UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO

**Desenvolvimento de Sistemas Anfífilos Baseados em Derivados de Quitosana para
Transporte e Liberação Sustentada de Fármacos.**

São Carlos

2017

RAFAEL DE OLIVEIRA PEDRO

Desenvolvimento de Sistemas Anfifílicos Baseados em Derivados de Quitosana para
Transporte e Liberação Sustentada de Fármacos

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação do Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências (Físico-química).

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Miguel Guillermo Neumann

Exemplar revisado

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

São Carlos

2017

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

Assinatura: Rafael de Oliveira Pedro
Data: 12/05/17

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

De Oliveira Pedro, Rafael

Desenvolvimento de sistemas anfílicos baseados em derivados de quitosana para transporte e liberação sustentada de fármacos / Rafael De Oliveira Pedro. — São Carlos, 2017.
165 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2017.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Miguel Guillermo Neumann

1. Quitosana. 2. Nanopartículas. 3. Transporte e liberação de fármacos. 4. Derivados anfílicos. 5. Células MCF-7. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

**“Aos meus pais, Anísio e Cleide, as
minhas irmãs Patrícia e Larissa,
que com seu apoio, compreensão,
incentivo constante e amor
incondicional foram responsáveis
diretos pelo êxito dessa
caminhada.”**

AGRADECIMENTOS

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

À minha família pela confiança, apoio e carinho oferecidos em todo momento de minha vida.

Ao meu orientador, Profº Drº Miguel G. Neumann, pela amizade, paciência, disponibilidade, incentivo e, acima de tudo, pelos conhecimentos compartilhados.

À Hellen por todo carinho, paciência, compreensão, companheirismo e apoio em todas as etapas dessa jornada.

À Profª Drª Carla Cristina Schmitt Cavalheiro pela colaboração, incentivo e apoio.

Ao Profº Éder Tadeu Gomes Cavalheiro pela amizade, dedicação, sabedoria, colaboração e discussões engrandecedoras.

Ao Profº Francisco M. Goycoolea por todos os momentos de amizade, sabedoria, trabalho, dedicação e, acima de tudo, envolvimento.

Ao Profº Sergio Paulo Campana Filho pelas valiosas contribuições.

À técnica do Grupo de Fotoquímica, Alessandra Lima Poli Leves, pelo profissionalismo e dedicação.

Aos meus amigos Marcos Costa, Paulo José e Marcelo Bello pelas horas de dedicação, companheirismo, diversão e risadas.

Aos meus amigos Hao, Eric, Kathrin, Stefan, Susana, Sara, Xiaofei, Tamara, Luciano e Sergio que fizeram minha estadia na Alemanha um período mais do que especial.

A todos os meus amigos e colegas do Grupo de Fotoquímica do IQSC.

Ao Institut Für Biologie und Biotechnologie der Pflanzen da Westfälische Wilhelms-Universität Münster pela oportunidade.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelos inestimados auxílios financeiros.

À Universidade de São Paulo, especialmente ao Instituto de Química de São Carlos e aos membros do Departamento de Físico-Química, que contribuíram para realização desse trabalho.

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência. ”

Augusto Cury

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver. ”

Martin Luther King

“Wer sein Ideal erreicht, kommt eben damit über dasselbe hinaus.”

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Esse trabalho apresenta resultados de modificações estruturais, caracterizações e aplicações de derivados de quitosana como carreadores de fármacos. Derivados anfifílicos de quitosana, contendo grupos hidrofílicos e grupos hidrofóbicos, foram caracterizados por técnicas de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN¹H), espectroscopia na região do infravermelho (IV), espectroscopia na região do UV-Vis, técnicas termoanalíticas (termogravimetria (TGA), termogravimetria derivada (DTG), análise térmica diferencial (DTA) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)), fluorescência no estado estacionário, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e microscopia eletrônica de transmissão (MET). Os resultados de caracterização mostraram que as sínteses propostas foram realizadas com sucesso. A determinação da concentração de agregação crítica (CAC) e os estudos de DLS e MET confirmam que os derivados se auto-organizam em solução aquosa formando agregados com diâmetros variando entre 230 a 500 nm. Esses valores, associados aos potenciais zeta (ζ) obtidos (+14,1 mV a +44,8 mV), demonstram que os agregados são estáveis em solução, característica fundamental para aplicação no transporte de fármacos. A capacidade de encapsulamento do fármaco quercetina por esses derivados foi avaliada por estudos de incorporação utilizando a espectroscopia UV-Vis. Os resultados obtidos demonstraram que o comportamento dos derivados depende de parâmetros como o grau de hidrofilicidade e grupo hidrofílico, grau de hidrofobicidade e pH do meio de encapsulamento, possibilitando controlar a quantidade de fármaco contida nos carreadores. A atividade biológica dos agregados formados pelos derivados de quitosana foi testada em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) e os resultados indicaram baixa toxicidade dos carreadores, além de potencialização do efeito terapêutico do fármaco. Estudos de microscopia confocal de varredura a laser evidenciaram que agregados marcados com proteína verde fluorescente com afinidade por quitosana (CAP-sfGFP) foram internalizados pelas células MCF-7. Resultados de hemocompatibilidade indicaram que os polímeros apresentam baixa destruição de glóbulos vermelhos do sangue e liberação de hemoglobina. Portanto, esses derivados possuem características adequadas para aplicação no transporte e liberação controlada de fármacos.

Palavras-chave: Quitosana, derivados anfifílicos, transporte e liberação de fármacos, células MCF-7.

ABSTRACT

This thesis presents results of structural modifications, characterizations and applications of chitosan derivatives as drug carriers. Amphiphilic derivatives of chitosan containing hydrophilic and hydrophobic groups were characterized by nuclear magnetic resonance spectroscopy (RMN¹H), infrared spectroscopy (IV), uv-vis spectroscopy, thermoanalytical techniques (thermogravimetry (TGA), derivative thermogravimetry (DTG), differential thermal analysis (DTA) and differential exploratory calorimetry (DSC)), fluorescence, dynamic light scattering (DLS) and transmission electron microscopy (MET). The characterization results showed that the proposed syntheses were successfully performed. The critical aggregation concentration (CAC), DLS and MET studies confirmed that the derivatives self-assembled in aqueous solution forming aggregates with diameters ranging from 230 to 500 nm. These values, associated with zeta potentials (+14.1 mV to +44.8 mV), demonstrate that the aggregates were stable in solution. The ability to encapsulate quercetin by these derivatives was assessed by incorporation studies using UV-Vis spectroscopy. The results showed that the behavior of the derivatives depends on parameters such as the degree of hydrophilicity and hydrophilic groups, degree of hydrophobicity and pH of the encapsulation medium. The biological activity of the aggregates formed by the chitosan derivatives was tested in breast cancer cells (MCF-7) and the results indicated low toxicity of the carriers, in addition to improving the therapeutic effect of the drug. Confocal laser scanning microscopy studies showed that aggregates stained with chitosan-affinity protein (CAP-sfGFP) were internalized by MCF-7 cells. Hemolysis assays showed good hemocompatibility of chitosan derivatives. Therefore, the derivatives have suitable characteristics for application as drug delivery systems.

Keywords: Chitosan, amphiphilic derivatives, transport and drug release, MCF-7 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação da estrutura da quitina. O índice n indica o grau de polimerização..	21
Figura 2: Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina.....	23
Figura 3: Representação da estrutura da quitosana. Os índices GD e GA representam o grau de desacetilação e grau de acetilação, respectivamente.	24
Figura 4: Número de publicações incluindo o termo "chitosan" na base de dados <i>Web of Science</i> desde o ano de 1900.	31
Figura 5: Comparação da variação do nível de fármaco liberado no organismo a partir de sistema de liberação clássica (ou imediata) e liberação controlada.....	36
Figura 6: Representação esquemática das mudanças de pH na região de um tecido tumoral..	39
Figura 7: Representação da estrutura da quercetina.	40
Figura 8: Esquema de auto-organização, encapsulamento e liberação de fármaco em solução aquosa contendo derivados anfifílicos de quitosana.....	41
Figura 9: Representação da estrutura química dos reagentes utilizados na síntese dos derivados de quitosana.	44
Figura 10: Esquema ilustrativo da rota de síntese utilizada na obtenção dos derivados anfifílicos de quitosana.	52
Figura 11: Espectro de RMN ¹ H da quitosana desacetilada.	63
Figura 12: Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial (QC) e desacetilada (QD).	64
Figura 13: Esquema do mecanismo de reação de substituição nucleofílica da quitosana com o grupo PTMA em meio básico.....	66
Figura 14: Esquema do mecanismo de reação de substituição nucleofílica da quitosana com o dodecilaldeído.....	67
Figura 15: Espectro de RMN ¹ H da quitosana modificada com grupo hidrofílico PTMA.	69
Figura 16: Espectro de RMN ¹ H dos derivados anfifílicos de quitosana modificados com o grupo PTMA, contendo 5,2% (QPTMA ₄₀ DDA ₅) e 33,8% (QPTMA ₄₀ DDA ₃₀) do grupo hidrofóbico DDA.	70
Figura 17: Espectros de absorção na região do infravermelho para o sal pentiltrimetilamônio (PTMA), quitosana desacetilada (QD) e quitosana substituída com 42,2% do grupo hidrofílico (QPTMA ₄₀).	72
Figura 18: Espectros de absorção na região do infravermelho para quitosana desacetilada (QD) e seus derivados.	73
Figura 19: Esquema do mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE.....	74
Figura 20: Espectro de RMN ¹ H da quitosana modificada com grupo hidrofílico DEAE.....	75
Figura 21: Espectro de RMN ¹ H dos derivados anfifílicos de quitosana modificados com o grupo DEAE, contendo 5,2% (QDEAE ₄₀ DDA ₅) e 33,8% (QDEAE ₄₀ DDA ₃₀) do grupo hidrofóbico DDA.	76

Figura 22: Espectros de absorção na região do infravermelho para a quitosana desacetilada (QD) e quitosana substituída com 38,5% do grupo DEAE (QDEAE ₄₀).	77
Figura 23: Espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras QDEAE ₄₀ , QDEAE ₄₀ DDA ₅ e QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	78
Figura 24: Esquema do mecanismo de reação de substituição por grupos GLY.	79
Figura 25: Espectro de RMN ¹ H da quitosana modificada com grupo hidrofílico GLY.	80
Figura 26: Espectro de RMN ¹ H dos derivados anfifílicos de quitosana modificados com o grupo GLY, contendo 7,5% (QGLY ₄₀ DDA ₅) e 34,3% (QGLY ₄₀ DDA ₃₀) do grupo hidrofóbico DDA.	81
Figura 27: Espectros de absorção na região do infravermelho para a quitosana desacetilada (QD) e quitosana substituída com 44,6% do grupo GLY (QGLY ₄₀).	82
Figura 28: Espectros de absorção na região do infravermelho para QGLY ₄₀ , QGLY ₄₀ DDA ₅ e QGLY ₄₀ DDA ₃₀	83
Figura 29: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QC e b) QD obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min ⁻¹ ; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min ⁻¹ ; porta amostra aberto de α -alumina.	85
Figura 30: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QPTMA ₄₀ , b) QPTMA ₄₀ DDA ₅ e c) QPTMA ₄₀ DDA ₃₀ obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min ⁻¹ ; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min ⁻¹ ; porta amostra aberto de α -alumina.	86
Figura 31: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QDEAE ₄₀ , b) QDEAE ₄₀ DDA ₅ e c) QDEAE ₄₀ DDA ₃₀ obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min ⁻¹ ; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min ⁻¹ ; porta amostra aberto de α -alumina.	88
Figura 32: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QGLY ₄₀ , b) QGLY ₄₀ DDA ₅ e c) QGLY ₄₀ DDA ₃₀ obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min ⁻¹ ; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min ⁻¹ ; porta amostra aberto de α -alumina.	89
Figura 33: Curvas DSC das amostras de a) quitosana comercial e desacetilada e modificada com os grupos b) PTMA, c) DEAE e d) GLY.	92
Figura 34: Gráfico da transmitância em ($\lambda = 566$ nm) em função do pH para as quitosanas QD, QPTMA ₄₀ , QDEAE ₄₀ e QGLY ₄₀ na concentração de 1,0 g L ⁻¹	94
Figura 35: Gráfico da transmitância em ($\lambda = 566$ nm) em função do pH para os derivados anfifílicos de quitosana na concentração de 1,0 g L ⁻¹	95
Figura 36: Determinação da CAC do polímero QGLY ₄₀ DDA ₃₀ . Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.	96
Figura 37: Diâmetro hidrodinâmico médio em função da concentração em pHs 5,0 e 7,4 para os derivados a) QPTMA ₄₀ DDA ₅ e QPTMA ₄₀ DDA ₃₀ , b) QDEAE ₄₀ DDA ₅ e QDEAE ₄₀ DDA ₃₀ e c) QGLY ₄₀ DDA ₅ e QGLY ₄₀ DDA ₃₀	100

Figura 38: Microscopia eletrônica de transmissão para as amostras a) QPTMA ₄₀ DDA ₅ , b) QPTMA ₄₀ DDA ₃₀ , c) QDEAE ₄₀ DDA ₅ , d) QDEAE ₄₀ DDA ₃₀ , e) QGLY ₄₀ DDA ₅ e f) QGLY ₄₀ DDA ₃₀ .	102
Figura 39: Espectros de absorção da quercetina em soluções tamponantes de pH a) 5,0 e b) 7,4.	103
Figura 40: Estabilidade dos nanoagregados carregados com quercetina em meio de cultura celular RPMI 1640 ao longo de 24 horas.	107
Figura 41: Liberação acumulada <i>in vitro</i> de quercetina ao longo de 96 horas.	108
Figura 42: Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado à curva de liberação para os agregados formados pelo derivado QPTMA ₄₀ DDA ₅ em pH 5,0.	110
Figura 43: Estruturas do sal MTT e do produto colorido formazan.	112
Figura 44: Ensaios de viabilidade celular (24 horas de incubação) para os agregados vazios utilizando células MCF-7.	113
Figura 45: Ensaios de viabilidade celular (24 horas) para os agregados carregados com quercetina (QCT) utilizando células MCF-7.	115
Figura 46: Evolução do diâmetro médio e PDI das partículas marcadas com CAP-sfGFP ao longo do tempo.	117
Figura 47: Microscopia confocal de varredura à laser de células MCF-7. a) Separação espectral dos fluoróforos para células incubadas com CAP-sfGFP livre. b) Sobreposição dos canais para células incubadas com proteína CAP-sfGFP livre. c) Separação espectral dos fluoróforos para células incubadas com nanopartículas recobertas com CAP-sfGFP. d) Sobreposição dos canais para células incubadas com nanopartículas recobertas com CAP-sfGFP.	118
Figura 48: a) Imagem de microscopia confocal de varredura à laser das células MCF-7 tratadas com nanoagregados formados pelo derivado QPTMA ₄₀ DDA ₅ . b) Seção transversal das células indicando a localização dos nanoagregados.	119
Figura 49A: Espectro de RMN ¹ H da quitosana desacetilada.	148
Figura 50A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QPTMA ₄₀ .	149
Figura 51A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QPTMA ₄₀ DDA ₅ .	150
Figura 52A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QPTMA ₄₀ DDA ₃₀ .	151
Figura 53A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QDEAE ₄₀ .	152
Figura 54A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QDEAE ₄₀ DDA ₅ .	153
Figura 55A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QDEAE ₄₀ DDA ₃₀ .	154
Figura 56A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QGLY ₄₀ .	155
Figura 57A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QGLY ₄₀ DDA ₅ .	156
Figura 58A: Espectro de RMN ¹ H da amostra QGLY ₄₀ DDA ₃₀ .	157
Figura 59B: Determinação da CAC dos polímeros a) QPTMA ₄₀ , b) QPTMA ₄₀ DDA ₅ e c) QPTMA ₄₀ DDA ₃₀ . Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.	159

Figura 60B: Determinação da CAC dos polímeros a) QDEAE ₄₀ , b) QDEAE ₄₀ DDA ₅ e c) QDEAE ₄₀ DDA ₃₀ . Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.....	160
Figura 61B: Determinação da CAC dos polímeros a) QGLY ₄₀ , b) QGLY ₄₀ DDA ₅ e c) QGLY ₄₀ DDA ₃₀ . Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.....	161
Figura 62C: Curva de calibração de CAP-sfGFP em solução tamponante pH 6,0.	163

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Reagentes utilizados no trabalho	48
Tabela 2: Atribuições de bandas e frequências vibracionais em cm^{-1}	64
Tabela 3: Resultados de caracterização por RMN ¹ H e massa molar viscosimétrica média das amostras utilizadas no trabalho.....	83
Tabela 4: Resultados quantitativos das curvas TGA/DTG e picos DTA nas seguintes condições: Vazão de ar: 100 mL min ⁻¹ ; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min ⁻¹ ; porta amostra aberto de α -alumina	90
Tabela 5: Valores de CACs obtido em diferentes pHs para os derivados anfifílicos de quitosana	97
Tabela 6: Diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas formadas pelos derivados de quitosana em pH 5,0 e 7,4	98
Tabela 7: Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (CC) da quercetina para os agregados formados pelos derivados anfifílicos de quitosana em pHs 5,0 e 7,4	104
Tabela 8: Diâmetro médio, potencial zeta e polidispersividade dos agregados anfifílicos de quitosana vazios e carregados com quercetina	106
Tabela 9: Valores de k , n , R^2 e mecanismos de liberação de fármaco dos agregados em pH 5,0 e 7,4	111
Tabela 10: Eficiência de associação de CAP-sfGFP às partículas formadas pelo derivado QPTMA ₄₀ DDA ₅	117
Tabela 11: Taxa de hemólise para os agregados formados pelos derivados de quitosana ($n = 9$, 1,0 g L ⁻¹)	121

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ζ	Potencial zeta
$\bar{M}_v$	Massa molar viscosimétrica média
$\overline{GA}$	Grau médio de acetilação
$\overline{GD}$	Grau médio de desacetilação
$\overline{GS}$	Grau médio de substituição
CAC	Concentração de agregação crítica
CAP-sfGFP	Proteína verde fluorescente com afinidade por quitosana
CC	Capacidade de carreamento
DDA	Dodecil aldeído
DEAE	Cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTA	Análise térmica diferencial
DTG	Termogravimetria derivada
EE	Eficiência de encapsulamento
GlcN	Unidade 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranoose
GlcNAc	Unidade 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranoose
GLY	2,3-Epóx-1-propanol
IV	Espectroscopia na região do infravermelho
MCF-7	Células de adenocarcinoma de mama
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MTT	Sal de tretrazólio
NAD ⁺	Dinucleótido de nicotinamida e adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido
PBS	Solução tamponante de fosfato salino
PDI	Índice de polidispersão
PEG	Polietileno glicol

PTMA	Brometo de 5-pentiltrimetilamônio
QC	Quitosana comercial
QD	Quitosana desacetilada
QDEAE ₄₀	Derivado de quitosana modificado com 38,5% do grupo DEAE
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	Derivado de quitosana modificado com 38,5% do grupo DEAE e 27,9% do grupo DDA
QDEAE ₄₀ DDA ₅	Derivado de quitosana modificado com 38,5% do grupo DEAE e 5,1% do grupo DDA
QGLY ₄₀	Derivado de quitosana modificado com 44,6% do grupo GLY
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	Derivado de quitosana modificado com 44,6% do grupo GLY e 34,3% do grupo DDA
QGLY ₄₀ DDA ₅	Derivado de quitosana modificado com 44,6% do grupo GLY e 7,5% do grupo DDA
QPTMA ₄₀	Derivado de quitosana modificado com 42,2% do grupo PTMA
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	Derivado de quitosana modificado com 42,2% do grupo PTMA e 33,8% do grupo DDA
QPTMA ₄₀ DDA ₅	Derivado de quitosana modificado com 42,2% do grupo PTMA e 5,2% do grupo DDA
RMN ¹ H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear
TGA	Termogravimetria
TPP	Tripolifosfato de sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Quitina	20
1.2 Quitosana	23
1.2.1 Ocorrência e obtenção	23
1.2.2 Propriedades	25
1.2.3 Grau médio de desacetilação (GD) e massa molar	27
1.2.4 Modificações químicas.....	29
1.2.5 Aplicações	30
1.3 Sistemas de liberação controlada de fármacos.....	34
1.4 Câncer de mama	37
1.5 Quercetina	39
1.6 Aplicação de derivados anfifílicos de quitosana como nanocarreadores de fármacos ...	41
2 OBJETIVOS	46
2.1 Objetivos específicos	46
3 PARTE EXPERIMENTAL.....	48
3.1 Reagentes	48
3.2 Síntese dos derivados de quitosana.....	48
3.2.1 Desacetilação da quitosana.....	48
3.2.2 Despolimerização da quitosana	49
3.2.3 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo pentil trimetilamônio (PTMA)	49
3.2.4 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo cloreto de 2-cloro-N,N-dietilamina (DEAE).....	50
3.2.5 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo 2,3-Epóx-1-propanol (GLY).....	50
3.2.6 Síntese dos derivados dodecilados de quitosana	50
3.3 Caracterização dos derivados de quitosana.....	52
3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H).	52
3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho Com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)	53
3.3.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média.....	53
3.3.4 Análise térmica.....	54
3.3.5 Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	54

3.4 Estudo do comportamento dos derivados em solução	55
3.4.1 Determinação da solubilidade dos derivados em função do pH	55
3.4.2 Determinação da concentração de agregação crítica por Fluorescência no Estado Estacionário	55
3.5 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Determinação do Potencial Zeta (ζ)	56
3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	56
3.7 Estudo da incorporação de fármacos utilizando a Espectroscopia UV-Vis	56
3.8 Liberação do fármaco <i>in vitro</i>	57
3.9 Citotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio de MTT	58
3.10 Ensaios de internalização celular das nanopartículas	58
3.10.1 Eficiência de associação de proteína CAP-sfGFP às nanopartículas	58
3.10.2 Interação célula-nanopartícula por Microscopia Confocal de Varredura à Laser ..	59
3.11 Ensaios de hemocompatibilidade pela atividade hemolítica	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 Caracterização da quitosana desacetilada	62
4.1.1 Determinação do grau médio de desacetilação GD da quitosana por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	62
4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho (IV)	63
4.1.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média	65
4.2 Síntese e caracterização dos derivados anfifílicos de quitosana contendo o grupo pentiltrimetilamônio (PTMA)	65
4.2.1 Determinação do grau médio de substituição GS por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	68
4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	71
4.3 Síntese e caracterização dos derivados anfifílicos de quitosana contendo o grupo cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina (DEAE)	73
4.3.1 Determinação do grau médio de substituição GS por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	74
4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	76
4.4 Síntese e caracterização dos derivados anfifílicos de quitosana contendo o grupo 2,3-Epóx-1-propanol (GLY)	78
4.4.1 Determinação do grau médio de substituição GS por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	79
4.4.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)	81
4.5 Análise térmica	83
4.6 Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	91
4.7 Estudo do comportamento dos derivados em solução	93

4.7.1 Determinação da solubilidade dos derivados em função do pH	93
4.7.2 Determinação da concentração de agregação crítica por Fluorescência no Estado Estacionário	95
4.8 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Determinação do Potencial Zeta (ζ)	97
4.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	101
4.10 Estudo da interação de fármacos com os agregados de quitosana	103
4.10.1 Determinação da incorporação de quercetina utilizando a Espectroscopia UV-Vis	103
4.10.2 Determinação da influência do fármaco no tamanho e potencial Zeta dos agregados	105
4.10.3 Liberação do fármaco <i>in vitro</i>	107
4.11 Citotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio de MTT	111
4.12 Ensaios de internalização celular das nanopartículas	116
4.13 Ensaios de hemocompatibilidade pela atividade hemolítica	120
5 CONCLUSÕES	124
6 PERSPECTIVAS FUTURAS	128
7 REFERÊNCIAS	130
APENDICE A	147
Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹ H)	147
APENDICE B	158
Gráficos da razão I/III vs concentração para determinação da CAC	158
APENDICE C	162
Curva de calibração para determinação da concentração de CAP-sfGFP	162
APENDICE D	164
Lista de trabalhos preparados durante o doutoramento	164

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quitina

Macromoléculas fazem parte do nosso cotidiano, podendo ser de origem natural, como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos, ou de origem sintética como plásticos, borracha, tintas, nanotubos de carbono, entre outros. A hipótese macromolecular, no entanto, surgiu apenas em 1922 quando o químico alemão Hermann Staudinger (1881 – 1965) sugeriu o termo “macromoléculas” para se referir a moléculas muito grandes (MULHAUPT, 1999). Após significativa relutância da comunidade científica, a aceitação da existência de compostos macromoleculares permitiu o avanço da área e descoberta de várias substâncias. Staudinger apresentou ainda várias reações que formavam moléculas de alto peso molecular pela ligação de pequenas moléculas entre si. O termo "polimerização" foi utilizado para se referir à ligação de unidades repetitivas individuais unidas entre si por ligações covalentes. Essas unidades individuais foram denominadas monômeros, enquanto que o produto final recebeu a denominação de polímero.

Polímeros sintéticos são produzidos de forma artificial. Diversos polímeros sintéticos estão disponíveis com variações na cadeia principal, bem como cadeias laterais. As cadeias principais de polímeros sintéticos mais comumente empregados, como polietileno, poliestireno e poliacrilatos, são constituídas por ligações carbono-carbono, enquanto que os polímeros de cadeia heterogênea como as poliamidas, poliésteres, poliuretanos, polissulfuretos e policarbonatos têm outros elementos como oxigênio e enxofre. O silício também pode estar presente em polímeros por meio de ligações siloxano, tais como silicones.

Biopolímeros são polímeros produzidos por organismos vivos. Os principais biopolímeros, classificados de acordo com as unidades monoméricas utilizadas e a sua respectiva estrutura, são polinucleotídeos, polipeptídeos e polissacarídeos. A celulose é o biopolímero mais comum na Terra, compondo em média 33% de toda a matéria vegetal. Os biopolímeros diferem entre si pelas unidades monoméricas, tipos de ligação, comprimento da cadeia, grau de ramificação, além de outras propriedades.

A quitina é um copolímero linear constituído por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (GlcN) unidas por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Figura 1). Esse biopolímero é sintetizado por diversos tipos de organismos e atua

como um dos componentes estruturais do exoesqueleto de artrópodes e da parede celular de fungos e leveduras (RINAUDO, 2006). A quitina, assim como a celulose, pode ser encontrada como polissacarídeo estrutural nos reinos vegetal e animal. Apesar da ocorrência generalizada, as principais fontes comerciais de quitina são as obtidas de caranguejo e camarão.

Figura 1: Representação da estrutura da quitina. O índice n indica o grau de polimerização.

Fonte: Autoria própria.

O químico e farmacêutico francês Henri Braconnot (1780-1855) foi o responsável pelo descobrimento e descrição da quitina no século XIX, sendo esse o primeiro polissacarídeo descrito, 30 anos antes da celulose (MUZZARELLI et al., 2012). Braconnot usou extrato obtido de diferentes fungos e, após purificação em hidróxido de potássio diluído para remoção de proteínas e pigmentos, obteve um complexo quitina-glucano que foi denominado “fungina”. Foi observado que esse material produzia amônia quando era destilado com hidróxido de potássio, indicando a presença de nitrogênio (MUZZARELLI et al., 2012). Essa observação foi confirmada por Anselme Payen (1795 – 1871), demonstrando que aproximadamente 9% do exoesqueleto de artrópodes era composto por nitrogênio. O termo fungina foi alterado para quitina por Auguste Odier (1802 – 1870) em 1823 baseado na palavra grega “*khitón*” que significa carapaça ou envelope.

Embora a quitina apresente função estrutural na natureza assim como a celulose, suas propriedades são diferenciadas. Este polissacarídeo é altamente hidrofóbico e insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, podendo ser parcialmente solubilizado em hexafluoro-2-propanol, hexafluoracetona, álcoois clorados em conjugação com soluções aquosas de ácido minerais ou solução de dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (KUMAR, M., 2000).

As principais fontes de obtenção da quitina originam-se dos subprodutos da indústria pesqueira. A quitina proveniente dessa matéria-prima contém significativas quantidades de matéria orgânica, lipídios e pigmentos. Desse modo, o descarte indiscriminado desses resíduos em corpos aquáticos, e, conseqüentemente, a decomposição desses produtos, pode acarretar no desequilíbrio desses ecossistemas. Além disso, a atividade pesqueira e os trabalhadores que dependem diretamente dela, podem ser diretamente impactados com a incorreta disposição desses subprodutos. A produção de quitina a partir dessas fontes é financeiramente viável, especialmente se incluir a recuperação de carotenóides como a astaxantina, utilizada como aditivo na aquicultura (KUMAR, M., 2000). Assim, o reaproveitamento desses resíduos não só agrega valores financeiros adicionais, mas também contribui para minimizar os impactos gerados pela indústria de pescados.

O processo de obtenção industrial da quitina a partir da indústria pesqueira utiliza tratamento ácido dos crustáceos para dissolução do carbonato de cálcio, seguido pela extração alcalina que solubiliza as proteínas. Na sequência, o material é descolorado para obtenção de um material branco, sólido e inelástico (RINAUDO, 2006). Essas etapas, no entanto, devem ser adaptadas para cada tipo de fonte de quitina, devido às diferentes constituições dos organismos (KUMAR, M., 2000).

As cadeias da quitina se organizam na forma de lamelas umas paralelas as outras, podendo ocorrer em três formas polimórficas distintas: alfa (α -), beta (β -) ou gama (γ -), representadas na Figura 2. As formas α ou β são dependentes da fonte, enquanto que alguns autores consideram a γ -quitina como umas das variações das formas anteriores (RUDALL, 1969). A α -quitina é a mais abundante, sendo encontrada principalmente em fungos, leveduras, camarões, lagostas e caranguejos. Outras fontes de α -quitina podem ser citadas: concha espiralada de caracóis (OLIVERA et al., 1995) e filamentos das algas *Phaeocystis* (CHRETIENNOTDINET et al., 1997). Embora pouco abundante, essas fontes alternativas são de grande interesse científico, uma vez que a quitina obtida possui excelente cristalinidade e pureza, devido à ausência de pigmentos e proteínas comumente presentes no processo de extração das demais fontes (RINAUDO, 2006).

Figura 2: Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina.

Adaptado de CAMPANA-FILHO et al. (2007).

A β -quitina é menos abundante e ocorre em estruturas mais flexíveis, embora resistentes. As principais fontes são gládios de lula (CAMPANA-FILHO et al., 2007), além de alguns tipos de algas e protozoários (RINAUDO, 2006). α - e β -quitina possuem propriedades semelhantes entre si tais como insolubilidade em água e retenção de umidade, embora a α -quitina seja um sólido mais denso enquanto que a β -quitina possui aspecto fibroso.

1.2 Quitosana

1.2.1 Ocorrência e obtenção

A principal derivatização da quitina resulta no polissacarídeo denominado quitosana, obtido pela hidrólise dos grupos acetoamida, num processo conhecido por desacetilação, em condições alcalinas ou por hidrólise enzimática na presença da enzima quitina desacetilase (RINAUDO, 2006). Normalmente condições ácidas não são empregadas no processo de desacetilação devido à susceptibilidade das ligações glicosídicas à hidrólise ácida. Assim como a quitina, esse polímero é constituído por unidades 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose (GlcNAc) e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose (GlcN) unidas por ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A principal diferença entre esses dois polissacarídeos é a porcentagem de unidades acetiladas presente na estrutura polimérica (Figura 3). A quitosana apresenta teor de nitrogênio acima de 7% e é definida por apresentar porcentagem média de unidades desacetiladas GlcN maior que 60%, enquanto que a quitina apresenta média de unidades GlcN inferior a esse valor (KUMAR, M. et al., 2004). Devido à presença predominante de unidades GlcN, e consequentemente

grupos amina ($-NH_2$), a quitosana pode participar de reações típicas de aminas, permitindo a obtenção de derivados por meio de reações químicas em condições relativamente brandas (KUMAR, M. et al., 2004).

Figura 3: Representação da estrutura da quitosana. Os índices GD e GA representam o grau de desacetilação e grau de acetilação, respectivamente.

Fonte: Autoria própria.

Em 1859 Charles Marie Benjamin Rouget (1824 – 1904) relatou a descoberta de um novo composto após manipulação térmica da quitina em hidróxido de potássio (RAAFAT; SAHL, 2009; SARMENTO; NEVES, 2012). Foi observado que esse produto era solúvel em soluções ácidas, em oposição ao material de partida. Após 35 anos, o fisiologista e químico alemão Felix Hoppe-Seyler (1825 – 1895) atribuiu a denominação quitosana para esse composto (SARMENTO; NEVES, 2012).

A produção industrial da quitosana se dá pela desacetilação alcalina da quitina, em solução 40-50% de hidróxido de sódio, com temperatura média de 105 °C e intervalo de reação variando entre 1 e 3 horas (RAAFAT; SAHL, 2009). A quitosana também pode ser encontrada na natureza, especialmente em paredes celulares de fungos zigomicetos (TAN, S. et al., 1996), na alga verde unicelular *Chlorella spp.* (RAAFAT; SAHL, 2009), leveduras (POCHANAVANICH; SUNTORNSUK, 2002) e cutículas de insetos (RAAFAT; SAHL, 2009). Esse polissacarídeo pode apresentar diferenças na sua estrutura, dependendo da sua origem. Quitosanas obtidas a partir de quitina extraída de crustáceos possuem grupamentos acetilados com distribuição relativamente uniforme ao longo da cadeia polimérica. Por outro lado, quitosanas de similar grau de desacetilação isolada da parede celular de fungos apresenta resíduos acetilados agrupados em clusters.

Devido ao caráter heterogêneo da reação de desacetilação em meio básico, as quitosanas obtidas são consideradas copolímeros constituídos por unidades GlcNAc e GlcN. De acordo

com KUMAR, M. (2000), em média a produção industrial de 1 kg de quitosana com grau de desacetilação ($\overline{GD}$) de 70% requer 6,3 kg de HCl, 1,8 kg de NaOH, além de 1,5 t água e nitrogênio, responsável por prevenir reações secundárias indesejadas. Nesse sentido, trabalhos tem sido propostos objetivando a redução das quantidades de ácido e base utilizadas no processo de obtenção a quitosana (HE, X. et al., 2016; TAHTAT et al., 2007).

1.2.2 Propriedades

As propriedades da quitosana estão intrinsecamente relacionadas a parâmetros como o grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), massa molar e pH do meio. Ao contrário de outros polissacarídeos naturais como a celulose, dextrana, pectina, ácido alginico, ágar e agarose, os quais são ácidos ou neutros na natureza, quitina e quitosana são exemplos de biopolímeros básicos. Essa característica confere a esses polímeros amplo espectro de aplicações. Outras propriedades únicas desses polímeros incluem a formação de sais, filmes, quelatos e características estruturais ópticas (KUMAR, M., 2000).

A presença do grupo amina ($-NH_2$) confere à quitosana vantagens significativas em relação à quitina, especialmente solubilidade em soluções aquosas ácidas e maior susceptibilidade para modificações químicas. Os grupos amina, presente no carbono C-2 da unidade D-glicosamina e cujo pK_a varia entre 6,3 – 6,5, assume a forma catiônica ($-NH_3^+$) quando em meio ácido, convertendo a quitosana em um polieletrólito. A solubilidade da quitosana também depende da massa molar do polímero, distribuição dos grupos acetila ao longo da cadeia polimérica, concentração iônica, natureza do ácido na protonação, além de condições de obtenção e secagem da amostra (AIBA, 1991; RINAUDO, 2006). As ligações hidrogênio que ocorrem entre os grupos hidroxila da estrutura polimérica podem desempenhar importante papel na solubilidade. O efeito de salting-out pode ser explorado na preparação de cloridrato de quitosana quando excesso de HCl (1 mol L^{-1}) é usado para solubilização do polímero (RINAUDO; PAVLOV; DESBRIERES, 1999).

Embora a quitosana apresente maior solubilidade em relação a quitina, trabalhos científicos têm sido propostos no sentido de se obter derivados com solubilidade melhorada e menos dependentes do pH. Dentre vários exemplos, destacam-se a síntese de quitosana com sais quaternários de amônio (DE OLIVEIRA PEDRO; SCHMITT; NEUMANN, 2016; DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013), fosforilcolina (TIERA et al., 2006), hidróxido de 1-(3-

sulfopropil)-2-vinilpiridina (BARBOSA et al., 2016) e glicerol (CHENITE et al., 2001). Isso evidencia a importância das derivatizações da quitosana com grupos hidrofílicos.

As cadeias da quitosana apresentam relativa flexibilidade, propriedade que associada ao caráter policatiónico, contribui para melhorar as características de mucoadesividade que esse polímero apresenta (HE, P.; DAVIS; ILLUM, 1998; KUMAR, A.; VIMAL; KUMAR, 2016). A natural mucoadesão da quitosana se dá pelas interações eletrostáticas do polímero catiónico com as superfícies carregadas negativamente das mucosas. Assim, a mucoadesividade da quitosana é proporcional ao $\overline{GD}$, uma vez que a desacetilação contribui para o aumento do número de grupos amina livres no polímero (KUMAR, A.; VIMAL; KUMAR, 2016). Essa propriedade pode ser explorada para proteger e transportar moléculas de cargas negativas complexadas com quitosana, como proteínas, poliânions, fármacos e DNA. A aderência nas mucosas aumenta o tempo de residência do transportador polimérico, de modo que a molécula de interesse pode ser lenta e gradualmente libertada e absorvida, viajando pelas células e entrando em circulação eficazmente.

A quitosana é amplamente aceita como biocompatível e biodegradável (KUMAR, A.; VIMAL; KUMAR, 2016; KUMAR, M. et al., 2004; RINAUDO, 2006; WAGH; QIAN; LAW, 2012). No entanto, é necessário ressaltar que esse polissacarídeo representa um grande número de estruturas químicas similares, provenientes de diferentes fontes e meios de obtenção e que pode apresentar perfis de biodistribuição, biodegradação e toxicidade variáveis (KEAN; THANOU, 2010). Propriedades como $\overline{GD}$ e massa molar podem influenciar significativamente na degradação e toxicidade da quitosana. É conhecido que esse polímero pode ser degradado em vertebrados pela ação enzimática da lisozima (KEAN; THANOU, 2010; MUZZARELLI, 1997). Funkhouser e Aronson (2007) identificaram oito quitinases humanas, da família das hidrolases de glicosídeos GH18, três das quais demonstraram atividade enzimática. Além disso, vários microrganismos são capazes de degradar quitina e quitosana, hidrolisando as ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ que unem as unidades acetiladas. A *N*-acetilglicosaminidase é outra importante enzima que atua na hidrólise desses polissacarídeos.

De modo geral, o $\overline{GD}$ influencia significativamente na biodegradabilidade da quitosana nos organismos (KEAN; THANOU, 2010; YANG, Y. M. et al., 2007). Quitosanas com alto $\overline{GD}$ apresentam taxas de degradação mais lentas, embora, mesmo amostras significativamente desacetiladas possam ser hidrolisadas e excretadas com tempo adequado (KEAN; THANOU, 2010). Essa degradação mais lenta proporcionada pelo elevado $\overline{GD}$ permite a utilização desse

polímero em aplicações biológicas que requerem longos períodos de retenção no organismo, como por exemplo o transporte de fármacos.

O perfil de biodistribuição da quitosana também é dependente do $\overline{GD}$ e massa molar, além da formulação do polímero. Por exemplo, numa formulação contendo nanopartículas de quitosana, a distribuição depende inicialmente do tamanho, carga das partículas e dos demais componentes do sistema. Estudos de biodistribuição de nanopartículas de quitosana radiomarcadas com tecnécio-99m (^{99m}Tc), preparadas utilizando o cloreto de estanho, revelou que as partículas se encontravam principalmente no fígado e baço, além do sangue, rins, coração e estômago (BANERJEE et al., 2005). Estudos utilizando quitosana modificada com *N*-octil-*O*-sulfato e marcada com trítio evidenciaram o acúmulo no rim, seguido de fígado, baço, intestino delgado, plasma, pulmão, estômago, coração, músculo e cérebro (ZHANG, C. et al., 2008).

1.2.3 Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) e massa molar

A relação entre unidades acetiladas e desacetiladas é um dos principais parâmetros analisados na caracterização da quitosana. Essa relação pode ser expressa em termos de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) ou grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), uma vez que são complementares. Várias técnicas têm sido empregadas na determinação do $\overline{GD}$, destacando-se a titulação potenciométrica (BALAZS; SIPOS, 2007), espectroscopia na região do infravermelho (BRUGNEROTTO; LIZARDI; et al., 2001; DOMSZY; ROBERTS, 1985), cromatografia líquida de alta eficiência (HAN et al., 2015), análise elementar, condutimetria, degradação enzimática (PELLETIER et al., 1990), espectroscopia no UV (TAN, et al., 1998), análise térmica (SANTOS, J. et al., 2003), DSC (GUINESI; CAVALHEIRO, 2006), espectroscopia de RMN¹H e RMN¹³C (RINAUDO et al., 1992).

A quantidade de grupos $-\text{NH}_2$ presente na cadeia polimérica pode ser determinada pela dissolução da quitosana em excesso estequiométrico de HCl, seguido pela neutralização por titulação potenciométrica ou condutimétrica dos grupos $-\text{NH}_3^+$ protonados. Essa técnica, embora apresente algumas restrições, é amplamente aceita e utilizada (BALAZS; SIPOS, 2007; DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013; MUZZARELLI et al., 1982; TIERA et al., 2006) por ser de simples execução, barata e com resultados adequados.

Embora seja relativamente cara, a espectroscopia de RMN¹H é a técnica mais conveniente para determinação do $\overline{GD}$. Em geral, uma pequena amostra (aproximadamente 10 mg) é solubilizada numa solução de 1 mL de água deuterada (D₂O) e ácido deuterado (comumente DCl) e submetida a análise. Além da capacidade quantitativa desse método, pequenas impurezas nas amostras, tais como resíduos de proteínas ou solventes orgânicos, podem ser facilmente identificados, ao contrário da titulação potenciométrica. Embora sejam requeridas menos etapas no preparo de amostras para a análise por RMN¹H, cabe ressaltar que alguns cuidados são necessários, sobretudo a temperatura da análise e a concentração do ácido, a fim de se evitar a hidrólise do polímero.

Outro parâmetro bastante importante da quitosana é a massa molar e a sua distribuição, haja visto que a massa molar pode influenciar significativamente nas características do polímero. Essa propriedade fornece informações sobre o tamanho médio das cadeias do polissacarídeo. O solvente utilizado para essas medidas precisa ser adequadamente escolhido, a fim de se evitar a solubilização parcial e a formação de agregados, comportamento típico de soluções de polissacarídeos (PHILIPPOVA et al., 2001). A escolha do solvente deve ser cuidadosa, especialmente quando a massa molar for calculada a partir da viscosidade intrínseca, obtida a partir da equação de Mark-Houwink (Equação 1)

$$[\eta] = K \cdot (\overline{M}_v)^a \quad (\text{Equação 1})$$

onde **K** é uma constante característica do polímero e dependente da temperatura, do solvente e do grau de acetilação da amostra, **a** é a constante característica da geometria da molécula do polímero e $\overline{M}_v$ é a massa molecular viscosimétrica média. Parâmetros para essa equação, utilizando diferentes solventes e quitosanas com $\overline{GD}$ variáveis, estão disponíveis na literatura (BRUGNEROTTO; DESBRIERES; et al., 2001; MAGHAMI; ROBERTS, 1988; RINAUDO; MILAS; LEDUNG, 1993), embora tenha sido demonstrado que alguns desses solventes podem induzir a formação de agregados, interferindo na viscosidade da solução (RINAUDO, 2006).

A cromatografia de exclusão por tamanho (SEC – do inglês *Size exclusion chromatography*) tem sido considerada bastante confiável para determinação dos parâmetros de Mark-Houwink (BRUGNEROTTO; DESBRIERES; et al., 2001), uma vez que os dados determinados por essa técnica não apresentam dependência com o $\overline{GD}$, além da excelente reprodutibilidade.

1.2.4 Modificações químicas

Polímeros naturais e sintéticos têm sido utilizados como uma ferramenta promissora em diferentes aplicações, sobretudo na nanotecnologia. A quitosana tem recebido destaque nessa área devido as suas propriedades biológicas. No entanto, para maximizar as aplicações desse polissacarídeo, algumas modificações químicas têm sido propostas na literatura. Destaca-se as reações químicas específicas envolvendo o grupo $-NH_2$ na posição C-2 do anel glicopiranosídico, ou ainda reações não específicas nos grupos $-OH$ nas posições C-3 e C-6.

Hidrogéis de quitosana podem ser obtidos pelo intercruzamento utilizando reagentes como a epicloridrina (WEI et al., 1992), diisocianato (WELSH; PRICE, 2003), persulfato de potássio (PRASHANTH; THARANATHAN, 2006) ou glutaraldeído (MONTEIRO; AIROLDI, 1999). O tratamento desse polímero com ânions multivalentes como o glicerolfosfato (ZHOU, H. et al., 2015), ácido oxálico (FADZALLAH et al., 2014) e o tripolifosfato de sódio (XU; DU, 2003) também são amplamente utilizados para obtenção de materiais reticulados.

Um dos derivados mais amplamente estudados é a *O*- ou *N*-carboximetilquitosana. O copolímero resultante apresenta caráter anfotérico e sua solubilidade depende de uma faixa de pH mais ampla que a quitosana não modificada. Chen e Park (2003) obtiveram *O*-carboximetilquitosanas preparada pela reação com ácido monocloroacético em diferentes condições. Foi observado que a solubilidade dos derivados apresentou relação direta com as condições de síntese, sobretudo temperatura da reação e grau de substituição.

A trimetilquitosana é um derivado catiônico, solúvel em uma ampla faixa de pH, podendo ser obtido por uma reação de quaternização utilizando iodeto de metila em condições básicas (SIEVAL et al., 1998). No entanto, alguns cuidados são requeridos a fim de se evitar a redução da massa molar do polímero durante a síntese. A preparação da *N,N,N*-trimetilquitosana foi relatada em 1985 por Muzzarelli e Tanfani (1985). Aplicações desse derivado incluem liberação de fármacos e moléculas biologicamente ativas, inibição do crescimento de fungos e bactérias, além de sistemas de adsorção de íons e moléculas de interesse (WU, M. et al., 2016).

O polietileno glicol (PEG) pode ser quimicamente ligado à quitosana, conferindo maior solubilidade e melhorando a biocompatibilidade do polímero. Harris et al. (1984) foi o primeiro a relatar a síntese de um derivado de PEG-quitosana usando um aldeído. A quitosana foi

inicialmente modificada com PEG-aldeído para produzir uma imina, sendo posteriormente reduzida com cianoborohidreto de sódio. No entanto, esse método apresentou alguns inconvenientes, especialmente devido à instabilidade do PEG-aldeído, motivando a utilização de outras rotas sintéticas (BENTLEY; ROBERTS; HARRIS, 1998; DENG et al., 2007).

Derivados anfifílicos de quitosana podem ser obtidos pela inserção de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na estrutura polimérica. Vários trabalhos têm sido sugeridos na literatura explorando esses compostos. Di Martino e Sedlarik (2014) obtiveram derivados anfifílicos utilizando quitosana modificada com ácido poli láctico. As propriedades anfifílicas de *O*-carboximetil-quitosana substituída com ácido glicirretínico foram estudadas por Du, H. et al. (2014). Yu, Tang e Yin (2014) obtiveram derivados modificados com ácidos linoleico, málico e poli(β -málico).

1.2.5 Aplicações

A abundância e versatilidade de modificações químicas permite o emprego da quitosana e seus derivados em diferentes aplicações. A Figura 4 mostra a evolução do número de publicações científicas registradas na base de dados *Web of Science* desde 1900 contendo o termo *chitosan*. É possível observar um aumento significativo de artigos publicados nas últimas duas décadas, evidenciando o interesse da comunidade científica pela quitosana.

Na agricultura a quitosana tem sido utilizada para liberação controlada de fertilizantes. Wu, L. e Liu (2008) desenvolveram um sistema baseado em quitosana, fósforo, nitrogênio, potássio e poli(ácido acrílico/acrilamida) como sorvente, para liberação controlada de fertilizante e retenção de água. Os resultados indicaram que a quitosana foi capaz de contribuir na regulação da velocidade de liberação do fertilizante, além de auxiliar na retenção da umidade e ser degradável no solo.

Dentre as diversas propriedades da quitosana, as interações eletrostáticas entre as cargas positivas desse polímero policatiônico e cargas negativas de fosfolipídios pode ser explorada em aplicações como fungicida (DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013). Essa capacidade fungistática da quitosana é explorada ainda em cosméticos como cremes, loções, géis capilares e outros produtos (KUMAR, M., 2000).

Figura 4: Número de publicações incluindo o termo "chitosan" na base de dados *Web of Science* desde o ano de 1900.

Fonte: <https://www.webofknowledge.com>

A área cosmética também tem empregado quitosana em produtos que permitem a manutenção da umidade da pele (RINAUDO, 2006). Friedman et al. (2013) estudando os efeitos de nanopartículas formadas por quitosana e alginato no tratamento de acne, demonstraram o aumento da eficiência do tratamento, além de redução dos efeitos colaterais. O uso de quitosana em aditivos capilares (MATOS et al., 2015) e produtos de higiene bucal também foi estudado (RINAUDO, 2006).

Estudos nutricionais com animais mostraram que a alimentação pode ser melhorada se a dieta apresentar materiais quitinosos. Esse comportamento está relacionado à alteração da microflora intestinal provocada pelo suplemento quitínico (KUMAR, M., 2000). Swiatkiewicz, Arczewska-Wlosek e Jozefiak (2014) demonstraram que a utilização de quitosana na alimentação de frangos melhorou significativamente a eficácia nutricional.

Ainda na área alimentícia, a quitosana tem sido estudada como aditivo alimentar. Nauss, Thompson e Nagyvary (1983) demonstraram a capacidade da quitosana em interagir e precipitar lipídios. Os estudos apontaram que parâmetros como pH e força iônica afetam o comportamento do polímero, sugerindo que as interações são principalmente de natureza iônica. Em condições ideais, a quitosana se mostrou capaz de precipitar lipídios equivalentes à

4-5 vezes seu peso. Essa propriedade confere a esse polissacarídeo a capacidade de aplicações biológicas visando a redução de peso e colesterol (RINAUDO, 2006).

A capacidade da quitosana em formar filmes tem possibilitado a utilização desse produto natural na preservação de frutas. Superfícies cortadas ou frutos com alta taxa de maturação pós-colheita, são recobertos com um filme de quitosana que age inibindo a oxidação e proliferação de fungos ou bactérias, possibilitando, desse modo, a prolongação do tempo de armazenamento (REYES-AVALOS et al., 2016).

A quitosana tem sido utilizada no tratamento de efluentes aquosos. Huang, P., Zhao e Ye (2016) obtiveram derivados de quitosana com grande capacidade flocculante. McKay, Blair e Gardner (1982) publicaram um dos primeiros estudos utilizando quitosana para remoção de íons Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} e Zn^{2+} em pH neutro e intervalo de temperatura entre 25 – 60 °C. Membranas de quitosana modificadas com álcool polivinílico e obtidas por eletrofiliação foram utilizadas para remoção seletiva de íons Cr^{6+} , Fe^{3+} e Ni^{2+} (HABIBA et al., 2017). Ainda no contexto de tratamento de efluentes, esse polímero foi utilizado por Fast, Kokabian e Gude (2014) na remoção de odores de efluentes líquidos. Devido a sua estrutura molecular única, a quitosana possui grande afinidade por diferentes corantes, podendo ser aplicada na remoção dessas moléculas (ALVER et al., 2017; KUMAR, M., 2000; MCKAY; BLAIR; GARDNER, 1982).

As aplicações biológicas também estão entre os principais estudos envolvendo a quitosana e seus derivados. A capacidade de protonação em meio ácido permite a formação de complexos com DNA por meio de interações eletrostáticas, permitindo assim o emprego em terapia gênica. Nanopartículas de quitosana/DNA podem ser rapidamente preparadas pelo método de coacervação entre as cargas positivas da quitosana e as cargas negativas dos grupos fosfato do DNA (MAO, H. et al., 2001). A eficiência de transfecção depende da massa molar da quitosana, $\overline{GD}$, pH do meio e tipo celular (KIANG et al., 2004).

Atualmente, as superfícies das mucosas nasais, perorais e pulmonares, estão recebendo grande atenção em relação as vias alternativas de administração de medicamentos (KUMAR, A.; VIMAL; KUMAR, 2016). As propriedades mucoadesivas da quitosana são particularmente úteis no emprego de formulações bioadesivas para administração em mucosas (terapia ocular, nasal, bucal, gastro-entérica e vaginal-uterina) (AGNIHOTRI; MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004). Borges et al. (2006) utilizaram nanopartículas de quitosana para liberar ovalbumina em nódulos linfáticos. Mais recentemente, Mura et al. (2016) utilizaram

formulações de quitosana e poloxamer (copolímero formado por unidades de óxido de propileno e óxido de etileno) para liberação tópica de clonazepam em mucosa bucal. Os resultados mostram significativo aumento da eficácia do fármaco.

O transporte de fármacos utilizando sistemas baseados em quitosana tem recebido grande destaque na literatura (KUMAR, A.; VIMAL; KUMAR, 2016; PEREZ-HERRERO; FERNANDEZ-MEDARDE, 2015; WU, M. et al., 2016; YU; TANG; YIN, 2014). O emprego de derivados de quitosana na liberação gastrointestinal de fármacos explora a capacidade de bioadesão desse polímero, especialmente para fármacos que são pouco solúveis em meio intestinal e prontamente solúveis em meio ácido (YANG, L. B.; ESHRAGHI; FASSIHI, 1999). Além disso, formulações destinadas a liberar lentamente fármacos no estômago podem explorar a formação de géis de quitosana, induzidos pelo nível de acidez dessa região, resultando no efeito retardado da liberação. A mucoadesividade da quitosana permite maior tempo de retenção nessa região, garantindo a manutenção da posologia por períodos mais longos.

Hidrogéis são constituídos por redes poliméricas hidrofílicas que podem absorver grandes quantidades de água e aumentar drasticamente de volume. Vários derivados de quitosana com capacidade de formação de hidrogéis tem sido vastamente utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos (LI, X. et al., 2012; WU, J. et al., 2007; ZHOU, H. Y. et al., 2015). Hidrogéis termossensíveis podem ser obtidos pela reação entre quitosana e α - ou β -glicerofosfato, composto que é líquido a temperatura ambiente, mas que gelifica a medida que a temperatura aumenta. O mecanismo de gelificação pode envolver múltiplas interações entre quitosana, glicerofosfato e água. O comportamento da solução, propriedades reológicas e físico-químicas e o processo de gelificação do hidrogel são afetados não apenas pela massa molar, grau de desacetilação e concentração de quitosana, mas também pelo tipo e concentração de glicerofosfato (ZHOU, H. et al., 2015). As propriedades e as redes tridimensionais dos hidrogéis possibilitam diversas aplicações no campo biomédico incluindo a administração local de fármacos e engenharia de tecidos.

Partículas formadas pela auto-organização de derivados de quitosana tem sido amplamente estudadas. Esses sistemas podem ser divididos em nanotubos (SHRESTHA et al., 2016), nanoesferas (YIN et al., 2016), nanocápsulas (GOYCOOLEA et al., 2012) nanoagregados (DE OLIVEIRA PEDRO; SCHMITT; NEUMANN, 2016), nanoemulsão (BAZYLINSKA; SACZKO, 2016), além de lipossomos (SAHU; JAIN, 2016) e dendrímeros (QI et al., 2016). As principais vantagens das nanopartículas como sistema de administração de

fármacos estão no controle do tamanho da partícula, propriedades de superfície e liberação de agentes farmacologicamente ativos de modo a conseguir a ação específica, no local e na taxa terapêutica ótimas. Nanopartículas de quitosana podem ser obtidas ainda por gelificação ionotrópica, coacervação, coprecipitação, evaporação de solvente e complexação (KUMAR, M. N. V. R., 2000; SONIA; SHARMA, 2011).

1.3 Sistemas de liberação controlada de fármacos

A substância responsável pelos efeitos terapêuticos dos medicamentos pode ser denominada fármaco ou agente terapêutico. Um determinado medicamento pode conter um ou mais agentes terapêuticos associados aos excipientes, substâncias farmacologicamente inativas. Para exercer sua função no organismo, o fármaco deve ser liberado nos fluidos biológicos a partir da sua forma de apresentação, que pode ser comprimido, cápsula, suspensão, xarope, entre outras. No entanto, nem sempre esse processo se dá de maneira eficaz, por isso, nos últimos anos vários trabalhos científicos têm sido propostos objetivando a obtenção de novos materiais para melhorar a eficiência do transporte e liberação desses agentes terapêuticos no organismo, bem como diminuir a sua toxicidade (CASETTARI et al., 2012; DU, Y. Z. et al., 2009; GOYCOOLEA et al., 2012; WORAPHATPHADUNG et al., 2015). Esses materiais têm recebido grande destaque, uma vez que a maioria dos fármacos necessita de veículo adequado para o seu transporte e liberação (SCHAFFAZICK et al., 2003). Além disso, a não seletividade dos fármacos na administração convencional é uma limitação muito significativa, uma vez que ela pode causar sérios danos aos tecidos saudáveis do organismo.

O desenvolvimento de um novo fármaco, processo demorado e significativamente caro, requer muitas etapas de pesquisa e os resultados *in vitro* nem sempre são reproduzidos *in vivo*. Dentre os problemas comumente encontrados, destaca-se a baixa concentração disponível no organismo, baixa solubilidade do fármaco, rápida eliminação pelos sistemas de defesa, distribuição em diferentes órgãos, influência da alimentação sobre os fluidos biológicos, entre outros (MEHNERT; MADER, 2001). Por isso, muitos pesquisadores têm buscado melhorar a eficácia de medicamentos conhecidos alterando doses, velocidades e modo de administração, além do emprego de sistemas de liberação controlada (TIWARI et al., 2012).

Nesse contexto, a tecnologia de liberação controlada de fármacos surgiu durante a década de 1980 como uma metodologia comercialmente sólida. A obtenção de um sistema de

liberação reprodutível de um agente num ambiente específico, durante um período de tempo prolongado, tem um mérito muito significativo. Teoricamente, nesses sistemas, são criadas condições adequadas, com resposta ótima, efeitos colaterais mínimos e eficácia prolongada.

Os primeiros estudos realizados para a obtenção de sistemas de liberação controlada tiveram como base o encapsulamento de moléculas modelo. O primeiro experimento foi realizado no início do século XX, quando Paul Ehrlich (1854 – 1915) propôs o modelo que ficou conhecido por “Bala Mágica de Ehrlich” (*Ehrlich's Magic Bullet* em inglês) (SANTOS, N.; CASTANHO, 2002). Neste modelo, Ehrlich se baseou nos mecanismos de especificidade, como a ligação entre antígeno e anticorpo, já conhecidos naquela época, para estabelecer que o fármaco ligado a um carreador específico é transportado até o tecido de interesse e idealmente exibe a sua atividade farmacológica exclusivamente no alvo. Desse modo, os efeitos indesejáveis resultantes da ação em outros tecidos são amplamente diminuídos, enquanto que o aumento da eficiência permite o decréscimo da dose administrada (SANTOS, N.; CASTANHO, 2002).

Nestes sistemas, o agente terapêutico está ligado a um transportador ou carreador responsável por contornar as barreiras físico-químicas limitantes dos fármacos encapsulados, melhorando assim, a sua farmacodinâmica (potencialização do efeito terapêutico), farmacocinética (controle da absorção e distribuição tecidual) e os efeitos toxicológicos (redução da toxicidade local e sistêmica) (SANTOS, N.; CASTANHO, 2002).

O principal objetivo desses sistemas é a liberação controlada e reprodutível de um determinado agente, em um meio específico, por um período de tempo significativo, possibilitando assim a criação de um meio de liberação ótimo, com efeitos colaterais mínimos e de alta eficácia. Além de reduzirem a frequência de administração dos medicamentos, o que facilita a adesão do paciente ao tratamento, esses sistemas ainda regulam a concentração do fármaco no organismo, assegurando uma maior biodisponibilidade, e reduzindo os efeitos colaterais.

Os sistemas de administração medicamentosas convencionais proporcionam grandes variações da concentração do fármaco no organismo. A maior parte do medicamento é liberada minutos após a administração, fazendo com que os níveis no corpo subam rapidamente, caindo drasticamente após um determinado período (KUMAR, M., 2000). O perfil de liberação controlada apresenta menos variações, mantendo a concentração dentro dos níveis terapêuticos por mais tempo, como pode ser visto na Figura 5.

Figura 5: Comparação da variação do nível de fármaco liberado no organismo a partir de sistema de liberação clássica (ou imediata) e liberação controlada.

Fonte: Adaptado de KUMAR, M. N. V. R. (2000).

No entanto, esses sistemas de liberação controlada também possuem desvantagens como, por exemplo, a impossibilidade de interrupção do efeito terapêutico imediato em caso de intoxicação ou intolerância. Além disso, existe o risco de acumulação do fármaco com velocidade de eliminação lenta, dificuldade de adaptação da posologia, além do alto custo desses tratamentos. Consequentemente, os fármacos mais indicados para este tipo de tratamento são aqueles que possuem velocidades médias de absorção e excreção, absorção em doses relativamente baixas e ampla margem de segurança de administração. Assim, se faz necessário o estudo e desenvolvimento de sistemas de liberação que minimizem as desvantagens, permitindo maior potencial de aplicação.

1.4 Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum em mulheres e aproximadamente um terço das pacientes desenvolvem metástases (espalhamento da doença para outras regiões) e morrem dessa doença. Estima-se que uma em cada oito mulheres norte-americanas e uma em cada 12 mulheres britânicas desenvolverão câncer de mama em sua vida (SIMSTEIN et al., 2003). Os locais mais comuns para o desenvolvimento de metástases, excluindo linfonodos, são ossos, fígado e pulmão. Os homens também são suscetíveis à doença e a Sociedade Americana de Câncer (*American Cancer Society*) estima que nos Estados Unidos 246.660 novos casos foram identificados em mulheres e 2.600 em homens somente no ano de 2016 (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

A homeostase da célula epitelial mamária requer o equilíbrio entre proliferação e a morte celular chamada apoptose. A apoptose é definida como morte celular geneticamente programada e ocorre em células de mama saudáveis a taxas variáveis durante o ciclo menstrual em resposta a alterações nos níveis hormonais (SIMSTEIN et al., 2003). Alterações genéticas dos mecanismos apoptóticos podem resultar num aumento do número de células, bem como na preservação de células geneticamente alteradas, o que inicia o processo de formação do tumor. Tratamentos como a quimioterapia, radioterapia e imunoterapia dependem fortemente da apoptose para eliminação das células de câncer de mama (DEBATIN, 2000). Embora muitos tumores respondem inicialmente à terapia, as células podem sobreviver e ganhar resistência a estes tratamentos. Esse comportamento pode possibilitar o aparecimento de uma variante celular mais fenotipicamente agressiva, com maior tendência para metástase.

Os eventos moleculares da apoptose podem ser divididos em três etapas: 1) iniciação por um agente indutor de apoptose, 2) ativação das caspases (enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar proteínas alvo apenas na extremidade C-terminal de um resíduo de ácido aspártico, especificidade incomum entre proteases) por uma sequência de sinalização, e 3) clivagem proteolítica de componentes celulares. Muitos genes de morte e sobrevivência celular, que são regulados por fatores extracelulares, estão envolvidos na apoptose.

Linhagens celulares correspondem à série de multiplicações que são originadas de uma única célula ou grupo de células específicas, o que possibilita o controle em culturas celulares, facilitando o estudo. Em 1970, a linhagem celular MCF-7 foi obtida de um paciente com câncer de mama metastático. O termo MCF-7 foi adotado em referência ao “Instituto Michigan Cancer

Foundation-7”, localizado em Detroit - EUA, onde a linhagem celular foi amplamente estudada. Pesquisas extensivas sobre as células MCF-7 nas décadas de 1970 e 1980 levaram ao desenvolvimento tecnologias que facilitaram a clonagem e sequenciamento. Até então, não era possível obter uma linha de células mamárias que fosse capaz de viver mais do que alguns meses, o que dificultava severamente o estudo em laboratório (SIMSTEIN et al., 2003). Os estudos envolvendo essas células permitiram a compreensão dos mecanismos de proliferação e controle celular, além de propriedades como a atividade metabólica e variações de pH intracelular.

Medições do pH em tecidos tumorais mostram que o microambiente nos tumores é geralmente mais ácido do que nos tecidos normais (Figura 6). Os principais mecanismos que levam à acidez tumoral incluem provavelmente a produção de ácido láctico e a hidrólise de ATP em regiões com baixo teor de oxigênio (TANNOCK; ROTIN, 1989). Mesmo na presença de oxigênio, as células cancerosas convertem a glicose principalmente em ácido láctico ($pK_a = 3,7$), o que contribui para um ambiente ácido no tumor (HUANG, W. J. et al., 2013; WOJTKOWIAK et al., 2011). O caráter ácido dos tecidos tumorais formados por células MCF-7 já foi demonstrado na literatura (ALTAN et al., 1998; MONTCOURRIER et al., 1994), incluindo estudos recentes envolvendo técnicas mais avançadas de medição do pH em tempo real (THAKUR; JAYAKUMAR; SAWANT, 2015).

Essas condições ácidas permite o desenvolvimento de sistemas carreadores de fármacos que apresentam sensibilidade às variações de pH. Nesse sentido, polímeros que alteram suas propriedades físico-químicas em resposta às variações do pH são uma excelente alternativa para essas aplicações (GAO; CHAN; FAROKHZAD, 2010). Além disso, esses sistemas podem evitar a degradação precoce do fármaco nos endossomos e lisossomos, regiões normalmente ácidas.

Figura 6: Representação esquemática das mudanças de pH na região de um tecido tumoral.

Fonte: Adaptado de WANG, Y. et al. (2014).

1.5 Quercetina

A quercetina, (Figura 7) flavonóide natural presente em vegetais, frutas, chás e vinhos, é bastante empregada como fármaco modelo nos sistemas de liberação controlada. Os flavonóides são uma classe de compostos naturais com estrutura fenólica variável e de considerável interesse científico, apresentando propriedades terapêuticas antioxidantes e anti-inflamatórias responsáveis por diversos benefícios à saúde (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008; YANG, C. S. et al., 2001). A capacidade antioxidante desses compostos é determinada pela presença de hidroxilas que atuam como doadores de elétrons e suportam a deslocalização em torno do sistema aromático.

Figura 7: Representação da estrutura da quercetina.

Fonte: Autoria própria.

A principal função da quercetina na natureza é proteger as espécies vegetais da radiação ultravioleta, além de eliminar bactérias e vírus. Já *in vitro*, as principais características que a quercetina apresenta são a potente atividade antioxidante (BOOTS; HAENEN; BAST, 2008) e elevada capacidade de inibir a proliferação de células tumorais, uma vez que apresenta propriedades antimutagênicas (RANELLETTI et al., 1992).

A quercetina exibe ainda efeitos citotóxicos em células tumorais por meio de diferentes mecanismos, tais como indução da morte celular programada, fenômeno conhecido por apoptose (JAKUBOWICZ-GIL et al., 2005) e inibição de angiogênese, que é o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes (TAN, W. et al., 2003). Esforços científicos tem sido realizado no sentido de compreender os mecanismos de inibição da quercetina. Resultados recentes indicaram que a quercetina é capaz de inibir substancialmente a proliferação de células HepG2 e induzir alterações morfológicas (ZHOU, J. et al., 2016). Os autores observaram que a quercetina exerce atividade antitumoral em células HepG2 através de vias múltiplas, incluindo a interferência com a expressão do gene CCND1, interrompendo o ciclo celular e a proliferação de células HepG2. RANGANATHAN; HALAGOWDER; SIVASITHAMBARAM (2015) mostraram que a quercetina induz a apoptose em células de câncer da mama MCF-7 através da supressão do gene Twist (essencial na fase de desenvolvimento embrionário celular) através da via p38MAPK (Proteína-quinase ativadas por mitógenos), importante mediador da resposta celular a sinais externos.

Apesar dessas atividades biológicas interessantes, a baixa solubilidade da quercetina em solução aquosa dificulta a sua utilização como um agente terapêutico, sendo necessário,

portanto, o emprego de sistemas nanoestruturados de liberação e transporte de fármacos que possibilitam a liberação nas regiões de interesse.

1.6 Aplicação de derivados anfífilos de quitosana como nanocarreadores de fármacos

A modificação química estrutural da quitosana pela adição de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos resulta em derivados com caráter anfílico. Em condições adequadas, esses compostos são capazes de se auto-organizar em solução, formando estruturas com regiões de diferentes polaridades. Em contato com solventes aquosos por exemplo, as cadeias de moléculas tendem a se reorganizar e formar micelas ou agregados por meio de associação intra- ou intermolecular entre porções hidrofóbicas, principalmente para minimizar a energia livre interfacial. A formação de partículas com núcleo hidrofóbico permite incorporar moléculas de baixa polaridade como a maioria dos fármacos (Figura 8).

Figura 8: Esquema de auto-organização, encapsulamento e liberação de fármaco em solução aquosa contendo derivados anfífilos de quitosana.

Fonte: Autoria própria.

Esses derivados podem ser aplicados como modificadores reológicos em vários setores industriais tais como tintas, recuperação de óleo, cosméticos e alimentos, além de sistemas de administração de fármacos (ARANAZ; HARRIS; HERAS, 2010). Wang, H. et al. (2010)

propôs a síntese de nanocarreadores de fármacos baseados em quitosana modificada com PEG, lisina e colesterol. Os derivados foram capazes de formar micelas espontaneamente em concentrações acima de $0,00378 \text{ mg mL}^{-1}$, com diâmetro médio de 165 nm. Os estudos de encapsulamento e liberação da molécula modelo calceína evidenciaram a eficiência desses sistemas.

Nanopartículas fotossensíveis formadas por derivados anfifílicos de quitosana e ácido 5β -cólico foram reportadas por Lee, S. et al. (2009). As partículas com diâmetro médio de 290 nm foram capazes de encapsular eficientemente a protoporfirina IX, apresentando grande estabilidade, especificidade e baixa toxicidade. Jena e Sangamwar (2016) obtiveram nanocarreadores de fármacos a partir da síntese de carboximetil quitosana e succinato de α -tocoferol. A liberação de tamoxifeno mostrou um perfil constante ao longo do tempo. Estudos biológicos indicaram condições adequadas para aplicações farmacêuticas.

Derivados de quitosana contendo grupos quaternários de amônio têm sido empregados no transporte e liberação de fármacos. Soares et al. (2016) obtiveram nanopartículas de quitosana modificada com 2-hidroxipropil-3-trimetilamônio pelo processo de gelificação ionotrópica com tripolifosfato de sódio (TPP). O encapsulamento e a liberação da doxorubicina foram dependentes do pH. As nanoformulações apresentaram baixa toxicidade em células Vero, linhagem estabelecida a partir de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), e células de tumor ósseo SaOs-2. Nanocarreadores formados utilizando o mesmo grupo quaternário de amônio e TPP foram estudados por (LI, S. et al., 2014). Outros exemplos da utilização de derivados de quitosana modificados com grupos quaternários de amônio para transporte e liberação de fármacos podem ser citados (FANG et al., 2015; MENNINI et al., 2014). No entanto, a quase totalidade desses sistemas se baseia na formação de nanopartículas pelo processo de gelificação ionotrópica. Além disso, estudos de internalização celular e hemocompatibilidade precisam ser conduzidos para verificação dos efeitos desses grupos catiônicos, haja vista que interações com cargas negativas presentes em estruturas biológicas pode comprometer severamente a aplicação desses derivados.

O cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE) é um dos compostos utilizados na modificação da quitosana para aplicações biológicas. Derivados de quitosana modificados com DEAE foram utilizados para liberação de vitamina B₁₂ (ZHANG, A. et al., 2014). Os resultados demonstraram liberação sustentada ao longo de 15 h e baixa toxicidade. Quitosana conjugada com DEAE foi utilizada ainda na transfecção de DNA *in vitro* (DALLA PICOLA et al., 2016).

O dodecil aldeído (DDA), também conhecido como dodecanal, lauraldeído ou aldeído láurico, pode ser ligado aos grupos amina da quitosana, conferindo hidrofobicidade ao polímero. Alguns autores estudaram derivados de quitosana modificados com DDA para formação de géis (LEE, J. et al., 2005), adsorção e separação de proteínas (YANG, S. et al., 2013), remoção de bactérias (VO; WHITELEY; LEE, 2015) e inibição do crescimento de fungos (DE SOUZA et al., 2013). No entanto, o emprego de derivados de quitosana contendo DDA para formação de nanocarreadores de fármacos ainda não foi devidamente explorado. Além disso, os efeitos de interações celulares, citotoxicidade e hemocompatibilidade desses compostos não são bem conhecidos.

Os grupos substituintes ligados à estrutura da quitosana podem conferir diferentes propriedades aos nanocarreadores. Esses grupos podem melhorar as interações com células alvo, responder a estímulos como mudanças de pH, temperatura e força iônica, além de possibilitar melhorias na farmacocinética e farmacodinâmica dos agentes terapêuticos. No entanto, os trabalhos descritos na literatura utilizam diferentes amostras de quitosana, com propriedades como $\overline{GD}$, massa molecular, cristalinidade e polimorfismo variáveis, para obtenção de carreadores de fármacos. Isso dificulta a correlação adequada entre a influência dos grupos substituintes e as propriedades físico-química e biológica dos carreadores. É necessário, portanto, para uma melhor compreensão, estudar os efeitos desses carreadores no encapsulamento de fármacos, na cinética e mecanismo de liberação, na citotoxicidade, internalização celular, hemocompatibilidade, além de propriedades físico-químicas, utilizando uma mesma quitosana de partida nos processos de síntese.

Diante desse contexto, o presente trabalho buscou explorar a síntese, caracterização e aplicação de derivados anfifílicos de quitosana, obtidos pela inserção de diferentes grupos hidrofílicos e o grupo hidrofóbico DDA, como carreadores de fármacos. Os grupos hidrofílicos utilizados foram brometo de 5-pentiltrimetilamônio (PTMA), cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE), 2,3-Epóx-1-propanol (GLY), além do grupo hidrofóbico dodecil aldeído (DDA) (Figura 9). Os estudos apresentados nesse trabalho visam aprofundar o entendimento da influência das propriedades físico-químicas dos polímeros no encapsulamento e liberação de fármaco, bem como nas interações com células e seus efeitos biológicos.

Na primeira etapa do trabalho, foram exploradas as sínteses dos derivados de quitosana, além das implicações de parâmetros como a massa molar e $\overline{GD}$ nas propriedades dos produtos obtidos. As sínteses foram otimizadas no sentido de se evitar ou diminuir a utilização de

solventes orgânicos e produtos químicos nocivos ao meio ambiente, sem prejudicar os rendimentos das reações. Na etapa seguinte, foram exploradas as propriedades e comportamento em solução dos derivados anfifílicos, além de respostas às mudanças de pH. Finalmente, foram realizados estudos avaliando a capacidade de encapsulamento, cinética e mecanismo de liberação da quercetina *in vitro*, além de ensaios biológicos envolvendo citotoxicidade em células de câncer de mama MCF-7, internalização celular e hemocompatibilidade.

Figura 9: Representação da estrutura química dos reagentes utilizados na síntese dos derivados de quitosana.

Fonte: Autoria própria.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo principal a síntese, caracterização e estudo do comportamento de derivados anfifílicos de quitosana em solução aquosa, visando a obtenção de nanoagregados poliméricos com potencial aplicação no transporte e a liberação controlada de fármacos.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Síntese e caracterização de derivados anfifílicos de quitosana contendo grupos hidrofílicos 5-pentiltrimetilamônio (PTMA), cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE), 2,3-Epóx-1-propanol (GLY) e proporções crescentes do grupo hidrofóbico dodecilaldeído (DDA).
- ✓ Estudo do comportamento auto-associativo dos derivados em meio aquoso, correlacionando o efeito da composição, proporção de cadeias hidrofílicas/hidrofóbicas, concentração e pH às propriedades em solução.
- ✓ Determinação da concentração de agregação crítica (CAC) empregando-se a espectroscopia de fluorescência utilizando-se pireno como sonda.
- ✓ Determinação do tamanho e estabilidade das nanopartículas utilizando as técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), potencial zeta (ζ) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).
- ✓ Estudos de incorporação e eficiência de encapsulamento de fármacos em diferentes condições de pH.
- ✓ Estudos de citotoxicidade em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7).
- ✓ Estudos de liberação *in vitro*.
- ✓ Estudos de cinética e mecanismo de liberação.
- ✓ Comparação do efeito terapêutico do fármaco livre e contido nos nanocarreadores.
- ✓ Estudos de incorporação celular.
- ✓ Estudos de hemocompatibilidade.

PARTE EXPERIMENTAL

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os reagentes empregados no trabalho estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Reagentes utilizados no trabalho

Nome	Grau de Pureza (%)	Procedência
2,3-Epóx-1-propanol	96,0	Aldrich Chemical Co
Ácido acético	98,0	Synth
Brometo de bromo-pentiltrimetilamônio	99,5	Aldrich Chemical Co
Cianoborohidreto de sódio	95,0	Aldrich Chemical Co
Cloreto de 2-cloro- <i>N,N</i> -dietiletilamina	99,0	Aldrich Chemical Co
Cloreto de deutério	99,8	Aldrich Chemical Co
Cloreto de sódio	99,1	Synth
Dodecilaldeído	99,0	Aldrich Chemical Co
Hidróxido de sódio	98,7	Dinâmica
Metanol	99,0	Synth
Quitosana de baixa massa molecular	98,9	Aldrich Chemical Co

3.2 Síntese dos derivados de quitosana

3.2.1 Desacetilação da quitosana

Para a desacetilação da quitosana comercial foram dispersos 8,0 gramas do polímero em 550 mL de água. Em seguida, foram adicionados 10 mL de ácido acético glacial e a solução mantida sob agitação durante 18 horas para a solubilização completa da quitosana. Posteriormente, foram adicionados lentamente 200 mL de solução de NaOH 50% (m/v), sendo essa suspensão aquecida a temperatura de aproximadamente 100 °C por 90 minutos, sob atmosfera de nitrogênio em refluxo. Decorrido o tempo de reação, a suspensão foi transferida para um béquer contendo 4 litros de água deionizada a 80 °C sob agitação. O precipitado obtido foi decantado, lavado até pH neutro com água deionizada e isolado por filtração a vácuo. Após

a última filtragem, a quitosana foi lavada com acetona e seca em estufa a temperatura de 40°C por 72h (DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013).

3.2.2 Despolimerização da quitosana

A despolimerização da quitosana foi realizada por oxidação com nitrito de sódio em meio ácido utilizando o procedimento descrito por Tommeraas et al. (2001). Aproximadamente 10,0 gramas de quitosana desacetilada foram solubilizadas em 555 mL de solução de ácido acético 2 % (v/v). Em seguida a solução foi purgada com nitrogênio por 1 hora sob agitação constante, resfriada a 4 °C. A agitação foi interrompida e 18,6 mL de uma solução contendo 231 mg de nitrito de sódio foram adicionados à mistura, sendo a reação mantida a 4 °C por 18 horas na ausência de luz. Após o período de reação, a solução resultante foi precipitada com hidróxido de sódio (5 mol L⁻¹) e centrifugada a 10.000 rpm. O precipitado foi então lavado com água deionizada até obtenção de pH 7,0, sendo o produto final liofilizado.

3.2.3 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo pentil trimetilamônio (PTMA)

Os derivados quaternários de quitosana substituídos com o grupo PTMA foram sintetizados e caracterizados de acordo com o procedimento descrito em trabalho prévio (DE OLIVEIRA PEDRO et al., 2013). Para tanto, uma massa de aproximadamente 2,5 g de quitosana desacetilada e despolimerizada foi dispersa em 20 mL de água. O pH desta dispersão foi ajustado para aproximadamente 8 com adições de solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹, sendo a dispersão mantida sob agitação por 2 horas. Após este tempo, 8,1 g de brometo de (5-bromo)-pentiltrimetilamônio foram adicionados à solução e o pH foi mantido na faixa de 7,5 - 8,0. A mistura foi então agitada por 72 horas a 55 °C sob refluxo. O pH da solução foi monitorado constantemente a fim de mantê-lo próximo de 8,0. Ao término da reação a solução foi dialisada utilizando-se membrana de diálise (MWCO = 12 kDA), contra água deionizada por 5 dias. O produto foi então recuperado por liofilização e caracterizado por RMN¹H, FTIR, TGA/DTG, DTA e DSC. A rota de obtenção dos derivados pode observada na Figura 10.

3.2.4 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE)

Para obtenção de derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo Cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE) foram dispersos 3,0 g de quitosana desacetilada e despolimerizada em 338,1 mL de solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. Em seguida foram adicionados 3,5 g de DEAE e o valor do pH da solução foi aumentado para 8,0 por adição de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹. A reação foi mantida em pH ~ 8,0, sob agitação e em refluxo por 2 horas a 65 °C. Após isso, a solução foi dialisada contra hidróxido de sódio 0,05 mol L⁻¹, por 24 horas, e contra água deionizada por três dias utilizando-se membrana de diálise (MWCO = 12 kDa). O produto final foi então recuperado por liofilização e caracterizado por RMN¹H, FTIR, TGA/DTG, DTA e DSC.

3.2.5 Síntese dos derivados hidrofílicos de quitosana contendo o grupo 2,3-Epóx-1-propanol (GLY)

O derivado hidrofílico de quitosana contendo o grupo 2,3-epóx-1-propanol (GLY) foi sintetizado de acordo com o proposto por Zhou, H. et al. (2010). Para isso, foram solubilizados 6,0 g de quitosana desacetilada e despolimerizada em 300 mL de solução de ácido acético 2% (v/v). Posteriormente foram adicionados 9,5 mL de GLY e a mistura foi agitada sob refluxo a 50 °C por 24 horas. Essa solução foi então dialisada contra água por 3 dias em membrana de diálise (MWCO = 12 kDa) e em seguida dialisada para obtenção do produto final. O derivado resultante foi caracterizado pelas técnicas de RMN¹H, FTIR, TGA/DTG, DTA e DSC.

3.2.6 Síntese dos derivados dodecilados de quitosana

Os derivados hidrofílicos de quitosana modificados com os grupos PTMA, DEAE e GLY foram submetidos a uma nova síntese para inserção do grupo hidrofóbico dodecila (DDA). A reação de aminação redutiva foi utilizada para a modificação da quitosana com DDA utilizando o procedimento descrito por (DESBRIERES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996). A quitosana previamente modificada com os grupos hidrofílicos foi solubilizada em 330 mL de

solução de ácido acético 2% (v/v) para obtenção dos derivados dodecilados. Após completa solubilização, essa solução foi gotejada em 240 mL de etanol. O pH dessa mistura foi ajustado para aproximadamente 5 com solução de hidróxido de sódio 2 mol L⁻¹. Em seguida diferentes volumes de dodecilaldeído, previamente solubilizados em 10 mL de etanol, foram adicionados à solução. Após 1 hora, sob agitação constante, o reagente cianoborohidreto de sódio foi incorporado à mistura. Essa solução foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente. A purificação dos derivados alquilados foi realizada por meio de diálise (MWCO = 12 kDa). Esse procedimento foi repetido para todos os derivados hidrofílicos. A Figura 10 apresenta um esquema ilustrativo que indica os polímeros inicial e final de cada processo realizado.

Figura 10: Esquema ilustrativo da rota de síntese utilizada na obtenção dos derivados anfífilos de quitosana.

Fonte: Autoria própria.

3.3 Caracterização dos derivados de quitosana

3.3.1 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H).

Amostras de 10 mg de quitosana e seus derivados foram dissolvidas em 1 mL de água deuterada e 10 µL de ácido clorídrico. As soluções foram mantidas sob agitação até completa

solubilização e transferidas para tubos de RMN¹H ($\phi = 5$ mm). Os espectros foram obtidos num espectrômetro Agilent 400/54 Premium Shielded de 400 MHz à temperatura de 70 °C, com 512 acumulações. A sequência de pulso PRESAT (supressão do sinal da água utilizando pré-saturação) foi utilizada. O tratamento dos dados foi realizado utilizando os softwares ACD/NMR Processor 12.01 e OriginPro 9.0.0.

3.3.2 Espectroscopia no Infravermelho Com Transformada de Fourier por Refletância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier por refletância total atenuada foi utilizada na caracterização da quitosana e seus derivados. Para tanto, amostras com massa de aproximadamente 2 mg foram mantidas em estufa a 60 °C por 24 h, para diminuição do teor de água, sendo os espectros de Infravermelho posteriormente obtidos em um espectrofotômetro Perkin Elmer FTIR-ATR Frontier, com refletância total atenuada (FTIR-ATR). Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos com a média de 4 acumulações na região compreendida entre 4000–600 cm⁻¹.

3.3.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média

A massa molar viscosimétrica média das quitosanas comercial (QC), despolimerizada e desacetilada (QD) foi determinada num viscosímetro digital de esfera rolante com ângulo variável modelo Lovis 2000 M/ME (Anton Paar), em pH 4,5, a 25 ± 0,01 °C. Os polímeros, em concentrações variando de 3.0 – 7.0×10⁻³ g mL⁻¹, foram solubilizados em solução tamponante de ácido acético (0,3 mol L⁻¹)/acetato de sódio (0,2 mol L⁻¹). A massa molar viscosimétrica média foi determinada utilizando as viscosidades intrínsecas $[\eta]$ e a equação de Mark-Houwink (Equação 2)

$$[\eta] = K. (\bar{M}_v)^a \quad (\text{Equação 2})$$

onde **K** é uma constante característica do polímero e dependente da temperatura, do solvente e do grau de acetilação da amostra, **a** é a constante característica da geometria da molécula do polímero e $\bar{M}_v$ é a massa molecular viscosimétrica média. Para o cálculo foram utilizadas as constante **a** = 0,796 e **K** = 0,079 mL g⁻¹, para quitosanas com grau de desacetilação próximo de 99% e **a** = 0,823 e **K** = 0,079 mL g⁻¹ para amostras com grau de desacetilação de 85% (RINAUDO; MILAS; LEDUNG, 1993).

3.3.4 Análise térmica

As curvas TG/DTG e DTA foram obtidas em um módulo simultâneo DTG/DTA SDT Q600 da TA Instruments integrado ao software Thermal Advantage 4.5A. A razão de aquecimento utilizada foi de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera dinâmica de ar, vazão de 100 mL min⁻¹, com massa aproximadamente de 6 mg, em suporte de amostra de α -alumina no intervalo de temperatura de 25 – 1000 °C. As curvas TGA das amostras foram utilizadas para verificação do perfil da decomposição térmica. Para se determinar os intervalos de temperatura correspondente às percentagens de desidratação, decomposição de material orgânico e resíduo formado, foram utilizadas as curvas DTG, correspondente à derivada primeira das curvas de TGA.

3.3.5 Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).

As curvas de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foram registradas em um módulo Q-10 (TA Instruments) integrado ao software Thermal Advantage 4.5A, utilizando massas de aproximadamente 5,0 mg colocadas em cadinhos de alumínio tapados com furo central. As amostras foram submetidas à razão aquecimento de 10 °C min⁻¹ em atmosfera dinâmica de N₂ com vazão de 50 mL min⁻¹.

3.4 Estudo do comportamento dos derivados em solução

3.4.1 Determinação da solubilidade dos derivados em função do pH

A transmitância dos derivados de quitosana em $\lambda = 550$ nm (comprimento de onda no qual não há absorbância da quitosana) foi utilizada para monitorar a solubilidade dos polímeros em função do pH (TIERA et al., 2006). Para tanto, 20 mg das amostras foram solubilizadas em ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e tituladas com porções de hidróxido de sódio ($25 \text{ }\mu\text{L}$, $0,5 \text{ mol L}^{-1}$) até pH 12. As variações de pH foram medidas num pHmetro UV-10 (Denver Instrument) e as transmitâncias foram registradas num espectrômetro de UV-Vis UV-2550 (Shimadzu).

3.4.2 Determinação da concentração de agregação crítica por Fluorescência no Estado Estacionário

Os experimentos de fluorescência utilizando pireno como sonda foram realizados a temperatura de 25°C nos pHs 5, 6,2, e 7,4 utilizando-se soluções tamponantes de acetato e de fosfato de sódio (concentração de 50 mmol L^{-1} e força iônica de 150 mmol L^{-1}). Foram adicionados 2 mL de solução tamponante e $1,5 \text{ }\mu\text{L}$ de uma solução de pireno em metanol (1 mmol L^{-1}) em uma cubeta de quartzo. A concentração foi variada pela adição consecutiva de alíquotas de $10 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções estoque dos derivados anfifílicos de quitosana. As intensidades das bandas I (373 nm) e III (385 nm) do espectro de fluorescência do pireno foram registradas num espectrofluorímetro Hitachi F4500 após a adição das alíquotas. O comprimento de onda de excitação (λ_{ex}) foi 310 nm, sendo o espectro de emissão obtido na região entre 350 a 550 nm. Os experimentos foram realizados em duplicata e com os resultados obtidos foi possível encontrar o valor aproximado de concentração de agregação crítica (CAC) utilizando como critério o início do decréscimo da razão I/III como descrito na literatura (DE OLIVEIRA PEDRO; SCHMITT; NEUMANN, 2016; PHILIPPOVA et al., 2001).

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

O tamanho médio dos agregados foi determinado por medidas de espalhamento dinâmico de luz utilizando um instrumento Zetasizer nano-ZS90 da Malvern Instrument (Worcestershire, UK), equipado com laser He-Ne 10 mW operando em 633 nm a 25 °C, com ângulo de espalhamento de 90°. As medidas foram realizadas nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 g L⁻¹ em solução tamponante de acetato (pH 5,0) e fosfato de sódio (pH 7,4), ambas na concentração de 50 mmol L⁻¹ e força iônica de 150 mmol L⁻¹. As medidas foram realizadas em duplicata com 3 acumulações para cada solução.

3.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das nanopartículas formadas pelos derivados de quitosana foi examinada num microscópio eletrônico de transmissão JEOL (JEM2100 LaB6) operando a 200 kV. Para tanto, as nanopartículas de quitosana foram suspensas em água (1,0 mg mL⁻¹) e sonicadas por 5 minutos para melhorar a dispersão e evitar agregação. Em seguida, 20 µL dessa dispersão foi adicionada sobre grades de cobre revestida com carbono (200 mesh). Após 20 min, o excesso de solução foi retirado cuidadosamente com papel filtro e as grades foram coradas com 20 µL de ácido fosfotúngstico (2%), sendo armazenadas em estufa a vácuo a 40 °C até completa evaporação do solvente.

3.7 Estudo da incorporação de fármacos utilizando a Espectroscopia UV-Vis

O estudo da incorporação de fármacos pode ser realizado utilizando a espectroscopia UV-Vis quando o fármaco livre apresenta comprimento de onda de absorção na faixa da região do visível. Uma vez conhecida a absorção do fármaco livre é possível inferir quanto do fármaco está associado/incorporado aos derivados poliméricos ou nanopartículas (XIA et al., 2010). A quercetina foi empregada como fármaco modelo.

Soluções estoques de quercetina foram preparadas no solvente orgânico *N,N*-dimetilformamida (DMF) para determinação da curva de calibração. Os derivados poliméricos foram solubilizados em solução tamponante de acetato e fosfato de sódio em pHs 5,0 e 7,4, respectivamente, na concentração de 2 g L⁻¹. As soluções dos polímeros foram misturadas com o fármaco previamente solubilizado em etanol (1 mg mL⁻¹) e mantidas sob leve agitação por aproximadamente 5 horas na ausência de luz. Em seguida, essas suspensões foram dialisadas por aproximadamente 15 horas em membranas de diálise (MWCO = 12 kDa) contra solução tamponante na ausência de luz. Decorrido esse tempo, a concentração do fármaco livre foi determinada utilizando espectroscopia de UV-Vis em 366 nm (pH 5,0) e 376 nm (pH 7,4) e curva de calibração previamente obtida. Esse procedimento foi realizado em triplicata para todos os derivados poliméricos. Dessa forma foi possível separar a fração de fármaco livre da fração associada às partículas para assim determinar a eficiência de encapsulamento (EE) média (Equação 3) e a capacidade de carregamento (CC) (Equação 4) em ambos pHs (YOO; PARK, 2001).

$$EE = \frac{(Massa\ de\ fármaco\ retida\ nas\ nanopartículas)}{(Massa\ de\ fármaco\ inicial)} \times 100\% \quad (\text{Equação 3})$$

$$CC = \frac{(Massa\ de\ fármaco\ retida\ nas\ nanopartículas)}{(Massa\ total\ de\ todos\ os\ componentes\ na\ nanopartícula)} \times 100\% \quad (\text{Equação 4})$$

3.8 Liberação do fármaco *in vitro*.

Os ensaios de liberação do fármaco *in vitro* foram realizados por meio da dispersão das nanopartículas carregadas em solução tamponante (pH 5,0 e pH 7,4). Posteriormente, essa solução foi transferida para membranas de diálise (MWCO = 12.000 Da) e imersas em 35 mL do meio de liberação (respectiva solução tamponante), mantidas sob leve agitação a 37 °C. Em intervalos predeterminados, foram retiradas alíquotas de 3 mL do meio de liberação e substituídas pelo mesmo volume da solução tamponante original. A concentração de fármaco liberada foi determinada por absorção no UV (NABID et al., 2011). O modelo cinético de Korsmeyer-Peppas foi aplicado para melhor compreensão do mecanismo de liberação dos sistemas em estudo.

3.9 Citotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio de MTT

Células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) foram cultivadas no meio de cultura RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS, Sigma-Aldrich) e 1% (v/v) de L-glutamina, penicilina e estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram incubadas em placas de cultura de 96 poços ($\sim 10^4$ células por poço) e após o período de adesão celular (24 h após a incubação), foram lavadas com o meio de crescimento, sendo posteriormente adicionadas as seguintes soluções para tratamento: fármaco livre, nanopartículas vazias, nanopartículas carregadas e Triton-X (controle positivo). O controle negativo foi feito por células não tratadas. Decorridas 24 h, o meio de tratamento foi substituído pelo meio de cultura, sendo o sal de tetrazólio (MTT), previamente solubilizado em tampão fosfato salino (PBS), adicionado em cada poço para avaliação da atividade mitocondrial na viabilidade celular. Decorridas 4 h, o meio contendo MTT foi removido, adicionando-se DMSO para solubilização dos cristais de formazan produzidos pelo metabolismo celular. Depois de agitação orbital a 300 rpm por 15 min, a absorbância do meio de cultura foi medida em $\lambda = 570$ nm num micro-leitor de placas (Safire, Tecan AG, Salzburg, Áustria). A viabilidade celular relativa foi calculada a partir da divisão dos valores individuais pelo controle negativo (LOZANO et al., 2008). Os resultados foram tratados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 6[®]. Esses estudos foram conduzidos nos laboratórios da Universidade de Münster, Alemanha, classificados com nível de segurança S1 (utilização de organismos e/ou métodos que não apresentam riscos a seres humanos ou ao meio ambiente) e aprovados de acordo com o comitê biológico central alemão ("*Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit*" - ZKBS).

3.10 Ensaio de internalização celular das nanopartículas

3.10.1 Eficiência de associação de proteína CAP-sfGFP às nanopartículas

A superfície das nanopartículas formadas pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅ foram marcadas com proteína verde fluorescente com afinidade por quitosana (CAP-sfGFP) para estudos de internalização celular de acordo com estudo prévio (FUENZALIDA et al., 2014). A

eficiência de associação nanopartículas-proteína foi determinada pela adição de uma alíquota do polímero a soluções de CAP-sfGFP (0,05, 0,10 e 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com concentração final de 0,0428 mg mL^{-1} . Após 5 min de incubação, a dispersão foi centrifugada por 50 min à 10000 g utilizando uma centrífuga Mikro 220R (Andreas Hettich, Tuttlingen, Alemanha). Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e sua respectiva fluorescência medida ($\lambda_{ex} = 470 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$) num micro leitor de placas (Safire, Tecan AG, Salzburg, Áustria). A quantidade de proteína associada à amostra foi estimada utilizando uma curva de calibração de CAP-sfGFP em solução tamponante (pH 6,0, NaH_2PO_4 40 mmol L^{-1} , manitol 195 mmol L^{-1} , glicose 5,5 mmol L^{-1} , KCl 5 mmol L^{-1} , MgCl_2 2,13 mmol L^{-1} , CaCl_2 1,32 mmol L^{-1}) até concentração de 0,15 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A evolução do diâmetro médio das nanopartículas marcadas com CAP-sfGFP em meio de cultura celular foi acompanhada ao longo de 180 minutos por DLS.

3.10.2 Interação célula-nanopartícula por Microscopia Confocal de Varredura à Laser

Ensaio de internalização celular foram realizados utilizando nanopartículas formadas pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅ como prova de conceito. Os agregados foram corados utilizando 100 $\mu\text{g/ml}$ de proteína verde fluorescente com afinidade por quitosana (CAP-sfGFP) (FUENZALIDA et al., 2014). As células MCF-7 foram cultivadas em placas μ -Slide de 8 poços até a confluência. Posteriormente, cada poço foi tratado com 100 μL de solução de nanopartículas vazias e marcadas com CAP-sfGFP. Após 3h de incubação, a solução foi removida e o corante fluorescente laranja (CellMask™ Orange Plasma Membrane Stain, Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para corar a membrana celular. Na sequência, foi feita a fixação utilizando solução de paraformaldeído 4%. Para coração do núcleo celular foi utilizado corante fluorescente vermelho (HCS CellMask™ Red stain, Thermo Fisher Scientific). As amostras foram então imediatamente observadas num Microscópio Confocal de Varredura à Laser (Leica TCS SP2).

3.11 Ensaios de hemocompatibilidade pela atividade hemolítica

Estudos de hemocompatibilidade podem ser conduzidos para obtenção de informações sobre o comportamento de compostos de interesse quando em contato com o sangue, permitindo avaliar os efeitos causados no organismo. A interação desses compostos com as células vermelhas, também conhecidas como eritrócitos ou hemácias, pode proporcionar a destruição mecânica prematura destas células (hemólise), resultando na liberação da hemoglobina no plasma sanguíneo. A concentração dessa proteína pode ser estimada por espectroscopia na região do UV-Vis devido à absorção em 545 nm. Assim, é possível avaliar a integridade dos eritrócitos de acordo com as variações da concentração da hemoglobina no plasma sanguíneo. As amostras em estudo são consideradas hemocompatíveis e adequadas para aplicações biológicas quando a taxa de hemólise é menor que 5% (ISO-10993-1, 2003).

Os ensaios de hemocompatibilidade foram realizados utilizando sangue recém coletado. 800 µL de sangue foram diluídos com 1 mL de solução tamponante de PBS. Posteriormente, 1 mg dos nanoagregados foram dispersos em 1 mL de PBS e incubados a 37 °C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 20 µL de sangue diluído e os tubos foram incubados por mais 60 minutos à 37 °C com leve agitação. Finalmente, a absorbância das amostras foi conferida utilizando um espectrômetro de UV-Vis em 545 nm. Esses estudos foram conduzidos nos laboratórios da Universidade de Münster, Alemanha, classificados com nível de segurança S1 (utilização de organismos e/ou métodos que não apresentam riscos a seres humanos ou ao meio ambiente) e aprovados de acordo com o comitê biológico central alemão ("*Zentrale Kommission für Biologische Sicherheit*" - ZKBS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da quitosana desacetilada

4.1.1 Determinação do grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) da quitosana por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

O grau médio de desacetilação foi determinado utilizando-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. A varredura do espectro e a aquisição de dados foram realizadas a 70 °C de modo a atenuar os efeitos de viscosidade da solução e da hidrólise ácida durante o experimento, uma vez que o polímero foi solubilizado em ácido clorídrico (VARUM; OTTOY; SMIDSROD, 2001).

O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) foi obtido utilizando-se a áreas dos picos na região de $\delta = 2,3$ ppm, atribuída aos núcleos de hidrogênio da metila do grupo acetamido (A_{CH_3}), e a região de $\delta = 3,5$ ppm, atribuída ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel glicosamino (A_H) (SIGNINI; CAMPANA FILHO, 1998). Essas regiões, indicadas na Figura 11 e Equação 5, sofrem menos influências dos picos dos demais núcleos de hidrogênio presentes na cadeia da quitosana. O grau médio de desacetilação obtido foi de $\overline{GD} = 98,6\%$.

$$\overline{GD}(\%) = \left[1 - \left(\frac{A_{CH_3}}{3A_H} \right) \right] \cdot 100\% \quad (\text{Equação 5})$$

Figura 11: Espectro de RMN¹H da quitosana desacetilada.

4.1.2 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

Os espectros de infravermelho (IV) obtidos para as quitosanas comercial (QC) e desacetilada (QD) estão dispostos na Figura 12. É possível notar que ambas quitosanas apresentam uma banda característica na região de 3365 cm^{-1} , devido às vibrações de estiramento axial dos grupos hidroxilas (O-H) presentes nos polímeros, estando estas sobrepostas ao estiramento das ligações nitrogênio-hidrogênio (N-H) (DOMSZY; ROBERTS, 1985). A banda localizada em 2875 cm^{-1} corresponde ao estiramento das ligações C-H (DONG et al., 2002).

Comparando ambos espectros, podem ser observadas bandas referentes ao estiramento de C=O de amida I em 1650 cm^{-1} . O sinal observado na região de 1593 cm^{-1} se refere à deformação angular de N-H dos grupos amino presentes nas unidades de glicosamina (MITRA et al., 2013; SANTOS, J. et al., 2003), estando sobreposta à deformação C=O de amida II. Em 1420 , 1380 e 1317 cm^{-1} são observadas as bandas referentes à deformação de -CN de amida, -

CN de amina e $-\text{CN}$ de amida III, respectivamente (BRUGNEROTTO; LIZARDI; et al., 2001). Podem ser observadas ainda as bandas referentes estiramento anti-simétrico de C-O-C de unidades glicosamina (1153 cm^{-1}), deformação angular simétrica de CH_3 (região entre 1360 a 1404 cm^{-1}), além de bandas de estruturas polissacarídicas na região de $890 - 1156\text{ cm}^{-1}$ (BRUGNEROTTO; LIZARDI; et al., 2001). A Tabela 2 resume as atribuições de bandas e suas respectivas frequências vibracionais.

Figura 12: Espectros de absorção na região do infravermelho para as quitosanas comercial (QC) e desacetilada (QD).

Tabela 2: Atribuições de bandas e frequências vibracionais em cm^{-1}

$\nu_{\text{O-H}}$	$\delta_{\text{C-H}}$	$\nu_{\text{C=O}}$	$\delta_{\text{C=O}}$	$\delta_{\text{N-H}}$	$\delta_{\text{C-N}}$	$\delta_{\text{C-N}}$	$\nu_{\text{C-N}}$	$\nu_{\text{C-O-C}}$
$\nu_{\text{N-H}}$		(Amida I)	(Amida II)	(Amina)	(Amida)	(Amina)	(Amida III)	
3365	2875	1650	1593	1593	1420	1380	1317	1153

ν = estiramento δ = deformação

É possível, portanto, utilizar as bandas em 1420 cm^{-1} ($-\text{CN}$ de amida) e 1380 cm^{-1} ($-\text{CN}$ de amina) para verificação do processo de desacetilação da quitosana. De acordo com a Figura 12, a razão das intensidades entre estas bandas muda após a reação de desacetilação do polímero, indicando menor grau de acetilação. A diminuição da quantidade de amida pode ser evidenciada pela diminuição da intensidade da banda em 1420 cm^{-1} na amostra QD quando comparada com QC. Esse resultado está de acordo com o observado por RMN¹H.

4.1.3 Determinação da massa molar viscosimétrica média

A massa molar viscosimétrica média da quitosana é muito importante para o controle da viscosidade, solubilidade e atividade biológica, uma vez que o tamanho das cadeias poliméricas interfere diretamente nas propriedades físico-químicas do polímero. Além disso, por se tratar de um biopolímero, a massa molar de diferentes amostras de quitosana pode variar dependendo da procedência da amostra e dos tipos de tratamentos empregados na sua obtenção. Somado a isso, quitosanas com altas massas moleculares tendem a apresentar maior toxicidade em sistemas biológicos (CARRENO-GOMEZ; DUNCAN, 1997).

Desse modo, as massas molares viscosimétricas médias foram determinadas de acordo com o item 3.3.3. Os valores de massa molar viscosimétrica média ($\bar{M}_v$) dos polímeros QC e QD foram obtidos pela equação de Mark-Houwink (Equação 2), utilizando as constantes $\mathbf{a} = 0,796$ e $\mathbf{K} = 0,079\text{ mL g}^{-1}$, para quitosanas com grau de desacetilação próximos de 99% e $\mathbf{a} = 0,823$ e $\mathbf{K} = 0,079\text{ mL g}^{-1}$ para amostras com grau de desacetilação de aproximadamente 85% (RINAUDO, MILAS e LE DUNG, 1993). Os valores das massas molares viscosimétricas médias para QC e QD foram 82,4 kDa e 3,8 kDa respectivamente. Diante dos dados obtidos é possível concluir que a reação de despolimerização da quitosana utilizando-se nitrato de sódio permitiu a redução de $\bar{M}_v$ em aproximadamente 20 vezes.

4.2 Síntese e caracterização dos derivados anfifílicos de quitosana contendo o grupo pentiltrimetilamônio (PTMA)

O esquema da síntese do derivado quaternário de quitosana contendo o grupo PTMA é mostrado na Figura 13. O procedimento adotado foi previamente descrito (DE OLIVEIRA

PEDRO et al., 2013), sendo utilizado o brometo de pentiltrimetilamônio em presença de quitosana desacetilada para a formação de um sal quaternário. Essa é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) que ocorre por meio do ataque do nucleófilo ao carbono ligado ao átomo de bromo presente no brometo de pentiltrimetilamônio, seguido do rompimento da ligação C–Br e formação da ligação C–N do grupo PTMA com a quitosana.

Figura 13: Esquema do mecanismo de reação de substituição nucleofílica da quitosana com o grupo PTMA em meio básico.

Fonte: Autoria própria.

A fim de se obter os derivados de quitosana com caráter anfifílico, o polímero hidrofílico modificado com o grupo PTMA foi submetido a uma reação subsequente para a adição de uma cadeia alquílica hidrofóbica (Figura 14).

Figura 14: Esquema do mecanismo de reação de substituição nucleofílica da quitosana com o dodecilaldeído.

Fonte: Autoria própria.

O processo de alquilação consiste basicamente em uma reação de adição nucleofílica que envolve uma etapa lenta, na qual ocorre a formação da imina (base de Schiff) entre o

nitrogênio presente na cadeia da quitosana e o carbono da carboxila do aldeído, e uma etapa rápida na qual ocorre a redução da dupla ligação da base de Schiff e a formação de uma ligação covalente simples, obtendo-se então o derivado alquilado (DESBRIERES; MARTINEZ; RINAUDO, 1996).

4.2.1 Determinação do grau médio de substituição ($\overline{GS}$) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

O grau médio de substituição foi determinado utilizando-se a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. O espectro de RMN¹H do derivado quaternário, exibido na Figura 15, confirma o sucesso da síntese. Para simplificar a análise do espectro de RMN¹H, foi considerada a estrutura da quitosana dividida em duas partes, sendo a unidade substituída representada pelo subíndice *s*.

Além dos sinais característicos da quitosana, podem ser observados os picos correspondentes dos grupos trimetilamônio e o desdobramento do hidrogênio anomérico devido à substituição (não-substituído em $\delta = 5,20$ ppm e substituído em $\delta = 5,37$ ppm). Em $\delta = 1,79$ ppm aparece o sinal referente aos hidrogênios do grupo metileno equidistante do grupo pentil (indicado em verde). A porcentagem do grupo PTMA ligado à cadeia de quitosana foi calculada comparando-se a integração do sinal do grupo metileno intermediário do grupo PTMA (CH_2 , $\delta = 1,79$ ppm), com a integração correspondente aos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos anoméricos (H , $\delta = 5,20$ ppm) e (H_s , $\delta = 5,37$) do anel. A relação utilizada foi a Equação 6 e o grau de substituição médio foi $\overline{GS} = 42,2\%$, sendo o derivado denominado QPTMA₄₀.

$$\overline{GS}(\%) = \left(\frac{A_{CH_2}}{2 \cdot [A_H + A_{H_s}]} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Equação 6})$$

Na sequência, o derivado hidrofílico obtido foi dividido em duas porções e reagido com diferentes quantidades de dodecilaldeído (DDA) para obtenção de dois derivados anfifílicos com diferentes proporções da cadeia hidrofóbica. Os espectros de RMN¹H para os derivados anfifílicos estão dispostos na Figura 16.

Figura 15: Espectro de RMN¹H da quitosana modificada com grupo hidrofílico PTMA.

O grau médio de substituição pelo grupo DDA foi determinado similarmente ao cálculo utilizado para o grupo PTMA. O sinal característico observado em $\delta = 1,18$ ppm pode ser atribuído aos núcleos de hidrogênio da metila do grupo dodecila (CH_3). A cadeia hidrocarbônica do grupo DDA exibe ainda sinais característicos em $\delta = 1,60$ ppm e $\delta = 2,38$ ppm. Os sinais dos hidrogênios anoméricos dos monômeros acetilados (H , $\delta = 5,21$ ppm) e substituídos com

PTMA e DDA (H_S , $\delta = 5,37$ ppm) foram utilizados para o cálculo do grau de substituição usando a Equação 7.

Figura 16: Espectro de RMN¹H dos derivados anfifílicos de quitosana modificados com o grupo PTMA, contendo 5,2% (QPTMA₄₀DDA₅) e 33,8% (QPTMA₄₀DDA₃₀) do grupo hidrofóbico DDA.

$$\overline{GS}(\%) = \left(\frac{A_{CH_3}}{3 \cdot [A_H + A_{HS}]} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Equação 7})$$

Foram obtidos, portanto, os derivados anfifílicos QPTMA₄₀DDA₅ e QPTMA₄₀DDA₃₀ contendo respectivamente 5,2 e 33,8% do grupo hidrofóbico dodecila.

4.2.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O derivado de quitosana substituído com o grupo hidrofílico PTMA foi caracterizando utilizando-se a espectroscopia na região do infravermelho. A Figura 17 mostra o espectro do derivado modificado com PTMA.

É possível notar as diferenças entre os espectros dos polímeros QD e QPTMA40. Isso se deve à incorporação dos grupos presentes no sal de amônio PTMA utilizado para a síntese junto à quitosana. A banda na região de 1485 cm⁻¹, presente no sal PTMA e no derivado de quitosana substituído, corresponde à deformação angular dos grupos –CH₂– existentes na cadeia alquílica do grupo PTMA. Outra evidência do sucesso da incorporação do grupo hidrofílico na cadeia da quitosana é a redução da intensidade da banda na região de 1590 cm⁻¹, referente à deformação angular de N-H dos grupos amina presentes nas unidades de glicosamina do polímero. Uma vez que o grupo PTMA é ligado majoritariamente na amina das unidades glicosamina da quitosana, é possível observar que para os polímeros QD e QPTMA40 houve redução da intensidade da banda exibida nessa região, indicando assim a diminuição dos grupos amina livres na cadeia do derivado modificado. A banda exibida em 2950 cm⁻¹, referente ao estiramento simétrico ou assimétrico de CH₂, também é ligeiramente mais intensa no derivado hidrofílico devido à maior quantidade desses grupos na cadeia da quitosana modificada.

Figura 17: Espectros de absorção na região do infravermelho para o sal pentiltrimetilamônio (PTMA), quitosana desacetilada (QD) e quitosana substituída com 42,2% do grupo hidrofílico (QPTMA40).

A Figura 18 mostra o comparativo dos espectros de IV para os derivados anfifílicos de quitosana. É possível observar, além das bandas de vibração da quitosana, o aparecimento de novos sinais característicos do grupo DDA. Há diminuição do sinal em 1592 cm^{-1} e em 1255 cm^{-1} , relacionados aos grupos amina, nos espectros dos derivados QPTMA₄₀DDA₅ e QPTMA₄₀DDA₃₀, indicando que a substituição do grupo hidrofóbico DDA ocorreu predominantemente no nitrogênio do grupo -NH_2 (ZHANG, A. et al., 2014). Os sinais característicos na região de 2926 e 2860 cm^{-1} correspondem, respectivamente, à deformação axial da ligação C–H dos grupos -CH_3 e -CH_2 . Esses sinais são mais intensos para o derivado QPTMA₄₀DDA₃₀, o que confirma a maior quantidade da cadeia hidrofóbica ligada à estrutura da quitosana. Além disso, os sinais em 2334 cm^{-1} e 2170 cm^{-1} são característicos da vibração dos substituintes dodecila (ROBLES et al., 2014). Os resultados estão de acordo com as observações obtidas por RMN¹H.

Figura 18: Espectros de absorção na região do infravermelho para quitosana desacetilada (QD) e seus derivados.

4.3 Síntese e caracterização dos derivados anfífilos de quitosana contendo o grupo cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina (DEAE)

A substituição da quitosana com o grupo DEAE se dá pelo ataque do par de elétrons do grupo amina ao carbono ligado ao átomo de cloro do grupo DEAE, sendo essa uma reação de substituição nucleofílica bimolecular S_N2 (Figura 19).

O derivado obtido foi modificado com DDA para obtenção dos derivados anfífilos. O mecanismo dessa reação foi discutido no item 4.2.

Figura 19: Esquema do mecanismo de reação de substituição por grupos DEAE.

Fonte: Autoria própria.

4.3.1 Determinação do grau médio de substituição ($\overline{GS}$) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN^1H)

A Figura 20 mostra o espectro de RMN^1H utilizado para o cálculo do grau médio de substituição do derivado de quitosana modificada com o grupo DEAE. O grau de substituição pode ser calculado com a Equação 8

$$\overline{GS}(\%) = \left(\frac{A_{\text{CH}_3}}{6 \cdot [A_H + A_{H_S}]} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Equação 8})$$

No qual A_{CH_3} ($\delta = 1,64$ ppm) se refere aos núcleos de hidrogênio dos grupos metila presentes na cadeia do DEAE e A_H ($\delta = 5,22$ ppm) e A_{H_S} ($\delta = 5,34$ ppm) se referem aos hidrogênios anoméricos das unidades não substituída e substituída, respectivamente. Assim, o $\overline{GS} = 38,5\%$, sendo atribuído a esse derivado a sigla QDEAE₄₀. São observados ainda sinais característicos do grupo DEAE em $\delta = 2,32$ e $\delta = 3,85$ ppm.

Figura 20: Espectro de RMN¹H da quitosana modificada com grupo hidrofílico DEAE.

Essa amostra hidrofílica foi então submetida à reação com DDA para obtenção de dois derivados anfifílicos. Os espectros de RMN¹H (Figura 21) foram utilizados para o cálculo do grau médio de substituição com grupos DDA de maneira semelhante ao descrito no item 4.2.1, utilizando a Equação 7. Foram obtidos, portanto, os derivados anfifílicos QDEAE₄₀DDA₅ e QDEAE₄₀DDA₃₀ contendo respectivamente 5,1 e 27,9% do grupo hidrofóbico dodecila.

Figura 21: Espectro de RMN¹H dos derivados anfifílicos de quitosana modificados com o grupo DEAE, contendo 5,2% (QDEAE₄₀DDA₅) e 33,8% (QDEAE₄₀DDA₃₀) do grupo hidrofóbico DDA.

4.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

A Figura 22 mostra o espectro na região do infravermelho para o derivado modificado com DEAE. É possível observar que para o derivado QDEAE₄₀ houve diminuição da banda em 1592 cm⁻¹, relacionado aos grupos amina livres, indicando assim a substituição do grupo DEAE no nitrogênio do grupo -NH₂ (ZHANG, A. et al., 2014). Outro sinal característico do grupo DEAE é exibido na região de 2973 cm⁻¹, correspondente à deformação axial da ligação C-H dos grupos -CH₃ presente na estrutura do substituinte.

Figura 22: Espectros de absorção na região do infravermelho para a quitosana desacetilada (QD) e quitosana substituída com 38,5% do grupo DEAE (QDEAE₄₀).

Na Figura 23 são observados sinais característicos na região de 2928 cm^{-1} e 2860 cm^{-1} correspondente às deformações axiais da ligação C–H dos grupos $-\text{CH}_3$ e $-\text{CH}_2$ da cadeia hidrofóbica DDA, respectivamente. É possível observar ainda a diminuição do sinal em 1572 cm^{-1} relacionada aos grupos amina livres, nos espectros dos derivados anfifílicos QDEAE₄₀DDA₅ e QDEAE₄₀DDA₃₀, evidenciando que a substituição do grupo hidrofóbico DDA ocorreu predominantemente no nitrogênio do grupo $-\text{NH}_2$. Também são observados os sinais em 2343 cm^{-1} e 2171 cm^{-1} , característicos da vibração dos substituintes dodecila (ROBLES et al., 2014). O derivado QDEAE₄₀DDA₃₀ apresenta esses sinais mais intensos, indicando assim que existem mais grupos DDA ligados à estrutura do polímero, confirmando assim os resultados obtidos por RMN¹H.

Figura 23: Espectros de absorção na região do infravermelho para as amostras QDEAE₄₀, QDEAE₄₀DDA₅ e QDEAE₄₀DDA₃₀.

4.4 Síntese e caracterização dos derivados anfífilos de quitosana contendo o grupo 2,3-Epóx-1-propanol (GLY)

A reação da quitosana com 2,3-Epóx-1-propanol (GLY) é uma reação de aminação de epóxido conforme indicado no esquema representado na Figura 24. A amina primária da quitosana reage com o grupo epóxido para formar um grupo hidroxila e uma amina secundária substituída.

Figura 24: Esquema do mecanismo de reação de substituição por grupos GLY.

Fonte: Autoria própria.

Após essa etapa, o derivado obtido foi então modificado com DDA. O mecanismo dessa reação foi discutido no item 4.2

4.4.1 Determinação do grau médio de substituição ($\overline{GS}$) por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

Os sinais observados no espectro de RMN¹H do derivado modificado com o grupo GLY em $\delta = 2,94$ ppm e $\delta = 3,27$ ppm são referentes aos núcleos de hidrogênio do grupo $-H-CH_2$ presente na cadeia *N*-(2,3-dihidroxipropil) do grupo GLY. Para o cálculo do grau médio de substituição com GLY foram utilizados os hidrogênios anoméricos das unidades não-substituída A_H ($\delta = 5,22$ ppm) e substituída A_{H_S} ($\delta = 5,34$ ppm) e o sinal em $\delta = 2,94$ ppm (A_{-N-CH_2}) (PAN et al., 2013; ZHOU, H. et al., 2010). A Figura 25 e a Equação 9 foram utilizadas para o cálculo do grau médio de substituição.

Figura 25: Espectro de RMN¹H da quitosana modificada com grupo hidrofílico GLY.

$$\overline{GS}(\%) = \left(\frac{A_{(-N-CH_2)}}{A_H + A_{H_S}} \right) \cdot 100\% \quad (\text{Equação 9})$$

O grau médio de substituição com GLY foi 44,6%, sendo a sigla QGLY₄₀ adotada para esse derivado.

Na sequência, esse derivado hidrofílico foi submetido à reação com DDA para obtenção do polímero com caráter anfifílico. Os espectros de RMN¹H estão mostrados na Figura 26, sendo o grau médio de substituição com grupos DDA calculado de maneira semelhante ao descrito no item 4.2.1, utilizando a Equação 7. Foram obtidos, assim, os derivados anfifílicos QGLY₄₀DDA₅ e QGLY₄₀DDA₃₀ contendo 7,5% e 33,4% do grupo hidrofóbico DDA, respectivamente.

Figura 26: Espectro de RMN¹H dos derivados anfifílicos de quitosana modificados com o grupo GLY, contendo 7,5% (QGLY₄₀DDA₅) e 34,3% (QGLY₄₀DDA₃₀) do grupo hidrofóbico DDA.

4.4.2 Espectroscopia no infravermelho (IV)

Os espectros na região do infravermelho para as amostras QD e QGLY₄₀ podem ser observados na Figura 27. A diminuição da intensidade do pico em torno de 1595 cm⁻¹, relacionada com a vibração do grupo amina primário (–NH₂), quando comparando os espectros de QD e QGLY₄₀, evidencia a reação do grupo hidrofílico glicidol com as aminas da cadeia da quitosana.

Figura 27: Espectros de absorção na região do infravermelho para a quitosana desacetilada (QD) e quitosana substituída com 44,6% do grupo GLY (QGLY₄₀).

Na Figura 28 são observados os sinais característicos na região de 2920 cm⁻¹ e 2860 cm⁻¹ correspondentes às deformações axiais da ligação C–H dos grupos –CH₃ e –CH₂ da cadeia hidrofóbica DDA, respectivamente. Além disso, é possível observar ainda na região de 2335 cm⁻¹ e 2170 cm⁻¹ sinais característicos da vibração dos substituintes dodecila (ROBLES et al., 2014). A diminuição do sinal em 1561 cm⁻¹ indica que as reações de modificação da cadeia hidrocarbônica da quitosana ocorreram predominantemente no grupo amina livre, concordando com os resultados obtidos por espectroscopia de RMN.

A Tabela 3 resume os resultados de grau médio de desacetilação, grau médio de substituição e massa molar viscosimétrica média das amostras utilizados nesse trabalho.

Figura 28: Espectros de absorção na região do infravermelho para QGLY₄₀, QGLY₄₀DDA₅ e QGLY₄₀DDA₃₀.

Tabela 3: Resultados de caracterização por RMN¹H e massa molar viscosimétrica média das amostras utilizadas no trabalho.

Amostra	$\overline{GD}^a$ (%)	$\overline{GS}_1^b$ (%)	$\overline{GS}_2^c$ (%)	$\overline{M}_v$ (kDa)
QC	85,1	-	-	82,4
QD	98,6	-	-	3,8
QPTMA ₄₀	-	42,2	-	-
QPTMA ₄₀ DDA ₅	-	42,2	5,2	-
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	-	42,2	33,8	-
QDEAE ₄₀	-	38,5	-	-
QDEAE ₄₀ DDA ₅	-	38,5	5,1	-
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	-	38,5	27,9	-
QGLY ₄₀	-	44,6	-	-
QGLY ₄₀ DDA ₅	-	44,6	7,5	-
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	-	44,6	34,3	-

a – grau médio de desacetilação

b – grau médio de substituição com o grupo hidrofílico

c – grau médio de substituição com o grupo hidrofóbico

4.5 Análise térmica

O comportamento térmico das amostras de quitosana e seus derivados foi investigado por meio de TGA/DTG-DTA. Os dados quantitativos referentes aos eventos de perdas de massa, intervalos de temperatura e picos DTA envolvidos nesse processo estão dispostos na Tabela 4.

A Figura 29 exhibe o perfil do comportamento das amostras QC e QD. Três eventos térmicos são observados referentes a desidratação da amostra, decomposição do polímero e geração de material carbonizado. Os resultados quantitativos indicam que as amostras contêm aproximadamente 12% de água, envolvendo vários tipos de hidratação, como por exemplo adsorção ou ligação fraca entre moléculas de água e hidrogênios do polímero (PAWLAK; MUCHA, 2003). É interessante notar que, após a desidratação, aproximadamente 45% de perda de massa pode ser observada no intervalo de temperatura de 150 – 380 °C referente a decomposição do polímero. A despolimerização das cadeias da quitosana, reações de decomposição e abertura do anel glicopiranosídico acontecem nessa etapa (LV et al., 2009; PAWLAK; MUCHA, 2003; ZAWADZKI; KACZMAREK, 2010).

A razão entre a perda de massa na etapa 1 e 2 (Tabela 4) revela que a decomposição térmica da amostra QC ocorre predominantemente na etapa 1, enquanto que a etapa 2 é a responsável pela decomposição majoritária da amostra QD. Os resultados indicam ainda que a amostra QD gerou mais resíduos ao final da decomposição quando comparada com a amostra QC.

Figura 29: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QC e b) QD obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min^{-1} ; massa da amostra: $\sim 5,0 \text{ mg}$; razão de aquecimento: $10 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$; porta amostra aberto de α -alumina.

A etapa de decomposição do polímero das amostras QC e QD acontece numa única etapa. A adição do grupo hidrofílico PTMA proporciona o aparecimento de um sinal exotérmico adicional acentuado na DTA (Figura 30a), revelando alteração no mecanismo de decomposição quando esse grupo está presente. Esse comportamento é corroborado pelo aparecimento de um pico agudo que também pode ser observado na correspondente curva DTG. Provavelmente a fração inicial da perda de massa é devida à decomposição dos anéis da quitosana que não foram modificados com o grupo PTMA, enquanto que o sinal agudo corresponde à decomposição das unidades modificadas do polímero. Esse efeito de modificações da estrutura polimérica da quitosana foi observado por NETO et al. (2005) estudando quitosanas substituídas com óxido de etileno.

A incorporação da longa cadeia hidrofóbica DDA (amostras QPTMA₄₀DDA₅ e QPTMA₄₀DDA₃₀, Figura 30b e 30c respectivamente) ao polímero conduz à uma perda súbita de massa observada no início da decomposição, referente às unidades não modificadas e modificadas com o grupo PTMA. Esta decomposição é seguida por um sinal mais largo observado na DTG, provavelmente representando a decomposição dos segmentos contendo a cadeia DDA. O sinal aumenta à medida que mais DDA está ligado à estrutura, sendo esse comportamento evidenciado pelo pico exotérmico acentuado na curva DTA.

Figura 30: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QPTMA₄₀, b) QPTMA₄₀DDA₅ e c) QPTMA₄₀DDA₃₀ obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min⁻¹; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min⁻¹; porta amostra aberto de α -alumina.

As razões entre as perdas de massa entre as etapas 1 e 2 indicam um comportamento semelhante para as amostras QPTMA₄₀ e QPTMA₄₀DDA₅, sendo a decomposição igualmente dividida entre as duas etapas. É interessante notar a significativa formação de resíduo ao final da decomposição térmica da amostra QPTMA₄₀DDA₃₀ (Tabela 4).

O comportamento térmico dos derivados QDEAE₄₀, QDEAE₄₀DDA₅ e QDEAE₄₀DDA₃₀ pode ser observado na Figura 31. É válido observar que a desidratação das amostras QDEAE₄₀DDA₅ e QDEAE₄₀DDA₃₀ ocorre num intervalo de temperatura maior do que a amostra QDEAE₄₀ (Tabela 4). As curvas DTG sugerem que esse acréscimo do intervalo

de temperatura ocorre devido à presença de moléculas de água mais fortemente associadas ao polímero. As curvas DTA revelam que a etapa de decomposição dos polímeros apresenta dois eventos térmicos, estando em acordo com o observado nas curvas DTG. Os picos da DTA (Tabela 4) comprovam que há dois eventos exotérmicos associados com a etapa de degradação do polímero.

A modificação da quitosana com grupos DDA promove o aparecimento de um sinal em aproximadamente 330 °C (Figura 31b e 31c). Esse sinal, também observado na DTG, provavelmente está relacionado com a decomposição térmica das unidades monoméricas da quitosana modificada com o grupo DDA. Além disso, conforme observado nas amostras contendo o grupo PTMA (Figura 30), o aumento do grau de substituição por grupos DDA promove o aumento da intensidade do sinal observado na região de 330 °C. Esse é um forte indício de que a decomposição das unidades modificadas com o grupo DDA são as responsáveis por esse evento térmico, uma vez que o mesmo padrão é observado nos derivados anfifílicos modificados com os grupos PTMA e DEAE. A decomposição térmica das amostras acontece predominantemente na primeira etapa, de acordo com as razões entre as perdas de massa entre as etapas 1 e 2.

Figura 31: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QDEAE₄₀, b) QDEAE₄₀DDA₅ e c) QDEAE₄₀DDA₃₀ obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min⁻¹; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min⁻¹; porta amostra aberto de α -alumina.

A Figura 32 exibe os perfis do comportamento térmico para as amostras QGLY₄₀, QGLY₄₀DDA₅ e QGLY₄₀DDA₃₀. Os dados quantitativos revelam que as amostras modificadas com o grupo GLY apresentaram teor de água de aproximadamente 14%. Conforme observado anteriormente para as demais amostras, a adição do grupo hidrofóbico DDA promove o aparecimento de um pico adicional na etapa de decomposição do polímero que é exibido nas curvas DTG e DTA. A presença desse sinal em todas as 6 amostras anfífilas indica que a etapa de decomposição das unidades poliméricas modificadas com o grupo DDA ocorre no intervalo de temperatura de 300 – 350 °C. As razões entre as perdas de massa entre as etapas 1 e 2 comprovam que a etapa 1 é a principal responsável pela decomposição térmica das amostras. É

interessante observar ainda o aumento do resíduo final com o aumento do $\overline{GS}$ com o grupo DDA.

Figura 32: Curvas TGA/DTG e DTA para amostras a) QGLY₄₀, b) QGLY₄₀DDA₅ e c) QGLY₄₀DDA₃₀ obtidas em atmosfera dinâmica de ar. Condições: Vazão de ar: 100 mL min⁻¹; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min⁻¹; porta amostra aberto de α -alumina.

Tabela 4: Resultados quantitativos das curvas TGA/DTG e picos DTA nas seguintes condições: Vazão de ar: 100 mL min⁻¹; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min⁻¹; porta amostra aberto de α -alumina

(Continua)

Amostra	Evento térmico	Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Razão [1]/[2]*	DTA (°C mg ⁻¹)
QC	Desidratação	20,1 - 151,2	10,1	1,20	53,4 (endo)
	Etapa 1	151,2 - 371,9	48,5		302,9 (exo)
	Etapa 2	371,9 - 621,7	40,3		482,5 (exo)
	Resíduo	621,7 - 1000	1,1		-
QD	Desidratação	24,1 - 187,6	13,3	0,96	57,1 (endo)
	Etapa 1	187,6 - 384,4	41,8		304,8 (exo)
	Etapa 2	384,4 - 591,2	43,5		527,9 (exo)
	Resíduo	591,2 - 1000	1,6		-
QPTMA ₄₀	Desidratação	20,3 - 115,7	11,9	1,02	63,8 (endo)
	Etapa 1	115,7 - 283,1	43,1		238,6/269,8 (exo)
	Etapa 2	283,1 - 581,8	42,3		524,1 (exo)
	Resíduo	581,8 - 1000	2,5		-
QPTMA ₄₀ DDA ₅	Desidratação	22,1 - 147,9	12,5	1,01	56,2 (endo)
	Etapa 1	147,9 - 264,2	43,4		256,6 (exo)
	Etapa 2	264,2 - 730,2	42,9		325,6/497,7 (exo)
	Resíduo	730,2 - 1000	1,2		-
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	Desidratação	21,7 - 161,1	10,4	1,74	56,2 (endo)
	Etapa 1	161,1 - 392,7	54,5		243,4 (exo)
	Etapa 2	392,7 - 838,9	31,3		330,3/517,5 (exo)
	Resíduo	838,9 - 1000	3,8		-
QDEAE ₄₀	Desidratação	22,3 - 143,2	11,4	2,52	55,2 (endo)
	Etapa 1	143,2 - 403,1	62,1		273,6/301,9(exo)
	Etapa 2	403,1 - 610,1	24,6		580,8 (exo)
	Resíduo	610,1 - 1000	2,4		-
QDEAE ₄₀ DDA ₅	Desidratação	24,1 - 213,1	17,3	2,02	50,5 (endo)
	Etapa 1	213,1 - 421,1	53,0		270,8/330,2 (exo)
	Etapa 2	421,1 - 844,6	26,3		531,7 (exo)
	Resíduo	844,6 - 1000	3,3		-
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	Desidratação	22,6 - 208,4	13,7	2,52	45,8 (endo)
	Etapa 1	208,4 - 413,5	59,7		261,3/336,9 (exo)
	Etapa 2	413,5 - 809,6	23,7		529,7 (exo)
	Resíduo	809,6 - 1000	2,7		-
QGLY ₄₀	Desidratação	22,2 - 166,7	15,1	2,68	54,3 (endo)
	Etapa 1	166,7 - 394,6	61,4		249,2/296,3 (exo)
	Etapa 2	394,6 - 608,2	22,9		580,8 (exo)
	Resíduo	608,2 - 1000	0,5		-

Tabela 4: Resultados quantitativos das curvas TGA/DTG e picos DTA nas seguintes condições: Vazão de ar: 100 mL min⁻¹; massa da amostra: ~5,0 mg; razão de aquecimento: 10 °C min⁻¹; porta amostra aberto de α -alumina

(Continuação)

Amostra	Evento térmico	Intervalo de temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Razão [1]/[2]*	DTA (°C mg-1)
QGLY ₄₀ DDA ₅	Desidratação	20,8 - 187,6	14,5	2,44	55,2 (endo)
	Etapa 1	187,6 - 388,9	58,7		242,4/304,8 (exo)
	Etapa 2	388,9 - 702,8	24,1		491,9 (exo)
	Resíduo	702,8 - 1000	2,5		-
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	Desidratação	21,2 - 186,6	12,4	2,57	51,5 (endo)
	Etapa 1	186,6 - 385,2	60,3		261,3/322,8 (exo)
	Etapa 2	385,2 - 764,2	23,5		495,8 (exo)
	Resíduo	764,2 - 1000	3,7		-

*Razão entre a perda de massa da Etapa 1 [1] pela perda de massa da Etapa 2 [2].

4.6 Medidas de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas DSC da quitosana e seus derivados são mostradas na Figura 33. É possível observar o aparecimento de um pico endotérmico amplo centrado em aproximadamente 60 °C, atribuído à perda de água adsorvida no polímero. É interessante notar ainda que o conteúdo de cada grupo substituinte ligado à estrutura da quitosana promove o deslocamento do pico de desidratação. Por exemplo, o pico está localizado em 62 °C na curva DSC da amostra QC e em 70 °C na curva da amostra mais hidrofílica QD. Isto confirma que a interação do polímero com a água depende diretamente do grau de hidrofiliicidade, que está relacionado com o tipo e grau de substituição dos grupos ligados à quitosana. Este comportamento é semelhante para os derivados anfifílicos. Como pode ser observado na Figura 33b, a introdução dos grupos hidrofóbicos DDA desloca o pico de desidratação centrado em 66,1 °C na amostra QPTMA₄₀ para 62,7 °C e 58,3 °C nas amostras QPTMA₄₀DDA₅ e QPTMA₄₀DDA₃₀, respectivamente. O pico inesperado em 75 °C na curva DSC da amostra QPTMA₄₀ pode estar relacionado à presença de água associada à porção hidrofílica do substituinte PTMA ou mesmo a decomposição de PTMA residual livre. Esta possibilidade pode ser correlacionada com a perda acentuada de massa observada na curva DTG (Figura 30a).

Figura 33: Curvas DSC das amostras de a) quitosana comercial e desacetilada e modificada com os grupos b) PTMA, c) DEAE e d) GLY.

O mesmo comportamento pode ser observado para os demais derivados. O padrão de hidratação se relaciona diretamente com a proporção entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos. Os eventos exotérmicos observados nas amostras QDEAE₄₀DDA₅ e QGLY₄₀DDA₅, em 95 e 108 °C respectivamente, podem ser relacionados ao início de decomposição, ou ainda à cristalização parcial da amostra ou massa residual dos reagentes utilizados na síntese. É interessante observar que os resultados de DSC estão de acordo com os obtidos pelas medidas de DTG com relação ao comportamento térmico dos derivados de quitosana e as interações com a água.

4.7 Estudo do comportamento dos derivados em solução

4.7.1 Determinação da solubilidade dos derivados em função do pH

A solubilidade da quitosana em solução aquosa está relacionada com a capacidade de protonação dos grupos amina livres na estrutura do polímero. Uma vez que o pKa desses grupos é aproximadamente 6,4, a quitosana pode ser solubilizada em condições de pH abaixo do pKa. Essa restrição de solubilidade a condições ácidas limita o espectro de aplicação desse polímero, sobretudo em áreas médicas. Assim, um dos objetivos da síntese dos derivados de quitosana substituídos com grupos hidrofílicos como os grupos PTMA, DEAE e GLY é aumentar a solubilidade da quitosana para uma faixa de pH mais ampla.

A Figura 34 exhibe o comportamento da transmitância das amostras QD, QPTMA₄₀, QDEAE₄₀ e QGLY₄₀ em função do pH. A diminuição abrupta da transmitância para a amostra QD em pH próximo a 6,2 indica a precipitação do polímero devido à desprotonação dos grupos amina. As amostras QPTMA₄₀ e QDEAE₄₀ apresentaram precipitação em pHs acima de 10,9 e 10,3, respectivamente. Nenhuma precipitação foi observada para o derivado QGLY₄₀ na faixa de pH analisada. Esses resultados indicam que a solubilidade da quitosana pode ser controlada de acordo com os diferentes grupos ligados a sua estrutura principal.

Figura 34: Gráfico da transmitância em ($\lambda = 566$ nm) em função do pH para as quitosanas QD, QPTMA₄₀, QDEAE₄₀ e QGLY₄₀ na concentração de 1,0 g L⁻¹.

O comportamento da transmitância em função do pH para os derivados anfifílicos também foi avaliado e os resultados podem ser observados na Figura 35. Os derivados mais hidrofóbicos (QPTMA₄₀DDA₃₀, QDEAE₄₀DDA₃₀ e QGLY₄₀DDA₃₀) apresentaram menores valores de transmitância quando comparados com os polímeros menos hidrofóbicos das respectivas séries (QPTMA₄₀DDA₅, QDEAE₄₀DDA₅ e QGLY₄₀DDA₅). Esses resultados comprovam a influência dos grupos DDA na solubilidade dos derivados. A redução da transmitância observada para os derivados anfifílicos sugere que há formação de agregados no meio aquoso, responsáveis pelo espalhamento da luz e decréscimo na porcentagem dos valores de transmitância. É válido ressaltar ainda que a diminuição dos valores de transmitância é substancialmente inferior àquela observada pela amostra QD (Figura 34), proporcionada pela formação de precipitado. Isso sugere que a diminuição da transmitância se dá pela formação dos agregados, sem precipitação da amostra.

Figura 35: Gráfico da transmitância em ($\lambda = 566 \text{ nm}$) em função do pH para os derivados anfifílicos de quitosana na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$.

4.7.2 Determinação da concentração de agregação crítica por Fluorescência no Estado Estacionário

Os derivados anfifílicos de quitosana que foram obtidos nesse trabalho possuem a capacidade de se auto-associarem em solução aquosa devido às interações com o solvente e interações entre as cadeias hidrofóbicas. Isso permite a formação de agregados em solução sem a necessidade de adição de nenhum tipo de molécula ou reagente (DU, et al., 2009).

O comportamento em solução aquosa desses derivados foi monitorado utilizando o pireno como sonda fluorescente. A razão entre a intensidade dos picos de fluorescência I/III do pireno é uma indicação da polaridade do meio em que a sonda está inserida, permitindo, desse modo, determinar a concentração de agregação crítica (CAC) (IAMAZAKI et al., 2004). As razões I/III na faixa de 1,2 – 2,0 indicam que a sonda está num meio aquoso, enquanto que razões abaixo de 1,2 indicam localização num meio hidrofóbico. Assim, é possível determinar a CAC monitorando a diminuição da razão I/III quando se aumenta a concentração dos polímeros na solução, já que a tendência da sonda é se localizar nas porções hidrofóbicas quando há formação de agregados. A Figura 36 exemplifica a obtenção dos valores das CACs para polímero QGLY₄₀DDA₃₀ obtidas a partir dos gráficos de razão I/III vs. concentração do

polímero em diferentes pHs. Os demais gráficos utilizados para obtenção das CACs estão mostrados no apêndice.

Figura 36: Determinação da CAC do polímero QGLY₄₀DDA₃₀. Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.

Os valores das CACs estão mostrados na Tabela 5, confirmando que os agregados formam microdomínios hidrofóbicos em baixas concentrações. É possível observar ainda que os derivados hidrofílicos QPTMA₄₀, QDEAE₄₀ e QGLY₄₀ não apresentam valores de CAC, o que sugere que não há formação de agregados em solução devido à ausência dos grupos hidrofóbicos DDA. Os dados revelam a tendência de diminuição da CAC com o aumento do grau de substituição dos polímeros pelo grupo DDA. Esse comportamento indica que as interações intermoleculares são favorecidas pela maior quantidade de cadeias alquílicas DDA presentes no núcleo dos agregados.

Tabela 5: Valores de CACs obtido em diferentes pHs para os derivados anfífilos de quitosana

Amostra	CAC ($\times 10^{-3} \text{ g L}^{-1}$)			
	pH 4,0	pH 5,0	pH 6,2	pH 7,4
QPTMA ₄₀	-	-	-	-
QPTMA ₄₀ DDA ₅	37,0	34,1	21,6	20,8
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	16,0	9,7	9,1	4,3
QDEAE ₄₀	-	-	-	-
QDEAE ₄₀ DDA ₅	17,5	20,1	3,7	3,2
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	14,8	10,4	10,6	11,5
QGLY ₄₀	-	-	-	-
QGLY ₄₀ DDA ₅	25,9	22,8	18,1	15,9
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	21,3	34,8	3,7	3,5

Os valores de CAC tendem a diminuir com o aumento do pH do meio. Essa dependência da CAC com o pH está relacionada à protonação/desprotonação dos grupos amina da quitosana, o que altera a repulsão eletrostática entre as cadeias e confere diferentes propriedades aos agregados (DI MARTINO; SEDLARIK, 2014; LOPEZ-LEON et al., 2005). A desprotonação parcial dos grupos amina devido ao aumento do pH confere maior hidrofobicidade ao polímero, possibilitando a formação de agregados em concentrações mais baixas. Esse comportamento da CAC em função do pH está de acordo com o estudo realizado por Barbosa et al. (2016) utilizando quitosanas anfífilas com diferentes massas moleculares. Resultados similares foram obtidos por Hu et al. (2008) envolvendo derivados de quitosana contendo o grupo hidrofílico PEG e o grupo hidrofóbico ácido esteárico.

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

As medidas de espalhamento dinâmico de luz possibilitaram determinar os valores de tamanho, potencial zeta e PDI dos agregados formados pelos derivados anfífilos de quitosana nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5 e 1,0 g L^{-1} e pHs 5,0 e 7,4. Os resultados estão mostrados na Tabela 6. É interessante observar que os valores de PDI variaram entre 0,278 a 0,782, sugerindo a participação de várias cadeias na formação dos agregados.

Tabela 6: Diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas formadas pelos derivados de quitosana em pH 5,0 e 7,4

Continua

Amostra	pH	Concentração (g L ⁻¹)	Diâmetro (nm)	Zeta (mV)	PDI
QPTMA ₄₀ DDA ₅	5,0	0,10	235 ± 22	16,7 ± 1,7	0,488 ± 0,093
		0,25	326 ± 49	27,1 ± 0,9	0,516 ± 0,034
		0,50	371 ± 26	36,8 ± 3,4	0,553 ± 0,089
		1,00	492 ± 31	38,9 ± 1,4	0,647 ± 0,067
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀		0,10	312 ± 35	40,0 ± 1,8	0,682 ± 0,146
		0,25	328 ± 08	39,6 ± 1,4	0,601 ± 0,098
		0,50	374 ± 12	44,8 ± 7,4	0,688 ± 0,095
		1,00	490 ± 25	44,4 ± 3,2	0,662 ± 0,134
QPTMA ₄₀ DDA ₅	7,4	0,10	232 ± 5	15,7 ± 0,8	0,575 ± 0,088
		0,25	244 ± 48	16,8 ± 2,0	0,628 ± 0,152
		0,50	302 ± 63	21,0 ± 1,4	0,712 ± 0,226
		1,00	445 ± 19	33,8 ± 1,6	0,772 ± 0,069
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀		0,10	247 ± 08	15,5 ± 0,3	0,514 ± 0,018
		0,25	258 ± 03	14,1 ± 1,2	0,605 ± 0,034
		0,50	267 ± 14	19,9 ± 1,4	0,650 ± 0,151
		1,00	410 ± 34	32,1 ± 0,8	0,775 ± 0,145
QDEAE ₄₀ DDA ₅	5,0	0,10	168 ± 14	24,1 ± 1,2	0,678 ± 0,053
		0,25	200 ± 8	27,6 ± 1,7	0,719 ± 0,025
		0,50	316 ± 13	32,1 ± 1,6	0,594 ± 0,039
		1,00	671 ± 13	46,3 ± 1,1	0,782 ± 0,056
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀		0,10	292 ± 25	13,4 ± 3,1	0,402 ± 0,123
		0,25	251 ± 13	17,4 ± 1,5	0,409 ± 0,109
		0,50	186 ± 2	21,2 ± 2,5	0,429 ± 0,078
		1,00	209 ± 8	21,9 ± 0,1	0,396 ± 0,076
QDEAE ₄₀ DDA ₅	7,4	0,10	258 ± 51	28,1 ± 0,7	0,608 ± 0,108
		0,25	183 ± 23	30,5 ± 0,7	0,661 ± 0,073
		0,50	213 ± 10	33,4 ± 1,4	0,714 ± 0,083
		1,00	411 ± 35	47,8 ± 1,5	0,627 ± 0,027
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀		0,10	231 ± 44	11,2 ± 0,2	0,429 ± 0,043
		0,25	465 ± 52	0,4 ± 1,2	0,406 ± 0,066
		0,50	313 ± 21	12,5 ± 1,1	0,418 ± 0,019
		1,00	289 ± 87	23,5 ± 3,7	0,482 ± 0,058
QGLY ₄₀ DDA ₅	5,0	0,10	232 ± 2	14,1 ± 1,5	0,497 ± 0,117
		0,25	293 ± 27	15,6 ± 0,7	0,401 ± 0,009
		0,50	218 ± 12	17,8 ± 0,6	0,495 ± 0,105
		1,00	267 ± 43	14,5 ± 0,6	0,429 ± 0,091
QGLY ₄₀ DDA ₃₀		0,10	147 ± 2	20,6 ± 0,2	0,366 ± 0,018
		0,25	148 ± 1	24,2 ± 0,4	0,380 ± 0,006
		0,50	146,1 ± 1	28,8 ± 1,9	0,298 ± 0,006
		1,00	158 ± 1	29,9 ± 1,7	0,287 ± 0,014

Tabela 6: Diâmetro, potencial zeta e polidispersividade das nanopartículas formadas pelos derivados de quitosana em pH 5,0 e 7,4

Continuação

Amostra	pH	Concentração (g L ⁻¹)	Diâmetro (nm)	Zeta (mV)	PDI
QGLY ₄₀ DDA ₅	7,4	0,10	402 ± 1	18,7 ± 1,9	0,451 ± 0,007
		0,25	250 ± 4	23,4 ± 1,4	0,587 ± 0,137
		0,50	232 ± 8	28,8 ± 3,2	0,781 ± 0,165
		1,00	257 ± 14	24,4 ± 0,4	0,644 ± 0,081
QGLY ₄₀ DDA ₃₀		0,10	139 ± 1	22,6 ± 0,8	0,284 ± 0,005
		0,25	137 ± 1	27,7 ± 0,7	0,279 ± 0,006
		0,50	143 ± 1	27,8 ± 0,9	0,278 ± 0,001
		1,00	151 ± 0	30,4 ± 0,3	0,292 ± 0,005

*Média ± Desvio Padrão (n = 3)

Os valores de potencial zeta demonstram a presença de cargas positivas na superfície dos agregados e sua estabilidade em meio aquoso (BOSSIO et al., 2014). Estudos na literatura (HONARY; ZAHIR, 2013) indicam que as cargas positivas conferem o aumento da biocompatibilidade aos agregados, permitindo sua aplicação em sistemas biológicos.

De acordo com o observado na Figura 37, o tamanho dos agregados apresenta dependência com a concentração. Esse comportamento indica que há mais cadeias do polímero interagindo entre si em concentrações mais elevadas, formando assim agregados maiores. É interessante observar que a amostra QGLY₄₀DDA₃₀ não apresentou variação do tamanho em função do aumento da concentração.

O pH exerce papel fundamental no diâmetro dos agregados. É possível observar que as amostras QPTMA₄₀DDA₅ e QPTMA₄₀DDA₃₀ (Figura 37a) formam agregados maiores quando em solução aquosa de pH 5,0 quando comparadas com pH 7,4. Esse comportamento pode ser explicado pela protonação dos grupos amina ($pK_a \sim 6,4$) livres que ocorre em pHs abaixo de 6,2 – 6,4, isso porque, além do aumento do impedimento estérico, esses hidrogênios adicionais na estrutura da quitosana participam de ligações de hidrogênio com moléculas de água, promovendo um distanciamento entre as cadeias do polímero. Essa variação do diâmetro médio das partículas em função do pH do meio é de grande importância para aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos. A mudança do pH do meio influencia diretamente no tamanho dos agregados, o que facilita a difusão do fármaco a partir de agregados maiores, permitindo o controle da liberação das moléculas aprisionadas no interior do nanotransportador.

Em meio fisiológico (pH 7,4) os agregados possuem menores dimensões, facilitando a circulação no organismo. Ao atingir os tecidos tumorais (pH 5,0), a protonação dos grupos amina e as interações com moléculas de água proporcionam o aumento do espaço entre as cadeias do polímero, facilitando a difusão do fármaco para a região alvo.

É interessante notar que o derivado QDEAE₄₀DDA₅ segue a tendência de formar agregados maiores em pH 5,0 enquanto que a amostra QDEAE₄₀DDA₃₀ apresenta comportamento inverso. A Figura 37c sugere que o derivado QGLY₄₀DDA₅ forma agregados maiores do que a amostra QGLY₄₀DDA₃₀ em ambos pHs.

Os valores de diâmetro médio obtidos por DLS estão de acordo com trabalhos da literatura. Aydin e Pulat (2012) utilizaram quitosana e TPP para preparação de partículas com diâmetros variando entre 150 e 300 nm. Doxorubicina foi encapsulada em nanopartículas de aproximadamente 200 nm formadas por derivados quaternários de quitosana (SOARES et al., 2016). Nanocápsulas coloidais, com um núcleo oleoso e recobertas com quitosana foram utilizadas para encapsular capsaicina (KAISER et al., 2015). Os resultados de DLS revelaram diâmetros variando entre 160 e 300 nm. Micelas formadas por quitosana modificada com fosforilcolina apresentaram diâmetro médio de 300 nm (WU, M. et al., 2014).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o comportamento de formação e diâmetro das nanopartículas depende do grupo hidrofílico presente na amostra, evidenciando que cada derivado possui características próprias.

Figura 37: Diâmetro hidrodinâmico médio em função da concentração em pHs 5,0 e 7,4 para os derivados a) QPTMA₄₀DDA₅ e QPTMA₄₀DDA₃₀, b) QDEAE₄₀DDA₅ e QDEAE₄₀DDA₃₀ e c) QGLY₄₀DDA₅ e QGLY₄₀DDA₃₀.

4.9 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia das partículas formadas pelos derivados anfifílicos de quitosana foi investigada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Como pode ser observado na Figura 38 as partículas apresentaram morfologia esférica com uma faixa estreita de distribuição de tamanhos. É interessante ressaltar que, embora a formação das partículas se baseie na associação de várias cadeias poliméricas com a geração de um núcleo hidrofóbico, não foi observada agregação severa entre as partículas.

Conforme esperado, o tamanho médio dos agregados observado pela microscopia foi menor do que o medido por DLS. Esse comportamento se deve ao fato de que as medidas de DLS envolvem o estudo das partículas em solução, portanto hidratadas. Por outro lado, as amostras são totalmente secas antes da realização da microscopia, permitindo assim a observação das partículas sem a influência das moléculas de água. Os diâmetros médios observados para as seis amostras estão em acordo com os resultados de DLS. É interessante observar que os agregados formados pelas amostras contendo o grupo hidrofílico GLY apresentaram os menores diâmetros, sugerindo que esse grupo possibilita a formação de estruturas mais condensadas, conforme observado previamente por DLS.

Figura 38: Microscopia eletrônica de transmissão para as amostras a) QPTMA₄₀DDA₅, b) QPTMA₄₀DDA₃₀, c) QDEAE₄₀DDA₅, d) QDEAE₄₀DDA₃₀, e) QGLY₄₀DDA₅ e f) QGLY₄₀DDA₃₀.

4.10 Estudo da interação de fármacos com os agregados de quitosana

4.10.1 Determinação da incorporação de quercetina utilizando a Espectroscopia UV-Vis

A incorporação do fármaco modelo quercetina nas partículas formadas pelos derivados anfifílicos de quitosana foi realizada como descrito no item 3.7. Alguns dos espectros de absorção da quercetina nas soluções tamponantes de pH 5,0 e 7,4 estão exibidos na Figura 39. As diferenças das intensidades nas bandas de absorção na região de 200 – 300 nm se deve a protonação/desprotonação dos grupos hidroxila da quercetina ocorrida nos diferentes pHs. A intensidade das bandas em 366 e 376 nm foi utilizada para quantificação do fármaco livre na solução de pH 5,0 e 7,4, respectivamente. Os valores de eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (CC), calculados utilizando as Equações 3 e 4 respectivamente, estão mostrados na Tabela 7.

Figura 39: Espectros de absorção da quercetina em soluções tamponantes de pH a) 5,0 e b) 7,4.

Os resultados de incorporação do fármaco mostram que o aumento do conteúdo hidrofóbico em geral tende a aumentar a quantidade de quercetina encapsulada pelos agregados, exceto para as amostras modificadas com o grupo GLY. Esse comportamento indica que a presença de mais cadeias hidrofóbicas na estrutura polimérica possibilita a interação de mais moléculas do fármaco, sugerindo que o processo de encapsulamento é regulado pelo grau de

substituição dos grupos DDA. A capacidade de carregamento, no entanto, apresenta comportamento inverso, sendo maior para os derivados menos hidrofóbicos.

Tabela 7: Determinação da eficiência de encapsulamento (EE) e capacidade de carregamento (CC) da quercetina para os agregados formados pelos derivados anfifílicos de quitosana em pHs 5,0 e 7,4

Polímero	pH	EE (%) (n = 3)		CC (%) (n = 3)	
		Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
QPTMA ₄₀ DDA ₅	5,0	71,4	7,5	5,1	0,6
	7,4	17,9	1,2	1,7	0,1
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	5,0	82,7	8,2	4,6	0,3
	7,4	21,5	1,9	1,4	0,2
QDAE ₄₀ DDA ₅	5,0	72,4	1,6	5,2	0,7
	7,4	14,4	0,9	1,3	0,2
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	5,0	77,7	6,1	4,3	0,5
	7,4	15,3	1,9	0,8	0,1
QGLY ₄₀ DDA ₅	5,0	82,6	7,6	5,2	0,6
	7,4	26,5	1,5	1,1	0,2
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	5,0	78,1	6,5	5,3	0,6
	7,4	24,0	1,7	1,4	0,2

É interessante observar também a influência do pH na eficiência de encapsulamento. Devido a protonação dos grupos amina da quitosana em pH 5,0, mais moléculas de água participam da formação de ligações hidrogênio com o polímero, possibilitando assim a formação de agregados maiores, o que facilita a interação do fármaco com o interior das partículas. A repulsão eletrostática entre as cargas positivas das unidades protonadas também contribui para o aumento do diâmetro dos agregados. Por outro lado, com a desprotonação do polímero em pH 7,4, há a formação de agregados com núcleos mais condensados, restringindo o acesso do fármaco às cadeias hidrofóbicas do polímero. Esse comportamento foi observado por (XIONG et al., 2016), estudando nanopartículas de quitosana contendo auricularia auricular, uma substância natural, bioativa e com diversas aplicações biológicas.

De modo geral os resultados de EE indicam o potencial dos sistemas desenvolvidos nesse trabalho. Estudos na literatura indicam que carregadores formados por derivados de quitosana tendem a apresentar baixa eficiência de encapsulamento devido as limitadas

interações entre polímero e fármaco proporcionadas por esses sistemas. Shi et al. (2014) obtiveram valores de EE de doxorubicina na ordem de 30% utilizando derivados de quitosana modificada com ácido cólico e polietilenoglicol. O encapsulamento da 5-Fluorouracila por nanopartículas de quitosana foi estudado por Aydin e Pulat (2012) e o intervalo de eficiência de encapsulamento variou entre 30 e 69%. Zhang, J. et al. (2013) trabalhando com derivados anfifílicos de quitosana para liberação controlada de pesticidas obteve EE variando entre 30 – 60%. Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que os derivados de quitosana utilizados possuem capacidade superior de encapsulamento.

Esses resultados indicam que é possível controlar a EE com variações do pH do meio ou ainda por diferentes graus de substituição com o grupo DDA. Isso permite obter dosagens adequadas do fármaco nas formulações, melhorando as condições de aplicação e comprovando o potencial desses sistemas para aplicações biológicas.

4.10.2 Determinação da influência do fármaco no tamanho e potencial Zeta dos agregados

As medidas de espalhamento dinâmico de luz possibilitaram a determinação dos valores de tamanho médio dos agregados formados pelos derivados anfifílicos de quitosana carregados com o fármaco quercetina. As medidas de tamanho das partículas vazias, na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ e pH 5,0, discutidas no item 4.8 foram utilizadas para comparação entre os tamanhos dos agregados vazios e carregados medidos nas mesmas condições ($0,1 \text{ g L}^{-1}$ e pH 5,0). Os resultados estão dispostos na Tabela 8.

Os resultados indicam que a incorporação do fármaco promove o aumento do diâmetro médio dos agregados. Como observado anteriormente, os derivados mais hidrofóbicos apresentam tendência a formar agregados com maiores diâmetros devido à maior presença de cadeias hidrofóbicas no núcleo disponíveis para interação com o fármaco. Além disso, segundo os experimentos de eficiência de encapsulamento, o aumento do conteúdo hidrofóbico proporciona aumento na quantidade de fármaco incorporada pelo núcleo desses agregados. Esses dois fenômenos contribuem para o aumento do tamanho médios das partículas.

Tabela 8: Diâmetro médio, potencial zeta e polidispersividade dos agregados anfifílicos de quitosana vazios e carregados com quercetina

Polímero	Nanoagregado	Diâmetro* (nm)	Zeta* (mV)	PDI*
QPTMA ₄₀ DDA ₅	Vazio	235 ± 22	16,7 ± 1,7	0,488 ± 0,093
	Carregado	490 ± 18	11,5 ± 1,4	0,563 ± 0,083
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	Vazio	312 ± 35	40,0 ± 1,8	0,682 ± 0,146
	Carregado	502 ± 33	38,4 ± 1,2	0,812 ± 0,062
QDEAE ₄₀ DDA ₅	Vazio	168 ± 14	24,1 ± 1,1	0,678 ± 0,053
	Carregado	410 ± 36	16,2 ± 1,4	0,562 ± 0,042
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	Vazio	292 ± 25	13,4 ± 3,1	0,402 ± 0,123
	Carregado	405 ± 30	16,3 ± 1,5	0,582 ± 0,195
QGLY ₄₀ DDA ₅	Vazio	232 ± 02	14,1 ± 1,5	0,497 ± 0,117
	Carregado	352 ± 09	10,4 ± 1,6	0,571 ± 0,134
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	Vazio	147 ± 02	20,6 ± 0,1	0,366 ± 0,018
	Carregado	314 ± 58	19,3 ± 0,5	0,492 ± 0,099

*Média ± Desvio Padrão ($n = 3$)

É possível observar na Tabela 8 que os valores de PDI variam de 0,366 a 0,682 e 0,492 a 0,812 para os nanoagregados vazios e carregados, respectivamente. Esses resultados evidenciam o aumento da polidispersividade das partículas com a incorporação do fármaco, indicando maior variação na distribuição de tamanhos. É importante ressaltar a tendência de redução do potencial zeta dos agregados contendo quercetina.

A evolução do tamanho dos agregados carregados com quercetina *versus* tempo foi investigada utilizando DLS e os resultados estão dispostos na Figura 40. As nanopartículas foram dispersas no meio de cultura celular RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino. O tamanho das nanopartículas foi medido em intervalos predeterminados.

Figura 40: Estabilidade dos nanoagregados carregados com quercetina em meio de cultura celular RPMI 1640 ao longo de 24 horas.

É possível notar que as amostras apresentam uma ligeira agregação nos primeiros 30 minutos, permanecendo com tamanho relativamente constante ao longo das 24 horas. Isso demonstra que os nanoagregados formados apresentam importante estabilidade em meio fisiológico, sendo esse comportamento fundamental para os estudos envolvendo cultura celular.

4.10.3 Liberação do fármaco *in vitro*.

Os estudos de liberação da quercetina (Figura 41) foram realizados em solução tamponante de pH 5,0 e 7,4. Esses pHs foram escolhidos para simular o pH fisiológico (7,4) e o pH do tecido tumoral (5,0), já que o metabolismo da célula cancerígena altera a concentração de íons H^+ na microrregião do tumor, deixando o pH mais ácido (STUART et al., 2010; TANNOCK; ROTIN, 1989). Adicionalmente, locais de pH ácido também podem ser encontrados em endossomos e lisossomos, no interior de células de tumorais (AYDIN; PULAT, 2012).

Figura 41: Liberação acumulada *in vitro* de quercetina ao longo de 96 horas.

É possível observar na Figura 41 que o processo de liberação varia conforme o pH, sendo muito mais pronunciado em pH 5,0. A protonação dos grupos amina da quitosana em pH 5,0 permite a formação de ligações hidrogênio com moléculas de água. Isso faz com que exista mais espaço entre as cadeias poliméricas que formam os agregados, o que facilita a difusão do fármaco para o meio externo. Além disso, a repulsão eletrostática entre as cargas positivas contribui para o maior espaçamento entre as cadeias. Por outro lado, os agregados estão mais

condensados em pH 7,4 devido a inexistência da protonação, o que restringe o processo de difusão. Esse comportamento é ideal do ponto de vista de aplicação, uma vez que a liberação deve ocorrer minimamente em pH fisiológico, atingindo valores máximos na região do tecido tumoral cujo pH é mais ácido.

É importante observar que o grau de hidrofobicidade dos polímeros influencia levemente no processo de liberação. Os derivados menos hidrofóbicos atingiram valores ligeiramente superiores na liberação acumulada quando comparados com os derivados mais hidrofóbicos em ambos pHs. Esses resultados estão de acordo com o observado nos experimentos de eficiência de encapsulamento e tamanho, indicando que a o aumento no número de cadeias hidrofóbicas presentes na estrutura da quitosana proporciona a formação de agregados mais densos e com interações mais fortes com o fármaco, o que dificulta a liberação. Os experimentos de liberação evidenciam ainda que esse processo ocorre em duas etapas. Durante as primeiras horas, a liberação ocorre de forma abrupta num fenômeno conhecido por “*burst release*”. Na etapa seguinte a liberação se dá de forma sustentada ao longo do tempo.

Korsmeyer et al. (1983) desenvolveram uma equação matemática simplificada (Equação 10) que descreve o mecanismo de liberação de fármacos a partir de sistemas poliméricos esféricos. Esse modelo é conhecido como Modelo de Korsmeyer-Peppas.

$$\frac{M_t}{M_T} = kt^n \quad (\text{Equação 10})$$

Nessa equação M_t é a massa de fármaco liberada no tempo t , M_T é a massa total a ser liberada, k é uma constante que depende da característica estrutural e da interação dos agregados com o solvente e n indica o tipo de difusão pela qual ocorre a liberação.

A difusão do solvente para o interior dos agregados é influenciada pelas propriedades físico-químicas da quitosana e pela interação solvente-polímero. A difusão Fickiana (ou Caso I) ocorre devido à diferença de concentração entre a matriz e o meio de dissolução. A diferença entre os outros tipos de difusão (Transporte Anômalo, Transporte Caso II e Transporte Supercaso II) é dada pelas contribuições relativas entre a velocidade de difusão do solvente (V_{DS}) e o relaxamento do polímero (R_P). Estas velocidades são da mesma ordem de magnitude no Transporte Anômalo ($V_{DS} = R_P$). No Transporte Caso II, as cadeias poliméricas não permitem uma penetração rápida do solvente para o interior da matriz polimérica, sendo a velocidade de difusão do solvente maior que o relaxamento do polímero ($V_{DS} > R_P$). A velocidade de penetração do solvente é muito maior no Transporte Supercaso II ($V_{DS} \gg R_P$).

devido ao intenso relaxamento do polímero, sendo esse o fator determinante da difusão (CARBINATTO, 2010).

Segundo o modelo de Korsmeyer-Peppas, o coeficiente n que indica o tipo de difusão predominante, pode ser dividido como segue:

- $n \leq 0,43$ - Fickiana
- $0,43 < n < 0,85$ - Transporte Anômalo
- $n = 0,85$ - Transporte Caso II
- $n > 0,85$ - Transporte Supercaso II

Para obtenção da constante n , o modelo de Korsmeyer-Peppas deve ser aplicado na porção da curva de liberação em que $Mt/M_\infty < 0,6$. A Figura 42 exemplifica a aplicação desse modelo à curva de liberação para os agregados formados pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅ em pH 5,0. Os resultados de n , k e R^2 bem como o tipo de liberação para todos os derivados estão mostrados na Tabela 9.

Figura 42: Modelo de Korsmeyer-Peppas aplicado à curva de liberação para os agregados formados pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅ em pH 5,0

Observando os dados da Tabela 9 é possível observar que o modelo de Korsmeyer-Peppas se ajusta melhor para os derivados em pH 5,0 (R^2 mais próximo a 1). Isso acontece porque em pH 7,4 a liberação é substancialmente menor, o que limita a aplicação do modelo matemático. Os resultados evidenciam ainda que o mecanismo de liberação depende do

diferente tipo de derivado quitosana (QPTMA vs. QDEAE vs. QGLY). O pH exerce influência no mecanismo de liberação dos derivados do tipo QPTMA, isso porque em pH 5,0 tanto a amostra menos hidrofóbica (QPTMA₄₀DDA₅) quanto a mais hidrofóbica (QPTMA₄₀DDA₃₀) apresentam o mesmo comportamento, sendo o mecanismo de liberação do tipo Transporte Anômalo. Já em pH 7,4 a difusão Fickiana predomina em ambos.

Tabela 9: Valores de k , n , R^2 e mecanismos de liberação de fármaco dos agregados em pH 5,0 e 7,4

Derivado	pH	$k \pm \text{desvio}$	$n \pm \text{desvio}$	R^2	Tipo de liberação
QPTMA ₄₀ DDA ₅	5,0	$9,3 \pm 1,6$	$0,51 \pm 0,11$	0,9914	Transporte Anômalo
	7,4	$4,1 \pm 1,3$	$0,32 \pm 0,22$	0,9035	Fickiana
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	5,0	$15,8 \pm 1,7$	$0,47 \pm 0,08$	0,9618	Transporte Anômalo
	7,4	$4,5 \pm 1,4$	$0,32 \pm 0,02$	0,8529	Fickiana
QDEAE ₄₀ DDA ₅	5,0	$7,3 \pm 1,2$	$0,41 \pm 0,11$	0,9768	Fickiana
	7,4	$3,7 \pm 1,3$	$0,26 \pm 0,25$	0,8935	Fickiana
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	5,0	$16,2 \pm 1,3$	$0,26 \pm 0,06$	0,9620	Fickiana
	7,4	$4,9 \pm 0,5$	$0,22 \pm 0,03$	0,8642	Fickiana
QGLY ₄₀ DDA ₅	5,0	$20,7 \pm 2,2$	$0,44 \pm 0,00$	0,9717	Transporte Anômalo
	7,4	$6,3 \pm 1,6$	$0,84 \pm 0,17$	0,9144	Transporte Anômalo
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	5,0	$25,4 \pm 1,5$	$0,31 \pm 0,04$	0,9835	Fickiana
	7,4	$13,3 \pm 1,5$	$0,23 \pm 0,08$	0,9027	Fickiana

O mecanismo de liberação para os derivados do tipo QDEAE independe do pH ou do grau de hidrofobicidade, sendo todos os casos do tipo Fickiano. Por outro lado, os derivados do tipo QGLY apresentam mecanismo de liberação dependente do grau de hidrofobicidade. O Transporte Anômalo é dominante para o derivado QGLY₄₀DDA₅ em ambos pHs enquanto que amostra QGLY₄₀DDA₃₀ apresenta liberação Fickiana nos dois pHs. Fica evidente, portanto, que cada tipo de derivado apresenta comportamento específico em relação ao mecanismo de liberação, podendo ser dependente do pH, grau de hidrofobicidade ou tipo de grupo hidrofílico ligado a estrutura da quitosana.

4.11 Citotoxicidade das nanopartículas pelo ensaio de MTT

Para fins de aplicação dos nanoagregados como carreadores de fármacos é necessário o conhecimento do potencial citotóxico desses compostos, uma vez que os transportadores devem

apresentar o mínimo possível de interações com os sistemas biológicos. A baixa interferência no metabolismo celular é de fundamental importância para os sistemas carreadores de fármacos, já que os efeitos biológicos devem proceder tão somente do agente terapêutico utilizado. Carreadores com biocompatibilidade elevada, ou inertes, proporcionam menores chances de interferir no metabolismo de tecidos saudáveis, apresentando assim menos efeitos colaterais.

Para tanto, foi utilizado o ensaio de MTT na avaliação da viabilidade celular dos agregados vazios formados pelos derivados anfifílicos de quitosana. Este ensaio baseia-se na medida do dano induzido pelo composto em estudo no metabolismo celular, por meio da avaliação da atividade mitocondrial. As células viáveis e com metabolismo ativo são capazes de reduzir o MTT (sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água) (RISS et al., 2004). O mecanismo celular exato da redução do MTT a formazan ainda não é bem compreendido, mas a reação provavelmente envolve a transferência de elétrons de NADH para a molécula de MTT de acordo com o mecanismo exibido na Figura 43 (BERRIDGE; TAN, 1993).

Figura 43: Estruturas do sal MTT e do produto colorido formazan.

Adaptado de (RISS et al., 2004).

Dessa forma, a redução do MTT a formazan é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e à viabilidade celular. A Figura 44 exibe os resultados dos ensaios de viabilidade celular (24 horas de incubação) para os agregados vazios utilizando células de adenocarcinoma de mama (MCF-7). O controle foi realizado por células não tratadas. Os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o software GraphPad Prism 6®.

Figura 44: Ensaios de viabilidade celular (24 horas de incubação) para os agregados vazios utilizando células MCF-7.

*Viabilidade relativa ao controle negativo (somente células e meio de cultura). **Concentração do polímero relativa aquela utilizada nos agregados carregados com fármaco (Vide Figura 45). Valores médios $\pm$ desvio padrão ($n = 24$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

É importante observar que a quitosana comercial (QC) apresentou citotoxicidade dose-dependente. Estudos na literatura sugerem que a toxicidade desse polímero depende de propriedade físico-químicas como massa molecular, grau de acetilação e linhagem celular testada (HUANG, M.; KHOR; LIM, 2004; MAO, S. et al., 2004).

Os derivados vazios, exceto QDEAE₄₀DDA₅, apresentam viabilidade celular acima de 80% em todas as concentrações. Isso sugere que esses polímeros não interferem significativamente no metabolismo das células MCF-7, indicando potencial para aplicação farmacêutica. É válido notar ainda que as amostras, exceto QDEAE₄₀DDA₅, apresentaram maior viabilidade celular do que a quitosana comercial mesmo nas concentrações de 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, evidenciando a biocompatibilidade desses polímeros anfifílicos.

A capacidade e efetividade de liberação da quercetina a partir dos nanoagregados carregados também foi testada contra células MCF-7 utilizando o ensaio de MTT. Os resultados estão mostrados na Figura 45. O objetivo desse experimento foi comparar a redução da viabilidade celular proporcionada pela quercetina livre e encapsulada. A série QPTMA

apresentou diferenças significativas na inibição do metabolismo das células MCF-7 quando comparada ao fármaco livre na concentração de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$. O mesmo comportamento foi observado pela série QGLY. O efeito foi similar ao fármaco livre nas demais concentrações. É válido ressaltar que os ensaios de viabilidade celular foram realizados durante 24 h. Comparando esse período com a cinética de liberação (Figura 41) é possível observar que apenas uma fração de quercetina é liberada após esse intervalo de tempo, sendo essa concentração responsável por apresentar resultados semelhantes ao fármaco livre. Esses resultados indicam a potencialização do efeito terapêutico, dado que uma menor concentração foi necessária para reduzir a viabilidade celular a níveis semelhantes à quercetina livre. Desse modo, provavelmente a utilização desse sistema por períodos mais longos deve proporcionar resultados ainda mais promissores devido à maior quantidade de quercetina que estará disponível para as células.

Comparando o grau de hidrofobicidade entre os agregados da série QPTMA é possível observar que a formulação mais hidrofóbica contendo fármaco ($\text{QPTMA}_{40}\text{DDA}_{30} + \text{QCT}$) foi menos eficiente na redução da viabilidade celular do que a formulação menos hidrofóbica ($\text{QPTMA}_{40}\text{DD}_5 + \text{QCT}$). Isso se deve ao fato de que o núcleo desse derivado contém mais cadeias apolares, permitindo assim uma interação mais forte com o fármaco, o que dificulta a liberação e restringe o efeito terapêutico. Esse comportamento está em concordância com o que foi observado nos experimentos de liberação (Figura 41). Os derivados da série QGLY apresentaram comportamento semelhante.

A série QDEAE foi capaz de reduzir a viabilidade celular mais eficientemente do que o fármaco livre, principalmente em concentrações acima $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, mesmo com apenas 24 h de incubação. Esses resultados sugerem que os agregados formados pelos polímeros da série QDEAE podem potencializar significativamente a atividade do fármaco. É interessante observar que nas concentrações de $0,1$; 5 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ a formulação $\text{QDEAE}_{40}\text{DDA}_{30} + \text{QCT}$ foi mais efetiva na redução da viabilidade celular. Já a formulação $\text{QDEAE}_{40}\text{DDA}_5 + \text{QCT}$ apresentou significativa diminuição dos índices de viabilidade nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essa série foi a mais eficiente no controle das células tumorais MCF-7, sugerindo potencial para aplicações farmacêuticas.

Figura 45: Ensaios de viabilidade celular (24 horas) para os agregados carregados com quercetina (QCT) utilizando células MCF-7.

*Viabilidade relativa ao controle negativo (somente células e meio de cultura). Valores médios $\pm$ desvio padrão ($n = 3$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

De modo geral, os resultados de MTT para as formulações contendo quercetina estão de acordo com o observado na literatura. Duo et al., 2012 mostraram que a quercetina atua diminuindo a proliferação e aumentando a apoptose de células MCF-7. Os resultados revelaram ainda que o tempo de incubação das células com quercetina está diretamente relacionado com os efeitos citotóxicos. Estudos recentes comprovaram a biodisponibilidade e efetividade da quercetina no combate a células MCF-7 (SARKAR et al., 2016).

Os resultados de viabilidade celular evidenciam que a quercetina mantém suas propriedades de inibição do metabolismo celular mesmo após o encapsulamento pelos derivados de quitosana. É interessante notar ainda que os carreadores vazios não apresentaram toxicidade significativa contra as células. O comportamento das nanopartículas e a efetividade da quercetina sugerem que os sistemas desenvolvidos nesse trabalho podem ser explorados no tratamento de tecidos tumorais.

4.12 Ensaios de internalização celular das nanopartículas

É possível utilizar a microscopia confocal de varredura a laser para visualizar estruturas celulares e as interações das nanopartículas com as células. Para tanto, a marcação das nanopartículas de quitosana com fluoróforos é necessária para adequada visualização na microscopia. As estratégias mais comuns de coração de partículas de quitosana apresentam desvantagens significativas. Nanopartículas de quitosana podem ser carregadas com albumina de soro bovino marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-BSA), porém não é possível distinguir as partículas marcadas do corante livre. Isso porque, a albumina pode interagir consigo mesma e com células humanas (FREI, 2011), além de ser susceptível a mudanças do meio externo, como a força iônica (MORENO-VILLOSLADA et al., 2010). Moléculas fluorescentes como a rodamina B também podem ser conjugadas às partículas de quitosana. No entanto, isso pode causar aumento da hidrofobicidade do polímero e alterar a permeabilidade celular, conferindo assim resultados imprecisos de internalização pelas células (FERNANDEZ-SUAREZ; TING, 2008; YUE et al., 2011).

Nesse sentido, a utilização de proteínas fluorescentes tem se tornando uma importante ferramenta não-destrutiva e não-invasiva para investigação de fluoróforos em células vivas (CHU et al., 2016; WAGH; QIAN; LAW, 2012). Como prova de conceito, a proteína verde fluorescente com afinidade por quitosana (CAP-sfGFP) foi utilizada nesse trabalho como marcador específico da superfície das nanopartículas formadas pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅. É interessante lembrar, no entanto, que essa proteína apresenta especificidade por quitosanas sem modificações químicas na sua estrutura polimérica. Assim sendo, a preocupação inicial foi garantir a adequada interação nanopartícula-proteína. Além disso, moléculas complexas presentes no meio de cultura utilizado para incubação celular podem facilitar a agregação das partículas, sendo necessário o acompanhamento da evolução do diâmetro médio das nanopartículas marcadas com CAP-sfGFP.

Os resultados da eficiência de associação de CAP-sfGFP às partículas formadas pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅ estão mostrados na Tabela 10. É possível observar que a eficiência de associação aumenta proporcionalmente com a concentração inicial de CAP-sfGFP. A determinação da evolução do diâmetro médio ao longo do tempo para as nanopartículas marcadas foi realizada apenas para as concentrações de 0,1 e 0,15 mmol L⁻¹ devido à baixa associação na concentração de 0,05 mmol L⁻¹.

Tabela 10: Eficiência de associação de CAP-sfGFP às partículas formadas pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅

Concentração de CAP-sfGFP (mmol L ⁻¹)	Eficiência de associação (%)
0,05	16,1 ± 0,3
0,10	25,4 ± 1,7
0,15	29,2 ± 2,5

A Figura 46 mostra a evolução do diâmetro médio e PDI das nanopartículas recobertas com CAP-sfGFP em meio de cultura celular ao longo de 180 minutos. É possível observar a tendência de agregação proporcionada pela presença de moléculas complexas no meio de cultura (proteínas, carboidratos, sais e outros) enquanto que os valores de PDI não apresentaram grandes variações. Os resultados mostram ainda, conforme esperado, que a concentração 0,10 mmol L⁻¹ de CAP-sfGFP proporciona menor variação do diâmetro médio dos agregados. Essa concentração foi então utilizada nos experimentos de microscopia confocal de varredura a laser.

Figura 46: Evolução do diâmetro médio e PDI das partículas marcadas com CAP-sfGFP ao longo do tempo.

Para facilitar a visualização da localização das partículas, a membrana e o núcleo celular foram corados em laranja e vermelho, respectivamente (Figura 47). As Figura 47a e 46c exibem

a separação espectral dos fluoróforos (vermelho, verde e laranja) e a sobreposição dos canais para as células incubadas com proteína livre e partículas recobertas com CAP-sfGFP, respectivamente. A separação espectral permite observar inequivocamente que a fluorescência observada em cada canal é específica do fluoróforo escolhido.

Figura 47: Microscopia confocal de varredura à laser de células MCF-7. a) Separação espectral dos fluoróforos para células incubadas com CAP-sfGFP livre. b) Sobreposição dos canais para células incubadas com proteína CAP-sfGFP livre. c) Separação espectral dos fluoróforos para células incubadas com nanopartículas recobertas com CAP-sfGFP. d) Sobreposição dos canais para células incubadas com nanopartículas recobertas com CAP-sfGFP.

A Figura 47b mostra em detalhes a sobreposição dos canais para as células incubadas com CAP-sfGFP livre. Fica evidente que a proteína fluorescente não possui afinidade pelas estruturas celulares, estando ausente quando não há quitosana. Por outro lado, é possível observar a presença de nanopartículas recobertas com CAP-sfGFP na Figura 47d, sendo, portanto, seguro afirmar que esse fluoróforo se apresenta especificamente associado à quitosana, na forma nanopartícula-CAP-sfGFP.

A técnica de aquisição de imagens do tipo Z-Stack (várias camadas de diferentes profundidades que permitem observar a seção transversal das células) foi utilizada para avaliação da interação das nanopartículas com as células. É possível observar na Figura 48b que os nanoagregados marcados com a proteína CAP-sfGFP acumularam-se na superfície celular (setas vermelhas) e alguns foram internalizados (setas brancas) durante o período de incubação.

Figura 48: a) Imagem de microscopia confocal de varredura à laser das células MCF-7 tratadas com nanoagregados formados pelo derivado QPTMA₄₀DDA₅. b) Seção transversal das células indicando a localização dos nanoagregados.

É interessante ressaltar que as imagens foram adquiridas após incubação, fixação e lavagem das células, removendo assim as partículas que não estavam interagindo com as estruturas celulares. Fica evidente, portanto, a interação efetiva dos nanoagregados com a superfície celular, além das internalizações observadas. A interação física direta entre as nanopartículas e a superfície celular provavelmente resulta num aumento significativo de fármaco liberado no microambiente extracelular, o que permite a potencialização do efeito terapêutico. Além disso, a internalização dos nanoagregados permite a liberação do fármaco diretamente no meio intracelular.

4.13 Ensaios de hemocompatibilidade pela atividade hemolítica

Hemólise é a ruptura ou lise prematura das células vermelhas (também conhecido por eritrócitos ou hemácias) do sangue por rompimento da membrana plasmática, resultando na liberação da hemoglobina. A hemólise pode ocorrer *in vivo* devido a traumas físicos, deficiências enzimáticas, anemia, toxinas, doenças autoimunes, infecções e outros. Pode ocorrer ainda devido à baixa produção ou falta de substâncias necessárias para a síntese de hemoglobina.

A hemoglobina é uma metaloproteína que contém ferro e que permite o transporte de oxigênio pelo sistema circulatório. Quatro subunidades, formadas por uma porção proteica (globina) e um grupo prostético (heme), unidas por ligações não covalentes, formam a hemoglobina. Embora existam diferentes tipos de globinas (α , β , γ , δ , ϵ), são encontradas duas globinas alfa e duas não alfa na estrutura da hemoglobina. A porção heme, no entanto, é um derivado porfirínico com ferro.

A oxi-hemoglobina, formada quando o oxigênio se liga ao ferro da hemoglobina, pode transportar quatro moléculas desse gás. Nos tecidos, essa combinação é revertida e o oxigênio é disponibilizado para as células. Além de possibilitar o transporte do oxigênio, a hemoglobina também atua na remoção do dióxido de carbono, garantindo o equilíbrio ácido-base do sangue.

A concentração de hemoglobina pode ser estimada por espectroscopia no UV-Vis devido à absorção na região de 545 nm. Desse modo, é possível verificar as variações da concentração dessa metaloproteína no sangue e avaliar a integridade dos eritrócitos. Essa técnica tem sido explorada como ferramenta de análise dos efeitos causados no sangue por

moléculas ou compostos utilizados em aplicações biológicas. O principal efeito resultante da interação da maioria dos fármacos ou carreadores sintéticos com as células vermelhas é o envelhecimento acelerado ou destruição mecânica prematura destas células, culminando com a liberação da hemoglobina. O estudo de hemocompatibilidade fornece informações sobre o comportamento do composto de interesse quando em contato com o sangue, permitindo avaliar os efeitos causados no organismo. A taxa de hemólise menor que 5% é aceita como segura para aplicações biológicas (ISO-10993-1, 2003).

As amostras dos agregados formados pelos derivados de quitosana foram testadas em sua capacidade de hemólise por meio do método de contato direto e a Equação 11 foi utilizada para o cálculo da taxa de hemólise.

$$\text{Taxa de hemólise (\%)} = \frac{Abs_{Derivado} - Abs_{PBS}}{Abs_{Água} - Abs_{PBS}} \times 100\% \quad (\text{Equação 11})$$

Sendo $Abs_{Derivado}$, Abs_{PBS} e $Abs_{Água}$ absorbâncias em 545 nm para as amostras de sangue tratadas com os derivados de quitosana, tampão PBS (controle negativo) e água (controle positivo), respectivamente. Os resultados estão dispostos na Tabela 11.

Tabela 11: Taxa de hemólise para os agregados formados pelos derivados de quitosana (n = 9, 1,0 g L⁻¹)

Amostra	Taxa de hemólise (%)	
	Média	Desvio Padrão
QPTMA ₄₀ DDA ₅	3,2	1,8
QPTMA ₄₀ DDA ₃₀	3,5	1,2
QDEAE ₄₀ DDA ₅	0,3	0,1
QDEAE ₄₀ DDA ₃₀	0,5	0,4
QGLY ₄₀ DDA ₅	3,2	2,6
QGLY ₄₀ DDA ₃₀	1,7	0,2

Os resultados de hemocompatibilidade pela atividade hemolítica evidenciados na Tabela 11 mostram que os derivados de quitosana, mesmo em concentração bastante elevada (1,0 g L⁻¹), apresentam baixa capacidade de induzir hemólise nos eritrócitos. Como esperado, os derivados da série QPTMA apresentaram taxa de hemólise maior do que as demais amostras. Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que o grupo hidrofílico PTMA possui carga positiva permanente (Figura 13), o que aumenta a interação dos polímeros com os eritrócitos, potencializando a hemólise. De todo modo, as amostras apresentaram taxa de hemólise inferior

ao limite de 5%, indicando assim comportamento adequado nas interações com o sangue, sugerindo propriedades adequadas para aplicações biológicas.

CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

Derivados anfífilos de quitosana modificados com grupos hidrofílicos 5-pentiltrimetilamônio, cloreto de 2-cloro-*N,N*-dietiletilamina, 2,3-Epóx-1-propanol (GLY) e grupo hidrofóbico dodecildeído foram obtidos e aplicados como carreadores de fármacos. As sínteses orgânicas propostas ou aprimoradas, de acordo com trabalhos prévios, foram empregadas no sentido de se obter significativos rendimentos com a menor geração de resíduos nocivos ao meio ambiente. A quitosana, previamente desacetilada e com massa molar reduzida, foi utilizada para as reações de modificação. Os derivados obtidos foram caracterizados quanto a estrutura e composição molecular utilizando técnicas de viscosimetria, RMN¹H, FTIR e análise térmica. Os resultados de caracterização comprovam que a substituição da quitosana ocorreu majoritariamente nos grupos amina livres.

A análise térmica revelou que a presença de água associada aos polímeros depende diretamente dos grupos ligados à quitosana bem como seus respectivos graus de substituição. O mesmo comportamento foi observado também nas curvas DSC. As curvas TGA/DTG-DTA das amostras demonstraram que a adição dos grupos hidrofílicos reduziu a estabilidade térmica do polímero enquanto que a presença do grupo hidrofóbico conferiu maior estabilidade. Os resultados termogravimétricos indicaram ainda que os eventos térmicos envolvidos nas etapas de degradação dos polímeros estão relacionados com os diferentes grupos substituintes.

A determinação da concentração de agregação crítica mostrou que os derivados anfífilos de quitosana possuem a propriedade de se auto-organizarem em solução aquosa devido as interações com as moléculas do solvente. Os valores de CAC (3,2 – 37,0 g L⁻¹) apresentaram tendência de diminuição com o aumento do pH do meio, fenômeno relacionado a protonação/desprotonação da cadeia polimérica da quitosana. Foi observado ainda que o aumento do conteúdo hidrofóbico proporciona diminuição da CAC devido ao favorecimento das interações intermoleculares, resultante da maior quantidade de cadeias DDA presentes no núcleo dos agregados.

As medidas de espalhamento dinâmico de luz foram utilizadas para a avaliação da distribuição de tamanho médio dos agregados vazios. Fatores como concentração, pH, grau de hidrofobicidade e tipo de grupo hidrofílico exerceram influência direta no diâmetro médio das partículas, que variou entre 137 e 490 nm. O potencial zeta (+10,4 – +47,8 mV) sugere a presença de cargas positivas na superfície dos agregados e significativa estabilidade em meio

aquoso. Os valores de PDI (0,278 - 0,782) apontam a participação de várias cadeias na formação dos agregados. Imagens de MET indicam que as nanopartículas apresentaram morfologia esférica com uma faixa estreita de distribuição de tamanhos, sem observação de agregação severa.

A incorporação do fármaco quercetina nos agregados foi estudada. Os valores de eficiência de encapsulamento e capacidade de carreamento revelaram que o pH e o conteúdo hidrofóbico dos polímeros anfifílicos exercem importância significativa na interação com o fármaco. A eficiência de encapsulamento em pH 7,4 variou entre 14,4 e 26,5%, enquanto que em pH 5,0 os valores ficaram entre 71,4 e 82,7%. Além disso, o aumento do grau de substituição do grupo DDA permitiu que mais quercetina fosse encapsulada. Resultados de DLS indicaram que o tamanho dos agregados aumentou aproximadamente duas vezes após a incorporação do fármaco. Estudos *in vitro* comprovaram o importante papel do pH no processo de liberação. O objetivo de promover liberação pronunciada em regiões tumorais (pH mais ácidos) em detrimento do ambiente fisiológico foi alcançado, dado que a quercetina foi mais eficientemente liberada em pH 5,0. O transporte anômalo e a liberação Fickiana foram os mecanismos de liberação observados.

A citotoxicidade dos agregados vazios foi testada *in vitro* contra células MCF-7 utilizando o ensaio de MTT. A viabilidade celular obtida foi acima de 80% em todas as concentrações, sugerindo que esses polímeros não interferem significativamente no metabolismo das células MCF-7. O mesmo ensaio foi utilizado para comparar o efeito do tratamento de células com o fármaco livre e encapsulado na redução da viabilidade celular. Foi possível observar que a quercetina manteve a capacidade de reduzir a atividade celular, mesmo após o encapsulamento. Além disso, os derivados da série QDEAE potencializaram significativamente o efeito do fármaco na viabilidade das células MCF-7. Estudos utilizando microscopia confocal de varredura à laser mostraram que as partículas interagem com a membrana celular e podem ser internalizadas. A taxa de hemólise provocada pelos agregados quando em contato com o sangue foi abaixo do limite de 5%, sugerindo que esses carreadores não afetam significativamente o comportamento dos glóbulos vermelhos.

O presente trabalho contribuiu de forma relevante na síntese, caracterização e elucidação do comportamento de derivados anfifílicos de quitosana em diferentes condições. Os dados obtidos fornecem bases para o entendimento da influência das propriedades físico-químicas dos polímeros no encapsulamento e liberação de fármaco, bem como nas interações com células. Estudos futuros que visam a utilização de quitosana como base para o

desenvolvimento de carreadores de fármacos podem se beneficiar da abordagem e resultados aqui apresentados. Portanto, tendo em vista os resultados discutidos nesse trabalho, é possível afirmar que os derivados anfifílicos de quitosana obtidos apresentam propriedades físico-químicas e biológicas importantes, revelando o potencial de aplicação como carreadores de fármacos. É de se esperar que esse trabalho cumpra a missão de fornecer bases para o entendimento das relações entre as estruturas dos derivados de quitosana e suas propriedades físico-químicas e biológicas, possibilitando o emprego desses sistemas no transporte e liberação controlada de fármacos.

PERSPECTIVAS FUTURAS

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O trabalho aqui apresentado pode ser beneficiado com estudos adicionais. O emprego de diferentes fármacos pode permitir a obtenção de informações adicionais sobre a eficiência de encapsulamento, cinética e mecanismo de liberação, além da citotoxicidade. Aplicações em diferentes linhagens celulares devem ser exploradas devido às diferenças no metabolismo e função biológica. As interações com as células podem ser melhor compreendidas pela exploração da microscopia confocal de varredura a laser. Modelos de membrana celulares podem ser empregados para facilitar o entendimento das interações dos polímeros com estruturas biológicas. Outros experimentos biológicos, como genotoxicidade, resposta inflamatória e testes *in vivo*, devem ser conduzidos para garantir as condições adequadas de segurança biológica dos carreadores. Existe, portanto, amplo espectro de estudos envolvendo os sistemas aqui apresentados, com significativas possibilidades de aprofundamento das fronteiras do conhecimento.

REFERENCIAS

7 REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.
- AIBA, S. Studies on chitosan .3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 1, p. 40-44, 1991.
- ALTAN, N.; CHEN, Y.; SCHINDLER, M.; SIMON, S. M. Defective acidification in human breast tumor cells and implications for chemotherapy. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 10, p. 1583-1598, 1998.
- ALVER, E.; BULUT, M.; METIN, A. U.; CIFTCI, H. One step effective removal of Congo Red in chitosan nanoparticles by encapsulation. **Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 171, p. 132-138, 2017.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2016**. Atlanta: American Cancer Society, p. 1-16, 2016.
- ARANAZ, I.; HARRIS, R.; HERAS, A. Chitosan amphiphilic derivatives. Chemistry and applications. **Current Organic Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 308-330, 2010.
- AYDIN, R. S. T.; PULAT, M. 5-Fluorouracil encapsulated chitosan nanoparticles for pH-stimulated drug delivery: evaluation of controlled release kinetics. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, n. 1, p. 1-10, 2012.
- BALAZS, N.; SIPOS, P. Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 1, p. 124-130, 2007.
- BANERJEE, T.; SINGH, A. K.; SHARMA, R. K.; MAITRA, A. N. Labeling efficiency and biodistribution of Technetium-99m labeled nanoparticles: interference by colloidal tin oxide particles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, n. 1-2, p. 189-195, 2005.
- BARBOSA, H. F. G.; LIMA, A. M. F.; TABOGA, S. R.; FERNANDES, J. C.; TIERA, V. A. D.; TIERA, M. J. Synthesis and self-assembly study of zwitterionic amphiphilic derivatives of chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 44, p. 44176-44185, 2016.
- BAZYLINSKA, U.; SACZKO, J. Nanoemulsion-templated polyelectrolyte multifunctional nanocapsules for DNA entrapment and bioimaging. **Colloids and Surfaces B-Biointerfaces**, v. 137, p. 191-202, 2016.

BENTLEY, M. D.; ROBERTS, M. J.; HARRIS, J. M. Reductive amination using poly(ethylene glycol) acetaldehyde hydrate generated in situ: applications to chitosan and lysozyme. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 87, n. 11, p. 1446-1449, 1998.

BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) - subcellular-localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron-transport in MTT Reduction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

BORGES, O.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; ROMEIJN, S. G.; AMIDI, M.; DE SOUSA, A.; BORCHARD, G.; JUNGINGER, H. E. Uptake studies in rat Peyer's patches, cytotoxicity and release studies of alginate coated chitosan nanoparticles for mucosal vaccination. **Journal of Controlled Release**, v. 114, n. 3, p. 348-358, 2006.

BOSSIO, O.; GOMEZ-MASCARAQUE, L. G.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, M.; VAZQUEZ-LASA, B.; ROMAN, J. S. Amphiphilic polysaccharide nanocarriers with antioxidant properties. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 29, n. 6, p. 589-606, 2014.

BRUGNEROTTO, J.; DESBRIERES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 9921-9927, 2001.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGUELLES-MONAL, W.; DESBRIERES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, n. 8, p. 3569-3580, 2001.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D. D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, p. 644-650, 2007.

CARBINATTO, F. M. **Matrizes poliméricas reticuladas de alta amilose e pectina para liberação controlada de fármacos**. 2010. 109f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista - Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2010.

CARRENO-GOMEZ, B.; DUNCAN, R. Evaluation of the biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 148, n. 2, p. 231-240, 1997.

CASETTARI, L.; VLLASALIU, D.; CASTAGNINO, E.; STOLNIK, S.; HOWDLE, S.; ILLUM, L. PEGylated chitosan derivatives: synthesis, characterizations and pharmaceutical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 5, p. 659-685, 2012.

CHEN, X. G.; PARK, H. J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 53, n. 4, p. 355-359, 2003.

CHENITE, A.; BUSCHMANN, M.; WANG, D.; CHAPUT, C.; KANDANI, N. Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 1, p. 39-47, 2001.

CHRETIENNOTDINET, M. J.; GIRAUDGUILLE, M. M.; VAULOT, D.; PUTAUX, J. L.; SAITO, Y.; CHANZY, H. The chitinous nature of filaments ejected by Phaeocystis (Prymnesiophyceae). **Journal of Phycology**, v. 33, n. 4, p. 666-672, 1997.

CHU, J.; OH, Y.; SENS, A.; ATAIE, N.; DANA, H.; MACKLIN, J. J.; LAVIV, T.; WELF, E. S.; DEAN, K. M.; ZHANG, F. J.; KIM, B. B.; TANG, C. T.; HU, M.; BAIRD, M. A.; DAVIDSON, M. W.; KAY, M. A.; FIOLKA, R.; YASUDA, R.; KIM, D. S.; NG, H. L.; LIN, M. Z. A bright cyan-excitable orange fluorescent protein facilitates dual-emission microscopy and enhances bioluminescence imaging in vivo. **Nature Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 760-767, 2016.

DALLA PICOLA, I. P.; SHI, Q.; FERNANDES, J. C.; PETRONIO, M. S.; LIMA, A. M. F.; TIERA, V. A. D.; TIERA, M. J. Chitosan derivatives for gene transfer: effect of phosphorylcholine and diethylaminoethyl grafts on the in vitro transfection efficiency. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 27, n. 16, p. 1611-1630, 2016.

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; SCHMITT, C. C.; NEUMANN, M. G. Syntheses and characterization of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 97-103, 2016.

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; TAKAKI, M.; GORAYEB, T. C.; DEL BIANCHI, V. L.; THOMEIO, J. C.; TIERA, M. J.; DE OLIVEIRA TIERA, V. A. Synthesis, characterization and antifungal activity of quaternary derivatives of chitosan on *Aspergillus flavus*. **Microbiological Research**, v. 168, n. 1, p. 50-5, 2013.

DE SOUZA, R. H. F. V.; TAKAKI, M.; PEDRO, R. D.; GABRIEL, J. D.; TIERA, M. J.; TIERA, V. A. D. Hydrophobic Effect of Amphiphilic Derivatives of Chitosan on the Antifungal Activity against *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4437-4450, 2013.

DEBATIN, K. M. Activation of apoptosis pathways by anticancer treatment. **Toxicology Letters**, v. 112, p. 41-48, 2000.

DENG, L. D.; QI, H. Y.; YAO, C. M.; FENG, M. H.; DONG, A. J. Investigation on the properties of methoxy poly(ethylene glycol)/chitosan graft co-polymers. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition**, v. 18, n. 12, p. 1575-1589, 2007.

DESBRIERES, J.; MARTINEZ, C.; RINAUDO, M. Hydrophobic derivatives of chitosan: Characterization and rheological behaviour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 19, n. 1, p. 21-28, 1996.

DI MARTINO, A.; SEDLARIK, V. Amphiphilic chitosan-grafted-functionalized polylactic acid based nanoparticles as a delivery system for doxorubicin and temozolomide co-therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 474, n. 1-2, p. 134-145, 2014.

DOMSZY, J. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analyzing chitosan. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 186, n. 8, p. 1671-1677, 1985.

DONG, Y.; XU, C.; WANG, J.; WU, Y.; WANG, M.; RUAN, Y. Influence of degree of deacetylation on critical concentration of chitosan/dichloroacetic acid liquid-crystalline solution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 83, n. 6, p. 1204-1208, 2002.

DU, H. L.; YANG, X. Y.; PANG, X.; ZHAI, G. X. The synthesis, self-assembling, and biocompatibility of a novel O-carboxymethyl chitosan cholate decorated with glycyrrhetic acid. **Carbohydrate Polymers**, v. 111, p. 753-761, 2014.

DU, Y. Z.; WANG, L.; YUAN, H.; WEI, X. H.; HU, F. Q. Preparation and characteristics of linoleic acid-grafted chitosan oligosaccharide micelles as a carrier for doxorubicin. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 69, n. 2, p. 257-63, 2009.

DUO, J.; YING, G. G.; WANG, G. W.; ZHANG, L. Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation. **Molecular Medicine Reports**, v. 5, n. 6, p. 1453-1456, 2012.

FADZALLAH, I. A.; MAJID, S. R.; CAREEM, M. A.; AROF, A. K. A study on ionic interactions in chitosan-oxalic acid polymer electrolyte membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 463, p. 65-72, 2014.

FANG, X. B.; XU, Y. Q.; ZHANG, J. M.; LU, X. H.; WANG, Y. T.; CHEN, M. W. Synthesis and characterization of an amphiphilic linoleic acid-g-quaternary chitosan with low toxicity. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, p. 1-7, 2015.

FAST, S. A.; KOKABIAN, B.; GUDE, V. G. Chitosan enhanced coagulation of algal turbid waters - Comparison between rapid mix and ultrasound coagulation methods. **Chemical Engineering Journal**, v. 244, p. 403-410, 2014.

FERNANDEZ-SUAREZ, M.; TING, A. Y. Fluorescent probes for super-resolution imaging in living cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 12, p. 929-943, 2008.

FREI, E. Albumin binding ligands and albumin conjugate uptake by cancer cells. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 3, n. 11, p. 1-9, 2011.

FRIEDMAN, A. J.; PHAN, J.; SCHAIRER, D. O.; CHAMPER, J.; QIN, M.; PIROUZ, A.; BLECHER-PAZ, K.; OREN, A.; LIU, P. T.; MODLIN, R. L.; KIM, J. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of chitosan alginate nanoparticles: a targeted therapy for cutaneous pathogens. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 5, p. 1231-1239, 2013.

FUENZALIDA, J. P.; WEIKERT, T.; HOFFMANN, S.; VILA-SANJURJO, C.; MOERSCHBACHER, B. M.; GOYCOOLEA, F. M.; KOLKENBROCK, S. Affinity protein-based FRET tools for cellular tracking of chitosan nanoparticles and determination of the polymer degree of acetylation. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 7, p. 2532-2539, 2014.

FUNKHOUSER, J. D.; ARONSON, N. N. Chitinase family GH18: evolutionary insights from the genomic history of a diverse protein family. **Evolutionary Biology**, v. 7, n. 96, p. 1-16, 2007.

GAO, W. W.; CHAN, J. M.; FAROKHZAD, O. C. pH-responsive nanoparticles for drug delivery. **Molecular Pharmaceutics**, v. 7, n. 6, p. 1913-1920, 2010.

GOYCOOLEA, F. M.; VALLE-GALLEGO, A.; STEFANI, R.; MENCHICCHI, B.; DAVID, L.; ROCHAS, C.; SANTANDER-ORTEGA, M. J.; ALONSO, M. J. Chitosan-based nanocapsules: physical characterization, stability in biological media and capsaicin encapsulation. **Colloid and Polymer Science**, v. 290, n. 14, p. 1423-1434, 2012.

GUINESI, L. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. The use of DSC curves to determine the acetylation degree of chitin/chitosan samples. **Thermochimica Acta**, v. 444, n. 2, p. 128-133, 2006.

HABIBA, U.; AFIFI, A. M.; SALLEH, A.; ANG, B. C. Chitosan/(polyvinyl alcohol)/zeolite electrospun composite nanofibrous membrane for adsorption of Cr^{6+} , Fe^{3+} and Ni^{2+} . **Journal of Hazardous Materials**, v. 322, p. 182-194, 2017.

HAN, Z. R.; ZENG, Y. Y.; LU, H.; ZHANG, L. J. Determination of the degree of acetylation and the distribution of acetyl groups in chitosan by HPLC analysis of nitrous acid degraded and PMP labeled products. **Carbohydrate Research**, v. 413, p. 75-84, 2015.

HARRIS, J. M.; STRUCK, E. C.; CASE, M. G.; PALEY, M. S.; VANALSTINE, J. M.; BROOKS, D. E. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 22, n. 2, p. 341-352, 1984.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 166, n. 1, p. 75-88, 1998.

HE, X.; LI, K.; XING, R.; LIU, S.; HU, L.; LI, P. The production of fully deacetylated chitosan by compression method. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 42, n. 1, p. 75-81, 2016.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - a review (part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

HU, F. Q.; MENG, P.; DAI, Y. Q.; DU, Y. Z.; YOU, J.; WEI, X. H.; YUAN, H. PEGylated chitosan-based polymer micelle as an intracellular delivery carrier for anti-tumor targeting therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 3, p. 749-757, 2008.

HUANG, M.; KHOR, E.; LIM, L. Y. Uptake and cytotoxicity of chitosan molecules and nanoparticles: Effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p. 344-353, 2004.

HUANG, P.; ZHAO, X. W.; YE, L. Synthesis of hydrophobic cationic chitosan flocculant and its sludge dewatering property. **Journal of Macromolecular Science Part B-Physics**, v. 55, n. 3, p. 299-309, 2016.

HUANG, W. J.; CHOI, W.; CHEN, Y. L.; ZHANG, Q.; DENG, H. T.; HE, W.; SHI, Y. G. A proposed role for glutamine in cancer cell growth through acid resistance. **Cell Research**, v. 23, n. 5, p. 724-727, 2013.

IAMAZAKI, E. T.; DE BRITTO, D.; SCHMITT, C. C.; CAMPANA, S. P.; NEUMANN, M. G. Preparation of substituted ionic carbohydrate polymers and their interactions with ionic surfactants. **Colloid and Polymer Science**, v. 283, n. 1, p. 33-40, 2004.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO-10993-1**: biological evaluation of medical devices. Part I. Evaluation and Testing. Genova, 2003. 63 p.

JAKUBOWICZ-GIL, J.; PADUCH, R.; PIERSIAK, T.; GLOWNIAK, K.; GAWRON, A.; KANDEFER-SZERSZEN, M. The effect of quercetin on pro-apoptotic activity of cisplatin in HeLa cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 69, n. 9, p. 1343-1350, 2005.

JENA, S. K.; SANGAMWAR, A. T. Polymeric micelles of amphiphilic graft copolymer of alpha-tocopherol succinate-g-carboxymethyl chitosan for tamoxifen delivery: Synthesis, characterization and in vivo pharmacokinetic study. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1162-1174, 2016.

KAISER, M.; PEREIRA, S.; POHL, L.; KETELHUT, S.; KEMPER, B.; GORZELANNY, C.; GALLA, H. J.; MOERSCHBACHER, B. M.; GOYCOOLEA, F. M. Chitosan encapsulation modulates the effect of capsaicin on the tight junctions of MDCK cells. **Scientific Reports**, v. 5, p. 1-15, 2015.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KIANG, T.; WEN, H.; LIM, H. W.; LEONG, K. W. The effect of the degree of chitosan deacetylation on the efficiency of gene transfection. **Biomaterials**, v. 25, n. 22, p. 5293-5301, 2004.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983.

KUMAR, A.; VIMAL, A.; KUMAR, A. Why chitosan? From properties to perspective of mucosal drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 615-622, 2016.

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

KUMAR, M. N. V. R.; MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A. J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 12, p. 6017-6084, 2004.

LEE, J. H.; GUSTIN, J. P.; CHEN, T. H.; PAYNE, G. F.; RAGHAVAN, S. R. Vesicle-biopolymer gels: networks of surfactant vesicles connected by associating biopolymers. **Langmuir**, v. 21, n. 1, p. 26-33, 2005.

LEE, S. J.; PARK, K.; OH, Y. K.; KWON, S. H.; HER, S.; KIM, I. S.; CHOI, K.; LEE, S. J.; KIM, H.; LEE, S. G.; KIM, K.; KWON, I. C. Tumor specificity and therapeutic efficacy of photosensitizer-encapsulated glycol chitosan-based nanoparticles in tumor-bearing mice. **Biomaterials**, v. 30, n. 15, p. 2929-2939, 2009.

LI, S. D.; LI, P. W.; YANG, Z. M.; PENG, Z.; QUAN, W. Y.; YANG, X. H.; YANG, L.; DONG, J. J. Synthesis and characterization of chitosan quaternary ammonium salt and its application as drug carrier for ribavirin. **Drug Delivery**, v. 21, n. 7, p. 548-552, 2014.

LI, X. Y.; KONG, X. Y.; ZHANG, Z. L.; NAN, K. H.; LI, L. L.; WANG, X. H.; CHEN, H. Cytotoxicity and biocompatibility evaluation of N,O-carboxymethyl chitosan/oxidized alginate hydrogel for drug delivery application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 5, p. 1299-1305, 2012.

- LOPEZ-LEON, T.; CARVALHO, E. L. S.; SEIJO, B.; ORTEGA-VINUESA, J. L.; BASTOS-GONZALEZ, D. Physicochemical characterization of chitosan nanoparticles: electrokinetic and stability behavior. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 283, n. 2, p. 344-351, 2005.
- LOZANO, M. V.; TORRECILLA, D.; TORRES, D.; VIDAL, A.; DOMINGUEZ, F.; ALONSO, M. J. Highly efficient system to deliver taxanes into tumor cells: Docetaxel-loaded chitosan oligomer colloidal carriers. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2186-2193, 2008.
- LV, P. J.; BIN, Y. Z.; LI, Y. Q.; CHEN, R.; WANG, X.; ZHAO, B. Y. Studies on graft copolymerization of chitosan with acrylonitrile by the redox system. **Polymer**, v. 50, n. 24, p. 5675-5680, 2009.
- MAGHAMI, G. G.; ROBERTS, G. A. F. Evaluation of the viscometric constants for chitosan. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 189, n. 1, p. 195-200, 1988.
- MAO, H. Q.; ROY, K.; TROUNG-LE, V. L.; JANES, K. A.; LIN, K. Y.; WANG, Y.; AUGUST, J. T.; LEONG, K. W. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 3, p. 399-421, 2001.
- MAO, S. R.; SHUAI, X. T.; UNGER, F.; SIMON, M.; BI, D. Z.; KISSEL, T. The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 281, n. 1-2, p. 45-54, 2004.
- MATOS, B. N.; REIS, T. A.; GRATIERI, T.; GELFUSO, G. M. Chitosan nanoparticles for targeting and sustaining minoxidil sulphate delivery to hair follicles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 225-229, 2015.
- MCKAY, G.; BLAIR, H. S.; GARDNER, J. R. Adsorption of dyes on chitin. I. Equilibrium studies. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 27, n. 8, p. 3043-3057, 1982.
- MEHNERT, W.; MADER, K. Solid lipid nanoparticles - production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 2-3, p. 165-196, 2001.
- MENNINI, N.; FURLANETTO, S.; BRAGAGNI, M.; GHELARDINI, C.; MANNELLI, L. D.; MURA, P. Development of a chitosan-derivative micellar formulation to improve celecoxib solubility and bioavailability. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 40, n. 11, p. 1494-1502, 2014.

MITRA, T.; SAILAKSHMI, G.; GNANAMANI, A.; MANDAL, A. B. Studies on cross-linking of succinic acid with chitosan/collagen. **Materials Research-Ibero-American Journal of Materials**, v. 16, n. 4, p. 755-765, 2013.

MONTCOURRIER, P.; MANGEAT, P. H.; VALEMBOIS, C.; SALAZAR, G.; SAHUQUET, A.; DUPERRAY, C.; ROCHEFORT, H. Characterization of very acidic phagosomes in breast-cancer cells and their association with invasion. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 2381-2391, 1994.

MONTEIRO, O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 26, n. 2-3, p. 119-128, 1999.

MORENO-VILLOSLADA, I.; FUENZALIDA, J. P.; TRIPAILAF, G.; ARAYA-HERMOSILLA, R.; PIZARRO, G. D. C.; MARAMBIO, O. G.; NISHIDE, H. Comparative study of the self-aggregation of rhodamine 6G in the presence of poly(sodium 4-styrenesulfonate), poly(N-phenylmaleimide-co-acrylic acid), poly(styrene-alt-maleic acid), and poly(sodium acrylate). **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 37, p. 11983-11992, 2010.

MULHAUPT, R. International historic chemical landmark: the foundation of polymer science by hermann staudinger (1881-1965). **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 200, n. 8, p. U5-U8, 1999.

MURA, P.; CIRRI, M.; MENNINI, N.; CASELLA, G.; MAESTRELLI, F. Polymeric mucoadhesive tablets for topical or systemic buccal delivery of clonazepam: Effect of cyclodextrin complexation. **Carbohydrate Polymers**, v. 152, p. 755-763, 2016.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 53, n. 2, p. 131-140, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A.; BOUDRANT, J.; MEYER, D.; MANNO, N.; DEMARCHIS, M.; PAOLETTI, M. G. Current views on fungal chitin/chitosan, human chitinases, food preservation, glucans, pectins and inulin: A tribute to Henri Braconnot, precursor of the carbohydrate polymers science, on the chitin bicentennial. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 995-1012, 2012.

MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F. The N-permethylation of chitosan and the preparation of N-trimethyl chitosan iodide. **Carbohydrate Polymers**, v. 5, n. 4, p. 297-307, 1985.

MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M.; MARIOTTI, S. N-(Carboxymethylidene)Chitosans and N-(Carboxymethyl)-Chitosans - Novel Chelating Polyampholytes Obtained from Chitosan Glyoxylate. **Carbohydrate Research**, v. 107, n. 2, p. 199-214, 1982.

NABID, M. R.; REZAEI, S. J. T.; SEDGHI, R.; NIKNEJAD, H.; ENTEZAMI, A. A.; OSKOOIE, H. A.; HERAVI, M. M. Self-assembled micelles of well-defined pentaerythritol-centered amphiphilic A(4)B(8) star-block copolymers based on PCL and PEG for hydrophobic drug delivery. **Polymer**, v. 52, n. 13, p. 2799-2809, 2011.

NAUSS, J. L.; THOMPSON, J. L.; NAGYVARY, J. The binding of micellar lipids to chitosan. **Lipids**, v. 18, n. 10, p. 714-719, 1983.

NETO, C. G. T.; GIACOMETTI, J. A.; JOB, A. E.; FERREIRA, F. C.; FONSECA, J. L. C.; PEREIRA, M. R. Thermal analysis of chitosan based networks. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, n. 2, p. 97-103, 2005.

OLIVERA, B. M.; HILLYARD, D. R.; MARSH, M.; YOSHIKAMI, D. Combinatorial peptide libraries in drug design - lessons from venomous cone snails. **Trends in Biotechnology**, v. 13, n. 10, p. 422-426, 1995.

PAN, Z.; GAO, Y. L.; HENG, L. S.; LIU, Y.; YAO, G.; WANG, Y.; LIU, Y. P. Amphiphilic N-(2,3-dihydroxypropyl)-chitosan-cholic acid micelles for paclitaxel delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p. 394-399, 2013.

PAWLAK, A.; MUCHA, A. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, n. 1-2, p. 153-166, 2003.

PELLETIER, A.; LEMIRE, I.; SYGUSCH, J.; CHORNET, E.; OVEREND, R. P. Chitin chitosan transformation by thermomechanicochemical treatment including characterization by enzymatic depolymerization. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 36, n. 3, p. 310-315, 1990.

PEREZ-HERRERO, E.; FERNANDEZ-MEDARDE, A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, p. 52-79, 2015.

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

POCHANAVANICH, P.; SUNTORNSUK, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 17-21, 2002.

PRASHANTH, K. V. H.; THARANATHAN, R. N. Crosslinked chitosan - preparation and characterization. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 1, p. 169-173, 2006.

QI, X. L.; QIN, J. Y.; FAN, Y. C.; QIN, X. X.; JIANG, Y. J.; WU, Z. H. Carboxymethyl chitosan-modified polyamidoamine dendrimer enables progressive drug targeting of tumors via pH-sensitive charge inversion. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 4, p. 667-678, 2016.

RAAFAT, D.; SAHL, H. G. Chitosan and its antimicrobial potential - a critical literature survey. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 186-201, 2009.

RANELLETTI, F. O.; RICCI, R.; LAROCCA, L. M.; MAGGIANO, N.; CAPELLI, A.; SCAMBIA, G.; BENEDETTIPANICI, P.; MANCUSO, S.; RUMI, C.; PIANTELLI, M. Growth-inhibitory effect of quercetin and presence of type-II estrogen-binding sites in human colon-cancer cell-lines and primary colorectal tumors. **International Journal of Cancer**, v. 50, n. 3, p. 486-492, 1992.

RANGANATHAN, S.; HALAGOWDER, D.; SIVASITHAMBARAM, N. D. Quercetin suppresses twist to induce apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. **Plos One**, v. 10, n. 10, p. 1-21, 2015.

REYES-AVALOS, M. C.; FEMENIA, A.; MINJARES-FUENTES, R.; CONTRERAS-ESQUIVEL, J. C.; AGUILAR-GONZALEZ, C. N.; ESPARZA-RIVERA, J. R.; MEZA-VELAZQUEZ, J. A. Improvement of the quality and the shelf life of figs (*figus carica*) using an alginate-chitosan edible film. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 12, p. 2114-2124, 2016.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

RINAUDO, M.; LEDUNG, P.; GEY, C.; MILAS, M. Substituent distribution on O, N-carboxymethylchitosans by H-1-NMR and C-13-NMR. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 3, p. 122-128, 1992.

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

RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIERES, J. Solubilization of chitosan in strong acid medium. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v. 5, n. 3, p. 267-276, 1999.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H. A.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. Cell viability assays. In: SITTAMPALAM, G. S.; COUSSENS, N. P.; BRIMACOMBE, K.; GROSSMAN, A.; ARKIN, M.; AULD, D.; AUSTIN, C.; BEJCEK, B.; GLICKSMAN, M.; INGLESE, J.; IVERSEN, P. W.; LI, Z.; MCGEE, J.; MCMANUS, O.; MINOR, L.; NAPPER, A.; PELTIER, J. M.; RISS, T.; TRASK, O. J.; WEIDNER, J.; (Ed.). **Assay guidance manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>>. Acesso em: 15 fev. 2017.

ROBLES, E.; JUAREZ, J.; BURBOA, M. G.; GUTIERREZ, L. E.; TABOADA, P.; MOSQUERA, V.; VALDEZ, M. A. Properties of insulin- chitosan complexes obtained by an alkylation reaction on chitosan. **Journal of Applied Polymers**, v. 131, n. 6, p. 39999-40009, 2014.

RUDALL, K. M. Chitin and its association with other molecules. **Journal of Polymer Science Part C-Polymer Symposium**, v. 28, n. 1, p. 83-102, 1969.

SAHU, A. K.; JAIN, V. The applied validated ultraviolet-visible spectrophotometric method and the kinetic model of the release of gedunin from a chitosan-coated liposome. **Journal of Applied Spectroscopy**, v. 83, n. 5, p. 878-887, 2016.

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

SANTOS, N. C.; CASTANHO, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? **Química Nova**, v. 25, p. 1181-1185, 2002.

SARKAR, A.; GHOSH, S.; CHOWDHURY, S.; PANDEY, B.; SIL, P. C. Targeted delivery of quercetin loaded mesoporous silica nanoparticles to the breast cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects**, v. 1860, n. 10, p. 2065-2075, 2016.

SARMENTO, B.; NEVES, J. Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics. In: SARMENTO, B.; NEVES, J. (Ed.). **Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics**. New York: John Wiley, 2012. v. 1, p. 1 - 26.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. U.; FREITAS, L. D.; POHLMANN, A. R. Physicochemical characterization and stability of the polymeric nanoparticle systems for drug administration. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SHI, Z. G.; GUO, R.; LI, W. C.; ZHANG, Y.; XUE, W.; TANG, Y.; ZHANG, Y. M. Nanoparticles of deoxycholic acid, polyethylene glycol and folic acid-modified chitosan for targeted delivery of doxorubicin. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 25, n. 3, p. 723-731, 2014.

SHRESTHA, B. K.; AHMAD, R.; MOUSA, H. M.; KIM, I. G.; KIM, J. I.; NEUPANE, M. P.; PARK, C. H.; KIM, C. S. High-performance glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase immobilized polypyrrole/Nafion/functionalized multi-walled carbon nanotubes bio-nanohybrid film. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 482, p. 39-47, 2016.

SIEVAL, A. B.; THANOU, M.; KOTZE, A. F.; VERHOEF, J. E.; BRUSSEE, J.; JUNGINGER, H. E. Preparation and NMR characterization of highly substituted N-trimethyl chitosan chloride. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 2-3, p. 157-165, 1998.

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

SIMSTEIN, R.; BUROW, M.; PARKER, A.; WELDON, C.; BECKMAN, B. Apoptosis, chemoresistance, and breast cancer: Insights from the MCF-7 cell model system. **Experimental Biology and Medicine**, v. 228, n. 9, p. 995-1003, 2003.

SOARES, P. I. P.; SOUSA, A. I.; SILVA, J. C.; FERREIRA, I. M. M.; NOVO, C. M. M.; BORGES, J. P. Chitosan-based nanoparticles as drug delivery systems for doxorubicin: Optimization and modelling. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 304-312, 2016.

SONIA, T. A.; SHARMA, C. P. Chitosan and its derivatives for drug delivery perspective. **Chitosan for Biomaterials I**, v. 243, p. 23-53, 2011.

STUART, M. A. C.; HUCK, W. T. S.; GENZER, J.; MULLER, M.; OBER, C.; STAMM, M.; SUKHORUKOV, G. B.; SZLEIFER, I.; TSUKRUK, V. V.; URBAN, M.; WINNIK, F.; ZAUSCHER, S.; LUZINOV, I.; MINKO, S. Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials. **Nature Materials**, v. 9, n. 2, p. 101-113, 2010.

SWIATKIEWICZ, S.; ARCZEWSKA-WLOSEK, A.; JOZEFIAK, D. Feed enzymes, probiotic, or chitosan can improve the nutritional efficacy of broiler chicken diets containing a high level of distillers dried grains with solubles. **Livestock Science**, v. 163, p. 110-119, 2014.

TAHTAT, D.; UZUN, C.; MAHLOUS, M.; GUVEN, G. Beneficial effect of gamma irradiation on the N-deacetylation of chitin to form chitosan. **Nuclear Instruments & Methods in Physics Research Section B-Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 265, n. 1, p. 425-428, 2007.

TAN, S. C.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, n. 4, p. 713-719, 1998.

TAN, S. C.; TAN, T. K.; WONG, S. M.; KHOR, E. The chitosan yield of zygomycetes at their optimum harvesting time. **Carbohydrate Polymers**, v. 30, n. 4, p. 239-242, 1996.

TAN, W. F.; LIN, L. P.; LI, M. H.; ZHANG, Y. X.; TONG, Y. G.; XIAO, D.; DING, J. Quercetin, a dietary-derived flavonoid, possesses antiangiogenic potential. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, n. 2-3, p. 255-262, 2003.

TANNOCK, I. F.; ROTIN, D. Acid pH in tumors and its potential for therapeutic exploitation. **Cancer Research**, v. 49, n. 16, p. 4373-84, 1989.

THAKUR, B.; JAYAKUMAR, S.; SAWANT, S. N. Probing extracellular acidity of live cells in real time for cancer detection and monitoring anti-cancer drug activity. **Chemical Communications**, v. 51, n. 32, p. 7015-7018, 2015.

TIERA, M. J.; QIU, X. P.; BECHAOUCH, S.; SHI, Q.; FERNANDES, J. C.; WINNIK, F. M. Synthesis and characterization of phosphorylcholine-substituted chitosans soluble in physiological pH conditions. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 11, p. 3151-3156, 2006.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; SRIWASTAWA, B.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; BANNERJEE, S. K. Drug delivery systems: an updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 2, n. 1, p. 2-11, 2012.

TOMMERAAS, K.; VARUM, K. M.; CHRISTENSEN, B. E.; SMIDSROD, O. Preparation and characterisation of oligosaccharides produced by nitrous acid depolymerisation of chitosans. **Carbohydrate Research**, v. 333, n. 2, p. 137-144, 2001.

VARUM, K. M.; OTTOY, M. H.; SMIDSROD, O. Acid hydrolysis of chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 46, n. 1, p. 89-98, 2001.

VO, D. T.; WHITELEY, C. G.; LEE, C. K. Hydrophobically modified chitosan-grafted magnetic nanoparticles for bacteria removal. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 38, p. 9270-9277, 2015.

WAGH, A.; QIAN, S. Y.; LAW, B. Development of biocompatible polymeric nanoparticles for in vivo NIR and FRET imaging. **Bioconjugate Chemistry**, v. 23, n. 5, p. 981-992, 2012.

WANG, H. J.; ZHAO, P. Q.; LIANG, X. F.; GONG, X. Q.; SONG, T.; NIU, R. F.; CHANG, J. Folate-PEG coated cationic modified chitosan - Cholesterol liposomes for tumor-targeted drug delivery. **Biomaterials**, v. 31, n. 14, p. 4129-4138, 2010.

WANG, Y. G.; ZHOU, K. J.; HUANG, G.; HENSLEY, C.; HUANG, X. N.; MA, X. P.; ZHAO, T.; SUMER, B. D.; DEBERARDINIS, R. J.; GAO, J. M. A nanoparticle-based strategy for the imaging of a broad range of tumours by nonlinear amplification of microenvironment signals. **Nature Materials**, v. 13, n. 2, p. 204-212, 2014.

WEI, Y. C.; HUDSON, S. M.; MAYER, J. M.; KAPLAN, D. L. The crosslinking of chitosan fibers. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 2187-2193, 1992.

WELSH, E. R.; PRICE, R. R. Chitosan cross-linking with a water-soluble, blocked diisocyanate. 2. Solvates and hydrogels. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 5, p. 1357-1361, 2003.

WOJTKOWIAK, J. W.; VERDUZCO, D.; SCHRAMM, K. J.; GILLIES, R. J. Drug resistance and cellular adaptation to tumor acidic pH microenvironment. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 2032-2038, 2011.

WORAPHATPHADUNG, T.; SAJOMSANG, W.; GONIL, P.; SAESOO, S.; OPANASOPIT, P. Synthesis and characterization of pH-responsive N-naphthyl-N,O-succinyl chitosan micelles for oral meloxicam delivery. **Carbohydrate Polymers**, v. 121, p. 99-106, 2015.

WU, J.; WEI, W.; WANG, L. Y.; SU, Z. G.; MA, G. H. A thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan and poly(ethylene glycol) for nasal drug delivery system. **Biomaterials**, v. 28, n. 13, p. 2220-2232, 2007.

WU, L.; LIU, M. Z. Preparation and properties of chitosan-coated NPK compound fertilizer with controlled-release and water-retention. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, n. 2, p. 240-247, 2008.

WU, M. M.; CAO, Z. Y.; ZHAO, Y. F.; ZENG, R.; TU, M.; ZHAO, J. H. Novel self-assembled pH-responsive biomimetic nanocarriers for drug delivery. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 64, p. 346-353, 2016.

WU, M. M.; GUO, K.; DONG, H. W.; ZENG, R.; TU, M.; ZHAO, J. H. In vitro drug release and biological evaluation of biomimetic polymeric micelles self-assembled from amphiphilic deoxycholic acid-phosphorylcholine-chitosan conjugate. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 45, p. 162-169, 2014.

WU, M. Y.; LONG, Z.; XIAO, H. N.; DONG, C. H. Recent research progress on preparation and application of N,N,N-trimethyl chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 434, p. 27-32, 2016.

XIA, C. L.; DING, X. Y.; SUN, Y.; LIU, H. W.; LI, Y. S. Hyperbranched-upon-dendritic macromolecules as unimolecular hosts for controlled release. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 48, n. 18, p. 4013-4019, 2010.

XIONG, W.; ZHANG, Q. T.; YIN, F.; YU, S. H.; YE, T. T.; PAN, W. S.; YANG, X. G. Auricularia auricular polysaccharide-low molecular weight chitosan polyelectrolyte complex nanoparticles: preparation and characterization. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 3, p. 439-448, 2016.

XU, Y.; DU, Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, n. 1, p. 215-226, 2003.

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

YANG, L. B.; ESHRAGHI, J.; FASSIHI, R. A new intragastric delivery system for the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastric ulcer: in vitro evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 57, n. 3, p. 215-222, 1999.

YANG, S.; WANG, Y. Z.; XU, M. L.; HE, M. Z.; ZHANG, M.; RAN, D.; JIA, X. P. Synthesis of modified chitosan-based molecularly imprinted polymers for adsorptive protein separation. **Analytical Methods**, v. 5, n. 20, p. 5471-5477, 2013.

YANG, Y. M.; HU, W.; WANG, X. D.; GU, X. S. The controlling biodegradation of chitosan fibers by N-acetylation in vitro and in vivo. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 18, n. 11, p. 2117-2121, 2007.

YIN, M. L.; CHEN, X. L.; LI, R.; HUANG, D.; FAN, X. Y.; REN, X. H.; HUANG, T. S. Preparation and characterization of antimicrobial PVA hybrid films with N-halamine modified chitosan nanospheres. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 46, p. 44204-44211, 2016.

YOO, H. S.; PARK, T. G. Biodegradable polymeric micelles composed of doxorubicin conjugated PLGA-PEG block copolymer. **Journal of Controlled Release**, v. 70, n. 1-2, p. 63-70, 2001.

YU, B. J.; TANG, C.; YIN, C. H. Enhanced antitumor efficacy of folate modified amphiphilic nanoparticles through co-delivery of chemotherapeutic drugs and genes. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6369-6378, 2014.

YUE, Z. G.; WEI, W.; LV, P. P.; YUE, H.; WANG, L. Y.; SU, Z. G.; MA, G. H. Surface charge affects cellular uptake and intracellular trafficking of chitosan-based nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 7, p. 2440-2446, 2011.

ZAWADZKI, J.; KACZMAREK, H. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 2, p. 394-400, 2010.

ZHANG, A. D.; DING, D. R.; REN, J. C.; ZHU, X. L.; YAO, Y. H. Synthesis, characterization, and drug-release behavior of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 131, n. 4, p. 39890-39899, 2014.

ZHANG, C.; QU, G. W.; SUN, Y. J.; WU, X. J.; YAO, Z. L.; GUO, Q. L.; DING, Q. O.; YUAN, S. T.; SHEN, Z. L.; PING, Q. E.; ZHOU, H. P. Pharmacokinetics, biodistribution, efficacy and safety of N-octyl-O-sulfate chitosan micelles loaded with paclitaxel. **Biomaterials**, v. 29, n. 9, p. 1233-1241, 2008.

ZHANG, J. K.; LI, M.; FAN, T. F.; XU, Q.; WU, Y.; CHEN, C. Y.; HUANG, Q. L. Construction of novel amphiphilic chitosan copolymer nanoparticles for chlorpyrifos delivery. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 3, p. 106-118, 2013.

ZHOU, H. F.; YU, W. T.; GUO, X.; LIU, X. D.; LI, N.; ZHANG, Y.; MA, X. J. Synthesis and characterization of amphiphilic glycidol-chitosan-deoxycholic acid nanoparticles as a drug carrier for doxorubicin. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 12, p. 3480-3486, 2010.

ZHOU, H. Y.; JIANG, L. J.; CAO, P. P.; LI, J. B.; CHEN, X. G. Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 117, p. 524-536, 2015.

ZHOU, J.; LI, L.; FANG, L.; XIE, H.; YAO, W. X.; ZHOU, X.; XIONG, Z. J.; WANG, L.; LI, Z. X.; LUO, F. Quercetin reduces cyclin D1 activity and induces G1 phase arrest in HepG2 cells. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 516-522, 2016.

APENDICE A

Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H)

Figura 49A: Espectro de RMN¹H da quitosana desacetilada.

Figura 50A: Espectro de RMN¹H da amostra QPTMA₄₀.

Figura 51A: Espectro de RMN¹H da amostra QPTMA₄₀DDA₅.

Figura 52A: Espectro de RMN¹H da amostra QPTMA₄₀DDA₃₀.

Figura 53A: Espectro de RMN¹H da amostra QDEAE₄₀.

Figura 54A: Espectro de RMN¹H da amostra QDEAE₄₀DDA₅.

Figura 55A: Espectro de RMN¹H da amostra QDEAE₄₀DDA₃₀.

Figura 56A: Espectro de RMN¹H da amostra QGLY₄₀.

Figura 57A: Espectro de RMN¹H da amostra QGLY₄₀DDA₅.

Figura 58A: Espectro de RMN¹H da amostra QGLY₄₀DDA₃₀.

APENDICE B

Gráficos da razão I/III vs concentração para determinação da CAC

Figura 59B: Determinação da CAC dos polímeros a) QPTMA₄₀, b) QPTMA₄₀DDA₅ e c) QPTMA₄₀DDA₃₀. Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.

Figura 60B: Determinação da CAC dos polímeros a) QDEAE₄₀, b) QDEAE₄₀DDA₅ e c) QDEAE₄₀DDA₃₀. Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.

Figura 61B: Determinação da CAC dos polímeros a) QGLY₄₀, b) QGLY₄₀DDA₅ e c) QGLY₄₀DDA₃₀. Gráficos de I/III em função da concentração dos derivados de quitosana em pHs 4,0, 5,0, 6,2 e 7,4.

APENDICE C

Curva de calibração para determinação da concentração de CAP-sfGFP

Figura 62C: Curva de calibração de CAP-sfGFP em solução tamponante pH 6,0.

APENDICE D

Lista de trabalhos preparados durante o doutoramento

Artigo publicado

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; SCHMITT, C. C.; NEUMANN, M. G. Syntheses and characterization of amphiphilic quaternary ammonium chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 97-103, 2016.

Trabalho submetido e em análise

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; SCHMITT, C. C.; CAVALHEIRO, E. T.; NEUMANN, M. G. Thermal Analysis of Amphiphilic Quaternary Ammonium Chitosan Derivatives. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, submetido.

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; GOYCOOLEA, F. M., PEREIRA, S., SCHMITT, C. C.; NEUMANN, M. G. Quercetin Encapsulated 6-*N*-Diethylaminoethyl Chitosan Nanoparticles: Drug-Release Behavior, cytotoxicity and biocompatibility. **Biomaterials**, submetido.

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; GOYCOOLEA, F. M., PEREIRA, S., SCHMITT, C. C.; NEUMANN, M. G. Self-aggregated nanoparticles of N-dodecyl,N'-glycidyl(chitosan) as drug delivery systems for quercetin. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, submetido.

Trabalho em fase final de preparação e submissão

DE OLIVEIRA PEDRO, R.; SCHMITT, C. C.; CAVALHEIRO, E. T.; NEUMANN, M. G. Thermal Analysis of quercetin-loaded chitosan nanoparticles.