V_1 , V_2 e V_3) de 10 repetições, além do raio hidrodinâmico médio total ($\bar{R}_h$) para cada concentração.

Tabela 6 - Raio hidrodinâmico (R_h) das amostras QAMM, QBMM e PAH em várias concentrações.

QAMM - Quitosana de alta massa molecular							$\bar{R}_h$ (nm)
Concentração (mg mL ⁻¹)	R_{h1} (nm)	V_1 (%)	R_{h2} (nm)	V_2 (%)	R_{h3} (nm)	V_3 (%)	
0,025	162	73	27	20	4	7	124
0,05	211	76	33	16	6	8	166
0,1	125	81	16	16	3	3	104
0,2	210	77	28	18	7	5	167
0,3	205	80	29	14	5	4	168
QBMM - Quitosana de baixa massa molecular							$\bar{R}_h$ (nm)
Concentração (mg mL ⁻¹)	R_{h1} (nm)	V_1 (%)	R_{h2} (nm)	V_2 (%)	R_{h3} (nm)	V_3 (%)	
0,025	96	80	66	17	3	3	88
0,05	152	78	51	18	1	4	128
0,1	124	90	8	8	3	2	113
0,2	93	91	6	7	2	2	85
0,3	97	91	28	7	3	2	90
PAH -cloridrato de polialilamina							$\bar{R}_h$ (nm)
Concentração (mg mL ⁻¹)	R_{h1} (nm)	V_1 (%)	R_{h2} (nm)	V_2 (%)	R_{h3} (nm)	V_3 (%)	
0,025	-	-	-	-	-	-	-
0,05	-	-	-	-	-	-	-
0,1	9	82	66	18	0	0	19
0,2	8	91	68	9	0	0	13
0,3	8	94	129	5	8	1	14

Dos resultados de $\bar{R}_h$ para QAMM, parece haver tendência de aumento no raio com a concentração em solução, o que é esperado [135]. Já para QBMM e PAH não há um comportamento definido. Os grandes raios para QAMM sugerem formação de agregados em solução, sendo que o raio hidrodinâmico é maior do que para QBMM em praticamente todas as concentrações. Isso deve ser devido ao maior enovelamento de cadeias ou agregação para QAMM. Os baixos valores de raio de PAH sugerem formação de estruturas menores; ressalta-se que a massa molecular do PAH é menor do que a das quitosanas utilizadas ($M_w = 15,000$ g mol⁻¹) e que suas cadeias possuem elevada densidade de carga positiva, o que determina a adoção de conformação estendida [135].

Não foi possível determinar o raio de giro e nem a conformação em solução (através do parâmetro ρ), devido à limitação da aparelhagem. Para determinar o raio de giro é necessária a construção do diagrama de Zimm (Figura 49) com experimentos de espalhamento de luz estático para várias concentrações e detecção em vários ângulos, o que o equipamento não permite. Entretanto, o espalhamento de luz estático foi utilizado para estudar as mesmas amostras e nas mesmas concentrações empregando dois comprimentos de onda da luz incidente e os resultados são mostrados na Tabela 7. Os valores indicam a intensidade da luz espalhada. Para todas as amostras a intensidade de luz espalhada aumenta com a concentração em solução. O espalhamento é maior em soluções de QAMM do que de QBMM sugerindo, mais uma vez, a formação de estruturas maiores em solução no caso da amostra de alta massa molecular.

Tabela 7 - Espalhamento de luz estático (SLS) das amostras QAMM, QBMM e PAH em várias concentrações.

QAMM - Quitosana de alta massa molecular		
Concentração (mg mL ⁻¹)	436 nm	546 nm
0,025	100	60
0,05	100	72
0,1	160	90
0,2	196	85
0,3	320	140
QBMM - Quitosana de baixa massa molecular		
Concentração (mg mL ⁻¹)	436 nm	546 nm
0,025	37	40
0,05	30	35
0,1	134	88
0,2	170	105
0,3	244	115
PAH - hidrocloreto de polialilamina		
Concentração (mg mL ⁻¹)	436 nm	546 nm
0,025	-	25
0,05	40	-
0,1	80	60
0,2	-	70
0,3	250	60

5.3 Conclusões

Os espectros de PM-IRRAS mostraram que tanto a região de vibração do C-H (região hidrofóbica) quanto a região de vibração do grupo fosfato - P=O - (região polar) dos fosfolipídios são afetadas pela quitosana, tanto de alta massa molecular (QAMM) quanto de baixa massa molecular (QBMM), na pressão de 20 mN m⁻¹. O efeito é mais acentuado para QBMM em monocamadas de DPPG em ambas as regiões, sendo que as intensidades das bandas de vibração de CH₂ e CH₃ são drasticamente diminuídas e deslocadas para maiores números de onda, indicando a penetração de QBMM na região hidrofóbica do DPPG. QBMM causa inversão na orientação do grupo P=O do DPPG, que torna-se orientado preferencialmente perpendicular à interface e paralelo às cadeias. Além disso, a banda em 1560 cm⁻¹, região da amida II (deformação N-H), é mais intensa para QBMM do que para QAMM, sugerindo maior densidade desses grupamentos na interface quando QBMM é utilizado na subfase, consequência da maior adsorção do mesmo.

Por meio da espectroscopia SFG foi possível obter informação sobre a compactação dos filmes. Os espectros mostraram alto grau de compactação da monocamada de DPPG pura, com ínfima intensidade da banda simétrica de CH₂ e alto valor para a razão de intensidade $\nu\text{CH}_3/\nu\text{CH}_2$, sugerindo grande ordenamento nas caudas e, conseqüentemente, poucos defeitos *gauche*. A diminuição na razão de intensidade provocada por QAMM (8,8) e QBMM (7,0) em comparação com a monocamada de DPPG puro (12,6) indica que a quitosana provoca desordem no empacotamento das caudas alifáticas, maior espaçamento entre as moléculas de DPPG e aumento no número de defeitos *gauche*. Em especial, o menor valor para DPPG/QBMM sugere maior espaçamento causado pela quitosana de baixa massa molecular, o que é atribuído à maior acessibilidade do polímero à interface e/ou ao fato de suas cadeias adotarem conformação mais estendida.

Os resultados dos experimentos de espalhamento de luz, embora inconclusivos quanto à conformação das cadeias de QAMM, QBMM e PAH em solução, indicaram que o raio hidrodinâmico da amostra QAMM é maior que o de QBMM, que é muito maior que o do PAH. O resultado sugere a formação de maiores estruturas, podendo ser ligados ao enovelamento das cadeias poliméricas maiores de QAMM ou a presença de agregados. As análises SLS indicaram aumento na intensidade de luz espalhada relacionada com o aumento da concentração do polímero da subfase.

Todos os resultados neste capítulo dão embasamento a hipóteses levantadas anteriormente ou corroboram resultados prévios [11]. A maior intensidade da banda de amida

II para o derivado QBMM nas medidas de PM-IRRAS indica maior densidade do polímero na interface em comparação com QAMM, explicado pela maior acessibilidade das cadeias menores de quitosana à interface. Além disso, é nítido o maior efeito de QBMM em comparação com QAMM nos espectros de vibração de C-H e P=O, além dos espectros de SFG. O maior espaçamento entre as moléculas de DPPG sugere, mais uma vez, maior quantidade de QBMM do que de QAMM na interface e ainda pode ser associado à conformação mais estendida dessas cadeias se arranjando na interface, interagindo com as cabeças polares de DPPG e causando maior distanciamento. O maior enovelamento das cadeias também foi argumento utilizado para explicar a menor atividade de QAMM em comparação com QBMM, sendo que o alto valor de raio hidrodinâmico médio de QAMM indica a formação de estruturas maiores em solução do que para QBMM.

Conclusões Finais e Perspectivas

Este trabalho foi desenvolvido no intuito de suprir lacunas no estudo da ação de quitosana no nível molecular sobre modelos de membrana celular, mimetizadas por filmes de Langmuir e Langmuir-Blodgett de fosfolipídios. O conhecimento do mecanismo de ação da quitosana pode explicar muito de suas aplicações biológicas em que há interação com membranas celulares. Dentre as lacunas existentes, o presente trabalho buscou contribuições principalmente: i) na avaliação da influência dos grupos hidroxila de quitosana na interação com os modelos de membrana; ii) influência dos grupamentos amina de quitosana na interação com os modelos de membrana e iii) avaliação da conformação do polímero em solução e a orientação dos seus grupos funcionais quando adsorvem nas monocamadas lipídicas. Para isso, a produção de derivados de quitosana foi necessária.

Assim, foram produzidos e caracterizados quatro derivados de quitosana com inserção de substituintes especialmente nos grupos hidroxila, através de reação de acilação com cloreto de ácido. Os derivados diferenciam-se no tamanho das cadeias dos substituintes inseridos e, consequentemente, na solubilidade, sendo que os que tiveram inserção de cadeias curtas, DEQUI (2C) e DPPQUI (3C), são solúveis em solução aquosa ácida e os que tiveram cadeias longas inseridas, DMQUI (14C) e DPQUI (16C), são solúveis em clorofórmio. Os derivados foram caracterizados estruturalmente por FTIR e RMN ^1H , sendo que a partir deste último foi possível determinar os graus de *O*- e *N*-substituição. As massas moleculares e a polidispersividade foram obtidas com análise de GPC.

Os derivados DEQUI e DPPQUI foram utilizados para estudo da influência dos grupos hidroxila de quitosana na interação com monocamadas de fosfolipídios DPPC, DPPG e DMPA. Observou-se que os derivados afetam fortemente as monocamadas de fosfolipídios, expandindo as isotermas de pressão de superfície (efeito que aumenta com a concentração na subfase), afetando também o potencial de superfície. DPPQUI causa maior expansão nas monocamadas do que DEQUI e ambos causam maior efeito do que a quitosana. Dessa observação, concluiu-se que as ligações hidrogênio envolvendo grupamentos hidroxila da quitosana não são essenciais para a ação de quitosana em modelos de membrana, pois os derivados com grupamentos hidroxila substituídos (portanto indisponíveis para ligações hidrogênio com os fosfolipídios) têm maior efeito sobre as monocamadas. Os espectros PM-IRRAS demonstraram que DEQUI e DPPQUI interagem tanto com as cabeças polares quanto com as caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios, interações que são favorecidas nos derivados devido às suas características estruturais (mais hidrofóbicos). No que diz respeito às

implicações biológicas, os resultados indicam que os derivados DEQUI e DPPQUI sejam mais eficientes do que a quitosana em aplicações onde atuam em membranas celulares, especialmente pela maior diminuição da elasticidade no plano e consequente aumento na flexibilidade das monocamadas promovida pelos derivados em comparação com a quitosana.

Os derivados DMQUI e DPQUI foram utilizados para inferir sobre a influência dos grupamentos amina nas interações eletrostáticas com os grupos fosfato dos fosfolipídios. Foram formados filmes de Langmuir puros de ambos os derivados com boa reprodutibilidade, obtendo-se monocamada altamente compactada. O potencial de superfície inicial (fase líquido-expandida) para os derivados é não nulo, indicando agregação das moléculas. Observou-se por meio da formação de monocamadas mistas que os compostos são miscíveis devido à diferença das pressões de colapso dos componentes puros e das misturas e pelo desvio da idealidade das curvas de área extrapolada *versus* fração do derivado. A interação entre os derivados e o DPPC tem comportamento atrativo devido a forças hidrofóbicas entre as caudas alquílicas de DPPC e os *O*-substituintes presentes em DMQUI e DPQUI. Já os resultados para monocamadas de DPPG e DMPA foram inconclusivos, pois os efeitos de atração ou repulsão entre os materiais podem ser associados tanto a interações eletrostáticas quanto hidrofóbicas. Os derivados DMQUI e DPQUI possibilitaram formação filmes LB puros e mistos com DMPA, que foram caracterizados estruturalmente por PM-IRRAS e morfologicamente por AFM e MEV. Os filmes mistos mostraram-se mais homogêneos do que o observado com quitosana pura. Os altos valores de rugosidade dos filmes indicam formação de agregados de moléculas devido, provavelmente, ao comportamento de atração entre os materiais (proporção de 1:1 DMQUI ou DPQUI/DMPA) e são consistentes com os valores não nulos de potencial de superfície.

Quitosanas com alta (QAMM) e baixa (QBMM) massa molecular foram utilizadas para o estudo da orientação dos grupos funcionais quando adsorvidas na interface e da conformação de suas cadeias em solução. Os espectros PM-IRRAS mostraram que tanto a região hidrofóbica quanto a região polar dos fosfolipídios são afetadas pela presença de QAMM e QBMM. Os maiores efeitos foram causados por QBMM em monocamadas de DPPG, provocando diminuição na intensidade das bandas de vibração CH₂ e CH₃ e deslocamento para maiores números de onda, indicando penetração nas caudas hidrofóbicas. QBMM causa inversão na orientação do grupo P=O do DPPG, que torna-se orientado preferencialmente perpendicular à interface e paralelo às cadeias acila. A banda de deformação de amida II é mais intensa para QBMM do que para QAMM, sugerindo maior densidade desses grupamentos na interface. Os espectros de SFG mostraram diminuição da

relação de intensidade das bandas $\nu\text{CH}_3/\nu\text{CH}_2$ de 12,6 no caso de DPPG puro para 8,8 e 7,0, provocadas por QAMM e QBMM, respectivamente, sugerindo interação com DPPG causando desordem no empacotamento das caudas alifáticas, maior espaçamento entre as moléculas e aumento no número de defeitos *gauche*. O menor valor correspondente ao efeito de QBMM sobre a monocamada sugere maior espaçamento entre as moléculas, devido à maior acessibilidade do polímero à interface e/ou cadeias mais estendidas. As cadeias menores (QBMM) tem, provavelmente, maior mobilidade em solução, acarretando maior acessibilidade e densidade dessas na interface. Os resultados dos experimentos de *DLS* e *SLS* não revelam a conformação exata das cadeias de QAMM, QBMM e PAH em solução; entretanto, os maiores valores de raio hidrodinâmico e intensidade de luz espalhada para QAMM do que QBMM sugere formação de estruturas maiores, podendo ser ligados ao maior enovelamento das cadeias poliméricas ou à presença de agregados. O mesmo comportamento é visto na comparação dos valores para QBMM em relação ao PAH.

Como complementação do trabalho propõe-se a realização de experimentos *SLS* em equipamento que permita detectar o espalhamento de luz em ângulo variável, das soluções de QAMM, QBMM e PAH. Com esses dados pode-se traçar o diagrama de Zimm e determinar o raio de giro (R_g) das moléculas em questão. Associando R_g/R_h , podemos definir a conformação das cadeias de quitosana e confrontar com os efeitos causados pelas amostras sobre os modelos de membrana. Ainda com foco na análise orientacional da quitosana quando interage com as monocamadas, medidas de elasticidade superficial podem auxiliar na análise da disposição das cadeias de quitosana, paralela ou perpendicularmente à monocamada lipídica. Os dados podem ser confrontados com os obtidos pelo PM-IRRAS. Os trabalhos realizados até aqui visando ao detalhamento da interação de quitosana com modelos de membrana celular fornecem boa visão sobre o modo de ação da quitosana. Porém, a comparação dos efeitos sobre os sistemas simplificados e em membranas reais é certamente meta para trabalhos futuros.

A rota sintética dos derivados produzidos neste trabalho foi realizada seguindo procedimento da literatura. A substituição para derivados com cadeias longas, embora suficiente para solubilização dos derivados em clorofórmio, não foi elevada. Assim, o estudo e variação dos parâmetros empregados na síntese, como a razão de reagente acilante:quitosana, tempo de reação, entre outros, será feita visando à obtenção de quitosana com maior grau de substituição. Este trabalho já está sendo desenvolvido em nível de doutorado por outro colega no laboratório de Físico-química orgânica, do IQSC-USP e o

interesse é na utilização desse derivado para produção de estruturas micelares, posteriormente utilizadas para carreamento de fármacos.

Referências Bibliográficas

- [1] ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: McMillan, 1992. 350 p.
- [2] GOOSEN, M. F. A. **Applications of chitin and chitosan**. Lancaster PA: Technomic Publishing Company, 1997. 336 p.
- [3] AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, Á.; ROMÁN, J. S.; ARGÜLLES, W.; GOYCOOLEA, F.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina y quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú/ Fondo Editorial, 2004. 312 p.
- [4] PAVINATTO, F. J.; SANTOS JUNIOR., D. S.; OLIVEIRA JUNIOR., O. N. Interaction between cholesterol and chitosan in Langmuir monolayers. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 91-94, 2005.
- [5] PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; PAVINATTO, A.; SANTOS JUNIOR, D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; SILVA, H. S.; MIRANDA, P. B.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Probing chitosan and phospholipid interactions using Langmuir and Langmuir-Blodgett films as cell membrane models. **Langmuir**, v. 23, n. 14, p. 7666-7671, 2007.
- [6] PAVINATTO, F. J.; PAVINATTO, A.; CASELI, L.; SANTOS JUNIOR, D. S.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Interaction of chitosan with cell membrane models at the air-water interface. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 5, p. 1633-1640, 2007.
- [7] CASELI, L.; PAVINATTO, F. J.; NOBRE, T. M.; ZANIQUELLI, M. E. D.; VIITALA, T.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Chitosan as a removing agent of beta-lactoglobulin from membrane models. **Langmuir**, v. 24, n. 8, p. 4150-4156, 2008.
- [8] SILVA, C. A.; NOBRE, T. M.; PAVINATTO, F. J.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Interaction of chitosan and mucin in a biomembrane model environment. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, n. 1, p. 289-295, 2012.
- [9] PAVINATTO, A.; SOUZA, A. L.; DELEZUK, J. A. M.; PAVINATTO, F. J.; CAMPANA-FILHO, S. P.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Interaction of *O*-acylated chitosans with biomembrane models: Probing the effects from hydrophobic interactions and hydrogen bonding. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 114, p. 53-59, 2014.

-
- [10] PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; BARROS-TIMMONS, A.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Electrostatic interactions are not sufficient to account for chitosan bioactivity. **Acs Applied Materials & Interfaces**, v. 2, n. 1, p. 246-251, 2010.
- [11] PAVINATTO, A.; PAVINATTO, F. J.; DELEZUK, J. A.; NOBRE, T. M.; SOUZA, A. L.; CAMPANA-FILHO, S. P.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 104, p. 48-53, 2013.
- [12] PAVINATTO, F. J.; PACHOLATTI, C. P.; MONTANHA, E. A.; CASELI, L.; SILVA, H. S.; MIRANDA, P. B.; VIITALA, T.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Cholesterol mediates chitosan activity on phospholipid monolayers and Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 25, n. 17, p. 10051-10061, 2009.
- [13] SYNOWIECKI, J.; AL-KHATEEB, N. A. A. Q. Mycelia of *Mucor rouxii* as a source of chitin and chitosan. **Food Chemistry**, v. 60, n. 4, p. 605-610, 1997.
- [14] STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M.; STAMFORD, N. P.; NETO, B. D.; CAMPOS-TAKAKI, G. M. Growth of *Cunninghamella elegans* UCP 542 and production of chitin and chitosan using yam bean medium. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 61-68, 2007.
- [15] DELEZUK, J. A. M.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A.; CAMPANA-FILHO, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. **Polymer International**, v. 60, n. 6., p. 903-909, 2011.
- [16] GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERA-CIAPARA, I.; HERNÁNDEZ, G.; LIZARDI, J.; GARCIA, K. D. Preparation of chitosan from quid (*Loligo* spp.) pen by microwave-accelerated thermochemical process. In: DOMARD, A.; ROBERTS, G. A. F.; VÅRUM, K. M. (Ed.). **Advances in chitin science**. Lyon: Jacques Andre Publisher, 1998. v. 2, p. 78-83.
- [17] CAMPANA-FILHO, S.P.; SEGNINI, R. Effects of additives and inert gas bubbling on the deacetylation of chitosan. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 2, p. 701-709, 2002.
- [18] ROBERTS, G. A.; WOOD, F. A. Inter-source reproducibility of the chitin deacetylation process. In: PETER, M. G. DOMARD, A.; MUZZARELLI, R. A. A. (Ed.). **Advances in chitin science**. Potsdam: Universitat Potsdam, 2000. v. 4, p. 34-39.
- [19] LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of alpha- and beta-chitins by means of freeze-pump out-thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1380-1388, 2005.

-
- [20] CAMPANA FILHO, S. P.; CAVALHEIRO, É. T. G.; SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL E. R. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- [21] CHO, Y. W.; JANG, J.; PARK, C. R.; KO, S. W. Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 609-614, 2000.
- [22] KUMAR, M. N. V. R. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**, v. 46, n. 1, p. 1-27, 2000.
- [23] RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.
- [24] SHIEKH, R. A.; MALIK, M. A.; AL-THABAITI, S. A.; SHIEKH, M. A. Chitosan as a novel edible coating for fresh fruits. **Food Science and Technology Research**, v. 19, n. 2, p. 139-155, 2013.
- [25] MELAJ, M. A.; DARAIIO, M. E. Preparation and characterization of potassium nitrate controlled-release fertilizers based on chitosan and xanthan layered tablets. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 4, p. 2422-2428, 2013.
- [26] TEIXEIRA, M. A.; PATERSON, W. J.; DUNN, E. J.; LI, Q. L.; HUNTER, B. K.; GOOSEN, M. F. A. Assessment of chitosan gels for the controlled release of agrochemicals. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 29, n. 7, p. 1205-1209, 1990.
- [27] ZHANG, Y. N.; LIU, Y.; CHU, Z. Y.; SHI, L.; JIN, W. Q. Amperometric glucose biosensor based on direct assembly of Prussian blue film with ionic liquid-chitosan matrix assisted enzyme immobilization. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 176, p. 978-984, 2013.
- [28] LIN, J. H.; QU, W.; ZHANG, S. S. Disposable biosensor based on enzyme immobilized on Au-chitosan-modified indium tin oxide electrode with flow injection amperometric analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 360, n. 2, p. 288-293, 2007.
- [29] LIU, H.; CHEN, B.; MAO, Z. W.; GAO, C. Y. Chitosan nanoparticles for loading of toothpaste actives and adhesion on tooth analogs. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 106, n. 6, p. 4248-4256, 2007.
- [30] TAVARIA, F. K.; SOARES, J. C.; REIS, I. L.; PAULO, M. H.; MALCATA, F. X., PINTADO, M. E. Chitosan: antimicrobial action upon staphylococci after impregnation onto cotton fabric. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 5, p. 1034-1041, 2012.

-
- [31] CUI, F. Y.; LI, G. D.; HUANG, J. J.; ZHANG, J. E.; LU, M.; LU, W. Y.; HUANG, Q. S. Extension of nasal anti-Staphylococcus aureus efficacy of lysostaphin by its incorporation into a chitosan-o/w cream. **Drug Delivery**, v. 17, n. 8, p. 617-623, 2010.
- [32] DEVI, M. G.; AL-HASHMI, Z. S. S.; SEKHAR, G. C. Treatment of vegetable oil mill effluent using crab shell chitosan as adsorbent. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 9, n. 4, p. 713-718, 2012.
- [33] KARIM, Z.; ADNAN, R.; HUSAIN, Q. A beta-cyclodextrin-chitosan complex as the immobilization matrix for horseradish peroxidase and its application for the removal of azo dyes from textile effluent. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 72, p. 10-17, 2012.
- [34] LIU, B. J.; WANG, D. F.; YU, G. L.; MENG, X. H. Adsorption of heavy metal ions, dyes and proteins by chitosan composites and derivatives - A review. **Journal of Ocean University of China**, v. 12, n. 3, p. 500-508, 2013.
- [35] PILLAI, C. K. S.; PAUL, W.; SHARMA, C. P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, n. 7, p. 641-678, 2009.
- [36] MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, n. 6, p. 1013-1051, 2008.
- [37] ZHENG, L. Y.; ZHU, J. A. F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydrate Polymers**, v. 54, n. 4, p. 527-530, 2003.
- [38] YAMADA, K.; ODOMI, M.; OKADA, N.; FUJITA, T.; YAMAMOTO, A. Chitosan oligomers as potential and safe absorption enhancers for improving the pulmonary absorption of interferon-alpha in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, n. 11, p. 2432-2440, 2005.
- [39] ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Preparation and characterization of carboxymethylchitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 79-83, 2005.
- [40] LI, M. C.; XIN, M. H.; MIYASHITA, T. Preparation of *N,N*-dilauryl chitosan Langmuir Blodgett film. **Polymer International**, v. 51, n. 10, p. 889-891, 2002.
- [41] LI, M. C.; YAO, K. D.; MIYASHITA, T. N. Alkyl chitosan: Interaction with water and LB film. **Designed Monomers and Polymers**, v. 5, n. 2, p. 277-283, 2002.

-
- [42] SASHIWA, H.; KAWASAKI, N.; NAKAYAMA, A.; MURAKI, E.; YAMAMOTO, N.; AIBA, S. Chemical modification of chitosan. 14: Synthesis of water-soluble chitosan derivatives by simple acetylation. **Biomacromolecules**, v. 3, n. 5, p. 1126-1128, 2002.
- [43] PEESAN, M.; SIRIVAT, A.; SUPAPHOL, P.; RUJIRAVANIT, R. Dilute solution properties of hexanoyl chitosan in chloroform, dichloromethane, and tetrahydrofuran. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 175-183, 2006.
- [44] TONG, Y. J.; WANG, S. F.; XU, J. W.; CHUA, B. S.; HE, C. B. Synthesis of *O,O'*-dipalmitoyl chitosan and its amphiphilic properties and capability of cholesterol absorption. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 2, p. 229-233, 2005.
- [45] BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Mechanical properties of *N,N,N* - trimethylchitosan chloride films. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 2, p. 142-145, 2005.
- [46] LODISH, H.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E. **Molecular cell biology**. New York: W. H. Freeman, 1999. 1296 p.
- [47] SINGER, S. J.; NICOLSON, G. L. Fluid mosaic model of structure of cell-membranes. **Science**, v. 175, n. 4023, p. 720-731, 1972.
- [48] JONES, M. N. **Micelles, monolayers, and biomembranes**. New York: Wiley-Liss, 1995. 252 p.
- [49] NICOLSON, G. L. The Fluid—Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40 years. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**. 2013. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273613003933> >. Acesso em: 18 fev 2014.
- [50] YEAGLE, P. **The membrane of cells**. San Diego: Academic Press, 1993. 349 p.
- [51] YEAGLE, P. L. **The structure of biological membranes**. Boca Raton: CRC, 2005. 540 p.
- [52] FINEGOLD, L. **Cholesterol in membrane models**. Boca Raton: CRC, 1993. 274 p.
- [53] HIANIK, T. Structure and physical properties of biomembranes and model membranes. **Acta Physica Slovaca**, v. 56, n. 6, p. 687-806, 2006.

-
- [54] MAGET-DANA, R. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1462, n. 1-2, p. 109-140, 1999.
- [55] BROCKMAN, H. Lipid monolayers: why use half a membrane to characterize protein-membrane interactions? **Current Opinion in Structural Biology**, v. 9, n. 4, p. 438-443, 1999.
- [56] BREZESINSKI, G.; MOHWALD, H. Langmuir monolayers to study interactions at model membrane surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 100-102, p. 563-584, 2003.
- [57] LEBLANC, R. M. Molecular recognition at Langmuir monolayers. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 10, n. 6, p. 529-536, 2006.
- [58] FENG, S. S. Interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. **Langmuir**, v. 15, n. 4, p. 998-1010, 1999.
- [59] FENG, S. S. Reply to comment on interpretation of mechanochemical properties of lipid bilayer vesicles from the equation of state or pressure-area measurement of the monolayer at the air-water or oil-water interface. **Langmuir**, v. 22, n. 6, p. 2920-2922, 2006.
- [60] ANCELIN, H.; ZHU, D. G.; PETTY, M. C.; YARWOOD, J. Infrared spectroscopic studies of molecular-structure, ordering, and interactions in enzyme-containing Langmuir-Blodgett-films. **Langmuir**, v. 6, n. 6, p. 1068-1070, 1990.
- [61] LANGMUIR, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. II. Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 39, n. 9, p. 1848-1906, 1917.
- [62] LANGMUIR, I. The shapes of group molecules forming the surfaces of liquids. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 3, p. 251-257, 1917.
- [63] ROBERTS, G. **Langmuir-Blodgett films**. New York: Plenum Press, 1990. 425 p.
- [64] PETTY, M. C. **Langmuir-Blodgett films: an introduction**. Cambridge: Cambridge University Press, 1996, 234 p.

-
- [65] DEMCHAK, R. J.; FORT, T. Surface dipole-moments of close-packed un-ionized monolayers at air-water-interface. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 46, n. 2, p. 191-202, 1974.
- [66] DAVIES, J. T. A surface equation of state for charged monolayers. **Journal of Colloid Science**, v. 11, n. 4-5, p. 377-390, 1956.
- [67] FERREIRA, M.; CAETANO, W.; ITRI, R.; TABAK, M.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. Characterization techniques to investigate molecular-level interactions in Langmuir and Langmuir-Blodgett. **Quimica Nova**, v. 28, n. 3, p. 502-510, 2005.
- [68] BLODGETT, K. B. Monomolecular films of fatty acids on glass. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, p. 495-495, 1934.
- [69] PETTY, M. C. Possible applications for langmuir-blodgett-films. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 417-426, 1992.
- [70] VOLDEN, S.; ESE, M. H. G.; ZHU, K. Z.; YASUDA, M.; NYSTROM, B.; GLOMM, W. R. Interactions between bovine serum albumin and Langmuir films composed of charged and uncharged poly(N-isopropylacrylamide) block copolymers. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 98, p. 50-57, 2012.
- [71] NUNES, C.; BREZESINSKI, G.; PEREIRA-LEITE, C.; LIMA, J. L. F. C.; REIS, S.; LUCIO, M. NSAIDs Interactions with membranes: A biophysical approach. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10847-10858, 2011.
- [72] COSTALONGA, B. L. P.; SILVA, R. C.; CASELI, L.; MOLINA, C. Interaction of chlorhexidine with biomembrane models on glass ionomer by using the Langmuir-Blodgett technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 57-61, 2012.
- [73] PANDA, A. K.; VASILEV, K.; ORGEIG, S.; PRESTIDGE, C. A. Thermodynamic and structural studies of mixed monolayers: Mutual mixing of DPPC and DPPG with DoTAP at the air-water interface. **Materials Science & Engineering C: Materials for Biological Applications**, v. 30, n. 4, p. 542-548, 2010.
- [74] DYNAROWICZ-LATKA, P.; KITA, K. Molecular interaction in mixed monolayers at the air/water interface. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 79, n. 1, p. 1-17, 1999.
- [75] GZYL, B.; PALUCH, M. Properties of insoluble mixed monolayers of lipids at the water/air interface. **Trends in Colloid and Interface Science XV**, v. 118, p. 22-26, 2001.

-
- [76] GONG, K.; FENG, S. S.; GO, M. L.; SOEW, P. H. Effects of pH on the stability and compressibility of DPPC/cholesterol monolayers at the air-water interface. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 207, n. 1-3, p. 113-125, 2002.
- [77] RAAFAT, D.; VON BARGEN, K.; HAAS, A.; SAHL, H. G. Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 12, p. 3764-3773, 2008.
- [78] LIU, H.; DU, Y. M.; WANG, X. H. and SUN, L. P. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 95, n. 2, p. 147-155, 2004.
- [79] HELANDER, I. M.; NURMIAHO-LASSILA, E. L.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 71, n. 2-3, p. 235-244, 2001.
- [80] LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n.7, p. 1324-1335, 2001.
- [81] PAWAR, H.; DOUROUMIS, D.; BOATENG, J. S. Preparation and optimization of PMAA-chitosan-PEG nanoparticles for oral drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 102-108, 2012.
- [82] AMMAR, H. O.; EL-NAHHAS, S. A.; GHORAB, M. M.; SALAMA, A. H. Chitosan/cyclodextrin nanoparticles as drug delivery system. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 127-136, 2012.
- [83] KATAS, H.; HUSSAIN, Z.; LING, T. C. Chitosan nanoparticles as a percutaneous drug delivery system for hydrocortisone. **Journal of Nanomaterials**, 2012, DOI: 10.1155/2012/372725.
- [84] MINTZER, M. A.; SIMANEK, E. E. Nonviral vectors for gene delivery. **Chemical Reviews**, v. 109, n. 2, p. 259-302, 2009.
- [85] KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017-6084, 2004.
- [86] MUN, S.; DECKER, E. A.; PARK, Y.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of interfacial composition on in vitro digestibility of emulsified lipids: Potential mechanism for chitosan's ability to inhibit fat digestion. **Food Biophysics**, v. 1, n. 1, p. 21-29, 2006.

-
- [87] PARK, G. Y.; MUN, S.; PARK, Y.; RHEE, S.; DECKER, E. A.; WEISS, J.; MCCLEMENTS, D. J.; PARK, Y. Influence of encapsulation of emulsified lipids with chitosan on their in vivo digestibility. **Food Chemistry**, v. 104, n. 2, p. 761-767, 2007.
- [88] COSTA SILVA, H. S. R.; DOS SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.
- [89] CROISIER, F.; JEROME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49, n. 4, p. 780-792, 2013.
- [90] PARK, H.; CHOI, B.; HU, J. L.; LEE, M. Injectable chitosan hyaluronic acid hydrogels for cartilage tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 9, n. 1, p. 4779-4786, 2013.
- [91] GROLIK, M.; SZCZUBIALKA, K.; WOWRA, B.; DOBROWOLSKI, D.; ORZECOWSKA-WYLEGALA, B.; WYLEGALA, E.; NOWAKOWSKA, M. Hydrogel membranes based on genipin-cross-linked chitosan blends for corneal epithelium tissue engineering. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 23, n. 8, p. 1991-2000, 2012.
- [92] MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 167-182, 2009.
- [93] BABAK, V.; LUKINA, I.; VIKHOREVA, G.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. Interfacial properties of dynamic association between chitin derivatives and surfactants. **Colloids and Surfaces a-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 147, n. 1-2, p. 139-148, 1999.
- [94] PARRA-BARRAZA, H.; BURBOA, M. G.; SANCHEZ-VAZQUEZ, M.; JUAREZ, J.; GOYCOOLEA, F. M.; VALDEZ, M. A. Chitosan-cholesterol and chitosan-stearic acid interactions at the air-water interface. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 5, p. 2416-2426, 2005.
- [95] WYDRO, P.; KRAJEWSKA, B.; HAC-WYDRO, K. Chitosan as a lipid binder: A Langmuir monolayer study of chitosan - Lipid interactions. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2611-2617, 2007.
- [96] KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; JANCZYK, A. Probing the modes of antibacterial activity of chitosan. Effects of pH and molecular weight on chitosan interactions with membrane lipids in Langmuir films. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 11, p. 4144-4152, 2011.
- [97] KRAJEWSKA, B.; KYZIOL, A.; WYDRO, P. Chitosan as a subphase disturbant of membrane lipid monolayers. The effect of temperature at varying pH: II. DPPC and

cholesterol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 434, p. 359-364, 2013.

[98] KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; KYZIOL, A. Chitosan as a subphase disturbant of membrane lipid monolayers. The effect of temperature at varying pH: I. DPPG. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**. v. 434, p. 349-358, 2013.

[99] MERTINS, O.; SCHNEIDER, P. H.; POHLMANN, A. R.; DA SILVEIRA, N. P. Interaction between phospholipids bilayer and chitosan in liposomes investigated by P-31 NMR spectroscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 75, n. 1, p. 294-299, 2010.

[100] FANG, N.; CHAN, V.; MAO, H. Q.; LEONG, K. W. Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH. **Biomacromolecules**, v. 2, n. 4, p. 1161-1168, 2001.

[101] QUEMENEUR, F.; RAMMAL, A.; RINAUDO, M.; PEPIN-DONAT, B. Large and giant vesicles "decorated" with chitosan: Effects of pH, salt or glucose stress, and surface adhesion. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2512-2519, 2007.

[102] WU, Y. S.; HISADA, K.; MAEDA, S.; SASAKI, T.; SAKURAI, K. Fabrication and structural characterization of the Langmuir-Blodgett films from a new chitosan derivative containing cinnamate chromophores. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 4, p. 766-772, 2007.

[103] LI, M. C.; SU, S.; XIN, M. H.; LIAO, Y. Z. Relationship between *N,N*-dialkyl chitosan monolayer and corresponding vesicle. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 311, n. 1, p. 285-288, 2007.

[104] LI, M. C.; XIN, M. H. *N,N*-dilauryl chitosan self-assembled vesicles for drug delivery. **Designed Monomers and Polymers**, v. 9, n.1, p. 89-97, 2006.

[105] BATTISTI, M. V.; CAMPANA, S. P. Preparation and characterization of alpha-chitin and chitosan from the shells of macrobrachium rosenbergii. **Quimica Nova**, v. 31, n.8, p. 2014-2019, 2008.

[106] HUGGINS, M. L. Revised theory of high polymer solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 86, n. 17, p. 3535-3540, 1964.

[107] RINAUDO, M.; MILAS, M.; LEDUNG, P. Characterization of chitosan - Influence of ionic-strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 15, n. 5, p. 281-285, 1993.

-
- [108] DAVIES, J. T.; RIDEAL, E. K. **Interfacial Phenomena**. New York: Academic Press, 1963. 265 p.
- [109] MENDELSON, R.; MAO, G. R.; FLACH, C. R. Infrared reflection-absorption spectroscopy: Principles and applications to lipid-protein interaction in Langmuir films. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1798, n. 4, p. 788-800, 2010.
- [110] BLAUDEZ, D.; TURLET, J. M.; DUFOURCQ, J.; BARD, D.; BUFFETEAU, T.; DESBAT, B. Investigations at the air/water interface using polarization modulation IR spectroscopy. **Journal of the Chemical Society-Faraday Transactions**, v. 92, n. 4, p. 525-530, 1996.
- [111] TOLSTOY, V. P.; CHERNYSHOVA, I. V.; SKRYSHEVSKY, V.A. **Handbook of infrared spectroscopy of ultrathin films**. New York: John Wiley, 2003. 732 p.
- [112] MALEC, A. D.; WU, D. G.; LOUIE, M.; SKOLIMOWSKI, J. J.; MAJDA, M. Gibbs monolayers at the air/water interface: Surface partitioning and lateral mobility of an electrochemically active surfactant. **Langmuir**, v. 20, n. 4, p. 1305-1310, 2004.
- [113] ROGALSKA, E.; BILEWICZ, R.; BRIGAUD, T.; EL MOUJAHID, C.; FOULARD, G.; PORTELLA, C.; STEBE, M. J. Formation and properties of Langmuir and Gibbs monolayers: a comparative study using hydrogenated and partially fluorinated amphiphilic derivatives of mannitol. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 105, n. 1, p. 71-91, 2000.
- [114] LOZANO, P.; FERNANDEZ, A. J.; RUIZ, J. J.; CAMACHO, L.; MARTIN, M. T.; MUNOZ, E. Molecular organization of LB multilayers of phospholipid and mixed phospholipid/viologen by FTIR spectroscopy. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 106, n. 25, p. 6507-6514, 2002.
- [115] PITTLER, J.; BU, W.; VAKNIN, D.; TRAVESSET, A.; MCGILLIVRAY, D. J.; LOESCHE, M. Charge inversion at minute electrolyte concentrations. **Physical Review Letters**, v. 97, n. 4, p. 046102-1-046102-4, 2006.
- [116] VOLLHARDT, D.; FAINERMAN, V.B.; SIEGEL, S. Thermodynamic and textural characterization of DPPG phospholipid monolayers. **Journal of Physical Chemistry B**, v.104, n. 17, p. 4115-4121, 2000.
- [117] MINONES, J.; DYNAROWICZ-LATKA, P.; MINONES, J.; PATINO, J. M. R.; IRIBARNEGARAY, E. Orientational changes in dipalmitoyl phosphatidyl glycerol Langmuir monolayers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 265, n. 2, p. 380-385, 2003.
- [118] MARSH, D. Lateral pressure in membranes. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**. v. 1286, n. 3, p. 183-223, 1996.

-
- [119] MORI, T.; OKAMOTO, K.; ENDO, H.; HILL, J. P.; SHINODA, S.; MATSUKURA, M.; TSUKUBE, H.; SUZUKI, Y.; KANEKIYO, Y.; ARIGA, K. Mechanical tuning of molecular recognition to discriminate the single-methyl-group difference between thymine and uracil. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 37, p. 12868-12870, 2010.
- [120] OLIVEIRA, O. N.; TAYLOR, D. M.; MORGAN, H. Modeling the surface-potential area dependence of a stearic-acid monolayer. **Thin Solid Films**, v. 210, n. 1-2, p. 76-78, 1992.
- [121] SAINTPIERRE, M.; DUPEYRAT, M. Measurement and meaning of the transfer process energy in the building up of Langmuir-Blodgett multilayers. **Thin Solid Films**, v. 99, n. 1-3, p. 205-213, 1983.
- [122] SELLSTROM, A.; GUSTAFSON, I.; OHLSSON, P. A.; OLOFSSON, G.; PUU, G. On the deposition of phospholipids onto planar supports with the Langmuir-Blodgett technique using factorial experimental-design 1. Screening of various factors and supports. **Colloids and Surfaces**, v. 64, n. 3-4, p. 275-287, 1992.
- [123] SELLSTROM, A.; GUSTAFSON, I.; OHLSSON, P. A.; OLOFSSON, G.; PUU, G. On the deposition of phospholipids onto planar supports with the Langmuir-Blodgett technique using factorial experimental-design 2. Optimizing lipid-composition for maximal adhesion to platinum substrates. **Colloids and Surfaces**, v. 64, n. 3-4, p. 289-298, 1992.
- [124] LEE, Y. L.; LIN, J. Y.; CHANG, C. H. Thermodynamic characteristics and Langmuir-Blodgett deposition behavior of mixed DPPA/DPPC monolayers at air/liquid interfaces. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 296, n. 2, p. 647-654, 2006.
- [125] GIRARD-EGROT, A. P.; MORELIS, R. M.; COULET, P. R. Direct influence of the interaction between the first layer and a hydrophilic substrate on the transition from Y- to Z-type transfer during deposition of phospholipid Langmuir-Blodgett films. **Langmuir**, v. 12, n. 3, p. 778-783, 1996.
- [126] CUI, D. F.; HOWARTH, V. A.; PETTY, M. C.; ANCELIN, H.; YARWOOD, J. The deposition and characterization of phosphatidic-acid Langmuir-Blodgett-films. **Thin Solid Films**, v. 192, n. 2, p. 391-396, 1990.
- [127] LAWRIE, G.; KEEN, I.; DREW, B.; CHANDLER-TEMPLE, A.; RINTOUL, L.; FREDERICKS, P.; GRONDAHL, L. Interactions between alginate and chitosan biopolymers characterized using FTIR and XPS. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 8, p. 2533-2541, 2007.
- [128] CZAPLA, K.; KORCHOWIEC, B.; ROGALSKA, E. Differentiating oxicam nonsteroidal anti-inflammatory drugs in phosphoglyceride monolayers. **Langmuir**, v. 26, n. 5, p. 3485-3492, 2010.

-
- [129] MORENO, M. M.; GARIDEL, P.; SUWALSKY, M.; HOWE, J.; BRANDENBURG, K. The membrane-activity of ibuprofen, diclofenac, and naproxen: A physico-chemical study with lecithin phospholipids. **Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes**, v. 1788, n. 6, p. 1296-1303, 2009.
- [130] MIRANDA, P. B.; PFLUMIO, V.; SAIJO, H.; SHEN, Y. R. Surfactant monolayers at solid-liquid interfaces: conformation and interaction. **Thin Solid Films**, v. 327, p. 161-165, 1998.
- [131] MIRANDA, P. B.; DU, Q.; SHEN, Y. R. Interaction of water with a fatty acid Langmuir film. **Chemical Physics Letters**, v. 286, n. 1-2, p. 1-8, 1998.
- [132] LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de polímeros - Determinação de peso molecular e análise térmica**. Rio de Janeiro: E-Papers, 2001. 336 p.
- [133] CANEVAROLO JÚNIOR, S.V. **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. 448 p.
- [134] BRYANT, G.; ABEYNAYAKE, C.; THOMAS, J. C. Improved particle size distribution measurements using multiangle dynamic light scattering 2. Refinements and applications. **Langmuir**, v. 12, n. 26, p. 6224-6228, 1996.
- [135] PA, J. H.; YU, T. L. Light scattering study of chitosan in acetic acid aqueous solutions. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 202, n. 7, p. 985-991, 2001.
- [136] DICKO, A.; BOURQUE, H.; PEZOLET, M. Study by infrared spectroscopy of the conformation of dipalmitoylphosphatidylglycerol monolayers at the air-water interface and transferred on solid substrates. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 96, n. 1-2, p. 125-139, 1998.
- [137] MIRANDA, P. B.; PFLUMIO, V.; SAIJO, H.; SHEN, Y. R. Conformation of surfactant monolayers at solid/liquid interfaces. **Chemical Physics Letters**, v. 264, n. 3-4, p. 387-392, 1997.
- [138] MIRANDA, P. B.; PFLUMIO, V.; SAIJO, H.; SHEN, Y. R. Chain-chain interaction between surfactant monolayers and alkanes or alcohols at solid/liquid interfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 46, p. 12092-12099, 1998.
- [139] WALKER, R. A.; GRUETZMACHER, J. A.; RICHMOND, G. L. Phosphatidylcholine monolayer structure at a liquid-liquid interface. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 28, p. 6991-7003, 1998.

[140] MERTINS, O. **Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana**. 2008. 206f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

Artigo publicado a partir dos resultados da tese

Pavinatto, Adriana; Souza, Adriano L.; Delezuk, Jorge A.M.; Pavinatto, Felipe J.; Campana-Filho, Sérgio P.; Oliveira Jr., Osvaldo N. *Interaction of O-acylated chitosans with biomembrane models: Probing the effects from hydrophobic interactions and hydrogen bonding.* **Colloids and Surfaces. B: Biointerfaces**, v. 114, p. 53-59, 2014.

Outras publicações

Pavinatto, Adriana; Pavinatto, Felipe J.; Delezuk, Jorge A.M; Nobre, Thatyane M.; Souza, Adriano L.; Campana-Filho, Sérgio P.; Oliveira Jr., Osvaldo N. *Low molecular-weight chitosans are stronger biomembrane model perturbants.* **Colloids and Surfaces: B, Biointerfaces**, v. 104, p. 48-53, 2013.

Pavinatto, A.; Pavinatto, F. J.; Barros-Timons, A.; Oliveira Jr, O.N. *Electrostatic Interactions Are Not Sufficient to Account for Chitosan Bioactivity.* **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 2, p. 246-251, 2010.

Pavinatto, Felipe J.; **Pavinatto, Adriana;** Caseli, Luciano ; dos Santos, David S. ; Nobre, Thatyane M.; Zaniquelli, Maria E. D.; Oliveira Jr., Osvaldo N. *Interaction of Chitosan with Cell Membrane Models at the Air-Water Interface.* **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1633-1640, 2007.

Pavinatto, Felipe J.; Caseli, Luciano; **Pavinatto, Adriana;** dos Santos, David S.; Nobre, Thatyane M.; Zaniquelli, Maria E. D.; Silva, Heurison S. ; Miranda, Paulo B.; Oliveira Jr., Osvaldo N. *Probing Chitosan and Phospholipid Interactions Using Langmuir and Langmuir-Blodgett Films as Cell Membrane Models.* **Langmuir**, v. 23, p. 7666-7671, 2007.