ANDERSON FIAMINGO

**Membranas Porosas de N,O-Carboximetilquitosana/Quitosana
Para Aplicação na Prevenção de Adesões Pericárdicas
Pós-Cirúrgicas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

Exemplar revisado.

**O exemplar original encontra-se disponível no
Serviço de Pós-Graduação do IQSC-USP.**

São Carlos
2012

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.

*Dedico este trabalho a minha Família, em especial aos meus pais, **Sérgio** e **Leonice**, pelo amor incondicional, e pelo apoio e incentivo à minha formação pessoal e acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador **Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho** pela orientação valiosa, pela amizade, confiança e incentivos constantes durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Jackson Brandão Lopes**, pela valiosa contribuição ao projeto, pelo empenho e disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas de laboratório: **Adriana, Bianca, Bruno, Cristina, Daniele, Daniella, Elaine, Érika, Fernando, Jorge, Raquel, Sara, Talita, Tonimar, Virgínia e Willian**, pela amizade, descontração, apoio e estímulo.

Aos Técnicos: **André, Bento, Luiz Antônio, Márcio, Paulo Beatriz, Salvador e Thiago**, pelo auxílio na realização das análises.

A **Profa. Dra. Mônica Beatriz Mathor** pelo uso dos equipamentos de esterilização através de radiação gama.

Ao meu colega **Renan**, pelas discussões, amizade e convivência.

Ao **Instituto de Química de São Carlos**, pela infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**) pela concessão da bolsa de mestrado.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho,

Muito obrigado!!!

*“A mente que se abre a uma nova
ideia jamais voltará ao seu tamanho
original.”*

Albert Einstein

RESUMO

FIAMINGO, A. **Membranas porosas de N,O-carboximetilquitosana/quitosana para aplicação na prevenção de adesões pericárdicas pós-cirúrgicas**. 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Este trabalho teve como objetivo produzir e caracterizar membranas de quitosana e de N,O-carboximetilquitosana reticuladas, que apresentassem propriedades físicas e químicas adequadas para desempenhar o papel de matriz para proliferação das células mesoteliais. As características estruturais e morfológicas das amostras purificadas de quitosana (amostra Q, adquirida da Yue Planting, China) e carboximetilquitosana na forma sódica (amostra NaCMQH, adquirida da Heppe Medical, Alemanha, e amostra NaCMQD, adquirida da Dayang Chemicals, China) foram investigadas através da espectroscopias de ressonância magnética nuclear e no infravermelho, condutimetria, solubilidade em função do pH e viscosimetria. As membranas de carboximetilquitosanas (amostras M-CMQHs e M-CMQDs) foram confeccionadas via liofilização, e glutaraldeído foi empregado como agente reticulante em diferentes concentrações para avaliar o seu efeito sobre o grau de reticulação e propriedades das membranas. As membranas foram caracterizadas quanto ao grau de reticulação, grau de hidratação, microscopia eletrônica de varredura (MEV), termogravimetria, teste mecânico de tração e quanto a susceptibilidade à degradação enzimática. A amostra Q apresentou grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) de 23,60%, sendo solúvel em $\text{pH} \leq 6,5$. A amostra NaCMQH apresentou $\overline{GA} = 16,32\%$ e grau médio de substituição ($\overline{GS}$) de 1,68, sendo insolúvel no intervalo $2,5 \leq \text{pH} \leq 6,5$, a amostra de NaCMQD apresentou $\overline{GA} = 3,31\%$ e $\overline{GS} = 1,43$, sendo insolúvel no intervalo $3,0 \leq \text{pH} \leq 7,0$. A reticulação das membranas de carboximetilquitosana (amostras M-CMQHs e M-CMQDs) foi realizada com a finalidade de reduzir sua solubilidade e melhorar as propriedades mecânicas. O grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) foi tanto maior quanto maior a concentração de glutaraldeído empregada na reação, variando de $\overline{GR} = 10,39 \pm 0,37\%$ ($[\text{glutaraldeído}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) a $\overline{GR} = 62,38 \pm 1,71\%$ ($[\text{glutaraldeído}] = 5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). As características morfológicas das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs foram observadas pelo emprego de MEV, sendo observada a formação de estruturas porosas, com maior quantidade de poros aparentes quanto

maior o valor de $\overline{GR}$, variando de 175 poros mm^{-2} a 291 poros mm^{-2} com o aumento do grau de reticulação de 12,30% (amostra M-CMQH-2,5) para 35,82%, (amostra M-CMQH-50). A amostra M-Q apresentou baixa taxa de hidratação ($321,16 \pm 18,68\%$) e alto percentual de massa recuperada ($90,62 \pm 2,13\%$) após imersão por 24 horas em solução PBS, quando comparada às amostras M-CMQHs e M-CMQDs. As amostras M-CMQHs e M-CMQDs apresentaram aumento da resistência máxima à tração com o aumento de $\overline{GR}$, aumentando de $0,21 \pm 0,16$ MPa (amostra M-CMQD-2,5; $\overline{GR} \approx 10,39\%$) para $0,82 \pm 0,33$ MPa (amostra M-CMQH-50; $\overline{GR} \approx 62,38\%$). Entretanto, amostras com menor $\overline{GR}$ apresentaram aumento dos valores de percentual de alongação, sendo que a amostra M-CMQH-2,5 ($\overline{GR} \approx 12,30\%$) apresentou alongação máxima de $73,08 \pm 2,20\%$. A amostra M-Q foi pouco susceptível à hidrólise enzimática ($[\text{GlcN}] = 47 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) devido à baixa solubilidade da quitosana em $\text{pH} > 6,5$. Já com relação ao efeito do $\overline{GR}$, houve redução da taxa de hidrólise enzimática de $[\text{GlcN}] = 449 \times 10^{-4} \pm 15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para $[\text{GlcN}] = 105 \times 10^{-4} \pm 11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, quando o $\overline{GR}$ aumentou de 12,30% (amostra M-CMQH-2,5) para 28,64% (amostra M-CMQH-25). As amostras M-CMQH-5, M-CMQH-10, M-CMQD-10 e M-CMQD-25 apresentam as propriedades mais adequadas para o emprego como membranas para a prevenção das adesões pericárdicas, pois apresentam superfícies altamente porosas, com baixas taxa de hidratação e de solubilidade, resistência máxima à tração superior a 0,67 MPa, percentual de alongação superior à 30%, e degradação enzimática inferior a $[\text{GlcN}] = 400 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 15 dias de incubação.

Palavras-chave: N,O-carboximetilquitosana; quitosana; glutaraldeído.

ABSTRACT

FIAMINGO, A. **Porous membranes of N,O-carboxymethylchitosan/chitosan for applying in the prevention of postsurgical pericardial adhesions** 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

The aim of this study was to produce and characterize membranes of chitosan and cross-linked N,O-carboxymethylchitosan, displaying appropriate physical and chemical properties to act as matrices for the proliferation of mesothelial cells. The structural and morphological characteristics of the purified samples of chitosan (sample Q, acquired from Yue Planting, China) and sodium carboxymethylchitosan (sample NaCMQH, acquired from Heppe Medical, Germany, and sample NaCMQD, acquired from Dayang Chemicals, China) were determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR^1H), infrared spectroscopy, conductometry, viscometry and pH-solubility tests. The carboxymethylchitosan membranes (M-CMQHs and M-CMQDs) were made up by means of lyophilization, with glutaraldehyde being used as a cross-linking agent at different concentrations to evaluate its effect on the cross-linking degree and on the membranes properties. The membranes were characterized in terms of cross-linking degree and hydration rate, by scanning electronic microscopy (SEM), thermogravimetry, ultimate tensile strength and the susceptibility to enzymatic degradation. The sample Q showed average degree of acetylation ($\overline{DA}$) of 23.60%, being soluble at $\text{pH} \leq 6.5$. The sample NaCMQH presented $\overline{DA}=16.32\%$ and average degree of substitution ($\overline{DS}$) of 1.68, being insoluble in the region of $2.5 \leq \text{pH} \leq 6.5$. The sample NaCMQD presented $\overline{DA}=3.31\%$ and $\overline{DS}=1.43$, being insoluble in the region of $3.0 \leq \text{pH} \leq 7.0$. The cross-linking of carboxymethylchitosan membranes (M-CMQHs and M-CMQDs) was carried out to reduce its solubility and to improve its the physical properties. The higher the glutaraldehyde concentration employed in the reaction, the higher average cross-linking degree ($\overline{CD}$), which ranged from $10.39 \pm 0.37\%$ ($[\text{glutaraldehyde}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) to $62.38 \pm 1.71\%$ ($[\text{glutaraldehyde}] = 2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). The morphological characteristics of the samples M-Q, M-CMQHs M-CMQDs were observed through SEM, evidencing the formation of porous structures with a larger quantity of apparent pores as $\overline{DC}$ increased, ranging from 175 pores mm^{-2} to 291 pores mm^{-2} when $\overline{DC}$ increased from 12.30%

(sample CMQH-M-2.5) to 35.82% (sample M-CMQH-50). The sample M-Q showed low hydration rate ($321.16 \pm 18.68\%$) and high percentage of recovered mass ($90.62 \pm 2.13\%$) after immersion for 24 hours, when compared to samples M-CMQHs and M-CMQDs. Increasing the $\overline{DC}$ of the samples M-CMQHs and M-CMQDs resulted in improved mechanical properties as the ultimate tensile strength increased from 0.21 ± 0.16 MPa (M-CMQD-2.5, $\overline{DC} \approx 10.39\%$) to 0.82 ± 0.33 MPa (M-CMQH-50, $\overline{DC} \approx 62.38\%$). However, those samples with lower $\overline{DC}$ values presented an increase in strain at fracture, as the CMQH-M-2.5 sample ($\overline{DC} \approx 12.30\%$), which registered a strain at fracture of $73.08 \pm 2.20\%$. The sample M-Q showed a low rate of enzymatic hydrolysis ($[\text{GlcN}] = 47 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) as a consequence of the low solubility of chitosan at $\text{pH} > 6.5$. Concerning the effects of cross-linked degree, there was a reduction in the enzymatic hydrolysis rate from $[\text{GlcN}] = 449 \times 10^{-4} \pm 15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ to $[\text{GlcN}] = 105 \times 10^{-4} \pm 11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, when $\overline{DC}$ increased from 12.30% (M-CMQH-2.5) to 28.64% (M-CMQH-25). The samples M-CMQH-5, M-CMQH-10, M-CMQD-10 and M-CMQD-25 exhibit appropriate properties to act in the prevention of pericardial adhesions, owing to its highly porous surfaces, low hydration rate and insolubility, ultimate tensile strength exceeding 0.67 MPa, strain at fracture higher than 30% and enzymatic degradation rate lower than $[\text{GlcN}] = 400 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ after 15 days of incubation.

Keywords: N,O-carboxymethylchitosan; chitosan; glutaraldehyde.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação da estrutura cardíaca e do pericárdico.....	23
Figura 2-	Representação da estrutura primária idealizada de quitina, onde n é o grau médio de polimerização.	26
Figura 3-	Representação idealizada da estrutura de quitosana, onde n é o grau de polimerização.	26
Figura 4 -	Representação da estrutura da N,O-carboximetilquitosana, onde n é o grau de polimerização.	29
Figura 5 -	Representação da estrutura do glutaraldeído.....	30
Figura 6 -	Representação esquemática da reticulação da N,O-carboximetilquitosana com glutaraldeído.....	31
Figura 7 -	Representação esquemática do glutaraldeído livre, formas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos (monomérico e polimérico) e polímeros α,β -insaturados. .	32
Figura 8 –	Modelo estrutural do fator de crescimento de queratinócitos (KGF).....	33
Figura 9 -	Representação da estrutura da heparina, onde n é o grau de polimerização.	34
Figura 10 -	Espectro de RMN ^1H característico de quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$, onde $\text{R} = -\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ou H	43
Figura 11 -	Espectro de RMN ^1H característico de carboximetilquitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$, onde $\text{R}_1 = -(\text{C})\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{COOD}$ ou H , R_2 e $\text{R}_3 = -\text{CH}_2\text{COOD}$ ou H	44
Figura 12 -	Curva de calibração do ensaio de ninidrina elaborada a partir das soluções de cloridrato de glucosamina ($r = 0,992$).	51
Figura 13 –	Reação da ninidrina com grupo amino primário.....	51
Figura 14 -	Ajuste da imagem, com a função ‘Threshold’: a) micrografia das partículas; b) ajuste da micrografia das partículas utilizando a função ‘Threshold’; c) micrografia da membrana; d) ajuste da micrografia da membrana utilizando a função ‘Threshold’.	54
Figura 15 -	Espectro na região do infravermelho da amostra Q.	60
Figura 16 -	Espectros na região do infravermelho das amostras NaCMQH e HCMQH.	61

Figura 17 - Espectros na região do infravermelho das amostras NaCMQD e HCMQD.	62
Figura 18 - Curva de titulação condutimétrica da amostra Q.	63
Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica da amostra NaCMQH.	64
Figura 20 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra Q em DCl/D ₂ O 1% (v/v) a 90°C.....	66
Figura 21 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra HCMQH em DCl/D ₂ O 1% (v/v) a 90°C.....	67
Figura 22 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra HCMQD em DCl/D ₂ O 1% (v/v) a 90°C.....	67
Figura 23 - Curva de viscosidade reduzida <i>versus</i> concentração da amostra Q em solução tampão ácido acético 0,3 mol L ⁻¹ / acetato de sódio 0,2 mol L ⁻¹ à temperatura de 25°C.	69
Figura 24 - Curva de viscosidade reduzida <i>versus</i> concentração da amostra NaCMQH em solução de cloreto de sódio 0,1 mol L ⁻¹ à temperatura de 30°C.	70
Figura 25 - Curva de viscosidade reduzida <i>versus</i> concentração da amostra NaCMQD em solução de cloreto de sódio 0,1 mol L ⁻¹ à temperatura de 30°C.	70
Figura 26 - Curvas de comprimento de onda <i>versus</i> absorbância da amostra Q em soluções com diferentes valores de pH.	72
Figura 27 - Curva absorbância ($A_{600\text{nm}}$) <i>versus</i> pH das soluções da amostra Q.	72
Figura 28 - Curva absorbância ($A_{600\text{nm}}$) <i>versus</i> pH das soluções da amostra NaCMQH.....	73
Figura 29 - Curva absorbância ($A_{600\text{nm}}$) <i>versus</i> pH das soluções da amostra NaCMQD.....	73
Figura 30 - Solubilidade das amostras Q, NaCMQH e de NaCMQD em função do pH de suas soluções ^(a)	74
Figura 31 - Micrografia da amostra Q com aproximações de: (a) 100x, (b) 500x, (c) 1.000x, (d) 10.000x.	76
Figura 32 - Micrografia da amostra NaCMQH com aproximações de: (a) 100x, (b) 500x, (c) 1.000x, (d) 10.000x.....	77
Figura 33 - Micrografia da amostra NaCMQD com aproximações de: (a) 100x, (b) 500x, (c) 1.000x, (d) 10.000x.....	78

Figura 34 - Fotografia das principais etapas da preparação das membranas: (a) solução de NaCMQH/glutaraldeído; (b) solução de NaCMQH/glutaraldeído congelada; (c) membrana de NaCMQH reticulada com glutaraldeído e liofilizada; (d) membrana de NaCMQH reticulada com glutaraldeído após neutralização e lavagem.	80
Figura 35 - Imagens das amostras M-CMQHs, em função da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação.	81
Figura 36 - Imagens das amostras M-CMQDs, em função da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação.	82
Figura 37 - Valores de percentual de contração da área das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs (experimento realizado em quintuplicata).	83
Figura 38 - Valores de espessura das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs (experimento realizado em quintuplicata).	84
Figura 39 - Grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) das amostras M-CMQHs e M-CMQDs, em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação (experimento realizado em quadruplicata).	85
Figura 40 - Curvas de percentual de hidratação das amostras M-CMQHs, em solução PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente, em função do tempo de imersão.	86
Figura 41 - Curvas de taxa de hidratação das amostras M-Q e M-CMQDs, em solução PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente, em função do tempo de imersão.	87
Figura 42 - Grau de hidratação das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs após 48 horas de imersão em solução PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente (experimento realizado em triplicata).	88
Figura 43 - Micrografias da superfície da amostra M-CMQD-50 obtidas antes da execução das etapas de neutralização e lavagem ((a) 100x e (b) 1000x), após lavagem por 30 min ((c) 100x, (d) 1000x), e após lavagem por 6 horas ((e) 100x, (f) 1000x).	92
Figura 44 - Micrografias da superfície da amostra M-Q: (a) 100x, (b) 1.000x.	94
Figura 45 - Micrografia da fratura da amostra M-Q: (a) 200x, (b) 1.000x.	94

Figura 46 - Micrografias das superfícies das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH (a) 100x, (b) 1.000x; M-CMQH-2,5 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQH-5 (e) 100x, (f) 1.000x.....	96
Figura 47 - Micrografias das superfícies das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH-10 (a) 100x, (b) 1.000x; M-CMQH-25 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQH-50 (e) 100x, (f) 1.000x.	97
Figura 48 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH (a) 200x, (b) 1.000x; M-CMQH-2,5 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQH-5 (e) 200x, (f) 1.000x.....	99
Figura 49 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH-10 (a) 200x, (b) 1.000x; M-CMQH-25 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQH-50 (e) 200x, (f) 1.000x.....	100
Figura 50 - Micrografia da superfície das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD (a) 100x, (b) 1.000x; M-CMQD-2,5 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQD-5 (e) 100x, (f) 1.000x.....	102
Figura 51 - Micrografia da superfície das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD-10 (a) 100x, (b) 1.000X; M-CMQD-25 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQD-50 (e) 100x, (f) 1.000x.	103
Figura 52 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD (a) 200x, (b) 1.000x; M-CMQD-2,5 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQD-5 (e) 200x, (f) 1.000x.....	105
Figura 53 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD-10 (a) 200x, (b) 1.000X; M-CMQH-25 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQH-50 (e) 200x, (f) 1.000x.....	106

Figura 54 - Difratoograma de raios X das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD.	108
Figura 55 - Difratoograma de raios X das amostras de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q).	109
Figura 56 - Difratoograma de raios X da amostra NaCMQH na forma de pó (NaCMQH) e na forma de membrana (M-CMQH).	110
Figura 57 - Difratoograma de raios X da amostra NaCMQD na forma de pó (NaCMQD) e na forma de membrana (M-CMQD).	110
Figura 58 - Difratoograma de raios X das amostras M-Q, M-CMQH e M-CMQD.	111
Figura 59 - Difratoograma de raios X das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.	112
Figura 60 - Difratoograma de raios X das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.	113
Figura 61 - Curvas termogravimétricas da amostra de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q), obtidas em atmosfera de ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	114
Figura 62 - Curvas termogravimétricas da amostra de NaCMQH na forma de pó (NaCMQH) e na forma de membrana (M-CMQH), em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	116
Figura 63 - Curvas termogravimétricas da amostra de NaCMQD na forma de pó (NaCMQD) e na forma de membrana (M-CMQD), em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	116
Figura 64 - Curvas TG das M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	118
Figura 65 - Curvas TG das M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	118
Figura 66 - Curvas DTG das M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	119

Figura 67 -	Curvas DTG das M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	119
Figura 68 -	Curva de resistência mecânica à tração da amostra M-Q hidratada em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C.	122
Figura 69 -	Curva de resistência mecânica à tração das amostras M-CMQHs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C.	122
Figura 70 -	Curva de resistência mecânica à tração das amostras M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C.	123
Figura 71 -	Valores de resistência máxima à tração das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).	124
Figura 72 -	Valores de percentual de alongação das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).	125
Figura 73 -	Valores do módulo de elasticidade das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).	126
Figura 74 -	Valores do módulo de elasticidade das amostras M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).	127
Figura 75 -	Curva de hidrólise enzimática da amostra M-Q em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL ⁻¹ de lisozima (experimento realizado em quadruplicata).	128
Figura 76 -	Curva de hidrólise enzimática das amostras M-CMQHs em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL ⁻¹ de lisozima (experimento realizado em quadruplicata).	129
Figura 77 -	Curva de hidrólise enzimática das amostras M-CMQDs em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL ⁻¹ de lisozima (experimento realizado em quadruplicata).	129

Figura 78 - Descrição esquemática do mecanismo de degradação da carboximetilquitosana reticulada com relação à massa molar média do polímero: (a) carboximetilquitosana de alta massa molar média, com fragmentação que não libera os fragmentos resultantes das quebras de ligações; (b) carboximetilquitosana de baixa massa molar média, com fragmentação e liberação de oligômeros..... 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Reagentes e solventes utilizados durante a realização dos experimentos.	37
Tabela 2 -	Composição das membranas de quitosana e de carboximetilquitosana.....	49
Tabela 3 -	Valores de massa inicial, massa recuperada após a purificação e o rendimento do procedimento de purificação.	59
Tabela 4 -	Valores de $\overline{GS}$ e $\overline{GA}$ das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD determinados por titulação condutimétrica.	65
Tabela 5 -	Valores de grau médio de substituição nos grupos hidroxila ($\overline{GS}_{6-O}$ e $\overline{GS}_{3-O}$) e amino ($\overline{GS}_{2-N}$) das amostras HCMQH e HCMQD, e de $\overline{GA}$ de carboximetilquitosanas e quitosana (amostra Q).	68
Tabela 6 -	Valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e de massa molar média viscosimétrica (M_v) de quitosana (amostra Q) e carboximetilquitosana (amostras NaCMQH e NaCMQD).	71
Tabela 7 -	Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$) e a área média ($\overline{AM}$) das partículas das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD.	79
Tabela 8 -	Valores de percentual de massa residual ^(a) das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs após 24 horas de imersão em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente.	90
Tabela 9 -	Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) da amostra M-CMQD-50 em função dos diferentes processos de lavagem.	93
Tabela 10 -	Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) para a superfície e para a fratura da amostra M-Q.	94
Tabela 11 -	Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) para a superfície das amostras M-CMQHs.	98
Tabela 12 -	Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente em função da área (NP) para a fratura das amostras M-CMQHs.	101

Tabela 13 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente em função da área (NP) para a superfície das amostras M-CMQDs..	104
Tabela 14 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente em função da área (NP) para a fratura das amostras M-CMQDs.....	107
Tabela 15 - Valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação e percentagem de perda de massa da amostra de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q) obtidas em ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹ no primeiro estágio de pirólise.....	115
Tabela 16 - Valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação e percentagem de perda de massa obtidos para o primeiro estágio de pirólise das amostras na forma de pó (NaCMQH) e na forma de membranas (M-CMQHs) obtidas em atmosfera de ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	120
Tabela 17 - Valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação e percentagem de perda de massa obtidos para o primeiro estágio de pirólise das amostras na forma de pó (NaCMQD) e na forma de membranas (M-CMQDs) obtidas em atmosfera de ar sintético com vazão de 20 mL min ⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min ⁻¹	120

LISTA DE SIGLAS

$\overline{AM}$	Área média
DAIUS	Desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade
$\overline{DM}$	Diâmetro médio
DTG	Análise termogravimétrica derivada
$\overline{GA}$	Grau médio de acetilação
GlcNAc	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose
GlcN	2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose
$\overline{GS}$	Grau médio de substituição
HCMQD	Carboximetilquitosana da Dayang purificada na forma ácida
HCMQH	Carboximetilquitosana da Heppe purificada na forma ácida
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M-CMQD	Membranas de carboximetilquitosana da Dayang
M-CMQDs	Conjunto de membranas de carboximetilquitosana da Dayang
M-CMQD-2,5	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Dayang reticuladas com $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-5	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Dayang reticuladas com $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-10	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Dayang reticuladas com $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-25	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Dayang reticuladas com $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-50	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Dayang reticuladas com $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH	Membranas de carboximetilquitosana da Heppe
M-CMQHs	Conjunto de membranas de carboximetilquitosana da Heppe

M-CMQH-2,5	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Heppe reticuladas com $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-5	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Heppe reticuladas com $0,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-10	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Heppe reticuladas com $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-25	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Heppe reticuladas com $2,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-50	Membranas de carboximetilquitosana (1% m/v) da Heppe reticuladas com $5,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-Q	Membranas de quitosana da Yue Planting
$\overline{M}_v$	Massa molar média viscosimétrica
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca
NaCMQD	Carboximetilquitosana da Dayang purificada na forma sódica
NaCMQH	Carboximetilquitosana da Heppe purificada na forma sódica
<i>NP</i>	Número de poros aparente
PBS	Tampão salino fosfato (pH 7,4)
Q	Quitosana da Yue Planting purificada na forma neutra
RMN ^1H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.
TG	Análise termogravimétrica
UV-Vis	Espectroscopia na região do Ultravioleta e do Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	Quitina e Quitosana	26
1.1.1	Fontes e Processos de Obtenção.....	27
1.2	Carboximetilquitosana.....	28
1.3	Produção de Membranas	29
1.4	Reticulação com Glutaraldeído	30
1.5	Fator de Crescimento de Queratinócitos	33
2	MOTIVAÇÃO	35
3	OBJETIVOS.....	36
4	PARTE EXPERIMENTAL	37
4.1	Reagentes.....	37
4.2	Purificação de Quitosana.....	38
4.3	Purificação de Carboximetilquitosana.....	38
4.4	Caracterizações.....	39
4.4.1	Espectroscopia no Infravermelho.....	39
4.4.2	Análise Condutimétrica.....	40
4.4.3	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)....	41
4.4.4	Solubilidade em Função do pH	45
4.4.5	Determinação da Massa Molar Média Viscosimétrica	45
4.5	Preparação das Membranas	48
4.6	Caracterizações das Membranas	49
4.6.1	Espessura.....	50
4.6.2	Determinação do Grau de Reticulação.....	50
4.6.3	Grau de Hidratação.....	52
4.6.4	Solubilidade e Estabilidade em Solução Salina de Tampão Fosfato (PBS).....	53

4.6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	53
4.6.5	Difração de Raios X	54
4.6.6	Estabilidade Térmica.....	55
4.6.7	Propriedades Mecânicas	55
4.6.8	Degradação Enzimática.....	56
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	57
5.1	Purificação das Amostras de Quitosana e de Carboximetilquitosana	58
5.2	Caracterizações.....	60
5.2.1	Espectroscopia no Infravermelho.....	60
5.2.2	Análise Condutimétrica.....	63
5.2.3	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	65
5.2.4	Massa Molar Média Viscosimétrica.....	68
5.2.5	Solubilidade em Função do pH.....	71
5.2.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	75
5.3	Preparação das Membranas	80
5.4	Caracterizações.....	85
5.4.1	Determinação do Grau de Reticulação.....	85
5.4.2	Grau de Hidratação.....	86
5.4.3	Solubilidade e Estabilidade em Solução Salina de Tampão Fosfato (PBS).....	89
5.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	91
5.4.5	Difração de Raios X	107
5.4.6	Termogravimetria.....	114
5.4.7	Propriedades Mecânicas	121
5.4.8	Degradação Enzimática.....	127
6	CONCLUSÕES	132
7	REFERÊNCIAS	135

1 INTRODUÇÃO

As aderências pericárdicas são decorrentes de intervenções cirúrgicas sobre o coração e os grandes vasos. Inúmeros problemas médicos são relatados como consequência da existência e da severidade das aderências pós-cirúrgicas, as quais dificultam futuras abordagens e adicionam maior morbidade e mortalidade às reoperações (DALLAN et al., 2009).

O pericardio é membrana que envolve e protege o coração (**Figura 1**), ela é formada pelo pericardio parietal (membrana esterna), o pericardio visceral (a parte interna) e entre estas duas membranas encontra-se a cavidade pericardica que contém o líquido pericardico, que funciona como um lubrificante entre as membranas dando mobilidade entre as membranas. Nas cirúrgicas cardiovasculares, para ter acesso ao coração, o pericárdio é lesionado e há perda do líquido pericárdico. Durante o processo de reparo do pericárdio, há o acumulando fibrina na forma de conexões entre as superfícies cruentas das lâminas parietais e viscerais do pericárdio, as quais são denominadas de bandas aderentes, estas bandas sofrem infiltração de fibroblastos, deposição de colágeno e neovascularização, deste processo, resultam aderências firmes e de difícil manipulação (NKERE et al., 1994).

Figura 1- Representação da estrutura cardíaca e do pericárdio (adaptado de MEDICINAGERIATRICA, 2012)

Vários métodos têm sido investigados para prevenir ou diminuir a gravidade das aderências pós-cirúrgicas tais como: membranas autólogas (MILGALTER; URETZKY; SIBERMAN, 1985) e heterólogas (GALO; ARTINANO; DURAN, 1982) para substituir o pericárdio lesado; agentes anti-inflamatórios (VANDER SALM et al., 1986) e anti-histamínicos (SMITH JR., 1968) para reduzir a atividade inflamatória exacerbada; agentes fibrinolíticos (WISEMAN et al., 1992) com a finalidade de degradar a fibrina. Entretanto, apenas após a utilização dos polímeros sintéticos ou dos biopolímeros é que os resultados se tornaram mais consistentes e reprodutivos (LAKS et al., 1981; ROBISON et al., 1984; MINALE et al., 1988; SEEGER et al., 1997; BENNETT et al., 2003; KONERTZ et al., 2003; LOPES, 2010).

Bennett et al. (2003) exploraram o conceito da separação mecânica temporária entre o pericárdio visceral e o parietal, pela interposição de um hidrogel tendo como base o poli(etileno glicol), e observaram redução significativa na incidência das adesões.

Seeger et al. (1997) testaram em animais a carboximetilcelulose, um derivado hidrossolúvel da celulose, e o hialuranato sódico, uma glicosamina constitucional humana, e observaram que ambas promoveram redução significativa na severidade das aderências pericárdicas quando comparado ao grupo controle, sendo que o hialuranato de sódio apresentou melhores resultados que a carboximetilcelulose.

Krause et al. (2001) descreveram, pela primeira vez, o uso do gel de N,O-carboximetilquitosana na prevenção das aderências pericárdicas, sendo que tal estudo demonstrou a acentuada redução de aderências pós-cirúrgicas em modelo de grandes animais, sem efeitos colaterais indesejáveis.

Gwon et al. (2010) estudando a produção e a utilização de hidrogéis de carboximetilquitosana reticuladas por radiação gama para a prevenção de aderências pós-cirúrgicas, observaram significativa redução da formação das aderências abdominais pela utilização dos hidrogéis de carboximetilquitosana quando comparado ao grupo controle em modelo de grandes animais.

Lopes et al. (2010) estudando o efeito da utilização da N,O-carboximetilquitosana e do fator de crescimento de keratinócitos, observaram que ambos, tanto carboximetilquitosana como fator de crescimento de queratinócitos quando isolados apresentaram significativa redução das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas, mais a interação sinérgica entre os dois

resultam em expressivas reduções das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas em modelo de grandes animais.

A carboximetilquitosana parece ser promissora por possuir inúmeras das características que são importantes para o uso na área biomédica, tais como a biocompatibilidade, biodegradabilidade, atoxicidade, baixa imunogenicidade, ação germicida, capacidade de formar géis, e solubilidade em amplo intervalo de acidez, as quais ampliam as possibilidades de aplicação (QIAN et al., 1996; RABEA et al., 2003; ISHIHARA et al., 2006; DAROZ et al., 2008; GWON et al., 2010; LOPES, 2010).

1.1 Quitina e Quitosana

A quitina é um polímero linear cuja estrutura primária é formada pelo dissacarídeo constituído de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (GlcN), unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4) (**Figura 2**) (CAMPANA-FILHO et al., 2007).

Figura 2- Representação da estrutura primária idealizada de quitina, onde n é o grau médio de polimerização.

A principal reação de derivatização de quitina é a desacetilação, hidrólise dos grupos acetamida da maioria (> 60%) das unidades de GlcNAc, que resulta em um polímero conhecido como quitosana, o qual pode ser definido como um copolímero de GlcN e GlcNAc, de composição variável em função do grau residual de acetilação (**Figura 3**) (CAMPANA-FILHO et al., 2003).

Figura 3- Representação idealizada da estrutura de quitosana, onde n é o grau de polimerização.

A reação de desacetilação pode ocorrer tanto pela via enzimática como química, sendo que a última é a mais comum e o tratamento de quitina em meio alcalino é o processo

mais empregado. Durante a reação de desacetilação, os grupamentos acetamido das unidades GlcNAc de quitina são convertidos, em graus variados, a grupos amino, gerando unidades GlcN. A composição de quitosana é variável em função das condições empregadas na desacetilação de quitina, e define-se o grau médio de acetilação do polímero ($\overline{GA}$), como a fração média de unidades GlcNAc presente nas cadeias. A massa molar média, o grau médio de acetilação e a distribuição das unidades GlcNAc e GlcN nas cadeias têm efeito marcante sobre as características físico-químicas, tais como a solubilidade e viscosidade, e propriedades da quitosana, tais como atoxicidade, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade (BRUGNEROTTO et al., 2001). O valor do parâmetro $\overline{GA}$ é um dos critérios empregados para diferenciar quitina e quitosana, sendo que as solubilidades destes polímeros também são diferentes. Assim, a quitosana ($\overline{GA} < 40\%$) apresenta solubilidade em soluções aquosas de ácidos diluídos e a quitina ($\overline{GA} > 80\%$) é insolúvel, sendo solúvel apenas em alguns poucos sistemas solventes, como N,N-dimetilacetamida/LiCl. A solubilidade de quitosana está relacionada com $\overline{GA}$, pois esta depende da quantidade de grupos aminos protonados ($-\text{NH}_3^+$) nas cadeias poliméricas quando o polímero é dissolvido em meios aquosos moderadamente ácidos. Assim, quanto maior a quantidade destes grupos, maior será a repulsão eletrostática entre as cadeias e maior a solubilidade (AGULLÓ et al., 2004; ROBERTS, 1992).

O fato de a quitosana ser um polieletrólito linear com alta densidade de carga positiva em soluções aquosas de ácidos diluídos faz com que tenha a capacidade de aderir a superfícies carregadas negativamente. Tal característica torna o polímero um excelente agente floculante, ligando-se a superfícies celulares, formando géis com poliânions e tendo a capacidade de formar membranas (CAMPANA-FILHO et al., 2003; AGULLÓ et al., 2004; ROBERTS, 1992; SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 2001).

1.1.1 Fontes e Processos de Obtenção

A quitina é encontrada em várias classes de invertebrados. As principais fontes para a produção industrial de quitina são as cascas de camarões e carapaças de caranguejos (ROBERTS, 1992).

O processo de extração de quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos envolve tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias

que as acompanham. Estas etapas se destinam a eliminar carbonatos e fosfato de cálcio e/ou magnésio, proteínas e os pigmentos contidos na biomassa. Os procedimentos mais utilizados para a extração da quitina geralmente compreendem a utilização de soluções ácidas na desmineralização, que tem por finalidade a eliminação dos sais minerais, e de soluções alcalinas na etapa de desproteínização, o que resulta na eliminação das proteínas. Em geral a eliminação dos pigmentos ocorre via extração por solventes orgânicos. No entanto, as condições reacionais empregadas nessas etapas devem ser brandas, no sentido de evitar a degradação do polímero (SGHEER et al., 2009).

A quitosana é comumente obtida pela desacetilação de quitina em meio alcalino sob condições heterogêneas, temperaturas elevadas e longos tempos de reação, o que resulta em amostras acentuadamente despolimerizadas, principalmente quando condições reacionais mais severas são empregadas e se a reação é sequencialmente repetida visando a preparação de quitosanas extensivamente desacetiladas (CAMPANA-FILHO; SIGNINI, 2001).

Recentemente, Delezuk et al. (2009) desenvolveram um novo processo para a obtenção de quitosana extensivamente desacetilada, denominado Processo DAIUS, desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade. Os resultados deste trabalho mostram que o Processo DAIUS é mais eficiente que a maioria dos processos de desacetilação de quitina descritos na literatura, pois permite a preparação de quitosana extensivamente desacetilada, de massa molar média elevada e baixa polidispersividade, pela execução de reação em tempos mais curtos e temperaturas mais baixas que as empregadas nos processos convencionais.

1.2 Carboximetilquitosana

Os grupos amino de quitosana só são protonados quando $\text{pH} < \text{pK}_a \approx 6,5$, o que leva a sua solubilização somente em soluções diluídas moderadamente ácidas. Assim, em soluções com $\text{pH} > 6,5$, a quitosana não é solúvel, e no sentido de superar essa limitação quanto à solubilidade, diferentes derivados de quitosana têm sido preparados e estudados. Modificações químicas, tais como as resultantes de reações de carboximetilação, permitem a preparação de derivados solúveis em ampla faixa de pH (ZHAO et al., 2003; CHEN et al., 2003; CHEN; PARK, 2003).

Os sítios reativos para a carboximetilação de quitosana são os grupos amino e hidroxila presentes em suas cadeias. A escolha das condições de reação apropriadas e reagentes adequados permite a preparação de N-, O-, N,N- ou N,O-carboximetilquitosana (**Figura 4**) (RABEA et al., 2003).

Figura 4 - Representação da estrutura da N,O-carboximetilquitosana, onde n é o grau de polimerização.

Uma das vantagens dos derivados carboximetilados sobre a quitosana é que a atividade antifúngica da quitosana, que é limitada somente a meios ácidos ($\text{pH} \leq 6,5$), é ampliada no caso da carboximetilquitosana a intervalo mais amplo de pH (LIU et al., 2001).

Doraz et al. (2008) avaliaram as alterações físico-químicas da N,O-carboximetilquitosana após a sua termoesterilização e sua eficácia na prevenção de aderências pericárdicas pós-cirúrgicas e observaram que o método de esterilização empregado não alterou as propriedades físico-químicas da N,O-carboximetilquitosana.

1.3 Produção de Membranas

Membranas são materiais cuja geometria é caracterizada por espessuras reduzidas, e que apresentam propriedades de barreiras que permitem o transporte seletivo de massa entre duas fases (ANDRADE et al., 2001).

Muito utilizadas em engenharia de tecidos, as membranas apresentam importantes propriedades, tais como a permeabilidade à água, e sua ação na liberação controlada de fármacos, como barreira física, e como suporte para a proliferação e crescimento celular.

Wu et al. (2004) observaram que membranas de quitosana/celulose produzidas via “casting” apresentam baixa taxa de permeação a vapor d'água, impedindo a desidratação excessiva, e acentuada atividade antimicrobiana contra *E.coli* e *S. Aureus*, indicando que tais membranas podem ser adequadas para utilização como curativos com propriedades antibacterianas.

Uma das características mais promissoras de quitosana e de seus derivados é sua excelente habilidade para ser processada em estruturas porosas para uso em transplante de células e regeneração tecidual. As estruturas porosas podem ser formadas por liofilização de soluções em moldes apropriados (LARANJEIRA, FÁVERE, 2009).

A liofilização é um método comumente utilizado para a preparação de materiais desidratados, as quais devem apresentar estabilidade adequada por longo período de armazenagem em temperaturas ambientes.

A liofilização é um processo de secagem constituído de três etapas: congelamento, secagem primária e secagem secundária. A finalidade do congelamento no processo de liofilização consiste na estabilização do produto a ser liofilizado, interrompendo reações químicas e atividades biológicas. O material, previamente congelado, é desidratado por sublimação (secagem primária) seguida pela dessorção (secagem secundária), utilizando-se baixas temperaturas de secagem a pressões reduzidas (TATTINI; PARRA; PITOMBO, 2006).

Tian et al. (2009) confeccionaram suportes porosos de quitosana reticulados com glutaraldeído e genipina, através de liofilização, e as amostras apresentaram grande porosidade, boa biocompatibilidade e taxa de degradação adequada para a sua utilização em engenharia de tecidos.

1.4 Reticulação com Glutaraldeído

O glutaraldeído (**Figura 5**) é uma molécula bifuncional que interage muito fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura (MONTEIRO, 1999).

Figura 5 - Representação da estrutura do glutaraldeído.

O glutaraldeído possui como principal característica a formação de ligações cruzadas (“crosslinking”). A reação do glutaraldeído com carboximetilquitosana (**Figura 6**) se dá pelos grupos aldeídos do glutaraldeído e os grupos amino disponíveis da carboximetilquitosana. O mecanismo dessa reação ainda não está bem esclarecido, mas afirma-se que há formação de uma base de Schiff (-CH=N-) (ABREU, 2006).

Figura 6 - Representação esquemática da reticulação da N,O-carboximetilquitosana com glutaraldeído.

A reação desejável do glutaraldeído é aquela na qual seus grupos funcionais reagem com os grupos amino disponíveis na carboximetilquitosana, formando ligações cruzadas tipo base de Schiff. Entretanto, estas reações não são homogêneas em virtude da química complexa do glutaraldeído (**Figura 7**), cujas soluções são caracterizadas por misturas complexas em equilíbrio contendo glutaraldeído livre, formas mono e diidratadas, hemiacetais

cíclicos (monomérico e polimérico) e vários polímeros α,β -insaturados (GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999).

Figura 7 - Representação esquemática do glutaraldeído livre, formas mono e diidratadas, hemiacetais cíclicos (monomérico e polimérico) e polímeros α,β -insaturados (GOISSIS; BRAILE; GIGLIOTI, 1999).

Mi et al. (2001) avaliaram *in vitro* as características das membranas reticuladas de quitosana. O glutaraldeído foi utilizado em diferentes concentrações, e foi observado que o aumento da concentração do agente reticulante levou à produção de membranas de quitosana mais reticuladas. Estas membranas apresentaram propriedades promissoras para a fabricação de sistemas de entregas de fármacos implantáveis.

Clasen et al. (2006) confeccionaram e caracterizaram membranas de quitosana, a fim de avaliar e ajustar as propriedades físicas. A adição de glutaraldeído levou ao aumento da resistência mecânica, no entanto, a permeabilidade foi significativamente reduzida com o aumento do grau de reticulação.

Liu, Y. et al. (2007) estudaram a reticulação de O-carboximetilquitosana com glutaraldeído para o desenvolvimento de um sistema de liberação controlada de fármacos. A reticulação foi realizada com a finalidade de retardar a liberação de fármacos em condições simuladas de solução fisiológica (pH 7,4). Os resultados relatados neste trabalho mostram que a reticulação de O-carboximetilquitosana levou à produção de material que apresenta propriedades promissoras para a liberação controlada de fármacos.

1.5 Fator de Crescimento de Queratinócitos

Tem sido observado que os fatores de crescimento contribuem para a regeneração de tecidos em vários estágios de proliferação e diferenciação celular (AARONSON et al., 1991). O fator de crescimento de queratinócitos (*keratinocyte growth factor*, KGF) (**Figura 8**), também conhecido como fator de crescimento de fibroblásto-7 (*fibroblast growth factor*, FGF-7), um dos membros da família dos fatores de crescimento ligados a heparina (*heparin-binding growth factors*, HBGF) (ISHIHARA et al., 2006; FUJITA et al., 2007; LIU, H. et al., 2007), foi identificado em cultura de fibroblastos pulmonares, e a transcrição do seu gene gerou uma cadeia polipeptídica de 24 kD, contendo 194 aminoácidos (DALLAN et al., 2009; LOPES, 2008).

Figura 8 – Modelo estrutural do fator de crescimento de queratinócitos (KGF) (YE et al, 2001).

A instabilidade do KGF é compartilhada com outros fatores de crescimento dessa família, HBGF, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF-2) (TROWBRIDGE et al., 2002; MASUOKA et al., 2005). A heparina apresenta um papel importante na estabilização dos fatores de crescimentos (PRESTRELSKI; FOX; ARAKAWA, 1992). Masuoka et al. (2005) demonstraram que a quitosana apresenta a capacidade de estabilizar o bFGF-2 e de reduzir sua degradação. Essa função estabilizadora parece estar ligada à similaridade das estruturas primárias da heparina (**Figura 9**) e da quitosana.

Figura 9 - Representação da estrutura da heparina, onde n é o grau de polimerização.

Devido ao bFGF-2 ter sua estabilidade aumentada através da interação com a heparina ou com a quitosana, e de partilhar com o KGF das mesmas cargas elétricas (MASUOKA et al., 2005; PRESTRELSKI; FOX; ARAKAWA, 1992), a associação de quitosana e seus derivado com o KGF pode aumentar a sua estabilidade.

Lopes et al. (2008) evidenciaram que o KGF e a carboximetilquitosana são capazes de reduzir significativamente a severidade das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas, e que o KGF associado à carboximetilquitosana apresenta um efeito sinérgico, observado pela redução significativa e intensa da severidade das aderências pós-cirúrgicas.

2 MOTIVAÇÃO

Inúmeros problemas médicos são relatados como consequência da ocorrência e da severidade das aderências, em especial quando se fala em aderências pós-cirúrgicas. Assim, a incidência crescente de reoperações cardiovasculares, que hoje representam 8,5% a 34% dos procedimentos cirúrgicos nesta área, ressalta a importância da prevenção das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas (DALLAN et al., 2009; DAROZ et al., 2008).

Na cavidade pericárdica as aderências pós-cirúrgicas dificultam a re-entrada no mediastino, causando acidentes numa taxa que varia de 4 a 9,1%, que leva a redução da função cardíaca e a oclusão de enxertos vasculares coronarianos (DALLAN et al., 2009).

Portanto, além dos inconvenientes gerados ao paciente, as aderências pós-cirúrgicas são fontes de problemas diários para os cirurgiões e lhes exigem mais habilidades técnicas e tempo durante as reoperações. Nos últimos anos, muitos esforços foram despendidos para tentar prevenir a ocorrência de aderências pós-cirúrgicas através do desenvolvimento de materiais comercializados por indústrias farmacêuticas internacionais, como, por exemplo, INTERCEED[®] (Johnson&Johnson Inc.), Sepragel[®] e Seprafil[®] (Genzyme Co.), CoSeal (Baxter Inc.), CovaTM CARD (Biom'Up).

Recentemente em trabalho desenvolvido por pesquisadores da Faculdade de Medicina (FM/USP), Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP) e Fundação São Francisco Xavier (USIMINAS) propôs-se uma nova abordagem, em que foram utilizados o fator de crescimento de queratinócitos e a N,O-carboximetilquitosana em forma de gel, resultando em efetiva diminuição de adesões pericárdicas em modelos de grandes animais (LOPES et al., 2010).

Entretanto, a presente formulação tem suas aplicações limitadas aos procedimentos cirúrgicos em que não são empregados drenos pós-cirúrgicos. Assim, o desenvolvimento de formulações na forma de filmes ou membranas é uma necessidade visando sua aplicação.

3 OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo produzir e caracterizar membranas porosas de quitosana e de N,O-carboximetilquitosana reticuladas, que apresentem propriedades físicas e químicas adequadas para desempenhar o papel de matriz para a proliferação das células mesoteliais, essenciais no processo de prevenção das aderências pericárdicas.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes

Os reagentes empregados neste trabalho são identificados na **Tabela 1**, os quais não foram purificados, a não ser quando especificado.

Tabela 1 - Reagentes e solventes utilizados durante a realização dos experimentos.

Reagente	Marca
Acetato de Sódio.3H ₂ O	Synth
Ácido Acético Glacial	Synth
Ácido Clorídrico 36,5-38%	Qhemis
Água Deuterada	Cambridge Isotope Laboratories
Brometo de Potássio	Spectrum
N,O-Carboximetilquitosana sódica	Heppe Medical (Alemanha)
N,O-Carboximetilquitosana sódica	Dayang Chemicals CO. (China)
Cloreto de Potássio	Qhemis
Cloreto de Sódio	Qhemis
Etanol	Tec-Lab
Fosfato de Potássio Monobásico	Qhemis
Fosfato de Sódio dibásico	Qhemis
Cloridrato de Glucosamina	Fluka - BioChemika
Glutaraldeído 25%	Acros Organics
Hidróxido de Sódio	Qhemis
Ninidrina	Sigma-Aldrich
Quitosana	Yue Planting Co. (China)

4.2 Purificação de Quitosana

A adição vagarosa de 3,0 g de quitosana em 1,0 L de ácido acético 1% (v/v) resultou em uma suspensão que foi mantida sob agitação constante por aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente. A solução resultante foi filtrada, sob pressão positiva, através de membrana de porosidade 0,45 μm (Millipore – White SCWP). A solução filtrada foi então neutralizada com solução concentrada de NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), provocando a precipitação de quitosana. O precipitado foi filtrado e então lavado com soluções de etanol/água a 75%, 80%, 90% (v/v), etanol absoluto, e seco à temperatura ambiente. A amostra purificada de quitosana foi denominada amostra Q.

4.3 Purificação de Carboximetilquitosana

Em um béquer de 2,0 L foram adicionados 2,0 g de carboximetilquitosana sódica em 1,0 L de água destilada, e a suspensão foi mantida sob agitação constante por aproximadamente 24 horas à temperatura ambiente. Em seguida, a solução resultante foi filtrada sob pressão positiva através de membranas de dimensões médias de poros de 0,45 μm (Millipore – White SCWP). À solução filtrada foi adicionado 1,0 L de solução de NaCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, permanecendo a solução sob agitação por aproximadamente 30 minutos. Em seguida, foi adicionado etanol 95%, em porções de 100 mL e com forte agitação, até que ocorresse a precipitação do polímero. Após a precipitação, a solução permaneceu em repouso até a decantação do precipitado e foram adicionados mais 20 mL de etanol para assegurar que toda carboximetilquitosana havia precipitado. O precipitado foi filtrado e então lavado com soluções de etanol/água 75%, 80%, 90% (v/v), etanol absoluto, e seco à temperatura ambiente. As amostras purificadas de carboximetilquitosana sódica da Heppe Medical e da Dayang Chemicals CO foram denominadas amostras NaCMQH e NaCMQD, respectivamente.

4.4 Caracterizações

4.4.1 Espectroscopia no Infravermelho

Todas as análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas no aparelho BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier no intervalo 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} com acúmulo de 32 varreduras e com resolução de 4 cm^{-1} .

filme de quitosana (amostra Q)

A solução de quitosana foi preparada dissolvendo 0,2 g da amostra Q em 10 mL de solução de ácido clorídrico $0,05\text{ mol L}^{-1}$ por agitação contínua durante 24 horas. A solução obtida foi gotejada sobre pastilha de silício e mantida a 30°C sob vácuo por 24 horas.

filme de carboximetilquitosana sódica (amostras NaCMQH e NaCMQD)

A solução de carboximetilquitosana sódica foi preparada dissolvendo 0,2 g da amostra (NaCMQH ou NaCMQD) em 10 mL de água destilada por agitação contínua durante 24 horas. A solução obtida foi gotejada sobre pastilha de silício e mantida a 30°C sob vácuo por 24 horas.

filme de carboximetilquitosana ácida (amostras HCMQH e HCMQD)

As análises da carboximetilquitosana na forma ácida foram realizadas a fim de melhor evidenciar as características estruturais devidas à presença dos grupos carboximetila nas cadeias do polímero. Assim, 500 mg de carboximetilquitosana sódica (NaCMQH ou NaCMQD) foram suspensos em 50 mL de água destilada e a suspensão foi mantida sob agitação por aproximadamente 24 horas para resultar em solução que foi submetida à diálise contra solução de HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, utilizando membrana para diálise da Viskase Corporation de 21 mm de diâmetro e limite de exclusão de massa molecular de 12.000-16.000 Da. As membranas de diálise contendo a amostra foram colocados em béquer de 2 L com HCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ e a diálise se estendeu por 7 dias, sendo que a cada 24 horas a solução de HCl foi trocada. Este processo foi realizado a fim de trocar os contra-íons Na^{+} por H^{+} . A solução resultante de carboximetilquitosana ácida foi gotejada sobre pastilha de silício e mantida a 30°C sob vácuo por 24 horas.

4.4.2 Análise Condutimétrica

A análise condutimétrica foi utilizada para determinação de grau médio de substituição ($\overline{GS}$) e grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) das amostras de quitosana e de carboximetilquitosana.

solução de quitosana (amostra Q)

Aproximadamente 0,25 g da amostra Q previamente seca em estufa a vácuo a 30°C por 24 horas, foi dissolvida em 100 mL de solução de HCl 0,05 mol L⁻¹, permanecendo sob agitação constante por aproximadamente 24 horas, e após esse período, foram adicionados 150 mL de água destilada.

solução de carboximetilquitosana na forma ácida (amostras HCMQH e HCMQD)

Aproximadamente 0,25 g da amostra de carboximetilquitosana sódica (NaCMQH ou NaCMQD) previamente seca em estufa a vácuo a 30°C por 24 horas, foi dissolvida em 250 mL de água destilada permanecendo sob agitação constante por aproximadamente 24 horas, e após esse período foram adicionados 0,2 mL de HCl concentrado à solução.

Alíquotas de 100 mL das soluções resultantes foram tituladas a 25,0 ± 0,1°C com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ empregando titulador automático Schott Titronic Universal com precisão de 0,01 mL, sendo as medidas de condutividade acompanhadas com condutivímetro Schott modelo Handylab LF1.

Os valores de $\overline{GS}$ das amostras carboximetilquitosana foram calculados utilizando a equação 1.

$$\overline{GS} = \left(1 - \frac{M * [NaOH] * (V_2 - V_1)}{m - (80 * [NaOH] * (V_2 - V_1))} \right) \quad (1)$$

sendo:

$\overline{GS}$ = Grau médio de substituição

M = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (161,0 g mol⁻¹)

[NaOH] = Concentração de NaOH (mol L⁻¹)

V₁ = Volume de base empregado para atingir o primeiro ponto de viragem (L)

V_2 = Volume de base empregado para atingir o segundo ponto de viragem (L)

m = Massa de carboximetilquitosana na forma sódica contida na alíquota de 100 mL.

Na **equação 1**, V_1 corresponde ao volume de solução de NaOH necessário para neutralizar o excesso de HCl presente na solução, e a diferença $V_2 - V_1$ representa o volume da solução de NaOH gasto para neutralizar os grupos carboximetila das cadeias de carboximetilquitosana.

Para determinação do grau médio de acetilação das amostras de quitosana e de carboximetilquitosanas foram utilizadas as **equações 2 e 3**.

$$\% \overline{GD} = \left(\frac{M * [NaOH] * (V_3 - V_2)}{m} \right) * 100 \quad (2)$$

$$\% \overline{GA} = 100 - \% \overline{GD} \quad (3)$$

sendo:

$\% \overline{GD}$ = Grau médio de desacetilação

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

M = Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana ($161,0 \text{ g mol}^{-1}$)

$[NaOH]$ = Concentração de NaOH (mol L^{-1})

V_2 = Volume de base empregado para atingir o segundo ponto de viragem (L)

V_3 = Volume de base empregado para atingir o terceiro ponto de viragem (L)

m = Massa de quitosana ou de carboximetilquitosana na forma sódica contida na alíquota de 100 mL.

Na **equação 2** a diferença $V_3 - V_2$ corresponde ao volume da solução de NaOH gasto para neutralizar os grupos amino das cadeias de quitosana (ou de carboximetilquitosana).

4.4.3 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de alta resolução foi utilizada para a análise das estruturas químicas e para a determinação do grau médio de

acetilação e grau médio de substituição das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD. Os espectros das amostras utilizadas neste trabalho foram obtidos no equipamento BRUKER AVANCE DRX500 (FFLC/RP-USP).

Aproximadamente 10 mg de amostra foram adicionados a 1,0 mL de D₂O/HCl (1% v/v) e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 24 horas, resultando em solução límpida e viscosa. Parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado (Aldrich 527-PP, ϕ = 5mm), e para a aquisição dos espectros de quitosana e carboximetilquitosana foi utilizado supressão de água com sequência de pulsos 1-1, sendo o intervalo entre os pulsos de supressão de 3 segundos, acumulando 32 varreduras e o tempo de relaxação foi de 7 segundos. A janela espectral utilizada foi de 10.0 ppm e tamanho do fid 32K.

O valor de $\overline{GA}$ foi determinado pela razão entre as áreas dos sinais atribuídos aos hidrogênios da metila dos grupos acetamido (-C(O)CH₃ 2,0 ppm) e ao hidrogênio ligado ao C(2) do anel glicosídico (H₂ 3,1 ppm). A **Figura 10** apresenta um espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio característico de quitosana. O valor do grau médio de acetilação por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) foi calculado a partir da **equação 4**.

$$\% \overline{GA} = \left(\frac{A_{CH_3}/3}{A_{H_2}} \right) * 100 \quad (4)$$

sendo:

A_{CH_3} = área dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamido

A_{H_2} = área do sinal do hidrogênio ligado ao carbono C(2) do anel glicopiranosídico

Figura 10 - Espectro de RMN ^1H característico de quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$, onde $\text{R} = -\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ou H .

O valor de $\overline{GS}$, referentes à introdução dos grupos carboximetila em 6-O-, 3-O- e 2-N-, pode ser determinado a partir do espectro de RMN ^1H utilizando o método de Xi-Guang e Hyun-Jin (2003). A **Figura 11** apresenta o espectro de RMN ^1H característico de carboximetilquitosana, onde “a” corresponde aos dois hidrogênios do grupo carboximetila ligado ao C(6) e a um hidrogênio do grupo carboximetila ligado ao C(3) ($-\text{CH}_2\text{COOD}$ 4,1-4,3 ppm), “b” corresponde a um hidrogênio do grupo carboximetila ligado ao C(3) ($-\text{CH}_2\text{COOD}$ 3,9-4,1 ppm), e “c” corresponde aos dois hidrogênio do grupo carboximetila ligado ao nitrogênio do grupo amino ($-\text{}^+\text{ND}_2\text{CH}_2\text{COOD}$ 3,2-3,4 ppm).

Figura 11 - Espectro de RMN ^1H característico de carboximetilquitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$, onde $\text{R}_1 = -(\text{C})\text{OCH}_3$, $-\text{CH}_2\text{COOD}$ ou H , R_2 e $\text{R}_3 = -\text{CH}_2\text{COOD}$ ou H .

A determinação do valor de $\overline{GS}$ por RMN ^1H foi realizada a partir das equações 5 a 8.

$$f_6 = \left(\frac{1}{2}\right) \cdot \frac{A_a - A_b}{A_{H_2}} \quad (5)$$

$$f_3 = \frac{A_b}{A_{H_2}} \quad (6)$$

$$f_2 = \left(\frac{1}{2}\right) \cdot \frac{A_c}{A_{H_2}} \quad (7)$$

$$F = f_6 + f_3 + f_2 \quad (8)$$

sendo:

A_a = área dos sinais dos dois hidrogênios do grupo carboximetila ligado ao C(6) e um hidrogênio do grupo carboximetila ligado ao C(3).

A_b = área do sinal de um hidrogênio do grupo carboximetila ligado ao C(3).

A_c = área dos dois hidrogênios do grupo carboximetila ligado ao N.

A_{H_2} = área do hidrogênio ligado ao carbono C(2).

Os valores de f_6 , f_3 e f_2 correspondem às frações de carboximetilação nas posições 6-O-, 3-O- e 2-N-, respectivamente, enquanto que F é a fração total de carboximetilação.

4.4.4 Solubilidade em função do pH

A determinação da solubilidade das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD em meio aquoso, foi baseada na turbidez de suas soluções. Assim, as amostras foram dissolvidas em água deionizada ($C_p = 1,5 \text{ g L}^{-1}$), os pHs das soluções foram ajustados com soluções aquosas de HCl e NaOH 0,5% (m/v) e a absorbância das soluções em 600 nm foi registrada em um espectrômetro UV-VIS: SPECTROPHOTOMETER JASCO – modelo V-630 utilizando-se uma cela de quartzo de 1 cm. O equipamento registra um espectro que mostra que a absorbância aumenta em determinadas condições de pH, pois as partículas em suspensão, ou seja, as partículas das amostras insolúveis em determinados valores de pH, difratam e espalham a radiação luminosa que, portanto, não atinge o detector. Assim o espectro registra o aumento da absorção como consequência da presença de partículas (materiais insolúveis) em suspensão (ABREU, 2006).

Com isso foram consideradas insolúveis as amostras que em determinados valores de pH apresentaram aumento na absorbância em 600 nm (SONG et al., 2011; XI-GUANG; HYUN-JIN, 2003).

4.4.5 Determinação da Massa Molar Média Viscosimétrica

Para a determinação da viscosidade intrínseca de quitosana, aproximadamente 50 mg da amostra Q (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 24h) foram suspensos em 25 mL de solução de ácido acético $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética constante durante 24 horas. Em seguida foram adicionados 25 ml de acetato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ e a agitação procedeu por mais 24 horas. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de $0,45\mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP). As medidas do tempo de escoamento foram realizadas a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ empregando tampão ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ /acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,5) para as sucessivas diluições isoônicas.

Para a determinação da viscosidade intrínseca de carboximetilquitosana sódica (amostras NaCMQH e NaCMQD), aproximadamente 50 mg de amostra (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 24h) foram suspensos em 25 mL de água destilada, mantidos sob agitação magnética constante por 24 horas, em seguida foi adicionado 25 ml de solução de NaCl 0,2 mol L⁻¹ e a agitação procedeu por mais 30 min. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 µm (Millipore – White SCWP). As medidas de tempo de escoamento foram realizadas a 30,00 ± 0,01°C em solução de NaCl 0,1 mol L⁻¹ empregada para as sucessivas diluições isoiônicas (GE; LUO, 2005).

Alíquota de 15 mL da solução foi transferida para um viscosímetro capilar de vidro (do tipo Ubbelohde, $\phi = 0,53$ mm) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (SCHOTT).

Como as soluções de quitosana e carboximetilquitosana sódica apresentam comportamento polieletrólítico típico, a viscosidade pode ser descrita como função da viscosidade intrínseca $[\eta]$ do polieletrólito e de sua concentração, quando houver uma força iônica suficientemente elevada e não houver interações macromoleculares (sistema diluído). Neste caso, a relação de Huggins (ROBERTS, 1992) pode ser aplicada (**equação 9**).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (9)$$

sendo:

$\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL/g);

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL/g);

k_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g/mL).

Desta forma, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) pode ser determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida *versus* concentração. A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink (**equação 10**) e, desta forma, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) do polieletrólito pode ser determinada.

$$[\eta] = K' \overline{M}_v^\alpha \quad (10)$$

onde K' e α são constantes para um dado solvente em uma dada temperatura (RINAUDO, 1993).

4.5 Preparação das Membranas

As membranas porosas foram confeccionadas por liofilização das soluções de quitosana e de carboximetilquitosana sódica. A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 1,0 g da amostra Q em 100 mL de solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido acético. As soluções de carboximetilquitosana sódica foram preparadas pela dissolução de 2,0 g de amostra (NaCMQH ou NaCMQD) em 100 mL de água deionizada. Em seguida as soluções de carboximetilquitosana sódica foram misturadas à solução aquosa de glutaraldeído, para resultar em soluções de concentração 1% (g/v) em polímero e cuja concentração de glutaraldeído foi variada (0,25 x10⁻³ mol L⁻¹; 0,5 x10⁻³ mol L⁻¹; 1,0 x10⁻³ mol L⁻¹; 2,5 x10⁻³ mol L⁻¹ e 5 x10⁻³ mol L⁻¹).

As soluções resultantes foram sonicadas em banho ultrassônico para a remoção das bolhas de ar, e então vertidas em placas de Petri (a relação área do disco/volume de solução foi de 2,0 cm² mL⁻¹) e mantidas à temperatura ambiente por 6 horas para que ocorresse a reticulação. Em seguida as membranas foram congeladas e liofilizadas.

As membranas liofilizadas foram neutralizadas com solução aquosa de NaOH (0,05 mol L⁻¹) no caso das membranas de quitosana, e solução tampão de ácido acético 0,3 mol L⁻¹ / acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH = 4,5) para as membranas de carboximetilquitosana, e lavadas com água destilada para remover o excesso de glutaraldeído e de sais presentes. Após a lavagem, as membranas foram liofilizadas novamente.

A **Tabela 2** apresenta as composições das membranas confeccionadas e os símbolos empregados para identificá-las.

Tabela 2 - Composição das membranas de quitosana e de carboximetilquitosana^(a).

Amostra	Descrição
M-Q	Membrana de quitosana
M-CMQH	Membrana de carboximetilquitosana da Heppe
M-CMQH-2,5	Membrana de carboximetilquitosana da Heppe reticulada com $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-5	Membrana de carboximetilquitosana da Heppe reticulada com $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-10	Membrana de carboximetilquitosana da Heppe reticulada com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-25	Membrana de carboximetilquitosana da Heppe reticulada com $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQH-50	Membrana de carboximetilquitosana da Heppe reticulada com $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD	Membrana de carboximetilquitosana da Dayang
M-CMQD-2,5	Membrana de carboximetilquitosana da Dayang reticulada com $0,25 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-5	Membrana de carboximetilquitosana da Dayang reticulada com $0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-10	Membrana de carboximetilquitosana da Dayang reticulada com $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-25	Membrana de carboximetilquitosana da Dayang reticulada com $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído
M-CMQD-50	Membrana de carboximetilquitosana da Dayang reticulada com $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de glutaraldeído

(a) as soluções de quitosana e carboximetilquitosana empregadas na confecção das membranas foram de concentração 1% (m/v).

4.6 Caracterizações das Membranas

4.6.1 Espessura

A espessura e o percentual de contração das membranas (M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs) foram avaliados com o auxílio de um paquímetro digital marca Pro-Max modelo NSK (Japão) com resolução de 0,01 mm. Para as medidas de espessura foram avaliados 5 pontos aleatórios de cada amostra.

O percentual de contração das membranas foi calculado utilizando a **equação 11**:

$$\% \text{Contração} = \left(1 - \frac{A_m}{A_d}\right) * 100 \quad (11)$$

sendo:

A_m = área de membrana (mm²).

A_d = área da placa de Petri onde as membranas foram confeccionadas (5.027 mm²)

4.6.2 Determinação do Grau de Reticulação

O grau de reticulação das membranas de carboximetilquitosana (M-CMQHs e M-CMQDs) foi determinado através do ensaio de ninidrina (MI, 2005), o qual permite determinar o percentual de grupos amino que não reagiram durante a reação de reticulação com o glutaraldeído.

Aproximadamente 20 mg de amostra foram adicionados a 2,0 mL de solução de ninidrina 2% (m/v) e a suspensão foi aquecida a 100°C por 20 minutos. À solução resultante foi adicionado água para completar 10 mL e o teor de grupos amino livre nas amostras foi determinado pela medida da absorbância em 570 nm, empregando equipamento UV-VIS: SPECTROPHOTOMETER JASCO modelo V-630, sendo que a curva de calibração foi elaborada usando soluções de cloridrato de glucosamina em diferentes concentrações (**Figura 12**).

Figura 12 - Curva de calibração do ensaio de ninidrina elaborada a partir das soluções de cloridrato de glucosamina ($r = 0,992$).

A reação de ninidrina é específica para grupos amino primários ($R-NH_2$), os quais reagem com ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona), como observado na **Figura 13**, levando à formação de um produto conhecido como *púrpura de Ruhemann* (3-hidroxi-2-(2-amino-hidrindeno-1,3-diona)-hidrindeno-1-ona) de coloração violeta intensa.

Figura 13 – Reação da ninidrina com grupo amino primário.

Esta reação tem sido estudada há anos, é amplamente utilizada para a análise de aminoácidos e também tem sido utilizada para a determinação do grau de reticulação e em estudos de degradação enzimática de quitosana (YAN et al. 2010).

Prestrelski et al. (1992) estudaram um método simples para a análise quantitativa de quitosana através do teste de ninidrina e observaram que a reação de quitosanas com ninidrina é rápida, sensível e reprodutível, sendo um método eficiente para a determinação da quantidade de grupos amino livre a partir de uma curva de calibração.

Sahu et al. (2009) estudaram a desacetilação de quitina por irradiação de microondas e empregaram o teste de ninidrina para determinar o grau médio de desacetilação das quitosanas obtidas, observando que o grau de desacetilação aumenta com o aumento do tempo de irradiação.

Yan et al. (2010) estudaram a confecção de suportes porosos de colágeno/quitosana reticulados com genipina e utilizaram o teste de ninidrina para a determinação do grau médio de reticulação das amostras produzidas. Através do teste de ninidrina foi observado que o aumento da concentração de quitosana resultou em reticulação mais eficiente.

Também são citados estudos das propriedades de membranas de quitosana reticuladas com glutaraldeído (MI et al., 2001) e das membranas de quitosana reticuladas com genipina (MI et al., 2005), nos quais o teste de ninidrina foi empregado para a determinação do grau de reticulação e para acompanhar a degradação enzimática das membranas formadas. Nesses estudos foram observados que com o aumento da concentração do agente reticulante houve diminuição do teor de grupos amino livre, indicando o aumento do grau de reticulação e a menor susceptibilidade das membranas de quitosana à hidrólise enzimática.

4.6.3 Grau de Hidratação

Os ganhos percentuais de massa devido à hidratação das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs foram determinados após imersão das membranas (fragmentos de 10x10 mm) em solução salina de tampão fosfato (PBS, pH=7,4) à temperatura ambiente por 48 horas. Após a imersão, a massa da membrana hidratada foi determinada removendo-se o excesso de água superficial com papel toalha, e pesando imediatamente as membranas. O grau de hidratação das membranas em PBS foi calculada utilizando a **equação 12**:

$$H = \frac{M_h - M_0}{M_0} * 100 \quad (12)$$

sendo:

H = Grau de hidratação da membrana

M_h = Massa da membrana hidratada (g)

M₀ = Massa da membrana seca (g)

4.6.4 Solubilidade e Estabilidade em Solução Salina de Tampão Fosfato (PBS)

As amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs previamente secas em estufa a 30°C por 24 horas, foram imersas em solução PBS (pH=7,4) por 48 horas à temperatura ambiente. Após a imersão, as membranas foram secas em estufa a 30°C por 24 horas e então pesadas para determinar a quantidade de substâncias extraídas das membranas. O percentual de massa da membrana recuperada após imersão em solução PBS foi calculado utilizando-se da equação 13:

$$\%MR = \frac{M_2}{M_1} * 100 \quad (13)$$

sendo:

%MR = percentual de massa da membrana recuperada após imersão em solução PBS

M₁ = massa da membrana antes da imersão em solução PBS (g)

M₂ = massa da membrana após a imersão em solução PBS (g)

4.6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia da superfície das amostras purificadas na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) e das membranas (M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs), foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura digital LEO-440, sendo as amostras colocadas sobre uma fita adesiva de carbono no porta-amostra de alumínio. Para a análise de fratura das membranas, estas foram imersas em nitrogênio líquido, fraturadas com o auxílio de uma pinça e colocadas sobre um porta-amostra transversal. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 30°C por 6 horas, posteriormente foram recobertas com ouro, com espessura de recobrimento de 30 nm. Nestas análises a corrente de feixe utilizada foi de 0,75 mA e a potência do feixe de 20 kV, o detector utilizado foi o detector de elétrons secundários (SE1). As imagens obtidas foram tratadas digitalmente utilizando o programa “Image J”.

Para analisar as micrografias com o programa Image J, inicialmente foi realizada a calibração da imagem, utilizando como padrão a barra de escala fornecida nas micrografias. Após a calibração a imagem foi ajustada com a opção ‘Threshold’, que ativa o filtro para a imagem eliminando da análise os espaços vazios entre as partículas, ou eliminando a área

entre os poros para as membranas (**Figura 14**), para a determinação do diâmetro médio (μm), da área média (μm^2) e do número de partículas ou de poros aparente.

Figura 14 - Ajuste da imagem, com a função ‘Threshold’: a) micrografia das partículas; b) ajuste da micrografia das partículas utilizando a função ‘Threshold’; c) micrografia da membrana; d) ajuste da micrografia da membrana utilizando a função ‘Threshold’.

4.6.5 Difração de Raios X

A análise de difração de raios X foi realizada para avaliar as alterações de cristalinidade das amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) e na forma de

membranas (M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs). As medidas de difração de raios X foram realizadas em difratômetro RIGAKU com tubo de cobre ($\lambda = 1,54\text{\AA}$), no intervalo de 3-50°, empregando varredura contínua com velocidade de 1°/min. A tensão e a corrente utilizadas foram de 40kV e 30mA, respectivamente.

4.6.6 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica das amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) e na forma de membranas (M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs) foi estudada através de análise termogravimétrica, utilizando o equipamento TGA-50, da Shimadzu, empregando atmosfera dinâmica de ar sintético (20% O₂ e 80% N₂) a uma vazão de 20 mL min⁻¹ e porta amostra de platina. As amostras foram aquecidas a uma razão de 10 °C min⁻¹, desde 25°C até 110°C (permanecendo a 110°C durante 10 min, para eliminação de água), e de 110°C até 800°C (permanecendo a 800°C por 5 min). A quantidade de amostra utilizada em cada análise foi de aproximadamente 8,0 mg.

As amostras analisadas foram previamente armazenadas em um dessecador contendo sílica gel durante 15 dias.

4.6.7 Propriedades Mecânicas

As propriedades mecânicas das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs foram avaliadas através de análise dinâmica mecânica no modo de tração. As amostras foram hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas antes do teste, e os testes de tração foram realizados em equipamento TA instruments DMA Q800 utilizando uma garra do tipo *Tension film*. As amostras foram cortadas em formato retangular, com dimensões 30 x 6,5 mm. O teste foi realizado com espaço entre garras de 15 mm, com uma rampa de força de 0,1 N min⁻¹ até 18 N e uma força de pré-carga de 0,01 N, à temperatura 37°C. As propriedades determinadas a partir das análises dinâmica mecânica no modo de tração foram: resistência máxima à tração (MPa), módulo de elasticidade (MPa) e percentual de elongação (%).

4.6.8 Degradação Enzimática

A degradação enzimática *in vitro* das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs foi determinada após imersão em solução PBS (pH=7,4) contendo lisozima 1.000 U mL⁻¹, e incubação a 37°C até 15 dias. Após a degradação, a formação de oligômeros contendo unidades glucosamina (GlcN), devido à clivagem das ligações glicosídicas de quitosana e de carboximetilquitosana, foi determinada pelo ensaio de ninidrina descrito anteriormente. O grau de degradação foi estudada através da análise do aumento da concentração de GlcN em função do tempo de incubação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Este capítulo foi dividido em duas partes. A primeira parte descreve a purificação e a caracterização das amostras de quitosana e de carboximetilquitosana. Para tais caracterizações foram empregadas as seguintes técnicas: espectroscopia no infravermelho, condutimetria, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), viscosimetria capilar, solubilidade em função do pH e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A segunda parte descreve a produção e a caracterização das membranas porosas (M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs). Para tal caracterização foram empregadas as seguintes técnicas: análise elementar, teste de ninidrina, absorção de água, estabilidade em solução PBS, microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X, termogravimetria, teste mecânico de tração e teste de degradação enzimática.

5.1 Purificação das Amostras de Quitosana e de Carboximetilquitosana

A aplicação dos materiais poliméricos nas áreas médica e farmacêutica demanda substratos ultrapuros, e assim, amostras homogêneas e completamente solúveis de polissacarídeos só são obtidas após um criterioso processo de purificação (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998).

A quitosana purificada na forma neutra (amostra Q) apresentou-se na forma de um pó fino de coloração levemente amarelada, o qual foi solúvel em ácido acético 1% (v/v) na concentração de 3 g L^{-1} . A solução resultante apresentou uma leve coloração amarelada e ausência de resíduos insolúveis.

A amostra de carboximetilquitosana sódica adquirida da Heppe Medical após ser purificada (NaCMQH) apresentou-se na forma de um pó fino de coloração branca. A amostra NaCMQH foi solúvel em água na concentração de 2 g L^{-1} , e a solução resultante apresentou-se límpida e muito viscosa, não apresentando resíduos insolúveis.

A amostra de carboximetilquitosana sódica adquirida da Dayang Chemicals CO. após ser purificada (NaCMQD) apresentou-se na forma de um pó fino de coloração amarelada. A amostra NaCMQD não foi completamente solúvel em água na concentração de 2 g L^{-1} , apresentou grande quantidade de materiais insolúveis, dificultando o processo de purificação, o que demandou a execução de várias etapas de filtração para a completa remoção dos materiais insolúveis. A solução resultante apresentou coloração amarelada, e o rendimento do procedimento de purificação foi reduzido ($< 75\%$) devido à grande quantidade de materiais insolúveis e às perdas por manipulação.

A **Tabela 3** apresenta os valores de massa inicial das amostras, massa das amostras purificadas e o rendimento dos processos de purificação das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD.

Tabela 3 - Valores de massa inicial, massa recuperada após a purificação e o rendimento do procedimento de purificação.

Amostras	Massa Inicial (g)	Massa Purificada (g)	Rendimento (%)
Q	2,12	1,98	93,4
NaCMQH	2,01	1,74	86,6
NaCMQD	2,04	1,51	74,0

5.2 Caracterizações

5.2.1 Espectroscopia no Infravermelho

A partir das análises de espectroscopia no infravermelho foram identificados os modos de vibração característicos das amostras de quitosana e de carboximetilquitosanas.

O espectro da amostra Q (**Figura 15**) apresentou bandas nos intervalos de $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (deformações axiais de —O—H e —N—H), $2895\text{-}2720\text{ cm}^{-1}$ (deformação axial de —C—H), 1610 cm^{-1} (deformação axial de —C=O banda de amida I), 1510 cm^{-1} (deformação angular de —NH_3^+), 1380 cm^{-1} (deformação angular de —C—H), 1305 cm^{-1} (deformação axial de —C—N), 1155 cm^{-1} (deformação angular de —O—H em ligação de hidrogênio) e 1085 cm^{-1} (deformação angular de —C—O—) (SANTOS et al., 2003; DELEZUK, 2009).

Figura 15 - Espectro na região do infravermelho da amostra Q.

Os espectros das amostras de carboximetilquitosana sódica (**Figuras 16 e 17**) apresentaram bandas similares às encontradas no espectro da amostra Q, nos intervalos de $3600\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ (deformações axiais de —O—H e —N—H), 2895 cm^{-1} (deformação axial de —C—H), 1630 cm^{-1} (deformação angular —NH_2 e deformação axial de —C=O) e $1070\text{-}1136\text{ cm}^{-1}$ (deformação angular de —C—O—). A banda centrada em 1411 cm^{-1} é característica de carboximetilquitosana sódica e não ocorre no espectro da amostra Q, pois corresponde a deformações axiais simétricas e assimétricas de —COO^- (XI-GUANG; HYUN-JIN, 2003; ABREU, 2006).

Figura 16 - Espectros na região do infravermelho das amostras NaCMQH e HCMQH.

Figura 17 - Espectros na região do infravermelho das amostras NaCMQD e HCMQD.

Independentemente da natureza da amostra, os espectros de carboximetilquitosana na forma ácida (HCMQH e HCMQD) apresentam um alargamento da banda de estiramento de —OH na região de $3600\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ quando comparados ao espectro de carboximetilquitosana sódica (NaCMQH e NaCMQD), devido aos grupos —OH das carboximetilas. Com a conversão da amostra de carboximetilquitosana da forma sódica (NaCMQH e NaCMQD) para a forma ácida (HCMQH e HCMQD) houve um deslocamento da banda em 1630 cm^{-1} (deformação axial —COO^-) para 1740 cm^{-1} (deformação axial —COOH), e da banda em 1411 cm^{-1} (deformação axial assimétrica —COO^-) para 1230 cm^{-1} (deformação axial assimétrica —COOH), enquanto a banda em 1630 cm^{-1} (deformação angular —NH_2) foi deslocada para 1510 cm^{-1} (deformação angular —NH_3^+), evidenciando a presença dos grupos carboximetila e de grupos amino nas amostras NaCMQH e NaCMQD.

5.2.2 Análise Condutimétrica

A curva de titulação condutimétrica da amostra Q solubilizada em HCl diluído (**Figura 18**), permitiu a determinação do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$). O pH inicial da solução da amostra Q foi de aproximadamente 2,2, o que assegurou que todos os grupos $-NH_2$ das cadeias de quitosana se encontrassem na forma $-NH_3^+$, pelo fato que o pK_a para esse grupo é de aproximadamente 6,5 (CAMPANA FILHO et al., 2003; ROBERTS, 1992).

Na curva de titulação condutimétrica da amostra Q (**Figura 18**), a forte inclinação na primeira parte da curva, corresponde à titulação do excesso de ácido forte presente. Após esse primeiro ponto de viragem (V_1), os grupos amônio ($-NH_3^+$) existentes ao longo das cadeias da amostra Q começa a ser neutralizados. O segundo ponto de inflexão (V_2) corresponde ao fim da neutralização dos grupos amônio, e a partir desse ponto, a adição de excesso de base resulta no aumento de concentração de íons hidroxila na solução e uma elevação mais acentuada da condutividade.

Os volumes de base gastos para atingir os dois pontos de equivalência (V_1 e V_2) foram determinados por extrapolação das seções lineares da variação da condutividade em função do volume de titulante.

Figura 18 - Curva de titulação condutimétrica da amostra Q.

A curva de titulação condutimétrica da amostra NaCMQH solubilizada em HCl diluído (**Figura 19**), permitiu a determinação do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e do grau médio de substituição ($\overline{GS}$). O pH inicial da solução de NaCMQH foi de aproximadamente 2,0, assegurando que todos os grupos amino e carboximetila nas cadeias de carboximetilquitosana encontram-se nas formas $-\text{NH}_3^+$ e $-\text{CH}_2\text{COOH}$, respectivamente.

A curva de titulação da amostra NaCMQH é mais complexa que a da amostra Q devido à dificuldade na determinação dos pontos de equivalência, devido à pequena variação na inclinação das seções lineares da titulação dos grupos $-\text{CH}_2\text{COOH}$ (ROBERTS, 1992).

Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica da amostra NaCMQH.

Na curva de titulação condutimétrica da amostra NaCMQH (**Figura 19**) observa-se que a região entre o início da titulação e o volume V_2 ocorre uma pequena curvatura, que não ocorre na curva de titulação da amostra Q. A primeira seção linear da curva de titulação da amostra NaCMQH corresponde à titulação do excesso de ácido forte presente. A segunda seção linear da curva (V_1 a V_2) corresponde ao volume de NaOH necessário para a neutralização dos grupos $-\text{CH}_2\text{COOH}$. A terceira seção linear da curva de titulação (V_2 a V_3) corresponde ao volume de base utilizado para neutralizar os grupos amônio

($-\text{NH}_3^+$, $-\text{NH}_2(\text{CH}_2\text{COOH})$, $-\text{NH}(\text{CH}_2\text{COOH})_2$). A quarta seção linear da curva de titulação corresponde à adição de excesso de base, resultando no aumento de concentração de íons hidroxila na solução e na elevação mais acentuada da condutividade.

A fim de padronizar as análises e as tornar mais precisas, os pontos experimentais obtidos pelas curvas de titulações condutimétricas (**Figura 18 e 19**) foram ajustados a partir da regressão linear das seções lineares das curvas, e os pontos de equivalência foram determinados pela interseção das retas. Os valores dos volumes obtidos foram introduzidos nas **equações 1, 2 e 3** e utilizados para o cálculo do grau médio de acetilação ($\overline{\text{GA}}$) e do grau médio de substituição ($\overline{\text{GS}}$) (**Tabela 4**).

Tabela 4 - Valores de $\overline{\text{GS}}$ e $\overline{\text{GA}}$ ^(a) das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD determinados por titulação condutimétrica.

Amostras	$\overline{\text{GS}}$	$\overline{\text{GA}}$ (%)
Q	-	17,78 ($\pm 2,11$)
NaCMQH	1,76 ($\pm 0,45$)	17,99 ($\pm 5,01$)
NaCMQD	1,52 ($\pm 0,38$)	4,91 ($\pm 2,57$)

(a) média de duas determinações independentes.

5.2.3 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)

A análise dos espectros de RMN ^1H das amostras Q, HCMQH e HCMQD foi realizada a fim de identificar as características estruturais das amostras, além de permitir a determinação do grau médio de acetilação das amostras Q, HCMQH e HCMQD, e o padrão de substituição dos grupos carboximetila nas amostras HCMQH e HCMQD.

O espectro de RMN ^1H da amostra Q (**Figura 20**) apresenta sinais característicos (XI-GUANG; HYUN-JIN, 2003) dos hidrogênios metílicos do grupo $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ em 2,00 ppm, do hidrogênio ligado ao C(2) em 3,05 ppm, dos hidrogênios ligados aos C(3) a C(6) do anel de glicopiranosose na região de 3,40 a 3,90 ppm, e dos sinais do hidrogênio ligado ao C(1) em 4,75 ppm.

Figura 20 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz) da amostra Q em DCl/D $_2$ O 1% (v/v) a 90°C.

As **Figuras 21** e **22** mostram os espectros de RMN ^1H das amostras HCMQH e HCMQD, respectivamente. Os espectros das amostras de carboximetilquitosana são semelhantes e apresentam sinais dos hidrogênios metílicos do grupo $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ em 2,00 ppm, hidrogênio ligado ao C(2) na região de 3,10 a 3,25 ppm, dos hidrogênios dos grupos $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOD}$ em 3,35 ppm, dos hidrogênios ligados aos C(3) a C(6) do anel de glicopirranose na região de 3,50 a 4,00 ppm, e da região de 4,00 a 4,40 ppm, corresponde à ressonância dos hidrogênios dos grupos $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOD}$ ligados ao C(3) e C(6) do anel glicopirranose, sendo o sinal em 4,05 ppm correspondente a 1 hidrogênio do grupo $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOD}$ ligados ao C(3), e o pico na região de 4,10 a 4,40 ppm correspondente a 3 hidrogênios do grupo $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOD}$ ligados ao C(3) (1 hidrogênio) e ao C(6) (2 hidrogênios). Estes sinais são característicos de carboximetilquitosana (SONG et al., 2011; XI-GUANG; HYUN-JIN, 2003; TIEN AN et al., 2009) e estão presentes nos espectros de ambas as amostras de carboximetilquitosana (HCMQH e HCMQD).

Figura 21 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz) da amostra HCMQH em DCl/D₂O 1% (v/v) a 90°C.

Figura 22 - Espectro de RMN ¹H (500 MHz) da amostra HCMQD em DCl/D₂O 1% (v/v) a 90°C.

O padrão de substituição dos grupos carboximetila das amostras HCMQH e HCMQD, e o grau de acetilação das amostras Q, HCMQH e HCMQD são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Valores de grau médio de substituição nos grupos hidroxila ($\overline{GS}_{6-O}$ e $\overline{GS}_{3-O}$) e amino ($\overline{GS}_{2-N}$) das amostras HCMQH e HCMQD, e de $\overline{GA}$ de carboximetilquitosanas e quitosana (amostra Q).

Amostras	(a) $\overline{GS}_{6-O}$	(b) $\overline{GS}_{3-O}$	(c) $\overline{GS}_{2-N}$	(d) $\overline{GS}_{RMN\ ^1H}$	(e) $\overline{GS}_{cond.}$	(f) $\% \overline{GA}_{RMN\ ^1H}$	(g) $\% \overline{GA}_{cond.}$
Q	-	-	-	-	-	23,60	17,78 ($\pm 2,11$)
HCMQH	1,04	0,44	0,20	1,68	1,76 ($\pm 0,45$)	16,32	17,99 ($\pm 5,01$)
HCMQD	0,75	0,45	0,23	1,43	1,52 ($\pm 0,38$)	3,31	4,91 ($\pm 2,57$)

(a) grau médio de substituição do grupo OH ligado ao C(6) da unidade repetitiva do polímero; (b) grau médio de substituição do grupo OH ligado ao C(3) da unidade repetitiva do polímero; (c) grau médio de substituição do grupo NH_2 ligado ao C(2) da unidade repetitiva do polímero; (d) grau médio de substituição determinado por RMN 1H ; (e) grau médio de substituição determinado por condutimetria; (f) grau médio de acetilação determinado por RMN 1H ; (g) grau médio de acetilação determinado por condutimetria.

A análise de RMN 1H das amostras HCMQH e HCMQD mostra que ambas as amostras apresentaram elevado grau de substituição, sendo a substituição na hidroxila de C(6) a substituição predominante, entretanto, tanto a amostra HCMQH quanto a amostra HCMQD apresentaram $\overline{GS}$ de aproximadamente 0,45 com relação à hidroxila do C(3) e 0,20 para a substituição no grupo amino do C(2).

Comparando os valores de $\overline{GS}$ e $\overline{GA}$ determinados por RMN 1H e por condutimetria, foi possível observar que ambas as técnicas apresentam valores próximos de $\overline{GS}$ e $\overline{GA}$.

5.2.4 Massa Molar Média Viscosimétrica

As curvas de viscosidade das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD são mostradas nas **Figuras 23, 24 e 25**, respectivamente. Pode ser observado que os pontos experimentais apresentam uma correlação linear elevada ($r > 0,99$), mostrando que as condições experimentais empregadas para a determinação da viscosidade foram adequadas, principalmente no que diz respeito à manutenção da força iônica durante o procedimento de diluição das soluções poliméricas.

Assim, as viscosidades intrínsecas ($[\eta]$) das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD foram determinadas a partir da extrapolação das curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração à diluição infinita, e as respectivas massas molares médias viscosimétricas ($\bar{M}_v$) foram calculadas de acordo com a equação de Mark-Houwink (**equação 10**). Os seguintes valores dos parâmetros K' e α da equação de Mark-Houwink foram empregados para calcular os valores de $\bar{M}_v$: a) quitosana: $K' = 74,0 \times 10^{-5}$, $\alpha = 0,76$ (KASAAI, 2007) e b) carboximetilquitosanas $K' = 7,92 \times 10^{-5}$, $\alpha = 1,00$ (GE; LUO, 2005). Os valores de $[\eta]$ e de $\bar{M}_v$ das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD são apresentados na **Tabela 6**.

Figura 23 - Curva de viscosidade reduzida *versus* concentração da amostra Q em solução tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹ / acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ à temperatura de 25°C.

Figura 24 - Curva de viscosidade reduzida *versus* concentração da amostra NaCMQH em solução de cloreto de sódio 0,1 mol L⁻¹ à temperatura de 30°C.

Figura 25 - Curva de viscosidade reduzida *versus* concentração da amostra NaCMQD em solução de cloreto de sódio 0,1 mol L⁻¹ à temperatura de 30°C.

Tabela 6 - Valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$)^(a) e de massa molar média viscosimétrica ($\bar{M}_v$) de quitosana (amostra Q) e carboximetilquitosana (amostras NaCMQH e NaCMQD).

Amostras	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)	$\bar{M}_v$ (g mol ⁻¹)
Q	412 ($\pm$ 1)	84.943 ($\pm$ 39)
NaCMQH	600 ($\pm$ 15)	75.760 ($\pm$ 1.833)
NaCMQD	162 ($\pm$ 4)	20.476 ($\pm$ 550)

(a) média de três determinações independentes.

A partir dos resultados contidos na **Tabela 6** é possível observar que a amostra Q apresenta baixa massa molar média, e que a amostra NaCMQD apresenta massa molar média significativamente inferior quando comparada à amostra de NaCMQH.

5.2.5 Solubilidade em Função do pH

A solubilidade das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD em solução aquosa de diferentes valores de pH foi determinada através de análises de UV-VIS.

A **Figura 26** mostra as curvas de absorbância *versus* comprimento de onda para soluções da amostra Q de diferentes pHs.

Figura 26 - Curvas de comprimento de onda *versus* absorvância da amostra Q em soluções com diferentes valores de pH.

A partir de tais medidas foi possível correlacionar as absorvâncias em $\lambda = 600 \text{ nm}$ ($A_{600\text{nm}}$) das soluções das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD com os pHs das respectivas soluções (**Figuras 27, 28 e 29**).

Figura 27 - Curva absorvância ($A_{600\text{nm}}$) *versus* pH das soluções da amostra Q.

Figura 28 Curva absorbância (A_{600nm}) *versus* pH das soluções da amostra NaCMQH.

Figura 29 - Curva absorbância (A_{600nm}) *versus* pH das soluções da amostra NaCMQD.

As curvas $A_{600\text{nm}}$ *versus* pH (**Figuras 27, 28 e 29**) permitiram avaliar as solubilidades das amostras Q, NaCMQH e de NaCMQD em função do pH de suas soluções, revelando em que meios tais amostras são solúveis ou insolúveis (**Figuras 30**).

Figura 30 - Solubilidade das amostras Q, NaCMQH e de NaCMQD em função do pH de suas soluções^(a).

(a) ■ representam os meios em que a amostra é insolúvel e □ representam os meios em que a amostra é solúvel.

De acordo com tais dados, a amostra Q foi solúvel apenas em meios ácidos ($\text{pH} \leq 6,0$), o que é atribuído à protonação dos grupos amino ($-\text{NH}_2 \rightarrow -\text{NH}_3^+$) das unidades GlcN das cadeias de quitosana, resultado que é corroborado por Xi-Guang e Hyun-Jin (2003). De fato, a protonação dos grupos amino resulta na quaternização do átomo de nitrogênio e a quitosana é um polieletrólito catiônico em meios ácidos (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009).

Por outro lado, as amostras NaCMQH e NaCMQD exibem solubilidades mais amplas quando comparadas à amostra Q, sendo solúveis em meios ácidos ($\text{pH} < 2,5$), pois também possuem grupos amino em suas cadeias, e também em meios alcalinos ($\text{pH} > 7$), devido à dissociação dos grupos carboximetila ($-\text{COOH} \rightarrow -\text{COO}^-$), o que confere caráter de polieletrólito aniônico ao polímero em tais meios.

A solubilidade das amostras NaCMQH e NaCMQD é determinada pelo balanço de cargas positivas e negativas devido à presença de grupos amônio ($-\text{NH}_3^+$) e de grupos carboxilato ($-\text{COO}^-$), sendo que os grupos amino ($-\text{NH}_2$) e carboximetila ($-\text{COOH}$) possuem

$pK_a \approx 6,5$ e $pK_a \approx 3,0$, respectivamente. Aparentemente, o principal fator que determina a solubilidade de carboximetilquitosana em um dado meio é o excesso de cargas positivas ou negativas, sendo a insolubilidade atribuída ao número insuficiente de cargas ao longo das cadeias poliméricas. Assim, a amostra NaCMQH foi insolúvel no intervalo $2,5 \leq pH \leq 6,5$, enquanto que a amostra NaCMQD foi insolúvel no intervalo $3,0 \leq pH \leq 7,0$, o que é atribuído ao fato de tais polímeros serem anfifílicos e não possuírem, em tais meios, cargas suficientes ao longo de suas cadeias. Também foi observado que a solubilidade de carboximetilquitosana foi afetada pelo conteúdo de grupos substituintes e pela massa molar média, visto que a amostra mais substituída e de maior massa molar média (amostra NaCMQH) foi insolúvel no intervalo de $2,5 \leq pH \leq 6,5$, enquanto que a amostra menos substituída e de menor massa molar média (amostra NaCMQD) foi insolúvel no intervalo de $3,0 \leq pH \leq 7,0$. Assim, com o aumento do grau de substituição houve um deslocamento da região insolúvel do polímero para menores pHs, resultado que é corroborado por Abreu e Campana-Filho (2009), sendo que a amostra de carboximetilquitosana mais substituídas foi insolúvel no intervalo de $1,4 \leq pH \leq 6,6$, enquanto que a amostra menos substituída foi insolúvel no intervalo de $2,5 \leq pH \leq 7,2$.

Tais resultados mostram que as amostras NaCMQH e NaCMQD exibem uma ampla faixa de solubilidade e, independentemente do valor de $\overline{GS}$, as amostras de carboximetilquitosana empregadas neste estudo são solúveis em um intervalo de pH mais amplo do que aquele em que quitosana (amostra Q) é solúvel.

5.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma das principais técnicas de caracterização da morfologia dos polímeros (TIAN; CUI; YAO, 2009). Nas **Figuras 31, 32 e 33** pode-se observar a morfologia das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD, respectivamente.

Figura 31 - Micrografia da amostra Q com aproximações de: (a) 100x, (b) 500x, (c) 1.000x, (d) 10.000x.

A partir das micrografias da amostra Q (**Figura 31**), foi possível observar que a superfície da quitosana purificada na forma neutra se apresenta rugosa, irregular e destituída de um padrão de ordenamento reconhecível, resultado que é corroborado por Signini e Campana Filho (2001).

(a)

(b)

(c)

(d)

Figura 32 - Micrografia da amostra NaCMQH com aproximações de: (a) 100x, (b) 500x, (c) 1.000x, (d) 10.000x.

Figura 33 - Micrografia da amostra NaCMQD com aproximações de: (a) 100x, (b) 500x, (c) 1.000x, (d) 10.000x.

A partir das micrografias da amostra NaCMQH (**Figura 32**) e NaCMQD (**Figura 33**), foi possível observar que ambas as amostras apresentam superfícies planas, lisas e bem definidas, entretanto a amostra NaCMQD apresenta partículas menores quando comparado à amostra NaCMQH.

A partir da análise das microscopias, utilizando-se do programa Image J, foram determinados o diâmetro médio ($\overline{DM}$) e a área média ($\overline{AM}$) das partículas (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$) e a área média ($\overline{AM}$) das partículas das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD.

Amostras	$\overline{DM}$ (μm)	$\overline{AM}$ (μm^2)
Q	81	889
NaCMQH	250	34.882
NaCMQD	157	1.179

A partir da análise dos valores de $\overline{DM}$ e $\overline{AM}$ (**Tabela 7**), foi observado que as partículas da amostra Q apresentam menor diâmetro, e consequentemente menor área, que as amostras NaCMQH e NaCMQD. Quando comparada à amostra NaCMQH, a amostra NaCMQD apresenta partículas de menor diâmetro e área, provavelmente devido à sua baixa massa molar média, pois durante a purificação, a amostra NaCMQH que apresenta maior massa molar média apresentou a formação de precipitados fibrosos, enquanto que a amostra de NaCMQD de menor apresentou a formação de precipitados globulares pequenos.

5.3 Preparação das Membranas

Para a confecção das membranas foram utilizadas placas de Petri de acrílico, nas quais as soluções foram vertidas, sendo que nesta etapa as soluções apresentaram-se límpidas e fluidas (**Figura 34a**). Após a reticulação as soluções resultantes foram congeladas, passando a exibir opacidade (**Figura 34b**), e então foram liofilizadas. Após a liofilização, as membranas se apresentaram totalmente opacas e com coloração levemente amarelada (**Figura 34c**). Entretanto, durante a neutralização e lavagem das membranas, foi observado o aparecimento de coloração e uma elevada contração das membranas (**Figura 34d**).

Figura 34 - Fotografia das principais etapas da preparação das membranas: (a) solução de NaCMQH/glutaraldeído; (b) solução de NaCMQH/glutaraldeído congelada; (c) membrana de NaCMQH reticulada com glutaraldeído e liofilizada; (d) membrana de NaCMQH reticulada com glutaraldeído após neutralização e lavagem.

Após a reação das amostras NaCMQH e NaCMQD com glutaraldeído foi observado o aparecimento de coloração amarelada, mais acentuada quanto maior a concentração de glutaraldeído empregada na reação (**Figura 35 e 36**), resultado que é corroborado por Mi et al. (2001), que estudaram a produção de membranas compactas de quitosana reticuladas com glutaraldeído, e Liu, Y. et al. (2007), que estudaram a produção de membranas compactas de carboximetilquitosana reticuladas com cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC). Em ambos os trabalhos foi observado que com o aumento da concentração do agente reticulante, as membranas se apresentaram com coloração amarelada mais acentuada.

Figura 35 - Imagens das amostras M-CMQHs, em função da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação.

Figura 36 - Imagens das amostras M-CMQDs, em função da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação.

As amostras M-CMQHs e M-CMQDs apresentaram grande contração de área após os procedimentos de neutralização e lavagem, sendo o percentual de contração dependente da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação (**Figura 37**).

Figura 37 - Valores de percentual de contração da área das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs (experimento realizado em quintuplicata).

Como observado na **Figura 37**, o aumento da concentração do glutaraldeído na etapa de reticulação reduz a contração de área das membranas, fato observado tanto no caso das M-CMQHs quanto nas M-CMQDs, devido à formação de uma rede polimérica mais rígida em decorrência da reticulação. A amostra M-Q apresenta pequena contração quando comparada às amostras M-CMQHs e M-CMQDs, devido à pequena solubilidade da amostra de Q em meio neutro (pH 7). Também foi observado que, devido à ocorrência de contração, houve variação na espessura das membranas (**Figura 38**), sendo que o aumento da concentração do glutaraldeído na etapa de reticulação produz membranas com menor contração e de menor espessura, como observado na M-CMQH e M-CMQH-50, onde a redução da contração da membrana de $76,45 \pm 5,61\%$ para $37,58 \pm 2,46\%$ levou a uma redução de espessura de $715 \pm 63 \mu\text{m}$ para $378 \pm 38 \mu\text{m}$.

Figura 38 - Valores de espessura das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs (experimento realizado em quintuplicata).

O procedimento de lavagem das membranas foi realizado pela execução de sucessivas trocas de água destilada para a remoção de sais e resíduos de glutaraldeído, sendo esta etapa acompanhada através de medidas de condutividade e de pH. Tal procedimento foi interrompido quando foi observada a estabilização da condutividade e do pH das soluções, o que demandou aproximadamente 6 horas com trocas sucessivas de água destilada.

5.4 Caracterizações

5.4.1 Determinação do Grau de Reticulação

A **Figura 39** mostra a variação do grau médio de reticulação das amostras M-CMQHs e M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.

Figura 39 – Grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) das amostras M-CMQHs e M-CMQDs, em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação (experimento realizado em quadruplicata).

A partir dos dados da **Figura 39** pode ser observado, que o grau de reticulação das amostras M-CMQHs e M-CMQDs aumentou com o aumento da concentração do glutaraldeído, e que as amostras M-CMQDs apresentaram grau de reticulação próximos às amostras M-CMQHs em baixas concentrações de glutaraldeído ($[\text{glutaraldeído}] \leq 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), entretanto, em concentrações mais elevadas de glutaraldeído ($[\text{glutaraldeído}] > 0,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), as amostras M-CMQDs apresentaram graus de reticulação mais elevados que as amostras de M-CMQHs, provavelmente devido à sua baixa massa molar média (**Tabela 6**) que favoreceu uma maior acessibilidade aos sítios reativos da

cadeias poliméricas para a reticulação, e a maior quantidade de grupos amino livre (**Tabela 5**), que favoreceu a reticulação devido ao maior número de sítios reativos presentes nas M-CMQDs.

5.4.2 Grau de Hidratação

As medidas de grau de hidratação, ou grau de absorção de água, foram realizadas para avaliar as amostras após imersão em solução de PBS (pH=7,4).

As **Figuras 40 e 41** mostram o perfil das curvas de hidratação das M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs em função do tempo de imersão em solução de PBS.

A amostra M-CMQH (**Figura 40**) exibiu rápida absorção de água, mas a sua solubilização ocorreu quase que imediatamente após a imersão em solução de PBS. As amostras M-CMQD e M-CMQD-2,5 apresentaram comportamentos semelhantes (**Figura 41**), pois também apresentaram rápida absorção de água, entretanto perderam a integridade física após 1 hora e 6 horas, respectivamente, devido ao baixo grau de reticulação e a alta solubilidade em solução PBS.

Figura 40 - Curvas de percentual de hidratação das amostras M-CMQHs, em solução PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente, em função do tempo de imersão.

A partir da análise das curvas de hidratação das amostras M-CMQHs (**Figuras 40**), foi observado que com o aumento do grau de reticulação, houve redução da taxa de hidratação das amostras. As membranas mais reticuladas (amostras M-CMQH-50, M-CMQH-25, M-CMQH-10 e M-CMQH-5) alcançaram equilíbrio de hidratação após 12 horas de hidratação, entretanto a membrana menos reticuladas (amostra M-CMQH-2,5), não apresenta estabilização devido ao baixo grau de reticulação.

Figura 41 - Curvas de taxa de hidratação das amostras M-Q e M-CMQDs, em solução PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente, em função do tempo de imersão.

As amostras M-CMQDs apresentaram comportamentos semelhantes aos das amostras M-CMQHs, pois a maioria delas alcançou o equilíbrio de hidratação em aproximadamente 12 horas (**Figuras 41**). Entretanto, apesar de apresentarem maior grau de reticulação, as amostras M-CMQDs apresentaram taxas de hidratação mais elevadas quando comparadas às amostras M-CMQHs. Além disso, a amostra M-CQMD-5 ($\overline{GR} \approx 20,09\%$) apresentou alta taxa de hidratação (1.388%), mas não alcançou o equilíbrio de hidratação no tempo estudado, enquanto a amostra M-CQMH-5 ($\overline{GR} \approx 17,51\%$) apresentou grau de hidratação muito inferior (683,44 %) e alcançou o equilíbrio em aproximadamente 12 horas, provavelmente devido à

menor massa molar média, pois, com a reticulação há a formação de uma rede polimérica insolúvel devido à elevação da massa molar média, como a amostra de NaCMQH apresenta maior massa molar média ($75.760 \text{ g mol}^{-1}$), uma maior elevação da massa molar média será observada com a reticulação, quando comparada à NaCMQD que apresenta menor massa molar média ($20.476 \text{ g mol}^{-1}$).

A **Figura 42** mostra os valores de grau de hidratação das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs após 48 horas de imersão em solução de PBS.

Figura 42 - Grau de hidratação das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs após 48 horas de imersão em solução PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente (experimento realizado em triplicata).

A partir da análise dos valores de grau de hidratação após 48 horas de imersão em PBS foi observado que o aumento da concentração de glutaraldeído levou a uma redução significativa da taxa de hidratação das amostras M-CMQHs e M-CMQDs (**Figura 42**). Tais resultados são corroborados por Mi et al. (2001), que estudaram o efeito da reticulação por glutaraldeído e genipina sobre as propriedades de membranas de quitosana, sendo observado que o aumento no grau de reticulação levou à redução significativa do grau de hidratação das membranas.

As membranas porosas produzidas neste trabalho (via liofilização) apresentam elevados grau de hidratação quando comparadas às membranas produzidas via “casting”. Assim, por exemplo, as membranas de quitosana confeccionadas por Mi et al. (2001) e Lu et al. (2007) via “casting”, apresentam grau de hidratação de $191,6 \pm 5,0\%$ e $163,9 \pm 8,1\%$ respectivamente, enquanto que a membrana de quitosana produzida neste projeto apresenta grau de hidratação de $321,2 \pm 18,7\%$. A mesma comparação é válida no caso das membranas de carboximetilquitosana, pois Lu et al. (2007) prepararam via “casting” membranas de carboximetilquitosana reticuladas com EDC e glutaraldeído cujo grau de hidratação foram $208,4 \pm 8,7\%$ e $151,2 \pm 6,3\%$, respectivamente, enquanto que as membranas de carboximetilquitosana reticuladas com glutaraldeído, obtidas neste projeto via liofilização, apresentaram grau de hidratação de $311,1 \pm 39,9\%$ (amostra M-CMQH_5,0) a $1.264,1 \pm 174,0\%$ (amostra M-CMQH_0,25). Entretanto estas membranas apresentam taxas de hidratação inferiores quando comparadas às membranas de carboximetilquitosana produzidas via “casting” utilizando glicerol como plastificante e reticuladas com radiação gama (GWON et al., 2010). De fato, o grau de hidratação da membrana reticulada com 50 kGy foi de aproximadamente 2.300,0%, o que pode ser atribuído ao baixo grau e reticulação e à presença do plastificante que favorece a interação da solução com a matriz polimérica.

5.4.3 Solubilidade e Estabilidade em Solução Salina de Tampão Fosfato (PBS)

A massa residual das membranas após imersão em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente por 24 horas foi determinada a fim de se observar a estabilidade e a solubilidade das membranas (**Tabela 8**).

Como observado na determinação da taxa de hidratação, as amostras M-CMQH e M-CMQD apresentaram rápida absorção de água, solubilizando-se totalmente após 24 horas de imersão em solução de PBS. A amostra M-CMQD-2,5 também apresentou rápida absorção de água, entretanto não foi totalmente solúvel, mas perdeu sua integridade física após 24 horas de imersão em solução de PBS.

Tabela 8 - Valores de percentual de massa residual^(a) das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs após 24 horas de imersão em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura ambiente.

Amostras	Massa Residual (%)
M-CMQH-50	87,04 ± 1,72
M-CMQH-25	93,21 ± 5,93
M-CMQH-10	89,13 ± 2,12
M-CMQH-5	72,04 ± 8,88
M-CMQH-2,5	57,36 ± 19,19
M-CMQD-50	91,87 ± 0,98
M-CMQD-25	85,89 ± 5,58
M-CMQD-10	79,14 ± 3,74
M-CMQD-5	64,32 ± 5,58
M-Q	90,62 ± 2,13

(a) média de três determinações independentes.

A partir da análise dos valores de percentual de massa residual das membranas (**Tabela 8**), foi observado que o aumento da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, levou à menor perda de massa por solubilização das membranas. De fato, com o aumento do grau de reticulação houve um grande aumento da massa molar média devido à formação de uma rede reticulada do polímero que reduziu a sua solubilidade. Assim, por exemplo, a amostra M-CMQD-50 ($\overline{GR} \approx 62,38\%$) apresentou elevado percentual de massa residual (91,87 ± 0,98%), enquanto a amostra M-CQMD-5 apresentou baixo valor percentual de massa residual (64,32 ± 5,58%), devido ao baixo grau de reticulação ($\overline{GR} \approx 20,09\%$). Por outro lado, a amostra M-Q apresentou elevado percentual de massa residual (90,62 ± 2,13%), pois a quitosana de partida é insolúvel quando pH > 6,5.

5.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada com a finalidade de avaliar a morfologia da superfície e das secções de fratura das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs.

A execução do processo de neutralização e lavagem das membranas foi uma etapa muito importante, pois resultou na eliminação de fibras superficiais aderidas fracamente à matriz e afetou a morfologia das superfícies das membranas. A partir da **Figura 43** foi possível observar que a porosidade aparente das membranas é dependente do tempo em que o material foi submetido ao processo de lavagem, e a **Tabela 9** apresenta os valores de diâmetro médio dos poros ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) obtidos a partir da análise das microscopias, utilizando-se do programa Image J, para as amostras M-CMQD-50 em função dos diferentes processos de lavagem.

Figura 43 - Micrografias da superfície da amostra M-CMQD-50 obtidas antes da execução das etapas de neutralização e lavagem ((a) 100x e (b) 1000x), após lavagem por 30 min ((c) 100x, (d) 1000x), e após lavagem por 6 horas ((e) 100x, (f) 1000x).

As membranas que não foram submetidas ao processo de neutralização e lavagem, ou seja, as que foram apenas liofilizadas (**Figura 43a e b**), apresentam uma camada de fibras finas superficiais com aproximadamente 1,6 μm de espessura. Com o início do processo de neutralização e lavagem realizado em aproximadamente 30 minutos (**Figura 43c e d**), houve lixiviação das fibras superficiais, fracamente ligadas à matriz, sendo observado o aparecimento de poros aparentes bem definidos. O prolongamento do processo de lavagem para aproximadamente 6 horas (**Figura 43e e f**) resultou na compactação da membrana, o que levou à diminuição do número e do diâmetro médio dos poros.

Tabela 9 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) da amostra M-CMQD-50 em função dos diferentes processos de lavagem.

Amostras	Tempo (horas)	$\overline{DM}$ (μm)	$\overline{AM}$ (μm^2)	NP (mm^{-2})
M-CMQD-50	0,5	151	9.538	347
M-CMQD-50	6,0	89	2.471	233

Com relação ao diâmetro médio e à quantidade de poros aparente obtido a partir da análise das micrografias (**Tabela 9**), foi observado que com o prolongamento do processo de lavagem de 30 minutos para aproximadamente 6 horas, houve redução do NP de 347 mm^{-2} para 233 mm^{-2} e redução do $\overline{DM}$ dos poros de 151 μm a 89 μm , respectivamente, como observado na **Figura 43**.

Para a remoção de sais e resíduos de glutaraldeído, todas as membranas estudadas foram neutralizadas e lavadas por aproximadamente 6 horas.

As **Figuras 44 e 45** mostram as morfologias da superfície da amostra M-Q e de secção da membrana fraturada, e a **Tabela 10** apresenta os respectivos valores de diâmetro médio dos poros ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP), para a superfície e para a fratura obtidos utilizando o programa Image J.

(a)

(b)

Figura 44 - Micrografias da superfície da amostra M-Q: (a) 100x, (b) 1.000x.

(a)

(b)

Figura 45 - Micrografia da fratura da amostra M-Q: (a) 200x, (b) 1.000x.

Tabela 10 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) para a superfície e para a fratura da amostra M-Q.

Amostra M-Q	$\overline{DM}$ (µm)	$\overline{AM}$ (µm ²)	NP (mm ⁻²)
Superfície	74	995	267
Fratura	211	4.645	116

Na **Figura 44** é possível observar que a amostra M-Q apresenta uma superfície com poros pequenos ($\overline{AM}$ 995 μm) distribuídos por toda a superfície, mas, com relação à estrutura interna da membrana (**Figura 45**), esta apresenta um arranjo altamente poroso, com poros de $\overline{AM}$ 4.645 μm bem distribuídos, e separados por folhas finas (espessura de 3,3 μm) do polímero.

As **Figuras 46 e 47** mostram as morfologias da superfície e as **Figuras 48 e 49** mostram as morfologias da fratura das M-CMQHs, enquanto as **Tabelas 11 e 12** apresenta os respectivos valores de diâmetro médio dos poros ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) para a superfície e para a fratura das amostras M-CMQHs, obtidos utilizando o programa Image J.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 46 - Micrografias das superfícies das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH (a) 100x, (b) 1.000x; M-CMQH-2,5 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQH-5 (e) 100x, (f) 1.000x.

Figura 47 - Micrografias das superfícies das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH-10 (a) 100x, (b) 1.000x; M-CMQH-25 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQH-50 (e) 100x, (f) 1.000x.

Nas **Figura 46** e **47** é possível observar que as amostras M-CMQHs apresentaram maior porosidade e maior uniformidade dos poros com o aumento do grau de reticulação. Assim, por exemplo, a amostra M-CMQH (**Figura 46a** e **b**) apresentou uma superfície irregular, com poucos poros aparentes (NP 31 mm^{-2}), pois durante o processo de lavagem este material apresentou um elevado intumescimento, já que a membrana não foi reticulada, a mobilidade relativa das cadeias resultando na compactação da amostra.

Tabela 11 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) para a superfície das amostras M-CMQHs.

Amostras	$\overline{DM}$ (μm)	$\overline{AM}$ (μm^2)	NP (mm^{-2})
M-CMQH	76	646	31
M-CMQH-2,5	53	442	175
M-CMQH-5	101	1.239	202
M-CMQH-10	84	1.690	227
M-CMQH-25	116	1.427	242
M-CMQH-50	101	2.582	291

Com a reticulação, as amostras apresentaram aumento do NP e da $\overline{AM}$, sendo a que a amostra M-CMQH-50 (**Figura 47e** e **f**) apresentou superfície altamente porosa (NP 242 mm^{-2} e $\overline{AM}$ 2.582 μm^2). Com a redução do grau de reticulação, houve redução do NP e da $\overline{AM}$, sendo observado NP de 242 mm^{-2} e $\overline{AM}$ 2.582 μm^2 para a amostra M-CMQH-50 (**Figura 47e** e **f**) com $\overline{GR} \approx 35,82\%$, enquanto que a amostra M-CMQH-5 (**Figura 46e** e **f**) com $\overline{GR} \approx 17,51\%$ apresentou $NP=175 \text{ mm}^{-2}$ e $\overline{AM}=1.239 \mu\text{m}^2$.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 48 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH (a) 200x, (b) 1.000x; M-CMQH-2,5 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQH-5 (e) 200x, (f) 1.000x.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 49 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQH-10 (a) 200x, (b) 1.000x; M-CMQH-25 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQH-50 (e) 200x, (f) 1.000x.

Com relação à morfologia das fraturas das amostras M-CMQHs (**Figuras 48 e 49**), foi observado que com a reticulação houve aumento do NP e da $\overline{AM}$ dos poros aparente. A fratura da amostra M-CMQH (**Figura 48a e b**) apresentou-se irregular, com poucos poros aparentes ($NP\ 25\ \text{mm}^{-2}$) como observado na morfologia da superfície (**Figura 46a e b**), pois durante o processo de lavagem, devido à elevada solubilidade da amostra M-CMQH, esta apresentou elevado intumescimento, que provavelmente resultou na compactação da membrana. Com a reticulação, as membranas apresentaram um aumento do NP e da $\overline{AM}$, sendo observado que a amostra M-CMQH-25 (**Figura 49c e d**) apresenta uma morfologia de fratura altamente porosa ($NP\ 103\ \text{mm}^{-2}$).

Tabela 12 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente em função da área (NP) para a fratura das amostras M-CMQHs.

Amostras	$\overline{DM}$ (μm)	$\overline{AM}$ (μm^2)	NP (mm^{-2})
M-CMQH	136	942	25
M-CMQH-2,5	127	1.097	35
M-CMQH-5	172	1.056	49
M-CMQH-10	334	3.747	86
M-CMQH-25	389	3.254	103
M-CMQH-50	401	4.260	83

Com relação ao grau de reticulação, foi observada a redução do NP com a redução do $\overline{GR}$, entretanto houve um aumento da $\overline{AM}$ como observado na morfologia da superfície, como por exemplo, para a fratura da amostra M-CMQH-10 (**Figura 49a e b**) com $\overline{GR} \approx 22,96\%$, apresentou NP de $86\ \text{mm}^{-2}$ com $\overline{AM}$ de $3.747\ \mu\text{m}^2$, já a amostra M-CMQH-2,5 (**Figura 48c e d**) com $\overline{GR} \approx 12,30\%$, apresentou uma menor quantidade NP ($35\ \text{mm}^{-2}$) com redução da $\overline{AM}$ ($1.097\ \mu\text{m}^2$).

As **Figuras 50 e 51** mostram a morfologia da superfície, as **Figuras 52 e 53** mostram a morfologia da fratura das M-CMQDs, e as **Tabelas 13 e 14** apresenta os respectivos valores de diâmetro médio dos poros ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente (NP) para a superfície e para a fratura das amostras de M-CMQDs respectivamente, obtidos utilizando o programa Image J.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 50 - Micrografia da superfície das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD (a) 100x, (b) 1.000x; M-CMQD-2,5 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQD-5 (e) 100x, (f) 1.000x.

Figura 51 - Micrografia da superfície das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD-10 (a) 100x, (b) 1.000X; M-CMQD-25 (c) 100x, (d) 1.000x; M-CMQD-50 (e) 100x, (f) 1.000x.

Tabela 13 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente em função da área (NP) para a superfície das amostras M-CMQDs.

Amostras	$\overline{DM}$ (μm)	$\overline{AM}$ (μm^2)	NP (mm^{-2})
M-CMQD	51	394	43
M-CMQD-2,5	61	753	77
M-CMQD-5	87	1.461	77
M-CMQD-10	55	1.691	84
M-CMQD-25	67	1.652	96
M-CMQD-50	134	2.471	121

As superfícies das amostras M-CMQDs (**Figura 50 e 51**) apresentaram características similares áquelas das amostras M-CMQHs (**Figura 46 e 47**), sendo observado que tanto as amostras M-CMQHs quanto as amostras M-CMQDs apresentaram maior porosidade aparente com a reticulação, e que a superfície da amostra M-CMQD (**Figura 50a e b**) apresenta poucos poros aparentes (NP 43 mm^{-2}) e com $\overline{AM}$ (394 μm^2) dos poros. Já a amostra M-CMQD-50 (**Figura 51e e f**) apresentou uma superfície mais porosa (NP 121 mm^{-2}), e estes poros apresentaram valores de $\overline{AM}$ mais elevados (2,471 μm^2), entretanto, quando comparado às amostras M-CMQHs, as amostras M-CMQDs apresentaram uma superfície menos porosa, sendo observado uma redução do NP de 242 mm^{-2} para 77 mm^{-2} para as amostras M-CMQH-5 e M-CMQD-5, respectivamente.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 52 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD (a) 200x, (b) 1.000x; M-CMQD-2,5 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQD-5 (e) 200x, (f) 1.000x.

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

(f)

Figura 53 - Micrografia da fratura das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação: M-CMQD-10 (a) 200x, (b) 1.000X; M-CMQH-25 (c) 200x, (d) 1.000x; M-CMQH-50 (e) 200x, (f) 1.000x.

Tabela 14 - Valores de diâmetro médio ($\overline{DM}$), área média ($\overline{AM}$) e o número de poros aparente em função da área (NP) para a fratura das amostras M-CMQDs.

Amostras	$\overline{DM}$ (μm)	$\overline{AM}$ (μm^2)	NP (mm^{-2})
M-CMQD	85	733	16
M-CMQD-2,5	110	943	25
M-CMQD-5	142	1.406	41
M-CMQD-10	181	2.239	45
M-CMQD-25	184	2.329	51
M-CMQD-50	140	1.961	54

Com relação à morfologia das fraturas das amostras M-CMQDs (**Figuras 52 e 53**), foi observado comportamento similar às das microscopias de superfície (**Figuras 50 e 51**), sendo que maior porosidade aparente foi observada com aumento do grau de reticulação, em que a fratura da amostra M-CMQD-2,5 (**Figura 52c e d**) com $\overline{GR} \approx 10,39\%$ apresentou uma superfície com poucos poros aparente (NP 25 mm^{-2}) e com baixa $\overline{AM}$ (943 μm^2). Já a amostra M-CMQD-50 (**Figura 52e e f**) com $\overline{GR} \approx 62,38\%$ apresentou uma fratura mais porosa (NP 54 mm^{-2}), e estes poros aparente apresentaram alta $\overline{AM}$ (1.961 μm^2), entretanto, quando comparada à estrutura interna da amostra M-CMQH-50 (**Figura 49e e f**) com relação à amostra M-CMQD-50 (**Figura 53e e f**), foi observado uma redução do NP de 83 mm^{-2} para 54 mm^{-2} e da $\overline{AM}$ de 4.260 μm^2 para 1.961 μm^2 .

5.4.5 Difração de Raios X

A análise de difração de raios X foi utilizada com o objetivo de avaliar a ocorrência de diferentes arranjos no estado sólido das amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) (**Figura 54**).

Figura 54 - Difratoograma de raios X das amostras Q, NaCMQH e NaCMQD.

A partir da análise dos difratogramas de raios X das amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) (**Figuras 54**), foi observado que a amostra Q apresenta picos cristalinos ($2\theta = 11,9$ e $19,8$) mais intensos e definidos que as amostras de NaCMQH e NaCMQD, o que se deve ao estabelecimento de ligações hidrogênio que resultam em ordenamento das cadeias de quitosana nos domínios cristalinos, enquanto que a carboximetilação resulta na substituição de átomos de hidrogênio (das hidroxilas e grupos amino) por grupos carboximetila, o que prejudica o estabelecimento de ligações hidrogênio por reduzir o número de hidrogênios susceptíveis de participar destas ligações. Além disso, os grupos carboximetila apresentam impedimento estérico muito mais importante, devido ao grupo carboximetila ser muito mais “volumoso” que o átomo de hidrogênio.

Com relação às amostras de carboximetilquitosana, a amostra NaCMQD apresentou dois picos cristalinos definidos ($2\theta = 11,9$ e $19,8$) de maior intensidade, já a amostra de NaCMQH apresenta apenas um pico cristalino definido ($2\theta = 19,9$), provavelmente devido à diferenças de massa molar média, pois no caso da NaCMQH ($\bar{M}_v$ $75.760 \text{ g mol}^{-1}$) as cadeias mais longas apresentam maior dificuldade de serem “acomodadas” em domínios relativamente organizados, quando comparado à amostra NaCMQH ($\bar{M}_v$ $20.476 \text{ g mol}^{-1}$).

A ocorrência de diferentes arranjos no estado sólido das amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) e na forma de membrana (M-Q, M-CMQH e M-CMQD), é mostrada nas **Figuras 55, 56 e 57**.

Figura 55 - Difratoograma de raios X das amostras de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q).

A partir análise dos difratogramas da amostra de quitosana confeccionada na forma de membranas (M-Q), foi observado significativa diminuição da intensidade e o alargamento dos picos cristalinos, indicando que o grau de ordem foi muito reduzido, quando comparado às amostras em forma de pó (Q), pois para a confecção das membranas foi realizado o processo de liofilização, no qual a solução do polímero foi congelada e liofilizada. Neste processo, o congelamento rápido e a liofilização do material levaram a um produto que manteve a estrutura tridimensional do polímero em solução quando congelado, reduzindo a possibilidade de ordenação das cadeias polimérica, resultando em amostras menos cristalinas.

Figura 56 - Difratoograma de raios X da amostra NaCMQH na forma de pó (NaCMQH) e na forma de membrana (M-CMQH).

Figura 57 - Difratoograma de raios X da amostra NaCMQD na forma de pó (NaCMQD) e na forma de membrana (M-CMQD).

Como observado nos difratogramas da amostra de quitosana (**Figura 55**), as amostras de carboximetilquitosana confeccionadas na forma de membranas (M-CMQH e M-CMQD) (**Figuras 56 e 57**) apresentaram significativa diminuição da intensidade e acentuado alargamento dos picos cristalinos, quando comparado à amostra na forma de pó (NaCMQH e NaCMQD), indicando que o grau de ordem foi muito reduzido, sendo que também foi observado o deslocamento do pico cristalino de $19,9^\circ$ (NaCMQH) para $22,7^\circ$ (M-CMQH).

Na **Figura 58** são mostrados os difratogramas das amostras M-Q, M-CMQH e M-CMQD.

Figura 58 - Difratograma de raios X das amostras M-Q, M-CMQH e M-CMQD.

A partir da análise dos difratogramas de raios X das amostras M-Q, M-CMQH e M-CMQD (**Figuras 58**), foram observadas que a M-Q apresentou picos cristalinos mais intensos quando comparado às M-CMQH e M-CMQD. Tais resultados são corroborados por Guangyuan et al. (2009), que ao estudar membranas de quitosana e de carboximetilquitosana reticuladas com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), produzidas via “casting”, observaram que as membranas de quitosana e carboximetilquitosana apresentam picos cristalinos com intensidade bastante reduzida. Com relação à intensidade dos picos

cristalinos das membranas de quitosana com relação às membranas de carboximetilquitosana produzidas por Guangyuan et al. (2009), as membranas de quitosana apresentaram picos cristalinos melhor definidos, e com intensidade superiores às membranas de carboximetilquitosana.

Os difratogramas das amostras M-CMQHs e M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação são mostrados nas **Figuras 59 e 60**, respectivamente.

Figura 59 - Difratograma de raios X das amostras M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.

Figura 60 - Difratoograma de raios X das amostras M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.

A partir da análise dos difratogramas de raios X das amostras M-CMQHs (**Figura 59**) e M-CMQDs (**Figura 60**) em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, foi possível observar que tanto o conjunto de amostras M-CMQHs quanto o conjunto de amostras M-CMQDs apresentam picos cristalinos alargados e de baixa intensidade, não sendo observada variação significativa da intensidade em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.

5.4.6 Termogravimetria

A análise termogravimétrica foi utilizada com o objetivo de avaliar a estabilidade térmica das amostras através das curvas de perda de massa em função da temperatura.

As curvas termogravimétricas das amostras na forma de pó (Q, NaCMQH e NaCMQD) e na forma de membrana (M-Q, M-CMQH e M-CMQD), são mostrados nas **Figuras 61, 62 e 63** respectivamente.

O comportamento térmico das amostras em atmosfera de ar sintético pode ser dividido em dois estágios principais. A primeira etapa corresponde ao intervalo de 25°C - 110°C, na qual ocorre a perda de água, e a segunda etapa corresponde à pirólise do polímero, na qual ocorre o primeiro estágio da decomposição térmica do polímero no intervalo de 200°C - 400°C, em que é atingindo o valor máximo de pirólise, e acima de 400°C ocorre a perda de massa resultante da decomposição oxidativa dos subprodutos do primeiro estágio de decomposição.

Figura 61 - Curvas termogravimétricas da amostra de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q), obtidas em atmosfera de ar sintético com vazão de 20 mL min⁻¹ e razão de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

A partir da análise das curvas termogravimétricas da amostra de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q) (**Figura 61**) e dos valores de temperaturas inicial,

final e de máxima degradação (**Tabela 15**), foi possível observar que as amostras de quitosana, independentemente da forma física, exibem teores de umidade semelhantes, pois as perdas de massa no intervalo de 25°C - 110°C correspondem a aproximadamente 11% em ambos os casos.

Tabela 15 – Valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação e percentagem de perda de massa da amostra de quitosana na forma de pó (Q) e na forma de membrana (M-Q) obtidas em ar sintético com vazão de 20 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ no primeiro estágio de pirólise.

Amostras	T _{onset}	T _{máx}	T _{final}	Perda de massa (%)	Teor de água (%)	Teor de cinzas (%)
Q	276	337	634	87	11	2
M-Q	227	264	538	84	11	5

Com relação aos valores de temperaturas e perdas de massa no primeiro estágio de pirólise do polímero, foi observado que a forma da amostra (pó ou membrana) afetou tanto a temperatura inicial desse estágio de decomposição como a perda de massa associada ao evento, sendo que a temperatura e a perda de massa são menores no caso da amostra M-Q, o que pode ser atribuído à menor cristalinidade da membrana de quitosana, como evidenciado pelas análises de difração de raios X (**Figura 55**).

Figura 62 - Curvas termogravimétricas da amostra de NaCMQH na forma de pó (NaCMQH) e na forma de membrana (M-CMQH), em ar sintético com vazão de 20 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} .

Figura 63 - Curvas termogravimétricas da amostra de NaCMQD na forma de pó (NaCMQD) e na forma de membrana (M-CMQD), em ar sintético com vazão de 20 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de 10 °C min^{-1} .

A partir da análise das curvas termogravimétricas das amostras NaCMQH e NaCMQD na forma de pó (NaCMQH e NaCMQD) e na forma de membrana (M-CMQH e M-CMQD) (**Figuras 62 e 63**) e dos valores de temperaturas inicial, final e de máxima degradação para o primeiro estágio de pirólise do polímero (**Tabela 16 e 17**), foi observado que as amostras NaCMQH e NaCMQD exibem teores de umidade semelhantes, pois as perdas de massa no intervalo de temperatura de 25°C - 110°C foram semelhantes (13% – 15%), independentemente da forma da amostra (pó ou membrana).

Com relação aos valores de temperaturas e correspondentes perdas de massa no primeiro estágio de pirólise, foi observado que as amostras NaCMQH e NaCMQD apresentam comportamento semelhante aos das amostras de quitosana, sendo que a forma física da amostra (pó ou membrana) afetou as temperaturas inicial (T_{onset}) e de máxima decomposição ($T_{\text{máx}}$), bem como a perda de massa associada ao evento. Assim, as temperaturas inicial ($T_{\text{onset}} = 227^{\circ}\text{C}$) e de máxima decomposição ($T_{\text{máx}} = 265^{\circ}\text{C}$) são menores e a perda de massa (79%) é maior no caso da amostra M-CMQ quando comparadas às correspondentes temperaturas da amostra NaCMQ ($T_{\text{onset}} = 265^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{máx}} = 281^{\circ}\text{C}$) e perda de massa (70%), o que pode, provavelmente, ser atribuído a menor cristalinidade dessas amostras em comparação com a amostras em forma de pó. De fato, a estabilidade térmica dos polímeros está ligada ao grau de ordem do material e à medida que a temperatura aumenta, as moléculas adquirem energia suficiente para romper as ligações intermoleculares, iniciando o deslizamento de umas sobre as outras. Polímeros com baixa cristalinidade, geralmente apresentam alto grau de enovelamento, e o maior enovelamento leva a uma maior restrição dos movimentos macromoleculares e uma menor dissipação da energia térmica, com maior probabilidade de quebra das ligações químicas em temperatura mais baixa (DE PAOLI, 2009).

As **Figuras 64 e 65** mostram as curvas TG, e as **Figuras 66 e 67** mostram as curvas DTG das amostras M-CMQHs e M-CMQDs, respectivamente, em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.

Figura 64 - Curvas TG das M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Figura 65 - Curvas TG das M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL min^{-1} e taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Figura 66 - Curvas DTG das M-CMQHs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL mim⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Figura 67 - Curvas DTG das M-CMQDs em função da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação, em ar sintético com vazão de 20 mL mim⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

A partir da análise das curvas TG e DTG das amostras M-CMQHs (**Figuras 64 e 66**) e M-CMQDs (**Figuras 65 e 67**) foram obtidos os valores de temperaturas inicial, final e de máxima degradação obtidos para o primeiro estágio de pirólise, e percentual de massa, teor de água e teor de cinzas das membranas (**Tabela 16 e 17**).

Tabela 16 – Valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação e percentagem de perda de massa obtidos para o primeiro estágio de pirólise das amostras na forma de pó (NaCMQH) e na forma de membranas (M-CMQHs) obtidas em atmosfera de ar sintético com vazão de 20 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Amostras	T _{onset}	T _{máx}	T _{final}	Perda de massa (%)	Teor de água (%)	Teor de cinzas (%)
NaCMQH	265	281	712	71	15	14
M-CMQH	227	265	520	79	14	7
M-CMQH-2,5	228	267	521	75	15	10
M-CMQH-5	229	270	524	75	15	10
M-CMQH-10	232	276	534	76	16	8
M-CMQH-25	238	279	539	73	14	13
M-CMQH-50	239	285	587	72	16	12

Tabela 17 – Valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação e percentagem de perda de massa obtidos para o primeiro estágio de pirólise das amostras na forma de pó (NaCMQD) e na forma de membranas (M-CMQDs) obtidas em atmosfera de ar sintético com vazão de 20 mL min⁻¹ e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

Amostras	T _{onset}	T _{máx}	T _{final}	Perda de massa (%)	Teor de água (%)	Teor de cinzas (%)
NaCMQD	263	283	729	70	13	17
M-CMQD	202	240	473	77	15	8
M-CMQD-2,5	204	246	474	80	13	7
M-CMQD-5	204	248	494	80	15	5
M-CMQD-10	205	252	507	81	13	6
M-CMQD-25	205	265	549	82	14	4
M-CMQD-50	208	270	556	83	14	3

A partir da análise dos valores de temperatura inicial, final e de máxima degradação para o primeiro estágio de pirólise (**Tabela 16 e 17**) e das curvas termogravimétricas das amostras M-CMQHs e M-CMQDs (**Figuras 62, 63, 64 e 65**), foi possível observar que as amostras M-CMQHs e M-CMQDs exibem teores de umidade semelhantes, pois as perdas de massa no intervalo de temperatura de 25⁰C - 110⁰C foram semelhantes (14% - 16% para as amostras M-CMQHs e 13% – 15% para as amostras M-CMQDs), independentemente do grau de reticulação. Entretanto, com o aumento do grau de reticulação, houve um aumento da T_{onset} e $T_{\text{máx}}$, sendo que a amostra M-CMQH-2,5 ($\overline{GR} \approx 12,30\%$) apresentou T_{onset} de 228°C e $T_{\text{máx}}$ de 267°C, enquanto a amostra M-CMQH-50 ($\overline{GR} \approx 35,82\%$) apresentou T_{onset} de 239°C e $T_{\text{máx}}$ de 285°C.

5.4.7 Propriedades Mecânicas

A análise das propriedades mecânicas é fundamental para a avaliação do comportamento de materiais. As propriedades de tração expressam a resistência do material ao alongamento e ao rompimento, quando submetido à tração.

Através dos testes de tração, três propriedades podem ser determinadas: resistência máxima à tração, módulo de elasticidade (módulo Young) e grau de alongação.

As análises dinâmico mecânicas no modo tração das membranas hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37⁰C, foram realizadas a fim de se avaliar as propriedades mecânicas das membranas sob as condições de emprego em procedimentos cirúrgicos.

As curvas de resistência à tração das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs, são mostradas nas **Figuras 68, 69 e 70**, respectivamente.

Figura 68 - Curva de resistência mecânica à tração da amostra M-Q hidratada em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C.

Figura 69 - Curva de resistência mecânica à tração das amostras M-CMQHs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C.

Figura 70 - Curva de resistência mecânica à tração das amostras M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C.

A partir da análise da curva de resistência mecânica da amostra M-Q (**Figura 68**), foi observado que a curva tensão-deformação expressa um caráter frágil da membrana, com elevado módulo de elasticidade ($21,23 \pm 5,39$ MPa) e baixo alongamento na ruptura ($8,40 \pm 3,98\%$). As análises das amostras M-CMQHs (**Figuras 69**) e M-CMQDs (**Figuras 70**) mostraram que as propriedades mecânicas dessas membranas são dependentes do grau de reticulação.

As **Figura 71**, **72** e **73** mostram os valores de resistência máxima à tração, percentual de alongação e módulo de elasticidade, respectivamente, das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs.

Figura 71 - Valores de resistência máxima à tração das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).

A partir da análise dos valores de resistência máxima à tração (**Figura 71**), foi observado que a amostra M-Q apresentou resistência à tração superior quando comparada às amostras M-CMQHs e M-CMQDs, pois estas últimas apresentam menor cristalinidade e elevada taxa de hidratação (**Figura 42**).

Com relação às amostras M-CMQHs, o aumento do grau de reticulação levou ao aumento da fragilidade da membrana, reduzindo a resistência máxima à tração. A redução do grau de reticulação levou ao aumento da resistência máxima à tração como ocorre, por exemplo, com a amostra M-CMQH-5 ($\overline{GR} \approx 17,51\%$) que apresenta valor de resistência máxima à tração de $0,67 \pm 0,15$ MPa, enquanto a amostra M-CMQH-50 ($\overline{GR} \approx 35,82\%$) apresentou valor de resistência máxima à tração de $0,27 \pm 0,01$ MPa. Entretanto, a amostra M-CMQH-2,5 ($\overline{GR} \approx 12,30\%$) apresentou significativa redução da resistência máxima à tração ($0,35 \pm 0,03$ MPa) quando comparado à amostra M-CMQH-5 ($0,67 \pm 0,15$ MPa), provavelmente devido a alta taxa de hidratação da amostra M-CMQH-2,5 ($1.264,09 \pm 174,03\%$).

Com relação às amostras M-CMQDs, o aumento do grau de reticulação levou a um aumento da resistência máxima à tração, alcançando um valor máximo de $0,82 \pm 0,33$ MPa para a amostra M-CMQD-50 ($\overline{GR} \approx 62,38\%$), enquanto a amostra M-CMQH-5 ($\overline{GR} \approx 20,09\%$) apresentou valor de resistência máxima à tração de $0,21 \pm 0,16$ MPa.

Guangyuan et al. (2009), estudaram membranas de quitosana e de carboximetilquitosana reticuladas com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), produzidas via “casting”, e observaram que as membranas de quitosana apresentam valores de resistência à tração mais elevados que as membranas de carboximetilquitosana reticuladas, devido à sua maior cristalinidade. Já com relação às membranas de carboximetilquitosana, foi observado que a utilização de carboximetilquitosana com menor massa molar média resultou em membranas com menor resistência máxima à tração.

Figura 72 - Valores de percentual de elongação das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).

A partir da análise dos valores de percentual de elongação (**Figura 72**), foi observado que as amostras M-CMQHs e M-CMQDs apresentam valores de percentual de elongação

superiores à da amostra M-Q. Em relação ao grau de reticulação, foi observada a redução no percentual de elongação com o aumento do grau de reticulação. Assim, por exemplo, a amostra M-CMQD-2,5 ($\overline{GR} \approx 10,39\%$) apresentou valor de percentual de elongação de $53,41 \pm 5,73\%$, enquanto a amostra M-CMQD-50 ($\overline{GR} \approx 62,38\%$) apresentou valor de percentual de elongação de $26,67 \pm 5,18\%$, pois com a reticulação a rede polimérica torna-se mais rígida, reduzindo a elongação do material. Comportamento similar foi observado por Mi et al. (2001), que estudaram membranas de quitosana reticuladas com glutaraldeído e genipina e observaram que o aumento do grau de reticulação levou à redução significativa dos valores do percentual de elongação.

Figura 73 - Valores do módulo de elasticidade das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) por 12 horas à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).

A partir da análise dos valores do módulo de elasticidade (**Figura 73**), foi observado que a amostra M-Q apresentou elevada rigidez quando comparada às amostras M-CMQHs e M-CMQDs, devido ao elevado valor de módulo de elasticidade da amostra M-Q. Com relação ao grau de reticulação (**Figura 74**), foi observado o aumento da rigidez das membranas com o

aumento do grau de reticulação das amostras M-CMQHs e M-CMQDs. Assim, por exemplo, a amostra M-CMQH-2,5 ($\overline{GR} \approx 12,30\%$) apresentou valor de módulo de elasticidade de $0,43 \pm 0,01$ MPa, enquanto a amostra M-CMQH-50 ($\overline{GR} \approx 35,82\%$) apresentou valor de módulo de elasticidade de $1,91 \pm 0,09$ MPa, pois com a reticulação a rede polimérica, tornou as amostras mais rígida.

Figura 74 - Valores do módulo de elasticidade das amostras M-CMQHs e M-CMQDs hidratadas em solução PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C (experimento realizado em quadruplicata).

5.4.8 Degradação Enzimática

A degradação de materiais poliméricos em meio biológico é uma das propriedades de maior relevância, visando a sua aplicação em organismos vivos, pois tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização (DALLAN, 2005).

As **Figuras 75, 76 e 77** apresentam as curvas de hidrólise enzimática das amostras M-Q, M-CMQHs e M-CMQDs, respectivamente, em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo lisozima na concentração de 1.000 U mL⁻¹.

Figura 75 - Curva de hidrólise enzimática da amostra M-Q em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima (experimento realizado em quadruplicata).

Figura 76 - Curva de hidrólise enzimática das amostras M-CMQHs em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima (experimento realizado em quadruplicata).

Figura 77 - Curva de hidrólise enzimática das amostras M-CMQDs em solução de PBS (pH=7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima (experimento realizado em quadruplicata).

A análise das curvas de hidrólise enzimática (**Figuras 75, 76 e 77**) mostrou que houve aumento na concentração dos grupos amino tituláveis em solução com o aumento do tempo de incubação em todos os casos, evidenciando a ocorrência de degradação enzimática. Entretanto, a amostra M-Q apresentou baixo valor de hidrólise enzimática ($[\text{GlcN}] = 47 \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 15 dias de incubação), quando comparado às amostras M-CMQHs e M-CMQDs, que apresentaram valores de hidrólise enzimática variando de $[\text{GlcN}] = 87 \pm 8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (M-CMQH-50) a $[\text{GlcN}] = 617 \pm 27 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (M-CMQD) após 15 dias de incubação. O processo de degradação enzimática é fortemente dependente do processo de dissolução do polímero, e como a amostra Q é insolúvel em $\text{pH} \geq 6,5$, e a membrana apresenta baixa taxa de hidratação (**Figura 42**), a ação da lisozima sobre a matriz polimérica não é favorecida, resultando em baixa taxa de hidrólise enzimática no caso da amostra M-Q.

Com relação ao grau de reticulação, houve redução da taxa de hidrólise enzimática com o aumento do grau de reticulação, como observado para as amostras M-CMQH-2,5 ($\overline{GR} \approx 12,30\%$) e M-CMQH-25 ($\overline{GR} \approx 28,64\%$), para as quais foi observada a redução da quantidade de grupos amino livre em solução de $[\text{GlcN}] = 449 \pm 15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para $[\text{GlcN}] = 105 \pm 11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ respectivamente, após 15 dias de incubação. Entretanto, as membranas reticuladas M-CMQDs apresentaram maior liberação de grupos amino livres em solução de lisozima que as membranas reticuladas M-CMQHs, mesmo as membranas reticuladas M-CMQDs tendo apresentando maior grau de reticulação, como observado na amostra M-CMQH-10 ($\overline{GR} \approx 22,96\%$), que apresentou $[\text{GlcN}] = 195 \pm 18 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, enquanto que a amostra M-CMQD-10 que apresenta menor grau de reticulação ($\overline{GR} \approx 38,60\%$), apresentou $[\text{GlcN}] = 436 \pm 36 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Comportamento similar foi observado por Guangyuan et al. (2009), que estudaram a degradação enzimática das membranas de quitosana e de carboximetilquitosana reticuladas com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e observaram que a fragmentação e liberação de oligômeros em solução é dependente do grau de reticulação e da massa molar média do polímero. Quando o polímero de partida apresenta elevada massa molar média, a membrana reticulada apresenta baixos valores de hidrólise enzimática, pois a hidrólise não é suficiente para que ocorra a separação completa do polímero entre as junções reticuladas (**Figura 78a**). Por outro lado, quando o polímero de partida apresenta baixa massa molar média, a formação de oligômeros em solução é favorecida (**Figura 78b**).

Figura 78 – Descrição esquemática do mecanismo de degradação da carboximetilquitosana reticulada com relação à massa molar média do polímero: (a) carboximetilquitosana de alta massa molar média, com fragmentação que não libera os fragmentos resultantes das quebras de ligações; (b) carboximetilquitosana de baixa massa molar média, com fragmentação e liberação de oligômeros (GUANGYUAN et al. 2009).

Assim, o efeito da massa molar foi determinante no teste de degradação enzimática, pois mesmo as amostras M-CMQDs tendo apresentado graus de reticulação mais elevados que as amostras M-CMQHs reticuladas com a mesma concentração de glutaraldeído, as amostras M-CMQDs apresentam uma maior liberação de oligômeros em solução de lisozima, devido à menor massa molar média do polímero de partida (NaCMQD $\bar{M}_v$ 20.476 g mol⁻¹) quando comparado às amostras de M-CMQHs (NaCMQD $\bar{M}_v$ 75.760 g mol⁻¹).

6 CONCLUSÕES

Membranas porosas de quitosana e de carboximetilquitosana foram confeccionadas com sucesso por processo de liofilização. A execução da reação das carboximetilquitosanas com glutaraldeído gerou membranas reticuladas de carboximetilquitosana cujo grau de reticulação foi tanto maior quanto maior a concentração de glutaraldeído empregada na reação, sendo possível confeccionar membranas com diferentes graus de reticulação, a partir do controle da concentração de glutaraldeído empregada na etapa de reticulação.

A membrana de quitosana (amostra M-Q) apresentou baixa grau de hidratação ($321,16 \pm 18,68\%$) e alto percentual de massa recuperada ($90,62 \pm 2,13\%$) após imersão em solução PBS quando comparada à amostra M-CMQH-2,5 com taxa de hidratação de $1.264,09 \pm 174,03\%$ e percentual massa recuperada de $54,36 \pm 19,19\%$ após imersão em solução PBS. Entretanto, o aumento do grau de reticulação reduziu a taxa de hidratação de $1.388,92 \pm 332,41\%$ para $491,72 \pm 122,50\%$ e aumentou o percentual de massa recuperada de $64,32 \pm 5,58\%$ para $91,87 \pm 0,98\%$ nas amostras M-CMQD-5 ($\overline{GR} \approx 20,09\%$) e M-CMQD-50 ($\overline{GR} \approx 62,38\%$) respectivamente. Assim, a taxa de hidratação e a solubilidade das membranas podem ser ajustadas a partir de um controle criterioso do grau de reticulação das membranas de carboximetilquitosana.

A morfologia das superfícies e da fratura das membranas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), sendo observada a formação de estruturas muito porosas, com maior número de poros aparentes e maior área média dos poros quanto maior o grau de reticulação, em que o número de poros aparente superficiais variou de 175 poros mm^{-2} a 291 poros mm^{-2} com o aumento do grau de reticulação de 12,30% para 35,82%, para as amostras M-CMQH-2,5 e M-CMQH-50 respectivamente. Assim, membranas mais porosas podem ser confeccionadas com o aumento do grau de reticulação.

A forma da amostra (pó ou membrana) afetou drasticamente o comportamento térmico das amostras. As temperaturas iniciais de degradação (T_{onset}) foram menores para as amostras na forma de membrana (T_{onset} de 227°C para a amostra M-Q) quando comparadas às das amostras na forma de pó (T_{onset} de 276°C para a amostra Q), devido à acentuada redução da cristalinidade das amostras na forma de membrana quando comparado com a amostra na forma de pó. Por outro lado, as amostras M-CMQHs e M-CMQDs foram termicamente mais

estáveis com o aumento da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação, sendo que a T_{onset} aumentou de 228°C para 239°C nas amostras M-CMQH-2,5 ($\overline{GR} \approx 12,30\%$) e M-CMQH-50 ($\overline{GR} \approx 35,82\%$) respectivamente.

As amostras M-CMQHs e M-CMQDs apresentaram aumento da resistência máxima à tração com o aumento da concentração de glutaraldeído empregado na etapa de reticulação, sendo que a resistência máxima à tração aumentou de $0,21 \pm 0,16$ MPa para $0,82 \pm 0,33$ MPa nas amostras M-CMQD-5 ($\overline{GR} \approx 20,09\%$) e M-CMQD-50 ($\overline{GR} \approx 62,38\%$) respectivamente. Entretanto membranas mais reticuladas apresentaram comportamento frágil com pequena elongação na ruptura ($18,10 \pm 6,78\%$ para a amostra M-CMQD-50). As membranas de carboximetilquitosana com menor grau de reticulação apresentaram altos valores de percentual de elongação, sendo que a amostra M-CMQH-2,5 apresentou elongação máxima de $73,08 \pm 2,20\%$. Assim, é possível controlar as propriedades físicas das membranas a partir do controle criterioso do grau de reticulação das membranas.

As curvas de hidrólise enzimática evidenciaram o aumento da degradação enzimática com o aumento do tempo de incubação para todas as membranas incubadas em solução de lisozima. Entretanto, a amostra M-Q apresentou baixo valor de taxa de hidrólise enzimática ($[\text{GlcN}] = 47 \pm 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), quando comparada à amostra M-CMQH-5 ($[\text{GlcN}] = 259 \pm 38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) após 15 dias de incubação. Com o aumento do grau de reticulação, houve redução da taxa de hidrólise enzimática de $[\text{GlcN}] = 449 \pm 15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para $[\text{GlcN}] = 105 \pm 11 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 15 dias de incubação para as amostras M-CMQH-2,5 e M-CMQH-25 respectivamente. Assim, a taxa de hidrólise enzimática das membranas de carboximetilquitosana também pode ser ajustada a partir do controle do grau de reticulação e da massa molar média do polímero de partida.

As amostras M-CMQH-5, M-CMQH-10, M-CMQD-10 e M-CMQD-25 apresentam propriedades adequadas para o emprego como membranas para a prevenção das adesões pericárdicas, pois apresentam superfícies altamente porosas, com baixas taxa de hidratação e de solubilidade, resistência máxima à tração superior a 0,67 MPa, percentual de elongação superior à 30%, e degradação enzimática inferior a $[\text{GlcN}] = 400 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ após 15 dias de incubação.

PERSPECTIVA PARA FUTUROS TRABALHOS

Estudo *in vivo* da eficácia das membranas de N,O-carboximetilquitosana reticuladas para a prevenção das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas.

Estudo da influência da massa molar média, grau de acetilação e grau de substituição das membranas de carboximetilquitosana nas propriedades físicas, químicas e biológicas.

Estudo das propriedades físicas, químicas e biológicas das membranas de carboximetilquitosana reticuladas com agente reticulante de menor citotoxicidade (genipina) e pelo emprego de método físico de reticulação, como a irradiação γ).

7 REFERÊNCIAS

AARONSON, S.A.; BOTTARO, D.P.; MIKI, T.; RON, D.; FINCH, P. W.; FLEMING, T. P.; AHN, J.; TAYLOR, W. G.; RUBIN, J. S. Keratinocyte growth factor. A fibroblast growth factor family member with unusual target cell specificity. **The New York Academy of Sciences**. v. 638, p. 62-77, 1991.

ABREU, F. R. **Estudos de obtenção e caracterização de esferas entrecruzadas de carboximetilquitosana**. 2006. 158f. Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2006.

ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**. v. 75, p. 214-221, 2009.

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, 2004. 312 p.

ANDRADE, C. T.; COUTINHO, F. M. B.; LUCAS, E. F.; OLIVEIRA, C. M. F.; TABAK, D. **Dicionário de polímeros**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2001. p. 116.

BENNETT, S. L.; MELANSON, D. A.; TORCHIANA, D.F.; WISEMAN, D. M.; SAWHNEY, A. S. Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 18, p. 494-499, 2003.

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

CAMPANA FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, R. F.; CARDOSO, M. B.; MARCOS, V. Extração, estruturas e propriedades da α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

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

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

CHEN, L.; YUMIN, D. U.; ZENG, X. Relationship between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan. II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. **Carbohydrate Research**, v. 38, p. 333-340, 2003.

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

CLASEN, C.; WILHELMS, T.; KULICKE, W.-M. Formation and characterization of chitosan membranes. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 3210-3222, 2006.

DALLAN, L. A. O.; LOPES, J. B.; CAMPANA FILHO, S. P.; LISBOA, L. A. F.; GUTIERREZ, P. S.; MOREIRA, L. F. P.; OLIVEIRA, S. A. STOLF, N. A.G. Keratinocyte growth factor: a new mesothelial targeted therapy to reduce postoperative pericardial adhesions. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 35, p. 313-318, 2009.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele.** (2005). 212 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

DAROZ, L. R. D.; LOPES, J. B.; DALLAN, L. A. O.; CAMPANA FILHO, S. F.; MOREIRA, L. F. P.; STOLF, N. A. G. Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de carboximetilquitosana termooestéril. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, v. 23, n. 4, p. 480-487, 2008.

DE PAOLI, M. A. **Degradação e estabilização de polímeros.** São Paulo: Artliber Editora Ltda, 2009. 286 p.

DELEZUK, J. A. M. **Desacetilação de beta-quitina assistida por ultrassom de alta intensidade: Estudo dos efeitos da amplitude e do tempo de irradiação e da temperatura de reação.** (2009). 97 f. Dissertação (Mestre em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

FUJITA, M.; ISHIHARA, M.; SHIMIZU, M.; OBARA, K.; NAKAMURA, S.; KANATANI, Y.; MORIMOTO, Y.; TAKASE, B.; MATSUI, T.; KIKUCHI, M.; MAEHARA, T. Therapeutic angiogenesis induced by controlled release of fibroblast growth factor-2 from injectable chitosan/non-anticoagulant heparin hydrogel in a rat hindlimb ischemia model. **Wound Repair Regen**, v. 15, p. 58-65, 2007.

GALLO, J. I.; ARTINANO, E.; DURAN, C. M. Clinical experience with glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the closure of the pericardium after open heart surgery. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 30, p. 306-309, 1982.

GE, H.-C.; LUO, D.-K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, p. 1351-1356, 2005.

GOISSIS, G.; BRAILE, D. M.; GIGLIOTI, A. F. Desenvolvimento de processo automático para reticulação progressiva de matrizes de colágeno com glutaraldeído. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 9, p. 92-97, 1999.

GUANGYAN, L.; BAIYANG, S.; GAN, W.; YUJUN, W.; YANDAO, G.; XIUFANG, Z. Controlling the degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan utilizing bimodal molecular weight distribution. **Journal of Biomaterials Applications**. v. 23, p. 435-451, 2009.

GWON, H.-J.; LIM, Y.-M.; CHANG, H.-N.; NHO, Y.-C. Reduction of postsurgical adhesion formation with CM-chitosan hydrogel barriers prepared by using γ -irradiation. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 116, p. 3682-3687, 2010.

ISHIHARA, M.; FUJITA, M.; OBARA, K.; HATTORI, H.; NAKAMURA, S.; NAMBU, M.; KIYOSAWA, T.; KANATANI, Y.; TAKASE, B.; KIKUCHI, M.; MAEHARA, T. Controlled releases of FGF-2 and paclitaxel from chitosan hydrogels and their subsequent effects on wound repair, angiogenesis, and tumor growth. **Current Drug Delivery**, v. 3, p. 351-358, 2006.

JIN, J.; SONG, M.; HOURSTON, D. J. Novel Chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. **Biomacromolecules**, v. 5, p. 162-168, 2004.

KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sahurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymer**. v. 68, p. 477-488, 2007.

KONERTZ, W.F.; KOSTELKA, M.; MOHR, F.W.; HETZER, R.; HÜBLER, M.; RITTER, J.; LIU, J.; KOCH, C.; BLOCK, J. E. Reducing the incidence and severity of pericardial adhesions with a sprayable polymeric matrix. **Annals Thoracic Surgery**, v. 76, p. 1270-1274, 2003.

KRAUSE, T. J.; ZAZANIS, G.; MALATESTA, P.; SOLINA, A. Prevention of pericardial adhesions with N-O carboxymethylchitosan in the rabbit model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 14, p. 93-97, 2001.

LAKS, H.; HAMMOND, G.; GEHA, A. S. Use of silicone rubber as a pericardial substitute to facilitate reoperation in cardiac surgery. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 82, p. 88-92, 1981.

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

LIU, H.; FAN, H.; CUI, Y.; CHEN, Y.; YAO, K.; GOH, J. C. Effects of the controlled released basic fibroblast growth factor from chitosan-gelatin microspheres on human fibroblasts cultured on a chitosan-gelatin scaffold. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1446-1455, 2007.

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, p. 1324-1335, 2001.

LIU, Y.-F.; HUANG, K.-L.; PENG, D.-M.; DING, P.; LI, G.-Y. Preparation and characterization of glutaraldehyde cross-linked O-carboxymethylchitosan microspheres for controlled delivery of pazufloxacin mesilate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, p. 87-93, 2007.

LOPES, J. B. **Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de fator de crescimento de queratinócitos e carboximetilquitosana**. 2008. 90f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LOPES, J. B.; DALLAN, L. A. O.; MOREIRA, L. F. P.; CAMPANA FILHO, S. P.; GUTIERREZ, P. S.; LISBOA, L. A. F.; OLIVEIRA, S. A.; STOLF, N. A. Synergism between keratinocyte growth factor and carboxymethyl chitosan reduces pericardial adhesions. **Annals Thoracic Surgery**, v. 90, p. 566-572, 2010.

LU, G.; KONG, L.; SHENG, B.; WANG, G.; GONG, Y.; ZHANG, X. Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration. **European Polymer Journal**, v. 43, p. 3807-3818, 2007.

MASUOKA, K.; ISHIHARA, M.; ASAZUMA, T.; HATTORI, H.; MATSUI, T.; TAKASE, B.; KANATANI, Y.; FUJITA, M.; SAITO, Y.; YURA, H.; FUJIKAWA, K.; NEMOTO, K. The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. **Biomaterials**, v. 26, p. 3277-3284, 2005.

MEDICINA Geriátrica. **Pericardite aguda nos idosos**. Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/pericardio/>>. Acesso em: 20 mar. 2012.

MI, F.-L.; TAN, Y.-C.; LIANG, H.-C.; HUANG, R.-N.; SUNG, H.-W. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, p. 835-850, 2001.

MI, F.-L.; SHYU, S.-S.; PENG, C.-K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry**, v. 43, p. 1985-2000, 2005.

MILGALTER, E.; URETZKY, G.; SIBERMAN, S. Pericardial meshing: an effective method for prevention of pericardial adhesions and epicardial reaction after cardiac operation. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 90, p. 281-286, 1985.

MINALE, C.; NIKOL, S.; HOLLWEG, G.; MITTERMAYER, C.; MESSMER, B.J. Clinical experience with expanded polytetrafluoroethylene Gore-Tex surgical membrane for pericardial closure: a study of 110 cases. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 3, p. 193-201, 1988.

MONTEIRO, O. A. C. **Preparação, modificação química e calorimétrica do biopolímero quitosana**. 1999. 113p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1999.

NKERE, U. U.; WHAWELL, S. A.; SARRAF, C. E.; SCHOFIELD, J. B.; THOMPSON, J. N.; TAYLOR, K. M. Perioperative histologic and ultrastructural changes in the pericardium and adhesions. **Annals Thoracic Surgery**, v. 58, p. 437-444, 1994.

PRESTRELSKI, S. J.; FOX, G.M.; ARAKAWA, T. Binding of heparin to basic fibroblast growth factor induces a conformational change. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 293, p. 314-319, 1992.

PROCHAZKOVAD, S.; VARUMA, K. M.; OSTGAARD, K. Quantitative determination of chitosans by ninhydrin. **Carbohydrate Polymers**, v. 38, p. 115-122, 1999.

QIAN, G.; ZHOU, J.; MA, J.; WANG, D.; HE, B. The chemical modification of E. coli L-asparaginase by N,O-carboxymethyl chitosan. **Artificial Cells Blood Substitutes Immobilization Biotechnology**, v. 24, p. 567-577, 1996.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, p. 1457-1465, 2003.

RINAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG P. L. 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.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin chemistry**. London: Mc Millan, 1992. p. 350.

ROBISON, R. J.; BROWN, J. W.; DESCHNER, W. P.; HIGHER, B.; KING, H. Prevention of pericardial adhesions with dextran 70. **Annals Thoracic Surgery**, v. 37, p. 488-490, 1984.

SAHU, A.; GOSWAMI, P.; BORA, U. Microwave mediated rapid synthesis of chitosan. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, n. 1, p. 171-175, 2009.

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

SEEGER, J. M.; KAEHLIN, L. D.; STAPLES, D. A.; YAACOBI, Y.; BAILEY, J. C.; NORMANN, S.; BURNS, J. W.; GOLDBERG, E. P.. Prevention of postoperative pericardial adhesions using tissue-protective solutions. **Journal of Surgical Research**, v. 18, p. 63-66, 1997.

SGHEER, F. AL.; AL SAGHEERA, F.A.; AL-SUGHAYERB, M.A.; MUSLIMA, S.; ELSABEEC, M.Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 410-419, 2009.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, n. 4, p. 63-68, 1998.

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

SMITH JR., L. O. Prevention of surgically induced pericardial adhesions with combined dexamethasone and promethazine therapy. **Journal of the Florida Medical Association**, v. 55, p. 413-417, 1968.

SONG, Q.; ZHANG, Z.; GAO, J.; DING, C. Synthesis and property studies N-carboxynethyl chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 119, p. 3282-3285, 2011.

TATTINI JR., V.; PARRA, D. F.; PITOMBO, R. N. M. Influência da taxa de congelamento no comportamento físico-químico e estrutural durante a liofilização da albumina bovina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**. v. 42, p. 127-136, 2006.

TIAN, J. S.; CUI, Y. L.; YAO, K. D. A study on the fabrication of porous scaffold cross-linked with genipin. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON BIOINFORMATICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING, 3., 2009, Beijing. **Anais...**Beijing: IEEE Xplore, 2009. p.101-104.

TIEN AN, N.; THIEN, D. T.; DONG, N. T.; DUNG, P. L. Water-soluble N-carboxymethylchitosan derivatives: Preparation, characteristics and its application. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, p. 489-497, 2009.

TROWBRIDGE, J. M.; RUDISILL, J. A.; RON, D.; GALLO, R. L. Dermatan sulfate binds and potentiates activity of keratinocyte growth factor (FGF-7). **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 42815-42820, 2002.

VANDER SALM, T. J.; OKIKE, O. N.; MARSICANO, T. H.; C.; COMPTON; ESPINOZA, E. Prevention of postoperative pericardial adhesions. An animal study. **Archives Surgery**, v. 121, p. 462-467, 1986.

XI-GUANG, C.; HYUN-JIN, P. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, p.355-359, 2003.

WISEMAN, D. M.; KAMP, L.; LINSKY, C. B.; JOCHEN, R. F.; PANG, R. H.; SCHOLZ, P. M. Fibrinolytic drugs prevent pericardial adhesions in the rabbit. **Journal of Surgical Research**, v. 53, p. 362-368, 1992.

WU, Y.-B.; YU, S.-H.; MI, F.-L.; WU, C.-W.; SHYU, S.-S.; PENG, C.-K.; CHAO, A.-C.. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends. **Carbohydrate Polymers**, v. 57, p. 435-440, 2004.

YAN, L.-P.; WANG, Y.-J.; REN, L.; WU, G.; CARIDADE, S. G.; FAN, J.-B.; WANG, L.-Y.; JI, P.-H.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, J. T.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 95A, p. 465-475, 2010.

YE, S.; LUO, Y.; LU, W.; JONES, R. B.; LINHARDT, R. J.; CAPILA, I.; TOIDA, T.; KAN, M.; PELLETIER, H.; MCKEEHAN, W. L. Structural basis for interaction of FGF-1, FGF-2 and FGF-7 with different heparan sulfate motifs. **Biochemistry**, v. 40, p. 14429-14439, 2001.

ZHAO, L.; MITOMO, H.; NAGASAWA, N.; YOSHII, F.; KUMEB, T. Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, p. 169-175, 2003.