Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos

Departamento de Físico-Química
Grupo de Físico-Química Orgânica

**PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
MECÂNICAS DE MEMBRANAS POROSAS DE
CARBOXIMETILQUITOSANA E HIDROGÉIS
DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO EM
ENGENHARIA DE TECIDOS**

Anderson Fiamingo

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências (Físico-Química).

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

São Carlos
Fevereiro / 2016

ANDERSON FIAMINGO

**Propriedades Físico-Químicas e Mecânicas de
Membranas Porosas de Carboximetilquitosana e
Hidrogéis de Quitosana para aplicação em
engenharia de tecidos**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Ciências (Físico-
Química).

Área de concentração: Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho.

Exemplar revisado

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

São Carlos
2016

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:

Data:

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

Fiamingo, Anderson

Propriedades físico-químicas e mecânicas de membranas porosas de carboximetilquitosana e hidrogéis de quitosana para aplicação em engenharia de tecidos / Anderson Fiamingo. — São Carlos, 2016.
159 f.

Tese (Doutorado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho

1. Quitosana. 2. Carboximetilquitosana. 3. Genipina. 4. Hidrogéis. 5. Membranas. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

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

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Prof. Dr. Laurent David** e **Dra. Alexandra Montembault** pela co-orientação, discussões acadêmicas e também pela amizade e acolhimento junto ao seu grupo de pesquisa **IMP@Lyon1** – França, durante todo o período de estágio sanduíche.

Aos técnicos do **IQSC** e **IMP**, **Agnès, Aldimar, Andre, Laurent, Luis, Marcelo, Sylvana** e **Thiago** pelo auxílio na realização das análises.

Aos amigos **Andrea, Bianca, Daniella, Danilo, Joice, Lívia, Raquel, Tonimar, Virgínia** e **William** pela amizade, bons momentos descontração, apoio e estímulo.

Aos meus pais **Sérgio** e **Leonice** pela educação, incentivo e amor incondicional. A minha irmã **Aline** pelo carinho e apoio. Aos meus padrinhos **José Luiz** e **Rosa Helena** e aos meus primos **Janaina** e **Rodrigo** pelo apoio e incentivo.

Ao **IQSC** e **IMP**, pela infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de doutorado e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**Capes**) pela concessão da bolsa de doutorado-sanduíche.

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

Muito obrigado!!!

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

Albert Einstein

RESUMO

FIAMINGO, A. **Propriedades físico-químicas e mecânicas de membranas porosas de carboximetilquitosana e hidrogéis de quitosana para aplicação em engenharia de tecidos.** 2016. 159 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Este trabalho teve como principal objetivo produzir membranas porosas de carboximetilquitosana e hidrogéis de quitosana com propriedades físico-químicas e mecânicas adequadas para aplicações em Engenharia de Tecidos. Para isso, quitosanas com diferentes graus de acetilação ($4,0\% < \overline{GA} < 40\%$) e de elevada massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v > 750.000 \text{ g mol}^{-1}$) foram produzidas através da aplicação de processos consecutivos de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (DAIUS) à beta-quitina extraída de gládios de lulas *Doryteuthis spp.*. A carboximetilação de quitosana extensivamente desacetilada (Qs-3; $\overline{GA} = 4\%$) foi realizada pela reação com ácido monoclóricoacético em meio isopropanol/solução aquosa de NaOH, gerando a amostra CMQs-0 ($\overline{GS} \approx 0,98$; $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$). A irradiação de ultrassom de alta intensidade foi empregada para tratar solução aquosa de CMQs-0 durante 1 h e 3 h, resultando nas amostras CMQs-1 ($\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) e CMQs-3 ($\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), respectivamente. Para a produção de membranas reticuladas, genipina foi adicionada em diferentes concentrações ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) às soluções aquosas das CMQs, que foram vertidas em placas de Petri e a reação de reticulação procedeu por 24 h. Em seguida, as membranas reticuladas (M-CMQs) foram liofilizadas, neutralizadas, lavadas e liofilizadas novamente, resultando em nove amostras, que foram caracterizadas quanto ao grau médio de reticulação ($\overline{GR}$), grau médio de hidratação ($\overline{GH}$), morfologia, propriedades mecânicas e quanto à susceptibilidade à degradação por lisozima. O grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) foi tanto maior quanto maior a concentração de genipina empregada na reação, variando de $\overline{GR} \approx 3,3\%$ (M-CMQs-01) a $\overline{GR} \approx 17,8\%$ (M-CMQs-35). As análises de MEV revelaram que as membranas reticuladas M-CMQs são estruturas porosas que apresentam maior densidade de poros aparentes quanto maiores os valores de $\overline{M}_v$ e $\overline{GR}$. Entretanto, as membranas preparadas a partir de CMQs de elevada massa molar ($\overline{M}_v > 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) e pouco reticuladas ($\overline{GR} < 10\%$), apresentaram propriedades mecânicas superiores em termos de resistência máxima à tração ($> 170 \text{ kPa}$) e alongamento máximo à ruptura ($> 40\%$). Por outro lado, as membranas mais susceptíveis à degradação enzimática foram aquelas preparadas a partir de CMQs de baixa massa molar ($\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) e que exibiram baixos graus de reticulação ($\overline{GR} < 11\%$). Hidrogéis estáveis de quitosana sem o uso de qualquer agente de

reticulação externo foram produzidos a partir da gelificação de soluções aquosas de quitosana com solução de NaOH ou vapor de NH₃. Os hidrogéis produzidos a partir de soluções de quitosana de elevada massa molar média ponderal ($\overline{M}_w \approx 640.000 \text{ g mol}^{-1}$) e extensivamente desacetilada ($\overline{DA} \approx 2,8\%$) em concentrações poliméricas acima 2,0%, exibiram melhores propriedades mecânicas com o aumento da concentração polimérica, devido à formação de numerosos emaranhamentos físicos das cadeias poliméricas em solução. Os resultados mostram que as propriedades físico-químicas e mecânicas dos hidrogéis de quitosana podem ser controladas variando a concentração do polímero e o processo de gelificação. A avaliação biológica de tais hidrogéis para a regeneração de miocárdio infartado de ratos revelou que os hidrogéis de quitosana preparados a partir de soluções de polímero a 1,5% foram perfeitamente incorporados sobre a superfície do epicárdio do coração e apresentaram degradação parcial acompanhada por infiltração de células mononucleares.

Palavras-chave: Quitosana; carboximetilquitosana; genipina; membranas; hidrogéis.

ABSTRACT

FIAMINGO, A. **Physico-chemical and mechanical properties of porous membranes of carboxymethylchitosan and chitosan-based hydrogel for application in tissue engineering.** 2016. 159 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

The aim of this study was to produce and characterize porous membranes of carboxymethylchitosan and chitosan-based hydrogel with physicochemical and mechanical properties appropriate for applications in tissue engineering. For this, chitosans with different degrees of acetylation ($4.0\% < \overline{DA} < 40\%$) and high viscosity average molecular weight ($\overline{M}_v > 750,000 \text{ g mol}^{-1}$) were produced by application of consecutive processes of ultrasound-assisted deacetylation (USAD) of the beta-chitin extracted from squid pens (*Doryteuthis spp.*). The carboxymethylation of extensively deacetylated chitosan (Qs-3; $\overline{DA} = 4\%$) was carried out by reaction with monochloroacetic acid in isopropanol/aqueous NaOH, producing CMQs-0 sample ($\overline{DS} \approx 0.98$; $\overline{M}_v \approx 190,000 \text{ g mol}^{-1}$). The ultrasonic irradiation was employed to depolymerize the CMQs-0 samples by irradiation for 1 h and 3 h, resulting in CMQs-1 samples ($\overline{M}_v \approx 94,000 \text{ g mol}^{-1}$) and CMQs-3 ($\overline{M}_v \approx 43,000 \text{ g mol}^{-1}$), respectively. For the production of crosslinked membranes, genipin was added at different concentrations ($1.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ and $5.0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) in the aqueous solutions of CMQs, which were poured into Petri dishes and the crosslinking reaction proceeded for 24 h. Then, the crosslinked membranes (M-CMQs) were lyophilized, neutralized, washed, and lyophilized again resulting in nine samples which were characterized by crosslinking degree ($\overline{CrD}$), swelling ratio ($\overline{SR}$), morphology, mechanical properties and the susceptibility to enzymatic degradation by lysozyme. The crosslinking degree ($\overline{CrD}$) increased with increasing concentration of genipin used in the reaction, varying from $\overline{CrD} \approx 3.3\%$ (M-CMQs-01) to $\overline{CrD} \approx 17.8\%$ (M-CMQs-35). The SEM analysis showed that the crosslinked membranes M-CMQs are porous structures that have a higher apparent pores density with increasing values of $\overline{M}_v$ and $\overline{CrD}$. However, the membranes prepared from high molecular weight CMQs ($\overline{M}_v > 94,000 \text{ g mol}^{-1}$) and low crosslinked ($\overline{CrD} < 10\%$) showed superior mechanical properties in terms of ultimate tensile strength ($> 170 \text{ kPa}$) and maximum elongation at break ($> 40\%$). However, the more susceptible membrane to enzymatic degradation was prepared from low molecular weight CMQs ($\overline{M}_v \approx 43,000 \text{ g mol}^{-1}$) and low cross-linking degrees ($\overline{CrD} < 11\%$). Stable chitosan hydrogels without any external crosslinking agent was successfully achieved by inducing the gelation of a viscous chitosan solution with aqueous NaOH or gaseous NH_3 . The hydrogels produced from high molecular

weight ($\overline{M}_w \approx 640,000 \text{ g mol}^{-1}$) and extensively deacetylated chitosan ($\overline{DA} \approx 2.8\%$) at polymer concentrations above $\approx 2.0\%$ exhibited improved mechanical properties due to the increase of the chain entanglements and intermolecular junctions. The results also show that the physicochemical and mechanical properties of chitosan hydrogels can be controlled by varying their polymer concentration and by controlling the gelation kinetics, *i.e.* by using different gelation routes. The biological evaluation of such hydrogels for regeneration of infarcted myocardium revealed that chitosan hydrogels prepared from 1.5% polymer solutions was perfectly incorporated onto the epicardial surface of the heart and presented partial degradation accompanied by mononuclear cell infiltration.

Keywords: Chitosan; carboxymethylchitosan; genipin; membranes; hydrogels; scaffold.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura das unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (<i>GlcNAc</i>) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (<i>GlcN</i>).....	31
Figura 2 – Representação da estrutura primária idealizada de quitina, onde “x” corresponde o percentual de unidades <i>GlcN</i> e “y” o percentual de unidades <i>GlcNAc</i> presentes na quitina.	32
Figura 3 – Representação da estrutura primária idealizada de quitosana, onde “x” corresponde o percentual de unidades <i>GlcN</i> e “y” o percentual de unidades <i>GlcNAc</i> presentes na quitosana.	32
Figura 4 – Estrutura da alfa-quitina: (a) projeção do eixo a-c; (b) projeção do eixo b-c; (c) projeção do eixo a-b (Rinaudo, 2006).	33
Figura 5 – Estrutura da beta-quitina: (a) projeção do eixo a-c; (b) projeção do eixo b-c; (c) projeção do eixo a-b (Rinaudo, 2006).	34
Figura 6 – Representação de distribuições idealizadas de unidades <i>GlcNAc</i> e <i>GlcN</i> em cadeias de quitosana (a) em bloco, (b) quitosana extensivamente desacetilada e (c) aleatória.	37
Figura 7 – Representação da estrutura da <i>N,O</i> -carboximetilquitosana, onde n é o grau de polimerização.	40
Figura 8 – Representação da estrutura cardíaca e do pericárdico.....	42
Figura 9 – Representação da estrutura da heparina, onde n é o grau de polimerização.	43
Figura 10 – Representação da estrutura da genipina.	45

Figura 11 – Mecanismo de reticulação de grupamentos <i>GlcN</i> de quitosana ou carboximetilquitosana com genipina em meio ácido (Gonsalves, Melo Araujo <i>et al.</i> , 2011).	46
Figura 12 – Mecanismo de reticulação de grupamentos <i>GlcN</i> de quitosana ou carboximetilquitosana com dimerização da genipina em meio ácido ou neutro (Mi, Shyu <i>et al.</i> , 2005).	47
Figura 13 – Mecanismo de homopolimerização da genipina em meio fortemente alcalino (Mi, Shyu <i>et al.</i> , 2005).	48
Figura 14 – Mecanismo de reticulação de grupamentos <i>GlcN</i> de quitosana ou carboximetilquitosana com genipina em meio fortemente alcalino (Mi, Shyu <i>et al.</i> , 2005).	49
Figura 15 – Conformações dos segmentos de rede de géis de quitosana reticulados com genipina: (a) em condições ácidas e neutras com segmentos de rede de géis de quitosana constituídas apenas por unidades curtas de agente reticulante; (b) em pH 9,0, com segmentos de rede de géis de quitosana constituídas por unidades curtas e longas de agente reticulante e; (c) em condições fortemente básicas, com segmentos de rede de géis de quitosana constituídas apenas por unidades longas de agente reticulante (Mi, Shyu <i>et al.</i> , 2005).	50
Figura 16 – Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação pelo processo DAIUS: (a) 1- ultrassom de alta intensidade, 2- banho termostático, 3- reator de vidro encamisado e sonotrodo, 4- agitador magnético; (b) reator de vidro encamisado.	54
Figura 17 – Espectros na região do infravermelho de beta-quitina e de quitosana (Qs-1).	63
Figura 18 – Espectros na região do infravermelho de filmes finos das amostras de quitosana (Qs-3) e carboximetilquitosana na forma ácida (HCMQs-0) e carboximetilquitosana na forma sódica (NaCMQs-0).	64

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H das amostras Qs-1, Qs-2 e Qs-3 adquiridos a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D ₂ O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).	65
Figura 20 – Ampliação da região de ressonância do hidrogênio H1 ligado ao carbono anomérico no espectro de RMN ^1H da amostra Qs-1 adquirido a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D ₂ O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).	66
Figura 21 – Espectro de RMN ^1H de carboximetilquitosana (CMQs-0) adquirido a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D ₂ O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).	68
Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C quantitativo de carboximetilquitosana (CMQs-3), adquirido a 80°C em D ₂ O utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).	69
Figura 23 – Avaliação do <i>GA</i> e do <i>GPv</i> das quitosanas DAIUS em relação à quitina de partida, sendo $GA_{\text{Rel}} = (GA_{\text{quitosana}})_n / GAB - \text{quitina}$ e $GPv_{\text{Rel}} = (GPv_{\text{quitosana}})_n / GPvB - \text{quitina}$, onde <i>n</i> é o número de processos DAIUS realizado.	71
Figura 24 – Curvas de cromatografia por exclusão de tamanho das quitosanas DAIUS dissolvidas em tampão acetato de amônio 0,15 mol L ⁻¹ / ácido acético 0,20 mol L ⁻¹ (pH = 4.5) em colunas TSK2500 e TSK6000 acopladas em linha com um refractômetro diferencial e espalhamento de luz multi-ângulo.	72
Figura 25 – Reação da ninidrina com grupo amino primário.	76
Figura 26 – Imagens das soluções de (a) CMQs-0 não reticulada e (b) M-CMQs-35 reticulada com 5,0 x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ de genipina, após 24 horas de reticulação.	79

- Figura 27** – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $GA \approx 36,7\%$; Qs-2, $GA \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $GA \approx 4,3\%$)...... 81
- Figura 28** – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $GA \approx 36,7\%$; Qs-2, $GA \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $GA \approx 4,3\%$)...... 82
- Figura 29** – Curvas de hidratação das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $GA \approx 36,7\%$; Qs-2, $GA \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $GA \approx 4,3\%$)...... 83
- Figura 30** – Curvas de hidrólise enzimática das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $DA \approx 36,7\%$; Qs-2, $DA \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $DA \approx 4,3\%$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima. 86
- Figura 31** – Grau médio de reticulação (GR) das membranas M-CMQs-x, onde “x” (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação. A linha sólida fina corresponde ao valor de reticulação teórico..... 88
- Figura 32** – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação..... 90

- Figura 33** – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação..... 91
- Figura 34** – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação..... 92
- Figura 35** – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação..... 93
- Figura 36** – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação..... 94
- Figura 37** – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação..... 95
- Figura 38** – Diâmetro médio dos poros na superfície das membranas reticuladas membranas M-CMQs-x, onde “x” (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação..... 97

Figura 39 – Curvas de hidratação das membranas reticuladas, M-CMQs-0y (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de imersão em PBS.....	98
Figura 40 – Curvas de hidratação das membranas reticuladas, M-CMQs-1y (CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de imersão em PBS.	99
Figura 41 – Curvas de hidratação das membranas reticuladas, M-CMQs-3y (CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de imersão em PBS.	99
Figura 42 – Grau médio de hidratação das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), após 48 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C, em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.	100
Figura 43 – Curvas de resistência mecânica à tração das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) após 24 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C.	101
Figura 44 – Curvas de resistência mecânica à tração das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) após 24 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C.	102
Figura 45 – Curvas de resistência mecânica à tração das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) após 24 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C.	102
Figura 46 – Valores de resistência máxima à tração das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.	103

- Figura 47** – Valores de módulo de elasticidade das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação. 104
- Figura 48** – Valores de percentual de elongação máxima na ruptura das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação. 105
- Figura 49** – Curvas de hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $Mv \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima. 107
- Figura 50** – Curvas de hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $Mv \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima. 107
- Figura 51** – Curvas de hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $Mv \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima. 108
- Figura 52** – Curvas de máxima hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-xy, incubadas por 15 dias em solução de PBS (pH = 7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima, em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação. 108
- Figura 53** – Esquema experimental de gelificação: (a) solução viscosa de quitosana; (b) gelificação induzida por solução de NaOH e; (c) gelificação induzida por vapor de NH₃. 113

Figura 54 – Hidrogéis de quitosana (HQs-z-w) obtidos a partir de diferentes concentrações de solução polimérica (2,0, 3,5 ou 5,0% (g/g)) e gelificados por dois modos deferentes de neutralização ("N" para gelificação induzida por solução de NaOH e "A" para gelificação induzida por vapor de NH ₃).	119
Figura 55 – Estrutura bicamada macroscópica dos hidrogéis: (a) HQs-5,0-A com concentração polimérica inicial de 5,0% (g/g) e (b) HQs-3,5-A com concentração polimérica inicial de 3,5% (g/g), ambos gelificado por vapores de NH ₃	120
Figura 56 – Evolução das curvas SEC normalizadas de eluição em função do tempo de armazenamento dos hidrogéis esterilizados (HQs-3,5-N-St) em água deionizada.	122
Figura 57 – Evolução da massa molar média ponderal (M_w) em função ao tempo de armazenamento dos hidrogéis de quitosana não esterelizados (HQs-3,5-N) e esterilizados (HQs-3,5-N-St) em água deionizada.	123
Figura 58 – Espessuras do hidrogel de quitosana (HQs-2,0-N) em função dos diferentes cortes radiais.	124
Figura 59 – Espessuras no centro dos hidrogéis em função das massas de géis adicionadas às placas de Petri (diâmetro de 3,5 cm). A linha contínua representa a estimativa teórica da espessura na ausência de encolhimento e efeito menisco ("□" é a densidade da água, "R" é o raio da placa de Petri, "g" é a massa de solução de quitosana adicionada).	125
Figura 60 – Variação da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) nos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois de esterilizados (HQs-N-St e HQs-A-St) em função da concentração polimérica nas soluções iniciais ($[Quitosana]_{Sol}$).	127
Figura 61 – Variação de G' e G'' em função da frequência para o hidrogel de quitosana HQs-2,0-N.	128

Figura 62 – Influência da concentração polimérica das soluções iniciais ($[Quitosana]_{Sol}$) no módulo de armazenamento no equilíbrio (G_e) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).	129
Figura 63 – Influência da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) no módulo de armazenamento no equilíbrio (G_e) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).	130
Figura 64 – Curvas de resistência mecânica à tração dos hidrogéis físicos de quitosana HQs-N à temperatura ambiente.	131
Figura 65 – Curva de resistência mecânica à tração do hidrogel HQs-5,0-N à temperatura ambiente, e as imagens dos estágios específicos destacados no ensaio de tração: estágios 1 e 2, início da rampa de força com a elongação; estágios 3 e 4, formação de gotas de água visíveis na superfície do corpo de prova; e estágio 5, ruptura do corpo de prova.	133
Figura 66 – Curvas de resistência mecânica à tração dos hidrogéis físicos de quitosana HQs-A à temperatura ambiente.	134
Figura 67 – Curva de resistência mecânica à tração do hidrogel HQs-5,0-A à temperatura ambiente, e a imagem dos estágios específicos destacados do ensaio de tração: estágios 1 e 2, início da rampa de força com a elongação; estágios 3 e 4, fratura da camada interna do hidrogel; e estágio 5, ruptura do corpo de prova.	135
Figura 68 – Resistência máxima à tração em função da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).	136
Figura 69 – Elongação máxima na ruptura em função da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).	137

Figura 70 – Módulo de elasticidade em função da concentração polimérica final ([Quitosana] _{Hidrogel}) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).	138
Figura 71 – Curva de resistência mecânica à sutura do hidrogel HQs-3,5-N à temperatura ambiente, e imagens dos estágios específicos destacados no ensaio de tração: estágios 1 e 2, início da rampa de força com a elongação; estágios 3 e 4, início do rasgo na sutura; e estágio 5, ruptura do corpo de prova.	139
Figura 72 – Curvas de resistência mecânica à sutura em função da espessura dos hidrogéis HQs-3,5-N e HQs-3,5-A à temperatura ambiente.	140
Figura 73 – Resistência máxima à sutura normalizada em função da concentração polimérica final ([Quitosana] _{Hidrogel}) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).	141
Figura 74 – Avaliação da biocompatibilidade cardíaca de hidrogéis de quitosana.	143
Figura 75 – A avaliação da função cardíaca do modelo infartado (a) do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) e (b) da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE,%) dos hidrogéis HQs-2,0-N-St e HQs-1,5-N-St.	144

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Distribuição das frequências de díades (F) e padrão de acetilação (PA) das quitosanas DAIUS determinadas a partir dos espectros de RMN ^1H adquiridos a 80°C em solução aquosa (1% $\text{HCl/D}_2\text{O}$) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz)..... 67
- Tabela 2** – Valores de grau médio de acetilação (GA), viscosidade intrínseca ($[\eta]$), massa molar média viscosimétrica (M_v), massa molar média ponderal (M_w), índice de dispersividade ($\bar{D}$) grau médio de polimerização viscosimétrico (GP_v) e grau médio de polimerização ponderal (GP_w) das amostras de quitina e quitosana..... 70
- Tabela 3** – Valores de grau médio de acetilação (GA), grau médio de substituição (GS) viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar média viscosimétrica (M_v) das amostras de carboximetilquitosana. 73
- Tabela 4** – Valores de grau médio de acetilação (GA), massa molar média viscosimétrica (M_v) e grau médio de hidratação (GH) após 12 h de imersão em PBS das membranas de quitosana. 84
- Tabela 5** – Valores de grau médio de acetilação (GA), resistência máxima à tração, módulo de elasticidade e elongação máxima à ruptura das membranas de quitosana..... 84
- Tabela 6** – Grau médio de reticulação (GR) das membranas de M-CMQs-xy de acordo com a massa molar média viscosimétrica (M_v) da carboximetilquitosana de partida e da concentração de genipina utilizada na reação de reticulação. 87
- Tabela 7** – Diâmetro médio dos poros (DP) e número médio de poros (NP) das membranas M-CMQs-xy de acordo com a massa molar viscosimétrica (M_v) da carboximetilquitosana de partida (CMQs-x) e da concentração de genipina utilizada. 96

LISTA DE SIGLAS

CMQs	Carboximetilquitosana
CMQs-0	Carboximetilquitosana não despolimerizada
CMQs-1	Carboximetilquitosana despolimerizada por 1 hora de irradiação de ultrassom de alta intensidade
CMQs-3	Carboximetilquitosana despolimerizada por 3 horas de irradiação de ultrassom de alta intensidade
C_p	Concentração polimérica
D	Índice de dispersividade
DAIUS	Desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade
FEVE	Fração de ejeção do ventrículo esquerdo
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
$\overline{GA}$	Grau médio de acetilação
$GlcNAc$	2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose
$GlcN$	2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose
$\overline{GS}$	Grau médio de substituição
HQs	Hidrogel de quitosana
HQs-z-w-St	Hidrogel de quitosana, onde “z” representa a concentração de quitosana nas soluções utilizadas durante a preparação do hidrogel ($C_p = 1,0, 1,5, 2,0, 3,5$ e $5,0\%$), “w” descreve o processo de gelificação (“N” para gelificação induzida por solução de NaOH e “A” para gelificação induzida por vapor de NH_3), enquanto “St” indica a realização do processo de esterilização.

HQs-A	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana por vapor de NH_3 .
HQs-N	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana por solução de NaOH.
HQs-1,0-A-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 1,0% por vapor de NH_3 , e posteriormente esterilizado.
HQs-1,5-A-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 1,5% por vapor de NH_3 , e posteriormente esterilizado.
HQs-2,0-A-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 2,0% por vapor de NH_3 , e posteriormente esterilizado.
HQs-3,5-A-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 3,5% por vapor de NH_3 , e posteriormente esterilizado.
HQs-5,0-A-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 5,0% por vapor de NH_3 , e posteriormente esterilizado.
HQs-1,0-N-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 1,0% por solução de NaOH, e posteriormente esterilizado.
HQs-1,5-N-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 1,5% por solução de NaOH, e posteriormente esterilizado.
HQs-2,0-N-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 2,0% por solução de NaOH, e posteriormente esterilizado.
HQs-3,5-N-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 3,5% por solução de NaOH, e posteriormente esterilizado.
HQs-5,0-N-St	Hidrogel de quitosana produzida a partir da gelificação da solução de quitosana 5,0% por solução de NaOH, e posteriormente esterilizado.
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M-CMQs	Membrana de carboximetilquitosana

M-CMQs-xy	Membrana de carboximetilquitosana, onde “x” corresponde a 0, 1 ou 3 para identificar as 3 amostras de CMQs (CMQs-0, CMQs-1 e CMQs-3), enquanto “y” corresponde a 1, 3 ou 5 para identificar a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reação de reticulação.
M-CMQs-00	Membranas de carboximetilquitosana não despolimerizada e não reticulada
M-CMQs-01	Membranas de carboximetilquitosana não despolimerizada, reticulada com $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-03	Membranas de carboximetilquitosana não despolimerizada, reticulada com $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-05	Membranas de carboximetilquitosana não despolimerizada, reticulada com $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-10	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 1 hora de irradiação de ultrassom de alta intensidade e não reticulada
M-CMQs-11	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 1 hora de irradiação de ultrassom de alta intensidade, reticulada com $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-13	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 1 hora de irradiação de ultrassom de alta intensidade, reticulada com $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-15	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 1 hora de irradiação de ultrassom de alta intensidade, reticulada com $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-30	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 3 horas de irradiação de ultrassom de alta intensidade e não reticulada
M-CMQs-31	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 3 horas de irradiação de ultrassom de alta intensidade, reticulada com $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina

M-CMQs-33	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 3 horas de irradiação de ultrassom de alta intensidade, reticulada com $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-CMQs-35	Membranas de carboximetilquitosana despolimerizado por 3 horas de irradiação de ultrassom de alta intensidade, reticulada com $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina
M-Qs	Membranas de quitosana DAIUS
M-Qs-1	Membranas de quitosana produzida pela aplicação do processo DAIUS por apenas uma vez
M-Qs-2	Membranas de quitosana produzida pela aplicação do processo DAIUS por duas vezes consecutivas
M-Qs-3	Membranas de quitosana produzida pela aplicação do processo DAIUS por três vezes consecutivas
$\overline{M}_v$	Massa molar média viscosimétrica
$\overline{M}_w$	Massa molar média ponderal
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca
PBS	Tampão salino fosfato (pH 7,4)
Qs	Quitosana
Qs-1	Quitosana produzida pela aplicação do processo DAIUS por apenas uma vez
Qs-2	Quitosana produzida pela aplicação do processo DAIUS por duas vezes consecutivas
Qs-3	Quitosana produzida pela aplicação do processo DAIUS por três vezes consecutivas
RMN ^1H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³ C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanho
VDFVE	Volume diastólico final do ventrículo esquerdo
VSFVE	Volume sistólico final do ventrículo esquerdo
[Genipina]	Concentração de genipina empregada na etapa de reticulação
[Quitosana] _{Sol}	Concentração de quitosana nas soluções iniciais
[Quitosana] _{Hidrogel}	Concentração de quitosana nos hidrogéis produzidos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	31
1.1	Quitina e Quitosana	31
1.2	Hidrogéis de Quitosana.....	38
1.3	Carboximetilquitosana	40
1.4	Reticulação.....	44
2	OBJETIVOS	52
PARTE 1 – Quitosana DAIUS e carboximetilquitosana		
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
3.1	Beta-quitina.....	53
3.2	Quitosana DAIUS	53
3.3	Carboximetilquitosana e Pós-tratamento de Despolimerização	54
3.4	Caracterizações	55
3.4.1	Espectroscopia no Infravermelho	55
3.4.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C)	56
3.4.3	Determinação da Massa Molar Média.....	59
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	62
4.1	Espectroscopia no Infravermelho	62
4.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C)	64
4.3	Massa Molar Média Viscosimétrica (M_v) e Ponderal (M_w).....	69

5	CONCLUSÃO: PARTE 1	74
---	--------------------------	----

PARTE 2 – Membranas porosas de quitosana e carboximetilquitosana

6	MATERIAIS E MÉTODOS.....	75
6.1	Membranas de Quitosana (M-Qs).....	75
6.2	Membranas Reticuladas de Carboximetilquitosana (M-CMQs)	75
6.3	Determinação do Grau de Reticulação	76
6.4	Grau de Hidratação	77
6.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	77
6.6	Propriedades Mecânicas de Tração.....	78
6.7	Degradação Enzimática	78
7	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	79
7.1	Membranas de Quitosana.....	80
7.1.1	Morfologia e Grau Médio de Hidratação	80
7.1.2	Propriedades Mecânicas	84
7.1.3	Degradação Enzimática	85
7.2	Membranas de Carboximetilquitosana	87
7.2.1	Grau Médio de Reticulação e Morfologia	87
7.2.2	Grau Médio de Hidratação	97
7.2.3	Propriedades Mecânicas	101
7.2.4	Degradação Enzimática	106
8	CONCLUSÃO: PARTE 2.....	110

PARTE 3 – Hidrogéis de Quitosana

9	MATERIAIS E MÉTODOS.....	111
---	--------------------------	-----

9.1	Quitosana	111
9.2	Caracterização Quitosana.....	111
9.3	Preparação dos Hidrogéis	112
9.4	Esterilização	113
9.5	Teste de Armazenamento.....	114
9.6	Concentração Polimérica	114
9.7	Análises Reológicas	115
9.8	Propriedades Mecânicas de Tração.....	115
9.9	Teste de Sutura.....	115
9.10	Estudo <i>in vivo</i>	116
9.11	Avaliação da Função Ventricular Esquerda	117
9.12	Avaliação Histológica	117
10	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	118
10.1	Teste de Armazenamento	121
10.2	Espessura dos Hidrogéis e Testes de Concentração Polimérica Final	123
10.3	Análises Reológicas	128
10.4	Propriedades Mecânicas de Tração	131
10.1	Teste de Sutura.....	138
10.1	Estudo <i>in vivo</i>	142
11	CONCLUSÃO: PARTE 3.....	146
12	CONSIDERAÇÕES FINAIS	Erro! Indicador não definido.
13	PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS.....	148
14	REFERÊNCIAS	149

APRESENTAÇÃO

Com a finalidade de facilitar a leitura e a compreensão e destacar os principais resultados obtidos neste trabalho, a tese foi dividida em três partes:

PARTE 1 – Quitosanas DAIUS e carboximetilquitosanas

Nesta parte são discutidos os resultados da produção e caracterização de quitosanas DAIUS, obtidas a partir da desacetilação de beta-quitina pelo processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS). Amostra de *N,O*-carboximetilquitosana foi obtida a partir da reação de carboximetilação da quitosana DAIUS, e o tratamento com irradiação de ultrassom de alta intensidade levou à produção de carboximetilquitosanas parcialmente despolimerizadas, *i.e.* com massas molares médias inferiores à amostra de partida.

PARTE 2 – Membranas porosas de quitosana e carboximetilquitosana

Nesta parte são apresentados os resultados da produção e caracterização de membranas porosas de quitosana fisicamente reticuladas e de carboximetilquitosana reticuladas com genipina. As membranas de carboximetilquitosana foram produzidas pela utilização de três carboximetilquitosanas de diferentes massas molares médias, e reticuladas por três diferentes concentrações de genipina, com o objetivo de avaliar o efeito da massa molar média e do grau de reticulação nas propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas de carboximetilquitosana.

Todos os resultados obtidos nas partes 1 e 2 foram desenvolvidos no **laboratório de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo** sob a orientação do Prof. Dr. Sergio Paulo Campana Filho.

PARTE 3 – Hidrogéis de quitosana

Nesta parte são apresentados os resultados de produção e caracterização de hidrogéis físicos de quitosana, *i.e.* preparados sem o uso de qualquer agente de reticulação externo a partir da gelificação de soluções aquosas de quitosana pela neutralização com solução aquosa de NaOH ou vapor de NH₃. Os hidrogéis foram produzidos a partir da variação da concentração polimérica ($1,0\% < C_p < 5,0\%$) e do modo de gelificação, com o objetivo de avaliar seu efeito nas propriedades físico-químicas e mecânicas dos hidrogéis. A partir dos resultados destas análises foram escolhidos dois hidrogéis que foram submetidos a testes biológicos *in vivo*, com o objetivo de avaliar a capacidade de regeneração de miocárdio infartado em modelo de ratos.

Todos os resultados físico-químicos e mecânicos obtidos nesta terceira parte foram desenvolvidos no laboratório de **Ingénierie des Matériaux Polymères** na **Université Claude Bernard Lyon 1** – França sob a supervisão do Prof. Dr. Laurent David e os testes biológicos *in vivo* foram realizados pela equipe do Dr. Onnik Agbulut no **Hôpital Européen Georges Pompidou, Department of Cardiology** na **Université Sorbonne Paris Cité** – França, durante o Doutorado-Sanduiche realizado no período de setembro/2013 a agosto/2014.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Quitina e Quitosana

Quitina e quitosana são polissacarídeos lineares constituídos por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (*GlcNAc*) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (*GlcN*) (**Figura 1**), unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4), sendo a quitina constituída predominantemente por unidades *GlcNAc* (**Figura 2**) e a quitosana constituída predominantemente por unidades *GlcN* (**Figura 3**) (Campana-Filho, Britto *et al.*, 2007).

Figura 1 – Representação da estrutura das unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose (*GlcNAc*) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose (*GlcN*).

Figura 2 – Representação da estrutura primária idealizada de quitina, onde “x” e “y” ($x < y$) correspondem às frações de unidades *GlcN* e *GlcNAc*, respectivamente.

Figura 3 – Representação da estrutura primária idealizada de quitosana, onde “x” e “y” ($x > y$) correspondem às frações de unidades *GlcN* e *GlcNAc*, respectivamente.

Quitina é abundantemente encontrada na natureza, principalmente nos exoesqueletos de artrópodes, cefalópodes e nas paredes celulares de fungos, sendo as principais fontes para a obtenção industrial de quitina, as cascas de camarões e as carapaças de caranguejos (Roberts, 1992). Quitina, é um polímero semicristalino, cujas cadeias se organizam em folhas (ou lamelas) dispostas paralelamente umas às outras nos domínios cristalinos, sendo encontrada em uma de suas duas principais polimorfos, nomeadas alfa- e beta-quitina (Rinaudo, 2006).

A cadeia de quitina apresenta dois tipos de extremidades, uma redutora e uma não-redutora, sendo a disposição relativa das cadeias de quitina nas folhas o que diferencia as suas polimorfos (**Figura 4 e 5**). Na beta-quitina as cadeias poliméricas se orientam paralelamente (cadeias orientadas no mesmo sentido, da extremidade redutora à não-redutora) e anti-paralelamente em alfa-quitina. Em ambas as polimorfos (alfa- ou beta-), as cadeias de quitina são organizadas em folhas dispostas paralelamente umas às outras.

A estrutura da alfa-quitina decorre da disposição anti-paralela das cadeias do polímero (**Figura 4b**) favorecendo o estabelecimento de inúmeras ligações hidrogênio intra e intermoleculares, resultando em empacotamento denso.

Figura 4 – Estrutura da alfa-quitina: (a) projeção do eixo a-c; (b) projeção do eixo b-c; (c) projeção do eixo a-b (Rinaudo, 2006).

Na beta-quitina a disposição paralela das cadeias poliméricas (**Figura 5b**) prejudica o estabelecimento de ligações hidrogênio inter-folhas, resultando em um empacotamento menos denso e mais susceptível à solvatação quando comparado com alfa-quitina.

Figura 5 – Estrutura da beta-quitina: (a) projeção do eixo a-c; (b) projeção do eixo b-c; (c) projeção do eixo a-b (Rinaudo, 2006).

A polimorfa mais estável e mais abundante é a alfa-quitina, sendo encontrada principalmente em estruturas que demandam grande resistência mecânica, como os exoesqueletos de animais invertebrados. Nestes organismos, alfa-quitina se encontra combinada com proteínas, sais minerais e pigmentos. Já a forma beta-quitina é encontrada em estruturas que requerem maior flexibilidade, por exemplo, gládios de moluscos e larvas de moscas (Roberts, 1992).

O processo de extração de alfa-quitina a partir de cascas de camarões e carapaças de caranguejos envolve tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que as acompanham. Estas etapas se destinam a eliminar carbonatos e fosfato de cálcio e/ou magnésio, proteínas e os pigmentos contidos na biomassa. Entretanto, na extração da beta-quitina a partir de gládios de moluscos, apenas a etapa destinada a eliminar proteínas se

faz necessária para a extração do polímero, pois nessas biomassas há quantidades muito baixas de sais minerais e pigmentos (Campana-Filho, Britto *et al.*, 2007).

Os procedimentos mais utilizados para a extração da alfa-quitina geralmente compreendem a utilização de soluções ácidas na desmineralização, que tem por finalidade a eliminação dos sais minerais, e de soluções alcalinas na etapa de desproteínização, o que resulta na eliminação das proteínas. Em geral, a eliminação dos pigmentos ocorre via extração por solventes orgânicos, mas procedimentos de oxidação também podem ser empregados. No entanto, independentemente dos procedimentos executados para extrair quitina da biomassa e de sua sequência, as condições reacionais empregadas nessas etapas devem ser brandas, no sentido de evitar a degradação do polímero (Al Sagheer, Al-Sughayer *et al.*, 2009).

A reação de conversão de quitina em quitosana é denominada como reação de *N*-desacetilação, visto que os grupamentos acetamido das unidades *GlcNAc* de quitina são hidrolisados a grupos amino, gerando unidades *GlcN*. A composição de quitosana é variável em função das condições empregadas na reação de *N*-desacetilação, sendo o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) definido como a fração média de unidades *GlcNAc* presentes nas cadeias de quitina e quitosana.

A massa molar média, o grau médio de acetilação e a distribuição das unidades *GlcNAc* e *GlcN* nas cadeias, que é expressa pelo parâmetro de acetilação, afetam as propriedades físico-químicas da quitosana, tais como solubilidade e viscosidade, além de suas atividades biológicas, tais como citotoxicidade, atividade antimicrobiana, biodegradabilidade e biocompatibilidade (Brugnerotto, Lizardi *et al.*, 2001). O valor de $\overline{GA}$ e a solubilidade são usados como critérios para diferenciar quitina e quitosana. Assim, quitosanas ($\overline{GA} < 40\%$) são solúveis em soluções aquosas de ácidos diluídos enquanto quitina ($\overline{GA} > 80\%$) é insolúvel nesses meios e na maioria dos solventes orgânicos, sendo solúvel apenas em poucos solventes, como *N,N*-dimetilacetamida / LiCl (Terbojevich, Carraro *et al.*, 1988). A solubilidade da quitosana em soluções aquosas de ácidos diluídos está diretamente relacionada com $\overline{GA}$, pois este parâmetro define a quantidade média de grupos amino nas cadeias disponíveis para protonação (Agulló, Peniche *et al.*, 2004) e, assim, a presença de numerosos grupos amônio resulta em forte repulsão eletrostática entre as cadeias, favorecendo a solubilização em meios ácidos diluídos. Entretanto, a massa molar e a distribuição de unidades *GlcNAc* e *GlcN* ao longo das cadeias também afetam a solubilidade de quitosana.

A *N*-desacetilação de quitina raramente é completa, *i.e.* geralmente restam unidades *GlcNAc* não hidrolisadas, e quitosanas, exceto aquelas extensivamente desacetiladas ($\overline{GA} < 5 \%$), são copolímeros com diferentes graus médios de acetilação e com diferentes distribuições de unidades *GlcNAc* e *GlcN*. Embora processos enzimáticos e químicos promovam a desacetilação de quitina, os processos químicos são os mais empregados, predominantemente em condições heterogêneas, gerando quitosanas com características não-uniformes e propriedades não reprodutíveis. De fato, a desacetilação parcial da quitina sob condições heterogêneas, por exemplo, por tratamento do polissacarídeo com excesso de solução aquosa de NaOH 40% em temperatura elevada ($> 100^{\circ}\text{C}$), ocorre preferencialmente nas regiões amorfas, resultando em copolímeros em bloco (**Figura 6a**), *i.e.* quitosanas com sequências de unidades *GlcNAc* intercaladas por sequências de unidades *GlcN*. Nessas condições, se a reação é prolongada, os domínios cristalinos são parcialmente acessíveis e o produto final conterá cadeias poliméricas desacetiladas em diferentes extensões e, portanto, exibindo diferentes solubilidades. Quando a desacetilação heterogênea de quitina resulta em $\overline{GA} \approx 50 \%$, a quitosana é apenas parcialmente solúvel em meio ácido. Entretanto se quitosana extensivamente desacetilada (**Figura 6b**) (Sashiwa, Saimoto *et al.*, 1993) for *N*-acetilada em condições homogêneas até atingir $\overline{GA} \approx 50 \%$, predomina a distribuição aleatória de unidades *GlcNAc* e *GlcN* (**Figura 6c**) e o produto é solúvel em meio aquoso ácido, e mesmo em condições próximas da neutralidade.

Figura 6 – Representação da distribuição idealizada de unidades *GlcNAc* e *GlcN* em cadeias de quitosana (a) em bloco, (b) quitosana extensivamente desacetilada e (c) aleatória.

A distribuição das unidades *GlcNAc* e *GlcN* ao longo das cadeias de quitosana é caracterizada pelo parâmetro de acetilação (*PA*), utilizando o modelo estatístico de Bernoulli (Kumirska, Weinhold *et al.*, 2009). O valor de *PA* pode ser determinado por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e/ou carbono (RMN ^{13}C) (Vårum, Antohonsen *et al.*, 1991), sendo seus valores associados às distribuições ideais em bloco ($PA = 0$), aleatória ($PA = 1$) ou alternada ($PA = 2$).

O grau médio de acetilação e seu padrão também afetam a degradação da quitosana *in vivo*, que ocorre principalmente pela ação da enzima lisozima, presente em tecidos e fluidos corpóreos, e resulta na liberação de oligômeros e monômeros. Segundo Nordtveit, Vårum *et al.* (1994) e Aiba (1992), lisozima tem ação específica em unidades acetiladas, sendo a velocidade de degradação proporcional à frequência de díades acetiladas (porcentagem de unidades *GlcNAc* vizinhas a outra unidade *GlcNAc*). Assim, quitosanas extensivamente desacetiladas apresentam baixa velocidade de degradação enzimática, enquanto quitosanas com altos percentuais de díades *GlcNAc/GlcNAc* são rapidamente degradadas.

Para a obtenção de quitosanas extensivamente desacetiladas ($\overline{GA} < 5\%$), a reação de desacetilação, que geralmente é realizada em meio fortemente alcalino sob condições heterogêneas, elevadas temperaturas e longos tempos de reação (Campana-Filho e Signini, 2001), deve ser executada repetidamente, o que resulta em quitosanas acentuadamente despolimerizadas (Lamarque, Viton *et al.*, 2004). Vários métodos têm sido propostos para aumentar a eficiência da reação e para minimizar a ocorrência de despolimerização, tais como a realização de reações em atmosfera inerte (Campana-Filho e Signini, 2002), utilização de extrusão reativa (Rogovina, Akopova *et al.*, 1998), utilização de irradiação por ultrassom (Campana Filho, Signini *et al.*, 2002), e de micro-ondas (Sahu, Goswami *et al.*, 2009). Recentemente, Delezuk, Cardoso *et al.* (2011) desenvolveram um novo processo, denominado processo DAIUS, desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade, que permite que a reação seja executada em temperaturas moderadas ($< 80^{\circ}\text{C}$) e tempos curtos (< 60 min.), gerando quitosanas, inclusive amostras extensivamente desacetiladas, de elevada massa molar e baixa dispersividade.

1.2 Hidrogéis de Quitosana

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros capazes de reter grande quantidade de água sem se dissolver, podendo apresentar variadas funções nos campos da Medicina e na Engenharia de Tecidos, sendo aplicados em enxertos, veículos de entrega de moléculas bioativas, e/ou estruturas tridimensionais que organizam e estimulam o crescimento de células dirigidas à formação e/ou restauração de um tecido específico (Drury e Mooney, 2003).

Hidrogéis físicos baseados em quitosana têm sido amplamente estudados por suas propriedades biológicas interessantes e sua potencial aplicação nas áreas biomédicas e farmacêuticas, sendo a gelificação física e/ou química da quitosana amplamente relatadas na literatura (Roberts e Taylor, 1989; Draget, Varum *et al.*, 1992; Vachoud, Zydowicz *et al.*, 1997; Montembault, Viton *et al.*, 2005; 2005).

Os hidrogéis à base de quitosana termo-reativos e/ou foto-reticuláveis mostraram a capacidade de libertação controlada de células estaminais (Wang, Shi *et al.*, 2014) e vários fatores de crescimento (Ishihara, Obara *et al.*, 2003; Obara, Ishihara *et al.*, 2003; Fujita,

Ishihara *et al.*, 2005), atuando como novos transportadores e induzindo a vascularização *in vivo*.

Montembault, Viton *et al.* (2005) propuseram que os hidrogéis físicos de quitosana resultam do estabelecimento de ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas quando o equilíbrio crítico entre interações hidrofílicas / hidrofóbicas é atingido. Este equilíbrio é dependente de vários parâmetros tais como grau médio de acetilação e densidade de carga aparente da quitosana, constante dielétrica do solvente, viscosidade do meio e temperatura.

O primeiro hidrogel físico à base de quitosana, *i.e.* preparado sem a utilização de qualquer agente de reticulação, foi descrito por Hirano, Kondo *et al.* (1975) durante a *N*-acilação homogênea de quitosana com vários anidridos em meio hidro-alcoólico. Em seguida, Moore e Roberts (1980) também estudaram a gelificação de quitosana por tratamento com anidridos, propondo que o processo de gelificação era devido à diminuição progressiva da solubilidade do polímero, como consequência da diminuição da densidade de carga provocada pela *N*-acilação.

Posteriormente, Montembault, Tahiri *et al.* (2006) e Ladet, Tahiri *et al.* (2011) descreveram a utilização de hidrogéis físicos de quitosana na regeneração de tecido e cartilagem *in vitro*. Tais hidrogéis de quitosana foram preparados mediante neutralização de soluções e/ou gel de quitosana com vapor de amônio e/ou solução aquosa de NaOH. Fragmentos destes hidrogéis foram misturados com condrócitos de coelho (ou humano), resultando na proliferação celular (Montembault, Tahiri *et al.*, 2006). Empregando estratégia diferente, Ladet, Tahiri *et al.* (2011) produziram hidrogéis de quitosana constituídos por muitas membranas separadas por *gaps* visando à colonização e proliferação de condrócitos. Em ambas as abordagens, foram observados que o fenótipo dos condrócitos foi preservado após 45 dias de incubação e as células foram envolvidas por uma matriz de proteínas de tipo cartilagem funcional. De fato, tais resultados sugerem que devido à semelhança com a matriz celular, os hidrogéis físicos de quitosana atuam como chamarizes biológicos (*biological decoy*), sendo que as células se fixam à superfície do hidrogel, promovendo sua colonização e favorecendo a proliferação celular.

1.3 Carboximetilquitosana

Os grupos amino das unidades *GlcN* de quitosana só são protonados quando $\text{pH} < \text{pK}_a \approx 6,5$, o que leva à solubilização do polímero somente em soluções diluídas moderadamente ácidas. Assim, em soluções com $\text{pH} > 6,5$, quitosana não é solúvel, e no sentido de superar essa limitação quanto à solubilidade, diferentes derivados de quitosana têm sido preparados e estudados, por exemplo, pela execução de reações de carboximetilação, quaternização, acilação, alquilação, entre outras (Roberts, 1992; Ledung, Milas *et al.*, 1994; De Abreu e Campana, 2009).

Os sítios reativos para a carboximetilação de quitosana são os grupos amino e hidroxilas de suas unidades estruturais, sendo que a seleção do reagente acilante (ácido glioxílico ou ácido monocloroacético) e das condições reacionais permite a preparação de *N*-, *O*-, *N,N*- ou *N,O*-carboximetilquitosana (**Figura 7**) (Chen, X.-G. e Park, H.-J., 2003; Rabea, Badawy *et al.*, 2003).

Figura 7 – Representação da estrutura da *N,O*-carboximetilquitosana, onde *n* é o grau de polimerização.

Uma das vantagens dos derivados carboximetilados sobre a quitosana é que a exploração da maioria das atividades biológicas da quitosana em aplicações se limita a meios ácidos ($\text{pH} \leq 6,5$) enquanto a carboximetilquitosana, que também apresenta atividades biológicas, é solúvel em amplo intervalo de pH , ampliando as possibilidades de aplicações (Chen, Du *et al.*, 2003; Chen, X. G. e Park, H. J., 2003; De Abreu e Campana, 2009; Upadhyaya, Singh *et al.*, 2013). Assim, carboximetilquitosana apresenta elevado potencial para aplicações em Engenharia de Tecidos e áreas biomédicas, principalmente na aplicação

para a redução das aderências pericárdicas, devido à suas propriedades físico-químicas, como a capacidade de formar géis (Chen, Wu *et al.*, 2004; Lin, Liang *et al.*, 2005), e biológicas tais como biocompatibilidade (Chen, Wang *et al.*, 2002), biodegradabilidade, baixa imunogenicidade (Fu, Han *et al.*, 2011), atividade antimicrobiana (Liu, Guan *et al.*, 2001; Kim, Thomas *et al.*, 2003; Rabea, Badawy *et al.*, 2003; Liu, Wang *et al.*, 2012), atividade antioxidante (Sun, Zhou *et al.*, 2007; Zhao, Huang *et al.*, 2011).

As aderências pericárdicas são decorrentes de intervenções cirúrgicas sobre o coração e os grandes vasos. Inúmeros problemas médicos são relatados como consequência da existência e da severidade das aderências pós-cirúrgicas, as quais dificultam futuras abordagens e adicionam maior morbidade e mortalidade às reoperações (Garrett e Matthews, 1989; Seeger, Kaelin *et al.*, 1997; Bennett, Melanson *et al.*, 2003; Lopes, Dallan *et al.*, 2009).

O pericárdio é membrana que envolve e protege o coração (**Figura 8**), sendo formada pelo pericárdio parietal (membrana externa) e o pericárdio visceral (a parte interna), enquanto e entre estas duas membranas encontra-se a cavidade pericárdica que contém o líquido pericárdico, o qual atua como lubrificante entre as membranas. Nas cirurgias cardiovasculares, para ter acesso ao coração, o pericárdio é lesionado e há perda do líquido pericárdico. Durante o processo de reparo do pericárdio há o acúmulo de fibrina, levando à formação de conexões entre as superfícies cruentas das lâminas parietais e viscerais do pericárdio, as quais são denominadas de bandas aderentes, sendo que tais bandas sofrem infiltração de fibroblastos, deposição de colágeno e neovascularização, resultando em aderências firmes e de difícil manipulação (Nkere, Whawell *et al.*, 1994).

Figura 8 – Representação da estrutura cardíaca e do pericárdio.

Fonte: <http://www.medicinageriatrica.com.br/tag/pericardio/>

Vários métodos têm sido investigados para prevenir ou diminuir a gravidade das aderências pós-cirúrgicas (Smith, 1968; Gallo, Artinano *et al.*, 1982; Milgalter, Uretzky *et al.*, 1985; Vandersalm, Okike *et al.*, 1986), mas apenas após a utilização dos polímeros sintéticos ou dos biopolímeros é que os resultados se tornaram mais consistentes e reprodutíveis (Duncan, Yaacobi *et al.*, 1988; Seeger, Kaelin *et al.*, 1997; Krause, Zazanis *et al.*, 2001; Lopes, Dallan *et al.*, 2009).

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

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

Krause, Zazanis *et al.* (2001) descreveram, pela primeira vez, o uso do gel de *N,O*-carboximetilquitosana na prevenção das aderências pericárdicas, sendo que tal estudo

demonstrou a acentuada redução de aderências pós-cirúrgicas em modelo de grandes animais, sem efeitos colaterais indesejáveis.

A redução das aderências pericárdicas deve-se, provavelmente, à semelhança estrutural entre carboximetilquitosana e heparina (**Figura 9**), um glicosaminoglicano sulfatado que estabiliza a família de fatores de crescimento ligados a heparina (*heparin-binding growth factors*, HBGF) e estimula o crescimento celular. Masuoka, Ishihara *et al.* (2005) demonstraram que quitosana apresenta a capacidade de estabilizar o fator de crescimento fibroblástico básico (*bFGF-2*) e de reduzir sua degradação.

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

Lopes, Dallan *et al.* (2010) propuseram o uso de uma solução aquosa viscosa de carboximetilquitosana na qual foi disperso o fator de crescimento de queratinócitos (*KGF*) para reduzir a gravidade das aderências pericárdicas pós-operatórias em modelo de grande animal, observando que isoladamente, tanto a carboximetilquitosana como fator de crescimento de queratinócitos levaram à significativa redução das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas, mas a interação sinérgica entre os dois resultou em expressivas reduções das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas em modelo de grandes animais. Entretanto, a aplicação de soluções e/ou gel de carboximetilquitosana está limitada apenas a procedimentos cirúrgicos que não necessitem de dreno pós-cirúrgico, pois em procedimentos que exigem a necessidade de dreno, a solução e/ou gel de carboximetilquitosana será totalmente drenada pelo organismo dentro de poucos dias, o que limita severamente sua eficácia na redução das aderências pericárdicas. Assim, o desenvolvimento de membranas ou filmes estáveis de carboximetilquitosana é um importante avanço na direção de sua aplicação para a prevenção de aderências pericárdicas.

1.4 Reticulação

O desenvolvimento de membranas autossustentadas que apresentem características físico-químicas e mecânicas apropriadas se faz necessário para ampliar a gama de aplicações de carboximetilquitosana em Engenharia de Tecidos e em procedimentos cirúrgicos. Para isso, carboximetilquitosana pode ser estabilizada por diferentes métodos de reticulação *via* reação com glutaraldeído (Liu, Huang *et al.*, 2007), epícloridrina (Demarchi, Debrassi *et al.*, 2014), 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (Lu, G., Kong, L. *et al.*, 2007; Lu, Sheng *et al.*, 2009; Reves, Bumgardner *et al.*, 2013), e genipina (Reves, Bumgardner *et al.*, 2013; Bao, Chen *et al.*, 2014), com o objetivo de controlar as propriedades físico-químicas e criar uma rede polimérica estável. Entretanto, agentes de reticulação sintéticos são altamente citotóxicos, apresentando baixa biocompatibilidade (Speer, Chvapil *et al.*, 1980). Assim, para aplicações biomédicas, é desejável a utilização de agentes reticulantes estáveis com baixa citotoxicidade e elevada biocompatibilidade.

Recentemente, genipina (**Figura 10**), um composto natural isolado a partir dos frutos de *Gardenia jasminoides Ellis* (Fujikawa, Yokota *et al.*, 1987) que reage espontaneamente com aminas primárias em glucosaminas e/ou proteínas formando reticulação química, tem sido amplamente utilizada para a preparação de materiais para aplicação em Engenharia de Tecidos (Agustina Aldana, Gonzalez *et al.*, 2012; Li, Nan *et al.*, 2012; Li, Wang *et al.*, 2015), devido à sua baixa toxicidade quando comparado ao glutaraldeído (Sung, Chen *et al.*, 2000; Mi, Tan *et al.*, 2002). Adicionalmente, Sung, Huang *et al.* (1999) observaram que bioadesivos reticulados com genipina foram 5.000 vezes menos citotóxicos que bioadesivos reticulados com glutaraldeído.

Figura 10 – Representação da estrutura da genipina.

O mecanismo de reticulação de glucosaminas por genipina é influenciado pelo pH do meio reacional. Assim, dois processos químicos de reticulação podem acontecer: em meio ácido ou neutro (**Figura 11 e 12**) e em meio alcalino (**Figura 13 e 14**) (Muzzarelli, 2009).

Em condição ácida ou neutra, o mecanismo de reação de reticulação de grupamentos *GlcN* de quitosana ou carboximetilquitosana pela genipina (**Figuras 11 e 12**) inicia-se pelo ataque nucleofílico da amina primária de unidades *GlcN* ao carbono olefínico em C3 da genipina, com consequente abertura do anel di-hidropirânico e formação da função aldeído na molécula. O aldeído formado reage com a amina secundária recém-formada para gerar o novo heterociclo. Na etapa final pode ocorrer um ataque nucleofílico de amina primária de *GlcN* ao éster da genipina e, consequentemente, a formação da reticulação de dois segmentos do biopolímero e liberação de metanol (**Figura 11**), ou pode ocorrer reação entre dois ou mais segmentos de cadeias com genipina, resultando em reticulação *via* dímeros ou trímeros (**Figura 12**) (Mi, Shyu *et al.*, 2005).

Figura 11 – Mecanismo de reticulação de grupamentos *GlcN* de quitosana ou carboximetilquitosana com genipina em meio ácido (Gonsalves, Melo Araujo *et al.*, 2011).

Figura 12 – Mecanismo de reticulação de grupamentos *GlcN* de quitosana ou carboximetilquitosana com dimerização da genipina em meio ácido ou neutro (Mi, Shyu *et al.*, 2005).

Em meio fortemente alcalino, ocorre abertura do anel di-hidropirânico da genipina *via* ataque nucleofílico promovido por íons hidroxila do meio reacional, com formação de grupos aldóxila (**Figura 12**), seguido da reação de homopolimerização da genipina por condensação aldólica. Na etapa final, os grupos amino das unidades *GlcN* de quitosana, ou carboximetilquitosana, reagem com os grupos aldóxila terminais (**Figura 13**) pela reação de Schiff com aminas primárias, promovendo a reticulação. Portanto, o pH do meio reacional desempenha importante papel nos tipos de reticulação dos grupamentos *GlcN* com a genipina.

Figura 13 – Mecanismo de homopolimerização da genipina em meio fortemente alcalino (Mi, Shyu *et al.*, 2005).

Figura 14 – Mecanismo de reticulação de grupamentos *GlcN* de quitosana ou carboximetilquitosana com genipina em meio fortemente alcalino (Mi, Shyu *et al.*, 2005).

Mi, Shyu *et al.* (2005) observaram que em condições ácidas, o ataque nucleofílico dos grupamentos aminos primários da quitosana sobre genipina é inibido devido à protonação destes, formando grupos amônio ($-\text{NH}_3^+$), não sendo observada ocorrência de reticulação em $\text{pH} = 1,2$, e baixo valor de grau de reticulação em $\text{pH} 5,0$ ($\approx 40\%$) quando comparado a pHs próximos à neutralidade ($\approx 96\%$ em $\text{pH} 7,4$), sendo também observado que em meios ácidos a reticulação é formada por cadeias curtas. Entretanto, em meio fortemente básico, devido à homopolimerização da genipina, os géis de quitosana reticulada são constituídos por longas cadeias de reticulantes (**Figura 15**).

Figura 15 – Conformações dos segmentos de rede de géis de quitosana reticulados com genipina: (a) em condições ácidas e neutras com segmentos de rede de géis de quitosana constituídas apenas por unidades curtas de agente reticulante; (b) em $\text{pH} 9,0$, com segmentos de rede de géis de quitosana constituídas por unidades curtas e longas de agente reticulante e; (c) em condições fortemente básicas, com segmentos de rede de géis de quitosana constituídas apenas por unidades longas de agente reticulante (Mi, Shyu *et al.*, 2005).

Assim, de acordo com as condições empregadas, é possível controlar a extensão da reticulação ajustando o excesso de agente reticulante e o tempo reacional, e também é possível modular o tipo de reticulação no que diz respeito ao estabelecimento de reticulações, que podem ser formadas por segmentos curtos ou longos, dos grupos *GlcN* de quitosana e/ou carboximetilquitosana com genipina, a partir do controle do pH das soluções poliméricas durante a etapa de reticulação.

2 OBJETIVOS

A primeira parte do presente estudo teve como principal objetivo a produção e caracterização de quitosanas DAIUS, obtidas a partir da desacetilação de beta-quitina pelo processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS), visando obtenção de quitosana extensivamente desacetilada e de alta massa molar média. Quitosana com essa característica foi submetida à reação de carboximetilação para a obtenção de *N,O*-carboximetilquitosana, enquanto o tratamento com irradiação de ultrassom de alta intensidade foi empregado com o objetivo de produzir carboximetilquitosanas com diferentes massas molares médias.

A segunda parte do presente estudo teve como principal objetivo a avaliação do efeito da massa molar média e do grau de reticulação nas propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas porosas de carboximetilquitosana reticuladas com genipina. Assim, três amostras de carboximetilquitosanas de diferentes massas molares médias foram reticuladas empregando três diferentes concentrações de genipina.

A terceira e última parte do presente estudo teve como principal objetivo a produção e caracterização de hidrogéis estáveis de quitosana obtidos sem o uso de qualquer agente de reticulação externo, que foram submetidos a testes biológicos *in vivo*, com o objetivo de avaliar a capacidade de regeneração de miocárdio infartado em modelo de ratos.

PARTE 1 – Quitosana DAIUS e carboximetilquitosana

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Beta-quitina

A polimorfa beta-quitina foi extraída de gládios de lulas da espécie *Doryteuthis spp.* cedidos pela empresa Miami Pescados (Cananéia/SP) e armazenadas a -20°C até sua utilização. Para a extração da beta-quitina, inicialmente os gládios foram lavados manualmente para a remoção de resíduos de carne, secos em estufa com circulação de ar por 24 h a 30°C e moídos em moinho de facas (MA-048, Marconi / Brasil). O processo de desproteínização dos gládios triturados foi realizado a partir da suspensão de 200 g de gládios em 3 L de solução aquosa de NaOH $1,0\text{ mol L}^{-1}$, mantida sob agitação mecânica por aproximadamente 18 h à temperatura ambiente. Após a desproteínização, a solução resultante foi filtrada e o sólido lavado com água destilada para a remoção de resíduos e até que se observasse a neutralidade da solução de lavagem. Em seguida, a beta-quitina resultante foi seca em estufa com circulação de ar por 24 h a 30°C e peneirada para separar a fração com tamanho médio de partículas (ϕ) no intervalo 125-250 μm .

3.2 Quitosana DAIUS

Beta-quitina triturada foi submetida ao processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS) para produzir quitosana extensivamente desacetilada e de alta massa molar média. Assim a beta-quitina foi suspensa em solução aquosa de NaOH 40% (g/g) na proporção 1/10 (massa de quitina/solução NaOH, g mL^{-1}), vertida em reator de vidro encamisado ($\theta_{\text{int}} = 3,5\text{ cm}$) acoplado a um banho termostatizado ($60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), e em seguida submetido à irradiação de ultrassom por 50 min. Para a execução do processo DAIUS foi empregado o dispositivo ultrassônico Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24\text{ kHz}$) acoplado ao sonotrodo de 22 mm de diâmetro, com irradiação

pulsada (0,5) e potência ajustada em 200 W. A geometria e dimensão do reator de vidro encamisado, assim como a posição da sonda de irradiação de ultrassom foram fixadas (**Figura 16**). A reação procedeu por 50 min com agitação magnética, e ao fim do processo, a reação foi interrompida pela adição de gelo destilado, e o meio reacional foi neutralizado com ácido clorídrico até atingir $\text{pH} \approx 8,0$. O sólido resultante (amostra Qs-1) foi lavado extensivamente com água destilada e seco em estufa a 30°C .

Figura 16 – Esquema experimental empregado nas reações de desacetilação pelo processo DAIUS: (a) 1- ultrassom de alta intensidade, 2- banho termostático, 3- reator de vidro encamisado e sonotrodo, 4- agitador magnético; (b) reator de vidro encamisado.

Objetivando alcançar altos teores de desacetilação e baixa taxa de despolimerização, a quitosana Qs-1 foi submetida ao processo DAIUS nas mesmas condições já descritas, resultando na quitosana Qs-2, a qual também foi submetida ao processo DAIUS nas condições descritas para gerar a quitosana Qs-3.

3.3 Carboximetilquitosana e Pós-tratamento de Despolimerização

Carboximetilquitosana foi preparada a partir de 10 g de quitosana extensivamente desacetilada e de alta massa molar (amostra Qs-3), suspensa em 100 mL de água/isopropanol

(1/4 v/v) contendo 13,5 g de NaOH, sendo a suspensão agitada durante 1 h em reator de vidro encamisado acoplada a um banho termostatizado a 30°C. Então, foi lentamente adicionada solução de ácido monocloroacético (15 g) em isopropanol (20 mL) e a reação foi deixada prosseguir por 4 h a 30°C (Liu, Guan *et al.*, 2001; Chen, X. G. e Park, H. J., 2003). A reação foi interrompida pela adição de etanol (200 mL), o produto foi isolado por filtração, e em seguida extensivamente lavado com etanol e seco à temperatura ambiente. Na etapa de purificação, a carboximetilquitosana resultante, denominada CMQs-0, foi suspensa (2,0 g L⁻¹) em solução aquosa de 0,1 mol L⁻¹ de NaCl e mantida sob agitação por 24 h. À solução resultante, após filtração para remoção das partículas insolúveis, foi adicionado etanol para provocar a precipitação do polieletrólito, que foi extensivamente lavado com etanol e seco à temperatura ambiente.

A amostra CMQs-0 foi submetida a pós-tratamento com irradiação de ultrassom visando à despolimerização, resultando nas amostras CMQs-1 e CMQs-3. Assim, 500 mL de solução aquosa de CMQs-0 (10 g L⁻¹) contidos em béquer de vidro foram submetidos à irradiação de ultrassom de alta intensidade por 1 h (3 h), gerando a amostra CMQs-1 (CMQs-3). O dispositivo ultrassônico Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24$ kHz) acoplado ao sonotrodo de 22 mm de diâmetro, com irradiação pulsada (0,5) e potência ajustada em 200 W foi empregado no pós-tratamento de despolimerização.

As soluções de carboximetilquitosanas despolimerizadas (CMQs-1 e CMQs-3) foram filtradas para remoção de partículas insolúveis e foi adicionado etanol para provocar a precipitação do polieletrólito, que foi extensivamente lavado com etanol e seco à temperatura ambiente.

3.4 Caracterizações

3.4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho

Todas as análises por espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas no aparelho BOMEM modelo MB-102 com transformada de Fourier no intervalo 4000-400 cm⁻¹ com acúmulo de 32 varreduras e com resolução de 4 cm⁻¹. Todos os espectros foram adquiridos a partir de filmes das amostras, os quais foram preparados como descrito a seguir.

Quitosana

As amostras de quitosana (20 mg) foram dissolvidas em 1,0 mL de solução de ácido clorídrico $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ por agitação contínua durante 24 h. A solução obtida foi gotejada sobre pastilha de silício e mantida a 30°C sob vácuo por 24 h.

Carboximetilquitosana na forma sódica

Carboximetilquitosanas na forma sódica (20 mg) foram dissolvidas em 1,0 mL de água destilada por agitação contínua durante 24 h. A solução obtida foi gotejada sobre pastilha de silício e mantida a 30°C sob vácuo por 24 h.

Carboximetilquitosana na forma ácida

Carboximetilquitosana na forma sódica (50 mg) foi suspensa em 5 mL de água destilada e a suspensão foi mantida sob agitação por aproximadamente 24 h. A solução resultante foi submetida à diálise contra solução de HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, utilizando membrana para diálise da Viskase Corporation de 21 mm de diâmetro e limite de exclusão de massa molecular de 12.000-14.000 Da. As membranas de diálise contendo a amostra foram colocados em béquer de 2 L com HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e a diálise se estendeu por 7 dias, sendo que a cada 24 horas a solução de HCl foi trocada. Este processo foi realizado a fim de trocar os contra-íons Na^+ por H^+ . A solução resultante de carboximetilquitosana na forma ácida foi gotejada sobre pastilha de silício e mantida a 30°C sob vácuo por 24 horas.

3.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de alta resolução, de hidrogênio e de carbono, foi utilizada para a análise das estruturas químicas e para a determinação do grau médio de acetilação e grau médio de substituição das amostras de quitosana e carboximetilquitosana. Os espectros foram adquiridos no equipamento Bruker AVANCE III (400 MHz).

Para a aquisição dos espectros de RMN ^1H , aproximadamente 10 mg de amostra foram adicionados a 1,0 mL de $\text{HCl/D}_2\text{O}$ (1% v/v) e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 24 horas, resultando em solução límpida e viscosa. Parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado ($\phi = 5\text{mm}$), e para a aquisição dos espectros de quitosana e carboximetilquitosana foi utilizado supressão de água com sequência de pulsos de supressão “ZGCPPR” à 80°C , aquisição de 32 varreduras e o tempo de relaxação de 7 segundos.

Para a aquisição do espectro de RMN ^{13}C , aproximadamente 100 mg de amostra CMQs-3 foram adicionados a 1,0 mL de D_2O e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 24 horas, resultando em solução límpida e viscosa. Parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado ($\phi = 5\text{mm}$), e o espectro foi adquirido, a 80°C , com acúmulo de aproximadamente 40.000 pulsos e tempo de relaxação de 7 segundos.

O grau médio de acetilação ($\overline{\text{GA}}$) de quitosana foi determinado pela razão entre as áreas dos sinais atribuídos aos hidrogênios da metila dos grupos acetamido ($-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ 2,0 ppm) e aos hidrogênios ligados aos átomos de carbono C(2) a C(6) do anel glicosídico (3,0 – 4,1 ppm), conforme a **equação 1** (Hirai, A., Odani, H. *et al.*, 1991; Rinaudo, Dung *et al.*, 1992; Signini e Campana, 1999; Chen, X. G. e Park, H. J., 2003).

$$\overline{\text{GA}}\% = \left(\frac{A_{\text{CH}_3/3}}{A_{\text{H}_{2-6}/6}} \right) * 100 \quad (1)$$

onde:

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

$A_{\text{H}_{2-6}}$ = área dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C(2) a C(6) do anel glicopiranosídico.

Adicionalmente, os valores do parâmetro de acetilação (PA) das amostras de quitosana foram determinados por espectroscopia de RMN ^1H de acordo com Vårum, Antohonsen *et al.* (1991) a partir da deconvolução e integração das áreas dos sinais referentes ao hidrogênio ligado ao carbono anomérico (H1) das unidades acetiladas (GlcNAc) e desacetiladas (GlcN) e normalizados de acordo com a estatística de Bernoulli (Kumirska, Weinhold *et al.*, 2009) a

partir da aplicação das **equações 2 a 5**, com o objetivo de estimar os valores de sequências *GlcN/GlcN*, *GlcNAc/GlcNAc* e *GlcNAc/GlcN* (*GlcN/GlcNAc*), expressas pelas frações de díades F_{DD} , F_{AA} e F_{AD} (F_{DA}), respectivamente:

$$F_{AA} = \frac{I_{AA}}{I_{AA} + I_{AD} + I_D} \quad (2)$$

$$F_{AD} = \frac{I_{AD}}{I_{AA} + I_{AD} + I_D} \quad (3)$$

$$F_{DA} = F_{AD} \quad (4)$$

$$F_{DD} = 1 - F_{AA} - F_{AD} - F_{DA} \quad (5)$$

onde I_{AA} , I_{AD} e I_D correspondem às áreas dos sinais devidos às díades AA, AD e DD + DA, respectivamente, e F_{AA} , F_{AD} , F_{DA} e F_{DD} são definidos como as probabilidades que duas unidades sejam vizinhas, *i.e.* expressam as frequências de díades AA, AD, DA e DD, respectivamente.

A partir dos valores de frequências de díades (F), o padrão de acetilação (PA) é calculado aplicando-se a **equação 6**:

$$PA = \frac{F_{AD}}{F_{AA} + F_{AD}} + \frac{F_{AD}}{F_{DD} + F_{AD}} \quad (6)$$

O grau médio de substituição ($\overline{GS}$) de carboximetilquitosana foi determinado a partir do espectro de RMN ^{13}C *via* deconvolução e integração dos sinais de acordo com a literatura (Rinaudo, Dung *et al.*, 1992).

3.4.3 Determinação da Massa Molar Média

3.4.3.1 Viscosimetria Capilar

Para a determinação da viscosidade intrínseca de beta-quitina, aproximadamente 10 mg da amostra (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 24 horas) foi suspensa em 50 mL de solução *N,N*-dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (DMAc/LiCl 5%) sob agitação magnética constante durante 24 horas. As medidas do tempo de escoamento foram realizadas a $25,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ empregando DMAc/LiCl 5% para as sucessivas diluições.

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

Para a determinação da viscosidade intrínseca de carboximetilquitosana na forma sódica (amostras CMQs-0, CMQs-1 e CMQs-3), aproximadamente 50 mg de amostra (previamente seca em estufa a vácuo, a 30°C por 24 horas) foram suspensos em 25 mL de água destilada, mantidos sob agitação magnética constante por 24 horas, em seguida foi adicionado 25 mL de solução de NaCl $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ e a agitação prosseguiu por mais 30 min. A solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP). As medidas de tempo de escoamento foram realizadas a $30,00 \pm 0,01^\circ\text{C}$ em solução de NaCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ empregada para as sucessivas diluições (Ge e Luo, 2005; Kasaai, 2007).

Independentemente da natureza da amostra, alíquota de 15 mL da solução polimérica foi transferida para um viscosímetro capilar de vidro ($\phi = 0,53 \text{ mm}$) e as medidas de tempo de escoamento foram determinadas em viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (SCHOTT).

Como as soluções de quitosana e carboximetliquitosana sódica apresentam comportamento polieletrólítico típico, a viscosidade pode ser descrita como função da viscosidade intrínseca $[\eta]$ do polieletrólito e de sua concentração, quando a força iônica é suficientemente elevada e não há interações macromoleculares (sistema diluído). Neste caso, a relação de Huggins (Roberts, 1992) pode ser aplicada (**equação 7**).

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad (7)$$

onde:

$\frac{\eta_{sp}}{C}$ = viscosidade reduzida (mL g^{-1});

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca (mL g^{-1});

k_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g mL^{-1}).

Desta forma, a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) pode ser determinada pela extrapolação à diluição infinita da curva de viscosidade reduzida *versus* concentração. A viscosidade assim determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink (**equação 8**) e, desta forma, a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) do polieletrólito pode ser determinada.

$$[\eta] = K' \cdot \overline{M}_v^\alpha \quad (8)$$

Na **equação 8**, K' e α são constantes para um dado solvente em uma dada temperatura (Rinaudo, Milas *et al.*, 1993).

Os valores de grau médio de polimerização viscosimétrico ($\overline{GP}_v$) da beta-quitina e quitosanas foram calculados levando em conta a quantidade média de unidades *GlcN* e *GlcNAc* de acordo com a **equação 9**:

$$\overline{GP_v} = \frac{\overline{M_v} \times 10^2}{(161 \times \overline{GD}) + (203 \times \overline{GA})} \quad (9)$$

onde $\overline{M_v}$ (g mol^{-1}), $\overline{GD}$ (%) e $\overline{GA}$ (%) correspondem a massa molar viscosimétrica média, grau médio de desacetilação e acetilação, respectivamente, enquanto 161 e 203 correspondem às massas molares (g mol^{-1}) das unidades *GlcN* e *GlcNAc*, respectivamente.

3.4.3.2 Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)

Para a determinação da massa molar média ponderal ($\overline{M_w}$) e o índice de dispersividade ($\mathcal{D}$) das amostras de quitosana, aproximadamente 1,0 mg de amostra foi dissolvido em 1,0 mL de solução tampão de acetato de amônio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ / ácido acético $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ (pH = 4,5) sob agitação magnética constante por 24 horas. A solução resultante foi filtrada em membrana com diâmetro dos poros de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP) e 100 μL de solução foram injetados em colunas TSK2500 e TSK6000 em série, acopladas com refractômetro diferencial (Optilab rEX, Wyatt) e espalhamento de luz multi-ângulo (Dawn DSP-EOS, Wyatt; $\lambda = 690 \text{ nm}$). De acordo com o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) de quitosana, diferentes valores de índice de refração (dn/dc) foram utilizados para determinar $\overline{M_w}$ e $\mathcal{D}$ a partir dos dados de SEC (Schatz, Viton *et al.*, 2003), e os valores de grau médio de despolimerização ponderal ($\overline{GP_w}$) das quitosanas foram calculados a partir da **equação 10**:

$$\overline{GP_w} = \frac{\overline{M_w} \times 10^2}{(161 \times \overline{GD}) + (203 \times \overline{GA})} \quad (10)$$

onde $\overline{M_w}$ (g mol^{-1}), $\overline{GD}$ (%) e $\overline{GA}$ (%) correspondem a massa molar média ponderal, grau médio de desacetilação e acetilação, respectivamente, enquanto 161 e 203 correspondem às massas molares (g mol^{-1}) das unidades *GlcN* e *GlcNAc*, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com o objetivo de produzir quitosanas extensivamente desacetiladas e de alta massa molar, e com base em trabalhos anteriores do grupo (Delezuk, Cardoso *et al.*, 2011), a desacetilação da beta-quitina foi realizada pelo processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (processo DAIUS) multi-etapas sob condições relativamente brandas de temperatura (60°C) e curto espaço de tempo (50 min./etapa), com o objetivo de evitar a ocorrência de despolimerização, independentemente do grau de acetilação da quitosana resultante.

Os resultados demonstram que a aplicação do processo DAIUS permitiu a conversão de beta-quitina em quitosana com elevado rendimento de produto recuperado após a execução de um (Qs-1; $\approx 88\%$), dois (Qs-2; $\approx 77\%$) ou três (Qs-3; $\approx 70\%$) processos DAIUS consecutivos. Além disso, todas as quitosanas DAIUS produzidas foram completamente solúveis em solução aquosa 1% de ácido acético ($C_p = 1,0 \text{ g L}^{-1}$).

A partir de quitosana extensivamente desacetilada e de alta massa molar (Qs-3) foi produzida *N,O*-carboximetilquitosana de alta massa molar com elevado rendimento de produto após a reação de carboximetilação (CMQs-0; $\approx 95\%$), que foi despolimerizada com sucesso pelo uso de irradiação de ultrassom, com o objetivo de obtenção de carboximetilquitosana com diferentes massas molares. Todas as carboximetilquitosana produzidas foram completamente solúveis em água ($C_p = 1,0 \text{ g L}^{-1}$).

4.1 Espectroscopia na região do Infravermelho

A partir das análises de espectroscopia no infravermelho foram identificados os modos de vibração característicos das amostras de beta-quitina, quitosanas e de carboximetilquitosanas.

O espectro de FTIR da beta-quitina e Qs-1 (**Figura 17**) apresentam bandas similares nos intervalos $3600\text{-}3000 \text{ cm}^{-1}$ (deformações axiais de —O—H e —N—H) e $2895\text{-}2720 \text{ cm}^{-1}$ (deformação axial de —C—H), em 1378 cm^{-1} (deformação angular de —C—H), 1320 cm^{-1} (deformação axial de —C—N), 1155 cm^{-1} (deformação angular de —O—H em ligação de

hidrogênio) e 1070 cm^{-1} (deformação angular de —C—O—). Entretanto, a banda de deformação axial de —C=O (banda de amida I) de beta-quitina apresenta seu pico centrado em 1655 cm^{-1} enquanto no espectro de Qs-1 ocorre em 1625 cm^{-1} ; a banda de deformação angular de —NH está centrada em 1550 cm^{-1} no caso de beta-quitina enquanto que no espectro de quitosana ocorre em 1520 cm^{-1} (Santos, Soares *et al.*, 2003).

Figura 17 – Espectros na região do infravermelho de beta-quitina e de quitosana (Qs-1).

As modificações estruturais introduzidas pela carboximetilação de quitosana foram observadas através da comparação dos espectros de FTIR (**Figura 18**) de quitosana e de carboximetilquitosana. O espectro de FTIR da amostra de carboximetilquitosana na forma sódica (NaCMQs-0) apresenta bandas similares às encontradas no espectro de quitosana (Qs-3), como aquelas em $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ (deformações axiais de —O—H e —N—H), 2925 cm^{-1} (deformação axial de —C—H) e $1070\text{--}1136\text{ cm}^{-1}$ (deformação angular de —C—O—). A banda intensa em 1600 cm^{-1} e a banda centrada em 1415 cm^{-1} são características de carboximetilquitosana na forma sódica, e correspondem a deformações axiais simétricas e assimétricas de —COO^- , respectivamente, e não ocorrem no espectro de quitosana. No espectro de carboximetilquitosana na forma ácida (HCMQs-0) é observado o alargamento da

banda de estiramento de —OH na região $3600\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ e a ocorrência das bandas em 1730 cm^{-1} (deformação axial —COOH) e em 1230 cm^{-1} (deformação axial assimétrica —COOH). Também é observado o deslocamento da banda em 1625 cm^{-1} (deformação angular —NH_2) para 1520 cm^{-1} (deformação angular —NH_3^+), evidenciando a presença dos grupos carboximetila e de grupos amônio (Chen, X. G. e Park, H. J., 2003).

Figura 18 – Espectros na região do infravermelho de filmes finos das amostras de quitosana (Qs-3) e carboximetilquitosana na forma ácida (HCMQs-0) e carboximetilquitosana na forma sódica (NaCMQs-0).

4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono (RMN ^{13}C)

A análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C das amostras de quitosana e carboximetilquitosana foi realizada a fim de identificar as características estruturais das amostras, além de permitir a determinação do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) e padrão de

acetilação (*PA*) para as amostras de quitosanas, e o grau médio de substituição ($\overline{GS}$) e padrão de substituição dos grupos carboximetila nas amostras de carboximetilquitosanas.

No espectro de RMN ^1H das amostras de quitosana (**Figura 19**) o sinal centrado em 2,0 ppm corresponde aos hidrogênios metílicos do grupo acetamido de unidades *GlcNAc*, e o sinal centrado em 3,2 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao C2 de unidades *GlcN*. Os sinais no intervalo 4,1 - 3,4 ppm são atribuídos aos hidrogênios ligados ao C2 das unidades *GlcNAc* e aos hidrogênios ligados aos C3 – C6 das unidades *GlcN* e *GlcNAc*, e em aproximadamente 4,6 ppm e 4,8 ppm são observados os sinais do hidrogênio H1 de unidades *GlcNAc* e *GlcN*, respectivamente.

Figura 19 – Espectro de RMN ^1H das amostras Qs-1, Qs-2 e Qs-3 adquiridos a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D₂O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).

A **Figura 19** mostra que a intensidade dos sinais dos hidrogênios metílicos do grupo acetamido ($\approx 2,0$ ppm) e os sinais do hidrogênio H1' ($\approx 4,6$ ppm), ambos ligados às unidades *GlcNAc*, são progressivamente menos intensos, comparados com os outros sinais, indicando

qualitativamente a maior desacetilação com o emprego de múltiplas etapas do processo DAIUS.

O tratamento quantitativo dos espectros revelou que embora o processo DAIUS tenha sido realizado em temperaturas relativamente baixas (60°C) em comparação com a maioria dos processos termoquímicos convencionais de conversão de quitina em quitosana, o processo DAIUS produziu eficientemente quitosanas com variado grau de acetilação devido à execução de etapas consecutivas, resultando nas amostras Qs-1, Qs-2, e Qs-3 com grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) de 36,7%, 15,0% e 4,3%, respectivamente.

Nos espectros de RMN ^1H das quitosanas DAIUS, os sinais devido ao hidrogênio H1 ligado ao carbono anomérico (**Figura 20**) das unidades *GlcNAc* e *GlcN* foram tratados de acordo com Vårum, Antohonsen *et al.* (1991), e a partir da deconvolução, integração das áreas dos sinais e normalização de acordo com a estatística de Bernoullian (Kumirska, Weinhold *et al.*, 2009) os valores das díades F_{DD} , F_{AA} e F_{AD} (F_{DA}) foram obtidos, e a partir destes foram calculados os padrões de acetilação (*PA*) apresentados na **Tabela 1**.

Figura 20 – Ampliação da região de ressonância do hidrogênio H1 ligado ao carbono anomérico no espectro de RMN ^1H da amostra Qs-1 adquirido a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D₂O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).

Tabela 1 - Distribuição das frequências de díades (F) e padrão de acetilação (PA) das quitosanas DAIUS determinadas a partir dos espectros de RMN ^1H adquiridos a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D₂O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).

Amostras	$\overline{GA}$ (%)	F_{AD} ^a	F_{AA} ^b	F_{DD} ^c	PA
Qt-1	36,7	0,16	0,15	0,53	0,75
Qt-2	15,0	0,07	0,05	0,81	0,66
Qt-3	4,3	0,04	0,01	0,91	0,84

a) F_{AD} é a probabilidade das unidades *GlcNAc* e *GlcN* serem vizinhos; b) F_{AA} é a probabilidade das unidades *GlcNAc* e *GlcNAc* serem vizinhos e; c) F_{DD} é a probabilidade das unidades *GlcN* e *GlcN* serem vizinhos.

De acordo com o valor de PA , quitosana pode apresentar três tipos de padrões de acetilação, *i.e.* três diferentes distribuições das unidades *GlcNAc* e *GlcN*: idealmente alternada ($PA = 2$), perfeitamente aleatório ($PA = 1$) ou distribuição ideal em bloco ($PA = 0$). Assim, os dados relativos às frequências de díades e o padrão de acetilação de quitosanas USAD (**Tabela 1**) evidenciam a ocorrência de padrão de acetilação predominantemente aleatória ($0,5 < PA < 1,5$), indicando que a reação de desacetilação no processo DAIUS ocorre de forma homogênea, devido à melhor acessibilidade dos íons hidroxila aos sítios reativos promovida pela irradiação com ultrassom.

O espectro de RMN ^1H da amostra CMQs-0 (**Figura 21**) apresenta sinais característicos de carboximetilquitosana (Hjerde, Varum *et al.*, 1997; Chen, X. G. e Park, H. J., 2003; An, Thien *et al.*, 2009). Assim, são observados os seguintes sinais: *i*) hidrogênios metílicos do grupo $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ em 2,00 ppm; *ii*) hidrogênio ligado ao C(2) na região 3,10 - 3,25 ppm; *iii*) hidrogênios dos grupos $-\text{N}-\text{CH}_2-\text{COOD}$ em 3,35 ppm; *iv*) hidrogênios ligados aos C(3) a C(6) do anel de glicopirranose na região 3,50 - 4,00 ppm; *v*) hidrogênios dos grupos $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{COOD}$ ligados ao C(3) e C(6) do anel glicopirranose na região 4,00 - 4,40 ppm. Entretanto devido à alta viscosidade das soluções das amostras e à interferência do sinal da HDO na região de 4,00 – 4,40 ppm, não foi possível determinar precisamente o grau de substituição das amostras de carboximetilquitosana por RMN ^1H .

Adicionalmente, o espectro da **Figura 21** é idêntico aos espectros de CMQs-1 e CMQs-3, assim como os valores de $\overline{GA}$ e $\overline{GS}$, evidenciando que a despolimerização induzida por irradiação de ultrassom não provocou modificações estruturais nas amostras de CMQs-1 e CMQs-3.

Figura 21 – Espectro de RMN ^1H de carboximetilquitosana (CMQs-0) adquirido a 80°C em solução aquosa (1% HCl/D₂O) utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).

O espectro de RMN ^{13}C de carboximetilquitosana (**Figura 22**) apresenta sinais na região 103 – 98 ppm correspondentes a C1, o sinal na região de 57 – 54 ppm corresponde a C2, os sinais na região 81 – 72 ppm são atribuídos a C3, C4 e C5, e os sinais em 51,7, 70,4 e 71,2 são atribuídos aos carbonos -CH₂- do grupo carboximetila nas posições N-, 3-O- e 6-O-, respectivamente (Rinaudo, Dung *et al.*, 1992). A partir de tratamento de deconvolução do espectro da amostra CMQs-3 (**Figura 22**) e integração dos sinais, foi possível determinar o grau médio de acetilação ($\overline{GA}$ = 4,7%), grau médio de substituição total ($\overline{GS}_{total} \approx 1,0$) e o padrão de substituição nas posições N- ($\overline{GS}_{N-} \approx 0,2$), 6-O- ($\overline{GS}_{6-O-} \approx 0,5$) e 3-O- ($\overline{GS}_{3-O-} \approx 0,3$).

Figura 22 – Espectro de RMN ^{13}C de carboximetilquitosana (CMQs-3), adquirido a 80°C em D_2O utilizando o espectrômetro Bruker AVANCE III (400 MHz).

4.3 Massa Molar Média Viscosimétrica ($\overline{M}_v$) e Ponderal ($\overline{M}_w$)

Os valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$), determinados a partir da extrapolação das curvas de viscosidade reduzida *versus* concentração à diluição infinita, foram empregados na equação de Mark-Houwink para calcular os valores de massas molares médias viscosimétricas ($\overline{M}_v$). Os valores dos parâmetros K' e α para quitosanas (Kasaai, 2007), são dependentes do grau médio de acetilação, da temperatura e do solvente utilizado. Na cromatografia de exclusão de tamanho multi-detecores, a massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$) e o índice de dispersividade ($\mathcal{D}$) foram obtidos utilizando os valores de índice de refração (dn/dc) que são dependentes do grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) de quitosana (Schatz, Viton *et al.*, 2003), e a

partir dos valores de massa molares médios e grau médio de acetilação foi possível calcular o grau médio de polimerização viscosimétrico ($\overline{GP}_v$) e ponderal ($\overline{GP}_w$) apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2 – Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), viscosidade intrínseca ($[\eta]$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$), índice de dispersividade (D) grau médio de polimerização viscosimétrico ($\overline{GP}_v$) e grau médio de polimerização ponderal ($\overline{GP}_w$) das amostras de quitina e quitosana.

Amostras	$\overline{GA}$ (%)	$[\eta]$ (g L ⁻¹)	$\overline{M}_v \times 10^{-5}$ (g mol ⁻¹)	$\overline{M}_w \times 10^{-5}$ (g mol ⁻¹)	D	$\overline{GP}_v$	$\overline{GP}_w$
B-quitina	80,7	4,2	13,4	-	-	6.865	-
Qs-1	36,7	2,7	10,3	12,6	1,4	5.838	7.142
Qs-2	15,0	2,5	8,6	11,4	1,4	5.128	6.796
Qs-3	4,3	2,3	8,0	9,1	1,3	4.889	5.602

Nas reações de desacetilação termoquímica de quitina, a diminuição do grau de acetilação é acompanhada por acentuada despolimerização, no entanto, o processo DAIUS para obtenção de quitosana apresenta baixa redução do grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) quando comparado à redução do grau médio de acetilação relativo ($\overline{GA}_{Rel}$) (**Figura 23**).

Figura 23 – Avaliação do $\overline{GA}$ e do $\overline{GP}_v$ das quitosanas DAIUS em relação à quitina de partida, sendo $\overline{GA}_{Rel} = (\overline{GA}_{quitosana})_n / \overline{GA}_{B-quitina}$ e

$\overline{GP}_{vRel} = (\overline{GP}_{vquitosana})_n / \overline{GP}_{vB-quitina}$, onde n é o número de processos DAIUS realizado.

A partir da análise dos valores da **Tabela 2** e da **Figura 23**, é possível observar que após a realização do primeiro processo DAIUS, o $\overline{GA}$ foi reduzido de 80,7% (beta-quitina) para 36% (Qs-1), e a realização do segundo e terceiro processo DAIUS levaram o $\overline{GA}$ das amostras a 15,0% (Qs-2) e 4,3% (Qs-3), respectivamente. Assim, a execução do primeiro processo DAIUS teve eficiência de $\approx 54\%$, enquanto a segunda e a terceira etapa atingiram $\approx 59\%$ e $\approx 71\%$, respectivamente, evidenciando que a reação de desacetilação torna-se mais eficaz em substratos mais desacetilados. Assim, a execução das três etapas consecutivas de desacetilação atingiu eficiência de $\approx 94\%$. Ao mesmo tempo, o grau médio de polimerização ($\overline{GP}_v$) diminuiu de 6.865 (beta-quitina) para 5.838 (Qs-1) após a realização do primeiro processo DAIUS, e para 5.128 (Qs-2) e 4.889 (Qs-3) depois da execução do segundo e terceiro processo DAIUS, respectivamente. Portanto, no primeiro processo DAIUS a taxa de despolimerização atingiu $\approx 15\%$, enquanto que o segundo e terceiro processo DAIUS houve a

redução da taxa de despolimerização para $\approx 12\%$ e $\approx 5\%$, respectivamente, resultando em taxa de despolimerização total de $\approx 29\%$, enquanto que a redução total de $\overline{GA}$ foi de $\approx 94\%$. Assim, com baixa taxa de despolimerização e eficiente desacetilação, o processo DAIUS com três etapas consecutivas tornou possível a produção de quitosana extensivamente desacetilada e de elevada massa molar média.

Adicionalmente, as curvas de cromatografia por exclusão de tamanho das quitosanas DAIUS (**Figura 24**) evidenciam distribuição gaussiana uniforme, monomodal e com baixa dispersividade.

Figura 24 – Curvas de cromatografia por exclusão de tamanho das quitosanas DAIUS dissolvidas em tampão acetato de amônio $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ / ácido acético $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4.5$) em colunas TSK2500 e TSK6000 acopladas em linha com um refractômetro diferencial e espalhamento de luz multi-ângulo.

Carboximetilquitosanas obtidas a partir da degradação da amostra CMQs-0 via irradiação de ultrassom durante 1 hora (CMQs-1) e 3 horas (CMQs-3), apresentaram diferentes valores de viscosidade intrínseca ($[\eta]$), e a partir destes valores foi possível calcular (Ge e Luo, 2005) o valor de massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) apresentado na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), grau médio de substituição ($\overline{GS}$) viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) das amostras de carboximetilquitosana.

Amostras	$\overline{GA}$ (%)	$\overline{GS}$	$[\eta]$ (g L ⁻¹)	$\overline{M}_v \times 10^5$ (g mol ⁻¹)
CMQs-0	4,7	1,0	1,50	1,90
CMQs-1	4,7	1,0	0,74	0,94
CMQs-3	4,7	1,0	0,34	0,43

5 CONCLUSÃO: PARTE 1

Quitosana extensivamente desacetilada e de alta massa molar média foi produzida a partir de beta-quitina *via* processo de desacetilação assistida por ultrassom de alta intensidade (DAIUS) sem uso de aditivos, nem atmosfera inerte. O processo DAIUS foi realizado em condições relativamente brandas de temperatura (60°C) e tempo de reação (50 min. cada etapa), em comparação com a desacetilação termoquímica convencional.

O processo DAIUS multi-etapas permitiu o preparo de quitosanas com variado grau médio de acetilação ($4\% \leq \overline{GA} \leq 37\%$), elevados valores de massa molar média ($900.000 \text{ g mol}^{-1} \leq \overline{M}_w \leq 1.200.000 \text{ g mol}^{-1}$) e baixo índice de dispersividade ($1,3 \leq \overline{D} \leq 1,4$) a partir de beta-quitina. Adicionalmente, foi observado que a reação de desacetilação no processo DAIUS ocorre de forma homogênea, devido à maior acessibilidade dos íons hidroxila aos sítios reativos promovida pela irradiação com ultrassom.

N,O-carboximetilquitosana (CMQs-0) foi obtida com sucesso a partir da reação de carboximetilação de quitosana extensivamente desacetilada e de alta massa molar média (Qs-3) com grau médio de substituição próximo de uma unidade ($\overline{GS} \approx 0,98$) sendo observada ocorrência, predominantemente, de *O*-substituição ($\overline{GS}_{3-O-} \approx 0,48$; $\overline{GS}_{6-O-} \approx 0,34$; e $\overline{GS}_{N-} = 0,16$). Com o objetivo de obtenção de carboximetilquitosana com diferentes massas molares, a amostra CMQs-0 foi despolimerizada com sucesso a partir uso de irradiação de ultrassom de alta intensidade, o que pode ser constatado pela redução da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) de $1,507 \text{ g L}^{-1}$ (CMQs-0) para $0,743 \text{ g L}^{-1}$ (CMQs-1) e $0,342 \text{ g L}^{-1}$ (CMQs-3).

PARTE 2 – Membranas porosas de quitosana e carboximetilquitosana

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Membranas de Quitosana (M-Qs)

As membranas foram preparadas por liofilização das soluções das quitosanas DAIUS, *i.e.* amostras Qs-1, Qs-2 e Qs-3. Em uma preparação típica, quitosana DAIUS foi dissolvida (0,5% g/v) em solução de ácido acético 0,1 mol L⁻¹ após agitação por 24 horas, a solução foi imersa em banho ultrassônico para a remoção das bolhas de ar, e então vertida em placa de Petri (a relação volume de solução / área do disco foi de 0,5 mL cm⁻²). Em seguida a solução viscosa resultante foi congelada, liofilizada, neutralizada com solução de hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ e lavada com água destilada para remoção do excesso de sais. Após a lavagem, a membrana foi novamente congelada e liofilizada.

6.2 Membranas Reticuladas de Carboximetilquitosana (M-CMQs)

As membranas reticuladas foram preparadas por liofilização das soluções aquosas de carboximetilquitosana na forma sódica (amostras CMQs-0, CMQs-1 e CMQs-3) às quais foi adicionado genipina como agente reticulante. Em todos os casos a concentração final de carboximetilquitosana foi mantida constante (0,5% g/v) enquanto a concentração de genipina foi variada (1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; 3,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ e 5 x 10⁻⁴ mol L⁻¹). As soluções CMQs/genipina foram tratadas em banho ultrassônico para a remoção das bolhas de ar, e então vertidas em placas de Petri (a relação volume de solução / área do disco foi de 0,5 mL cm⁻²) e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas para que ocorresse a reticulação. Em seguida as membranas foram congeladas e liofilizadas.

As membranas liofilizadas foram neutralizadas com solução tampão de ácido acético $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ / acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,5$) e lavadas com água destilada para remover o excesso de genipina e de sais. Após a lavagem, as membranas foram novamente congeladas e liofilizadas.

As membranas reticuladas foram nomeadas como M-CMQs-xy, onde “x” corresponde a 0, 1 ou 3 para identificar as 3 amostras de CMQs (CMQs-0, CMQs-1 e CMQs-3), enquanto “y” corresponde a 1, 3 ou 5 para identificar a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reação de reticulação.

6.3 Determinação do Grau de Reticulação

O grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) das membranas de carboximetilquitosana foi determinado através do ensaio de ninidrina (Mi, Shyu *et al.*, 2005), o qual permite determinar o percentual de grupos amino que não reagiram durante reação de reticulação com genipina.

Assim, aproximadamente 20 mg de amostra foram adicionados a 2,0 mL de solução de ninidrina 2% (m/v) e a suspensão foi aquecida a 100°C por 20 min. À solução resultante, foi adicionada água para completar 10 mL e o teor de grupos amino livre foi determinado pela medida da absorbância em 400 nm, empregando equipamento UV-VIS: SPECTROPHOTOMETER JASCO modelo V-630, sendo que a curva de calibração foi elaborada usando soluções de cloridrato de glucosamina em diferentes concentrações.

A reação de ninidrina (2,2-diidroxi-hidrindeno-1,3-diona) é específica para grupos amino primários (R-NH_2), os quais reagem (Figura 25) para produzir 3-hidroxi-2-(2-amino-hidrindeno-1,3-diona)-hidrindeno-1-ona, conhecido como *púrpura de Ruhemann*, de coloração violeta intensa.

Figura 25 – Reação da ninidrina com grupo amino primário.

Esta reação tem sido estudada há anos, e é amplamente utilizada para a análise de aminoácidos e também tem sido utilizada para a determinação do grau médio de reticulação e estudos de degradação enzimática de quitosana (Mi, Tan *et al.*, 2001; Mi, Shyu *et al.*, 2005; Yan, Wang *et al.*, 2010).

6.4 Grau de Hidratação

Os ganhos percentuais de massa devido à hidratação das membranas foram determinados após imersão das amostras (fragmentos de 10 x 10 mm) em solução salina de tampão fosfato (PBS, pH = 7,4) a 37°C por 48 h. Após imersão, a massa da membrana hidratada foi determinada removendo-se o excesso de água superficial com papel toalha, e pesando-se imediatamente as membranas. O grau médio de hidratação das membranas em PBS foi calculado utilizando a **equação 11**:

$$\overline{GH}(\%) = \frac{M_h - M_0}{M_0} * 100 \quad (11)$$

onde $\overline{GH}$, M_h e M_0 correspondem ao grau médio de hidratação (%), massa da membrana hidratada (g) e massa da membrana seca (g), respectivamente.

6.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As morfologias das superfícies e de fraturas das membranas foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura digital LEO-40. Para análise da superfície, a membrana foi cortada (10 x 10 mm) e colada em porta-amostra vertical. Para a análise de fratura, a membrana foi imersa em nitrogênio líquido, fraturada com o auxílio de uma pinça e colocada sobre porta-amostra transversal. As amostras foram previamente secas em estufa a vácuo a 30°C por 6 h, posteriormente foram recobertas com ouro, com espessura de recobrimento de 30 nm. Nestas análises a corrente de feixe utilizada foi de 0,75 mA e a potência do feixe de 20

kV, o detector utilizado foi o detector de elétrons secundários (SE1). As imagens obtidas foram tratadas digitalmente utilizando o programa “Image J”.

6.6 Propriedades Mecânicas de Tração

As propriedades mecânicas das membranas foram avaliadas através de análise dinâmica mecânica no modo de tração. As membranas foram hidratadas em solução PBS (pH = 7,4) por 24 horas antes do teste, e os testes de tração foram realizados em equipamento TA instruments DMA Q800 utilizando uma garra do tipo *Tension film*. As amostras foram cortadas em formato retangular, com dimensões 30 x 5,7 mm. O teste foi realizado com espaço entre garras de 15 mm, com rampa de força de 0,1 N min⁻¹ até 18 N e força de pré-carga de 0,01 N, a 37°C. As propriedades determinadas a partir das análises dinâmico-mecânicas no modo de tração foram: resistência máxima à tração (MPa), módulo de elasticidade (MPa) e percentual de alongamento máximo na ruptura (%).

6.7 Degradação Enzimática

A degradação enzimática *in vitro* das membranas foi determinada após imersão em solução PBS (pH = 7,4) contendo lisozima 1.000 U mL⁻¹, e a suspensão (2,0 g L⁻¹, massa de membrana/volume solução de lisozima) foi incubada a 37°C por 15 dias (Lu, G. Y., Kong, L. J. *et al.*, 2007). Após a degradação, a formação de oligômeros em solução contendo unidades *N*-glucosamina (*GlcN*), devido à clivagem das ligações glicosídicas da quitosana ou carboximetilquitosana, foi determinada pelo ensaio de ninidrina descrito anteriormente. A evolução da degradação foi acompanhada pelo aumento da concentração de *GlcN* em função do tempo de incubação.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Membranas de quitosana, insolúveis e estáveis, foram produzidas sem a utilização de qualquer agente químico reticulante, enquanto que as membranas de carboximetilquitosana foram produzidas após reação de reticulação das amostras CMQs com diferentes concentrações de genipina. Nesse último caso, foi observada a ocorrência de coloração levemente azulada (**Figura 26**), a qual é mais acentuada quanto maior a concentração de genipina empregada na reação, resultado que é corroborado por Mi, Tan *et al.* (2001), que estudaram a produção de membranas densas de quitosana reticuladas com genipina.

Figura 26 – Imagens das soluções de (a) CMQs-0 não reticulada e (b) M-CMQs-35 reticulada com $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de genipina, após 24 horas de reticulação.

7.1 Membranas de Quitosana

7.1.1 Morfologia e Grau Médio de Hidratação

Todas as membranas de quitosana (M-Qs) apresentaram coloração branca, sendo totalmente opacas mesmo após a hidratação. As morfologias das superfícies das membranas (**Figura 27**) revelam estruturas porosas com poros distribuídos homogeneamente, entretanto é possível observar que a membrana M-Qs-1 apresenta estrutura mais compacta e com número de poros aparentes relativamente menor. Além disso, a análise das micrografias das fraturas das membranas (**Figura 28**) revela que a estrutura interna da membrana M-Qs-1 aparenta ser mais homogênea quando comparada com as membranas M-Qs-2 e M-Qs-3. A presença de uma estrutura contendo fibras finas observadas nas superfícies das membranas M-Qs-2 e M-Qs-3 dificultaram a análise e quantificação de poros.

Assim, a estrutura de poros melhor definida da membrana M-Qs-1 se deve, provavelmente, à elevada viscosidade intrínseca da quitosana Qs-1 ($[\eta] \approx 2,75 \text{ g L}^{-1}$), aliada ao elevado grau médio de acetilação ($\overline{GA} \approx 36,7\%$), que pode ter favorecido a agregação das cadeias poliméricas.

Figura 27 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $\overline{GA} \approx 36,7\%$; Qs-2, $\overline{GA} \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $\overline{GA} \approx 4,3\%$).

Figura 28 – Microscopia eletrônica de varredura da superfície das fraturas das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $\overline{GA} \approx 36,7\%$; Qs-2, $\overline{GA} \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $\overline{GA} \approx 4,3\%$).

As medidas de grau médio de hidratação, ou grau médio de sorção de água, das membranas de quitosana, foram realizadas após imersão em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C. As curvas de grau de hidratação *versus* tempo de imersão das membranas M-Qs

(Figura 29) mostram rápida cinética de absorção da solução de PBS na primeira hora de hidratação, sendo atingindo um platô de máxima hidratação após 12 horas de hidratação, independentemente da amostra considerada.

Figura 29 – Curvas de hidratação das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) correspondem ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $\overline{GA} \approx 36,7\%$; Qs-2, $\overline{GA} \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $\overline{GA} \approx 4,3\%$).

Assim, conforme os dados relativos à adsorção de solução PBS após 48 horas de imersão das membranas M-Qs (Tabela 4), a maior taxa de hidratação foi alcançada no caso da membrana M-Qs-3 ($\overline{GH} \approx 630\%$), a qual foi preparada a partir da quitosana DAIUS mais desacetilada ($\overline{GA} \approx 4,3\%$), o que torna esta membrana mais hidrofílica quando comparada à membrana resultante da quitosana mais acetilada (M-Qs-1; $\overline{GA} \approx 36,7\%$; $\overline{GH} \approx 485\%$).

Tabela 4 – Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) e grau médio de hidratação ($\overline{GH}$) após 12 h de imersão em PBS das membranas de quitosana.

Amostras	$\overline{GA}$ (%)	$\overline{M}_v \times 10^5$ (g mol ⁻¹)	$\overline{GH}$ (%)
M-Qs-1	36,6	10,3	485 ± 45 %
M-Qs-2	15,0	8,6	564 ± 32 %
M-Qs-3	4,3	8,0	628 ± 26 %

7.1.2 Propriedades Mecânicas

As análises no modo tração das membranas M-Qs foram realizadas após estas terem sido hidratadas em solução PBS (pH = 7,4) por 24 horas a 37°C, a fim de se avaliar suas propriedades mecânicas sob as condições semelhantes àquelas empregadas em procedimentos cirúrgicos. A **Tabela 5** apresenta os valores de resistência máxima à tração, módulo de elasticidade e percentual de alongamento máximo à ruptura.

Tabela 5 – Valores de grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), resistência máxima à tração, módulo de elasticidade e alongamento máximo à ruptura das membranas de quitosana.

Amostras	$\overline{GA}$ (%)	Resistência máxima à tração (kPa)	Módulo de elasticidade (kPa)	Alongamento máximo à ruptura (%)
M-Qs-1	36,6	321 ± 53	835 ± 128 %	29 ± 3 %
M-Qs-2	15,0	418 ± 73	487 ± 95 %	52 ± 8 %
M-Qs-3	4,3	219 ± 57	531 ± 145 %	43 ± 10 %

A partir da análise dos valores de resistência máxima à tração, é possível observar que a membrana produzida a partir de quitosana extensivamente desacetilada (M-Qs-3; $\overline{GA} \approx 4,3\%$) exibe o menor valor de resistência máxima à tração, sendo observado o aumento do valor de resistência máxima à tração de ≈ 219 kPa (M-Qs-3) a ≈ 418 kPa (M-Qs-2) com o aumento do $\overline{GA}$ para $\approx 15,0\%$ (M-Qs-2). Adicionalmente, a análise dos valores de elongação máxima à ruptura e de módulo de elasticidade, evidenciam que a membrana M-Qs-1 é mais frágil, exibindo elevados valores de módulo de elasticidade e baixos valores de elongação máxima à ruptura, provavelmente devido à agregação das cadeias poliméricas, favorecida por elevados valores de $\overline{GA}$ e de $\overline{M}_v$, tornando as membranas mais frágeis.

A membrana M-Qs-2 apresentou as melhores propriedades mecânicas de tração, exibindo altos valores de resistência máxima à tração e mais baixos valores de alongamento máximo à ruptura, além de apresentar o menor valor de módulo de elasticidade, tornando estas membranas mais flexíveis, provavelmente devido ao equilíbrio entre interações hidrofílicas e hidrofóbicas da quitosana Qs-2 ($\overline{GA} \approx 15,0\%$).

7.1.3 Degradação Enzimática

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

Quando em contato com tecidos vivos, quitosana estimula a produção extracelular de lisozima, que é a principal enzima capaz de degradar quitosana e também carboximetilquitosana (Chen, Wang *et al.*, 2002). Assim, para avaliar a biodegradabilidade *in vitro* das membranas M-Qs, estas foram submetidas à ação de lisozima em tampão PBS, sendo que a evolução da degradação foi acompanhada *via* determinação da concentração de unidades *N*-glucosamina (*GlcN*) no sobrenadante em função do tempo de incubação (Figura 30) por reação com ninidrina. De acordo com Nordtveit, Vårum *et al.* (1994) e Aiba (1992), a degradação da quitosana pela lisozima depende do $\overline{GA}$ assim como da frequência de díades *GlcNAc/GlcNAc*, expressa por F_{AA} , pois a lisozima apresenta ação específica de degradação à sequências de dois ou três unidades *GlcNAc* vizinhas. Assim, as membranas M-Qs-2 ($F_{AA} \approx 0,05$) e M-Qs-3 ($F_{AA} \approx 0,01$) foram lentamente degradados durante os 15 dias

de incubação. Entretanto, a membrana M-Qs-1 ($F_{AA} \approx 0,15$) foi rapidamente degradada já nos primeiros 6 dias de incubação (**Figura 30**).

Figura 30 – Curvas de hidrólise enzimática das membranas M-Qs-x onde “x” (1, 2 ou 3) corresponde ao número de processos DAIUS a qual a quitosana foi submetida (Qs-1, $\overline{DA} \approx 36,7\%$; Qs-2, $\overline{DA} \approx 15,0\%$ e; Qs-3, $\overline{DA} \approx 4,3\%$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL^{-1} de lisozima.

Tendo em conta a concentração de unidades *GlcN* após 15 dias de incubação, pode-se observar que a taxa de degradação da membrana M-Qs-1 ($\approx 660 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) é aproximadamente 6,5 vezes mais elevada quando comparado às membranas M-Qs-2 e M-Qs-3 ($\approx 105 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), resultado que é corroborado por Nordtveit, Vårum *et al.* (1994) que observaram que a degradação enzimática é diretamente dependente do grau de acetilação, sendo observado o aumento de 6 vezes na razão de degradação enzimática com o aumento do $\overline{GA}$ de $\approx 17\%$ para $\approx 27\%$.

7.2 Membranas de Carboximetilquitosana

7.2.1 Grau Médio de Reticulação e Morfologia

A reação de reticulação de carboximetilquitosana resultou em membranas (M-CMQs-xy) completamente insolúveis em meio aquoso, cujo grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) depende da concentração do agente reticulante, bem como da massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) da carboximetilquitosana de partida (CMQs-x). Assim, quanto menor o valor de $\overline{M}_v$ de CMQs-x de partida e quanto maior a concentração de genipina utilizada na reação de reticulação, maior o valor de $\overline{GR}$ (**Tabela 6**).

Tabela 6 – Grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) das membranas M-CMQs-xy de acordo com a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) da carboximetilquitosana de partida e da concentração de genipina utilizada na reação de reticulação.

CMQs-x	$\overline{M}_v$ g mol ⁻¹	[Genipina] x 10 ⁻⁴ mol L ⁻¹	M-CMQs-xy	$\overline{GR}$ (%)
CMQs-0	190.000	1,0	M-CMQs-01	3,3 ± 1,9
CMQs-0	190.000	3,0	M-CMQs-03	9,5 ± 1,4
CMQs-0	190.000	5,0	M-CMQs-05	12,5 ± 0,8
CMQs-1	94.000	1,0	M-CMQs-11	4,2 ± 0,6
CMQs-1	94.000	3,0	M-CMQs-13	10,3 ± 1,1
CMQs-1	94.000	5,0	M-CMQs-15	14,0 ± 1,1
CMQs-3	43.000	1,0	M-CMQs-31	5,1 ± 0,6
CMQs-3	43.000	3,0	M-CMQs-33	11,6 ± 0,5
CMQs-3	43.000	5,0	M-CMQs-35	17,8 ± 1,0

A **Figura 31** evidencia que um aumento linear de $\overline{GR}$ foi observado com o aumento da concentração de genipina no caso da reticulação da membrana M-CMQs-3y (CMQs-3; $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), e que o desvio da linearidade, que ocorre nos casos das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0; $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) e M-CMQs-1y (CMQs-1; $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$), é mais acentuado quanto maior a massa molar da carboximetilquitosana submetida à reticulação. Estes resultados sugerem que a acessibilidade de genipina aos sítios reativos nas cadeias da carboximetilquitosana pode ser afetada pela conformação do polímero e/ou agregação macromolecular. Também foi observado que com o aumento da concentração de genipina, houve um significativo desvio da inclinação das retas quando comparado com a curva de reticulação teórica, provavelmente devido à auto-polimerização da genipina, que é favorecida pelo aumento da concentração de genipina em solução.

Figura 31 – Grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) das membranas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação. A linha sólida fina corresponde ao valor de reticulação teórico.

De fato, *Mi, Shyu et al. (2005)* relataram que a reticulação da quitosana com genipina é uma reação dependente do pH e que quando a reticulação é realizada em meio fortemente alcalino ($\text{pH} > 9$) resulta em uma matriz reticulada na qual o agente reticulante se auto-polimeriza (**Figura 15**) formando segmentos reticulantes contendo várias unidades de genipina, enquanto que em meios ácido e/ou levemente alcalino ($\text{pH} < 7,4$), as reticulações são formadas por poucas unidades de genipina. Assim, como o presente estudo as reações de reticulação de carboximetilquitosana ocorreram em $\text{pH} \approx 8$, o desvio das curvas da linearidade (**Figura 31**) se deve à possibilidade de ocorrência dos dois tipos de reticulação, predominando reticulações curtas quando baixas concentrações de genipina foram empregadas, enquanto que a formação de longos segmentos foi favorecida com o aumento da concentração de genipina, provavelmente devido à auto-polimerização do agente reticulante.

Independentemente da carboximetilquitosana de partida, ou da concentração de genipina empregada na reticulação, o procedimento experimental adotado para a realização da reação de reticulação e para formação das membranas reticuladas M-CMQs-xy resultou em materiais porosos, característica importante para suportar o crescimento celular. Além disso, tais membranas exibem morfologias diferentes de acordo com $\overline{M}_v$ da carboximetilquitosana de partida e do $\overline{GR}$ da membrana correspondente. As **Figuras 32, 33 e 34** mostram as morfologias das superfícies e as **Figuras 35, 36 e 37** mostram as morfologias das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-xy. Assim, tais resultados mostram que quanto maiores os valores de $\overline{M}_v$ e $\overline{GR}$, os poros são maiores e mais bem distribuídos na superfície da membrana, que se apresentam mais homogêneas (**Tabela 7**).

Figura 32 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação.

Figura 33 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação.

Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura das superfícies das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação.

Figura 35 – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação.

Figura 36 – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação.

Figura 37 – Microscopia eletrônica de varredura das fraturas das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), onde “y” (1, 3 ou 5) caracteriza a concentração de genipina ($1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ou $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) empregada na reticulação.

Tabela 7 – Diâmetro médio dos poros (DP) e número médio de poros (NP) das membranas M-CMQs-xy de acordo com a massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v$) da carboximetilquitosana de partida (CMQs-x) e da concentração de genipina utilizada.

M-CMQs-xy	$\overline{GR}$ (%)	DP (μm)	NP (cm^{-2})
M-CMQs-01	$3,3 \pm 1,9$	115 ± 70	584
M-CMQs-03	$9,5 \pm 1,4$	122 ± 73	1.039
M-CMQs-05	$12,5 \pm 0,8$	112 ± 45	1.623
M-CMQs-11	$4,2 \pm 0,6$	94 ± 42	1.855
M-CMQs-13	$10,3 \pm 1,1$	99 ± 55	1.110
M-CMQs-15	$14,0 \pm 1,1$	107 ± 71	1.207
M-CMQs-31	$5,1 \pm 0,6$	92 ± 39	936
M-CMQs-33	$11,6 \pm 0,5$	99 ± 64	1.247
M-CMQs-35	$17,8 \pm 1,0$	106 ± 57	1.532

A **Tabela 7** mostra que o número médio de poros por unidade de área (PN) aumenta com o aumento da $\overline{M}_v$ e do $\overline{GR}$, sendo que a mesma tendência é observada no que diz respeito ao diâmetro médio dos poros, que parecem convergir para um valor constante com o aumento da concentração de genipina, independentemente da $\overline{M}_v$ (**Figura 38**).

Figura 38 – Diâmetro médio dos poros na superfície das membranas reticuladas membranas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.

Assim, tais dados mostram que a porosidade das membranas reticuladas M-CMQs-xy pode ser controlada a partir da massa molar média viscosimétrica da carboximetilquitosana de partida (CMQs-x) e do grau médio de reticulação.

7.2.2 Grau Médio de Hidratação

As medidas de grau médio de hidratação, ou grau de absorção de solução PBS, das membranas reticuladas M-CMQs-xy foram realizadas após imersão em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C. As curvas de grau médio de hidratação *versus* tempo das membranas reticuladas M-CMQs-xy (**Figuras 39, 40 e 41**) mostram forte influência da massa molar

média da carboximetilquitosana de partida e do grau médio de reticulação sobre a capacidade de absorver solução PBS. Em todos os casos foi observado que as membranas apresentam rápida hidratação nas primeiras 5 horas e que após aproximadamente 20 horas atingem um platô de máxima hidratação. Também foi observado que as membranas que adsorvem mais água são aquelas produzidas a partir de carboximetilquitosana de elevada massa molar média viscosimétrica (M-CMQs-0y) e que em todos os casos, a capacidade de adsorção diminui à medida que aumenta o $\overline{GR}$ da membrana e diminui a $\overline{M}_v$ da carboximetilquitosana de partida.

Figura 39 – Curvas de hidratação das membranas reticuladas, M-CMQs-0y (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de imersão em PBS.

Figura 40 – Curvas de hidratação das membranas reticuladas, M-CMQs-1y (CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de imersão em PBS.

Figura 41 – Curvas de hidratação das membranas reticuladas, M-CMQs-3y (CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de imersão em PBS.

Os dados de hidratação das membranas reticuladas de carboximetilquitosana após 48 horas de hidratação (**Figura 42**) mostram que as maiores taxas de hidratação foram apresentadas pelas membranas produzidas a partir das amostras CMQs-0 ($\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) e CMQs-1 ($\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$), as quais possuem maior massa molar média viscosimétrica, enquanto que o aumento da concentração de agente reticulante levou à redução significativa da taxa de hidratação em todos os casos. Tais resultados são corroborados por Mi, Tan *et al.* (2001), que estudaram o efeito da reticulação por glutaraldeído e genipina sobre as propriedades de membranas de quitosana, sendo observado que o aumento no grau de reticulação levou à redução significativa do grau de hidratação das membranas.

Figura 42 – Grau médio de hidratação das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), após 48 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C, em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.

7.2.3 Propriedades Mecânicas

As análises dinâmico-mecânicas no modo tração das membranas reticuladas M-CMQs-xy foram realizadas após estas terem sido hidratadas em solução PBS (pH = 7,4) por 24 horas a 37°C, a fim de se avaliar suas propriedades mecânicas sob as condições semelhantes àquelas empregadas em procedimentos cirúrgicos. As **Figuras 43, 44 e 45** mostram as curvas de resistência à tração das membranas reticuladas M-CMQs-0y, M-CMQs-1y e M-CMQs-3y, respectivamente. As curvas mostraram comportamento similar ao comportamento de elastômeros, com altos valores de alongamento, e com contínuo aumento da resistência à tração com o aumento da deformação.

Figura 43 – Curvas de resistência mecânica à tração das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) após 24 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C.

Figura 44 – Curvas de resistência mecânica à tração das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) após 24 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C.

Figura 45 – Curvas de resistência mecânica à tração das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) após 24 horas de imersão em tampão PBS à temperatura de 37°C.

As **Figuras 46, 47 e 48** mostram os resultados das análises referentes à resistência máxima à tração, ao módulo de elasticidade e ao percentual de alongamento máximo na ruptura, respectivamente.

Figura 46 – Valores de resistência máxima à tração das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.

Os efeitos da reticulação com genipina sobre a resistência máxima à tração (**Figura 46**) foram mais evidentes nos casos das membranas reticuladas M-CMQs-0y e M-CMQs-1y, sendo que nesses casos o aumento do grau médio de reticulação resultou em estruturas menos resistentes e mais susceptíveis à tração e ruptura. De fato, tal comportamento é claramente observado no caso das membranas reticuladas M-CMQs-0y, enquanto as membranas reticuladas M-CMQs-1y apresentam comportamento diferente, pois nesse caso foi observado um ponto de máxima resistência quando a concentração de genipina empregada na reação de

reticulação foi $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Por outro lado, as membranas reticuladas M-CMQs-3y, preparadas a partir de carboximetilquitosana de massa molar média viscosimétrica inferior, apresentam maior resistência máxima à tração quanto maior o grau médio de reticulação, mas são menos resistentes à tração em comparação com a maioria das membranas reticuladas M-CMQs-0y e M-CMQs-1y.

Figura 47 – Valores de módulo de elasticidade das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.

Figura 48 – Valores de percentual de alongamento máximo na ruptura das membranas reticuladas M-CMQs-x, onde "x" (0, 1 ou 3) identifica as amostras de carboximetilquitosana (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$; CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$ e; CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$), em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.

Com relação aos módulos de elasticidade (**Figura 47**) e de alongamento (**Figura 48**) das membranas reticuladas M-CMQs-xy, foi observado que a massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) da carboximetilquitosana de partida (CMQs-x) e o grau médio de reticulação das membranas ($\overline{GR}$) afetam a primeira propriedade, enquanto a taxa de alongamento é independente da $\overline{M}_v$, mas é tanto menor quanto maior o $\overline{GR}$, resultando em membranas mecanicamente frágeis e menos flexíveis.

Adicionalmente, os resultados mostram que as membranas fracamente reticuladas ($\overline{GR} < 6,0 \%$) e produzidas a partir de carboximetilquitosana de elevada massa molar média viscosimétrica exibem as melhores propriedades mecânicas, o que pode ser atribuído à ocorrência de numerosos emaranhamentos, ou “nós”, das cadeias, resultando em rede polimérica densa que ainda é capaz de se expandir e resistir a tensões mecânicas.

Tal comportamento é claramente observado no caso da membrana reticulada M-CMQs-01 que é capaz de adsorver enormes quantidades de solução PBS ($\overline{GH} \approx 1.750\%$) e apresenta elevada resistência à tração (> 300 kPa) e alongamento máximo na ruptura ($> 65\%$). Assim, é proposto que este comportamento é devido à ocorrência de numerosos emaranhados físicos e de reticulações curtas e longas de genipina, o que confere elasticidade à rede polimérica e melhora a capacidade de se expandir, resultando em elevada estabilidade física.

7.2.4 Degradação Enzimática

Para avaliar a biodegradabilidade *in vitro* das membranas de carboximetilquitosana reticuladas com genipina (M-CMQs-xy), estas foram submetidas à ação de lisozima em tampão PBS, sendo que a evolução da degradação foi acompanhada *via* determinação da concentração de unidades *N*-glucosamina (*GlcN*) no sobrenadante por reação com ninidrina com relação ao tempo de incubação. Para efeito de comparação, membranas não-reticuladas (M-CMQs-00, M-CMQs-10 e M-CMQs-30) também foram submetidas ao mesmo tratamento, sendo observado neste caso que tais membranas perderam integridade nos primeiros 3 dias e que, em consequência da ação de lisozima, a degradação dessas membranas resulta em elevadas concentrações de unidades *GlcN* desde o início do experimento (**Figuras 49, 50 e 51**).

Figura 49 – Curvas de hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-0y (CMQs-0, $\overline{M}_v \approx 190.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima.

Figura 50 – Curvas de hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-1y (CMQs-1, $\overline{M}_v \approx 94.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima.

Figura 51 – Curvas de hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-3y (CMQs-3, $\overline{M}_v \approx 43.000 \text{ g mol}^{-1}$) em função do tempo de incubação em solução de PBS (pH = 7,4) a 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima.

Figura 52 – Curvas de máxima hidrólise enzimática das membranas reticuladas M-CMQs-xy, incubadas por 15 dias em solução de PBS (pH = 7,4) à temperatura de 37°C contendo 1.000 U mL⁻¹ de lisozima, em função da concentração de genipina utilizada durante a reação de reticulação.

No entanto, as curvas relativas às membranas reticuladas preparadas a partir da carboximetilquitosana de elevada massa molar (amostras CMQs-0 e CMQs-1) apresentam taxa de degradação enzimática tanto menor quanto maior a concentração de genipina empregada na reação de reticulação (**Figuras 49 e 50**), o que se deve à formação de rede polimérica tridimensional resistente ao ataque de lisozima. De fato, tal comportamento foi observado para todas as membranas reticuladas, o que é evidenciado pela comparação das concentrações de unidades *GlcN* após 15 dias de incubação em tampão PBS contendo lisozima (**Figura 52**). Assim, esses dados permitem constatar que, em comparação com as correspondentes membranas não-reticuladas, houve redução da taxa de hidrólise com o aumento do grau de reticulação nos casos das amostras M-CMQs-01 ($\overline{GR} \approx 3,3\%$) e M-CMQs-05 ($\overline{GR} \approx 12,5\%$). Entretanto, as membranas reticuladas que foram preparadas a partir de carboximetilquitosana de menor massa molar (CMQs-3), apresentaram maior liberação de unidades *GlcN* mesmo possuindo maior grau de reticulação. Comportamento similar foi observado por Lu, Sheng *et al.* (2009), que estudaram a degradação enzimática das membranas de quitosana e reticuladas com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e observaram que a fragmentação da rede polimérica reticulada e a liberação de oligômeros em solução é dependente do grau de reticulação e da massa molar média do polímero. Assim, quando o polímero de partida apresenta elevada massa molar média, a membrana reticulada apresenta baixas taxas de degradação enzimática, pois a ação de lisozima é limitada e insuficiente para que ocorra a fragmentação da rede polimérica.

8 CONCLUSÃO: PARTE 2

Membranas de quitosana foram produzidas com sucesso sem a utilização de qualquer agente químico reticulante, já as membranas de carboximetilquitosana foram produzidas com sucesso após a reação de reticulação das amostras de carboximetilquitosana (CMQs-x) com genipina em diferentes concentrações. Os resultados obtidos permitem concluir que a morfologia e as propriedades das membranas, principalmente a capacidade de adsorver água, as propriedades mecânicas e a susceptibilidade à ação de lisozima, dependem das características dos polímeros de partida, *i.e.* quitosana e carboximetilquitosana, sobretudo da massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), e do grau médio de reticulação ($\overline{GR}$) após reação com genipina.

A morfologia das superfícies e das fraturas das membranas foi analisada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), evidenciando que tanto as membranas de quitosana quanto as membranas M-CMQs-xy são estruturas altamente porosas, sendo que as membranas M-CMQs-xy apresentam maior número de poros aparentes e maior área média dos poros quanto maior a $\overline{M}_v$ da CMQs-x de partida e maior o grau de reticulação ($\overline{GR}$) das membranas.

Grau médio de hidratação elevado e melhores propriedades mecânicas foram exibidos por membranas preparadas a partir de carboximetilquitosana de elevada $\overline{M}_v$. As curvas de hidrólise enzimática evidenciaram que a degradação por lisozima é mais acentuada com o aumento do tempo de incubação em todos os casos. Entretanto, as membranas mais reticuladas foram menos susceptíveis à ação de lisozima. Já para as membranas de quitosana (M-Qs-x) as curvas de hidrólise enzimática evidenciaram que a degradação por lisozima apresenta ação específica de degradação à sequências de dois ou três grupos *GlcNAc* vizinhos. Assim, as membranas M-Qs-2 ($F_{AA} \approx 0,05$) e M-Qs-3 ($F_{AA} \approx 0,01$) foram lentamente degradadas durante os 15 dias de incubação enquanto que as membranas M-Qs-1 ($F_{AA} \approx 0,15$) foram rapidamente degradadas já nos primeiros dias de incubação.

Assim, é concluído que as propriedades físico-químicas e mecânicas das membranas de quitosana não-reticuladas e de carboximetilquitosana reticuladas com genipina, bem como as suas susceptibilidades à degradação enzimática pela lisozima, podem ser controladas a partir do grau de acetilação (membranas de quitosana, M-Qs), da massa molar média da carboximetilquitosana de partida (CMQs-x) e da concentração de genipina empregada na etapa de reticulação no caso das membranas reticuladas M-CMQs-xy.

PARTE 3 – Hidrogéis de Quitosana

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 Quitosana

Quitosana resultante da desacetilação de beta-quitina extraída de gládios de lulas foi adquirida da Mahtani Chitosan (lote número: 114, 26/09/2012; Índia). Antes da utilização, a quitosana foi suspensa em 0,5% (g/g) em solução aquosa de ácido acético ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e mantida sob agitação mecânica por 24 horas. A solução resultante foi sucessivamente filtrada através de membranas de porosidade de 1,2, 0,8 e $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore). Solução de hidróxido de amônia foi então adicionada à solução de polímero para induzir a precipitação da quitosana, que foi extensivamente lavada com água deionizada e liofilizada.

9.2 Caracterização da Quitosana

O grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) da quitosana foi determinado de acordo com Hirai, Asako, Odani, Hisashi *et al.* (1991) a partir do espectro de RMN ^1H utilizando-se a **equação 1**. Para a aquisição dos espectros, aproximadamente 8 mg de quitosana foram adicionados em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (1 g/ 5 μL) e a suspensão foi mantida sob agitação constante por 24 horas, resultando em solução límpida e viscosa. Parte desta solução foi transferida para tubo apropriado ($\phi = 5\text{mm}$), e o espectro foi adquirido a 25°C em espectrofotômetro RMN (Bruker AVANCE III; 250 MHz). A cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) foi utilizada para a determinação da massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$) e índice de dispersividade ($\overline{D}$) da quitosana. Para isso, aproximadamente 1,0 mg de amostra foi dissolvido em 1,0 mL de solução tampão de acetato de amônia $0,15 \text{ mol L}^{-1}$ / ácido acético $0,20 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH} = 4,5$) sob agitação magnética constante por 24 horas. A solução resultante foi filtrada em membrana com diâmetro dos poros de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP) e 100 μL de solução foi injetada em colunas TSK2500 e TSK6000 acoplada em linha com um refractômetro

diferencial (Optilab rEX, Wyatt) e espalhamento de luz multi-ângulo (Dawn DSP-EOS, Wyatt; $\lambda = 690 \text{ nm}$).

9.3 Preparação dos Hidrogéis

Hidrogéis físicos de quitosana foram formados *via* gelificação de soluções aquosas do polímero induzida por neutralização com: *i*) solução aquosa de NaOH ou *ii*) vapor de NH_3 . A quitosana purificada foi dissolvida em solução diluídas de ácido acético em condição estequiométrica em relação ao teor de grupamentos *GlcN* presente em cada solução. As soluções de quitosana resultantes ($C_p = 1,0, 1,5, 2,0, 3,5$ e $5,0\%$) foram centrifugadas para a remoção de bolhas de ar e adicionadas às placas de Petri (diâmetro de $3,5 \text{ cm}$) (**Figura 53a**).

De modo a determinar a correlação entre quantidade de massa adicionada à placa de Petri e a espessura do hidrogel resultante, a quantidade de hidrogel (em gramas) adicionado à placa de Petri foi variado de $1,2 - 3,0 \text{ g}$ em todas as concentrações de solução de quitosana estudadas.

Para produzir a gelificação induzida por neutralização com solução de NaOH, as soluções de quitosana foram colocadas em contato com solução aquosa de NaOH ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$) durante 1 hora (**Figura 53b**). No caso da gelificação induzida por neutralização com vapor de NH_3 , as soluções de quitosana foram colocadas em dessecador contendo 100 mL de solução aquosa de NH_4OH ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) por 24 horas (**Figura 53c**). Independentemente do processo de gelificação, após a sua ocorrência, os hidrogéis de quitosana foram extensivamente lavados com água deionizada até a neutralização e eliminação completa de sais, e em seguida, armazenados em água deionizada à temperatura ambiente por uma semana antes das análises.

Figura 53 – Esquema experimental de gelificação: (a) solução viscosa de quitosana; (b) gelificação induzida por solução de NaOH e; (c) gelificação induzida por vapor de NH_3 .

9.4 Esterilização

Antes da realização das caracterizações e dos testes em animais, os hidrogéis de quitosana foram esterilizados em autoclave, método considerado um dos modos mais seguros e convenientes para a esterilização de dispositivos médicos, inclusive para os hidrogéis (Jarry, Chaput *et al.*, 2001; San Juan, Montembault *et al.*, 2012). Assim, os hidrogéis adicionados à frascos Schott foram submetidos à esterilização em autoclave (K_{7+} , Gentige) sob condições padrões a 121°C por 15 min.

Para a identificação dos hidrogéis, a codificação “HQs-z-w-St” foi usada, onde “HQs” representa a quitosana na forma de hidrogel, “z” representa a concentração de quitosana nas soluções utilizadas durante a preparação do hidrogel ($C_p = 1,0, 1,5, 2,0, 3,5$ e $5,0\%$), “w” descreve o processo de gelificação (“N” para gelificação induzida por solução de NaOH e “A” para gelificação induzida por vapor de NH_3), enquanto “St” indica a realização do processo de esterilização.

9.5 Teste de Armazenamento

Após esterilização, os hidrogéis de quitosana foram mantidos estocados em água deionizada à temperatura ambiente por 210 dias, e a massa molar média ponderal ($\overline{M}_w$) foi monitorada em função do tempo de armazenagem através do uso da cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Para isso a cada 30 dias, amostras esterilizadas de hidrogéis de quitosana foram liofilizadas, e as amostras secas foram suspensas em tampão de acetato de amônio 0,15 mol L⁻¹ / ácido acético 0,20 mol L⁻¹ (pH = 4,5) por 24 h, as soluções resultantes foram filtradas em membrana Millipore de porosidade de 0,45 µm e submetidas à SEC como descrito anteriormente.

9.6 Concentração Polimérica

A concentração final de quitosana nos hidrogéis foi determinada a partir da determinação da massa hidratada e da massa seca do hidrogel. Para isso, a massa do hidrogel (fragmento de 10 x 10 mm) foi determinada removendo-se o excesso de água superficial com papel toalha, e pesando-se imediatamente o hidrogel. Após a pesagem do hidrogel, este foi liofilizado e pesado, e a concentração polimérica final foi determinada pela **equação 12**:

$$C_{p-final} (\%) = \frac{M_0}{M_h} * 100 \quad (12)$$

onde $C_{p-final}$, M_h e M_0 correspondem a concentração polimérica final (%), massa do hidrogel hidratado (g) e massa do hidrogel seco (g), respectivamente.

9.7 Análises Reológicas

Medidas reológicas dinâmico-mecânicas foram realizadas à temperatura ambiente usando reômetro ARES (TA Instruments) operando com geometria placa-placa (25 mm de diâmetro). A amplitude de deformação foi estudada para assegurar que as medições fossem realizadas dentro da região viscoelástica linear (elongação máxima aplicada = 0,5%), resultando em módulos de armazenamento (G') e módulo de perda (G'') independentes da amplitude de deformação. A altura entre as placas foi deduzida a partir do sensor de força normal do reômetro, de modo a medir a localização da placa superior no primeiro contato com o hidrogel rígido (gap $\approx 1,0$ mm). As medidas de frequência angular foram realizadas no intervalo 100 rad s^{-1} - $0,05 \text{ rad s}^{-1}$.

9.8 Propriedades Mecânicas de Tração

As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram avaliadas através de análise dinâmica mecânica no modo de tração. Os testes de tração foram realizados em equipamento DMA Q800 (TA instruments) utilizando uma garra do tipo *Tension film*. As amostras foram cortadas em formato retangular, com dimensões 30 x 5,7 x 1,0 mm. Os testes foram realizados com espaço entre garras de 15 mm, com rampa de força de $0,1 \text{ N min}^{-1}$ até 18 N e força de pré-carga de 0,01 N à temperatura ambiente. As propriedades determinadas a partir das análises dinâmico-mecânicas no modo de tração foram: resistência máxima à tração (MPa), módulo de elasticidade (MPa) e percentual de alongamento máximo na ruptura (%).

9.9 Teste de Sutura

A suturabilidade dos hidrogéis foi avaliada a partir do teste de resistência do hidrogel ao rasgo no ponto de sutura. O método consiste em fazer um ponto frouxo de sutura no hidrogel e aumentar gradualmente a força aplicada à sutura até a ocorrência da ruptura.

Amostras de 10 x 10 mm, com variados valores de espessura foram analisadas no equipamento DMA Q800 (TA instruments) utilizando uma garra do tipo *Tension film*. O hidrogel foi perfurado a 3 mm de sua borda inferior com um fio de sutura (fio de polipropileno, Prolene 6/0; Ethicon, então foi fixado à garra superior enquanto o fio de sutura foi fixado na garra inferior. As medidas de tração de sutura foram realizadas à temperatura ambiente com rampa de força de 0,1 N min⁻¹ até 18 N e força de pré-carga de 0,01 N, o que permitiu determinar a força máxima à ruptura.

9.10 Estudo *in vivo*

Quarenta ratos Wistar fêmeas (Laboratórios Janvier; Genest St Isle, França) pesando de 200 - 250 g foram usados neste estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética institucional e respeitam a legislação europeia sobre cuidados com animais (Diretiva n.º 86/609 / CEE). Os ratos foram anestesiados com isoflurano (Baxter; Maurepas, França), 3% para a indução e 1,5% para manutenção da anestesia. A ventilação traqueal foi mantida a uma taxa de 70 min⁻¹ com volume inflado médio de 0,2 mL (Alphalab; Minerve, França). A analgesia foi mantida por 2 dias após a cirurgia com injeções peritoneal de cetoprofeno à taxa de 10 mg kg⁻¹ (Merial; Lyon, França). Para criar o modelo de enfarte do miocárdio, o coração foi exposto por toracotomia esquerda e a artéria coronária esquerda foi fechada permanentemente por um ponto de sutura entre o tronco da artéria pulmonar e do apêndice atrial esquerdo. Três semanas após o infarto do miocárdio, os ratos foram submetidos a uma avaliação por ecocardiografia na linha de base da função do ventrículo esquerdo (VE). Após a avaliação por ecocardiografia os animais foram então aleatoriamente distribuídos, de modo a receber os hidrogéis de quitosana HQs-1,5-N-St (n = 12) ou hidrogéis HQs-2,0-N-St (n = 12) que foram suturados sobre a área infartada. Os ratos não tratados com os hidrogéis foram usados como grupo controle (n = 8). A taxa de mortalidade devido a procedimentos cirúrgicos foi de aproximadamente 20% em todos os grupos.

9.11 Avaliação da Função Ventricular Esquerda

A avaliação da função cardíaca do modelo enfartado antes e depois da adição do hidrogel foi avaliada por ecocardiografia transtorácica (Sequoia 516, equipado com uma fase de 13 MHz com sonda linear 15L8; Siemens; Saint-Denis, França) em animais sedados com isoflurano a 2% (Sigma-Aldrich). O eixo bidimensional parasternal permitiu a medida do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) e o volume sistólico final do ventrículo esquerdo (VSFVE) como descrito por Agbulut, Vandervelde *et al.* (2004). A fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE,%) foi calculada pela **equação 13**.

$$FEVE (\%) = \frac{VDFVE - VSFVE}{VDFVE} * 100 \quad (13)$$

9.12 Avaliação Histológica

Após a avaliação ecocardiográfica, os animais foram sacrificados com uma overdose de pentobarbital e os corações foram retirados e separados em duas metades por um corte de eixo curto através da porção média da área infartada. Os blocos foram imediatamente fixados em solução de formaldeído 4% por 24 horas, desidratados e então embebidos em parafina. As secções do coração foram cortadas, coradas com hematoxilina e eosina, e então examinadas por microscopia de luz.

10 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após a purificação, a quitosana apresentou coloração branca, e a solução obtida foi totalmente transparente, sem coloração aparente e altamente viscosa. A caracterização por RMN ^1H e SEC mostrou que a quitosana utilizada neste projeto foi extensivamente desacetilada ($\overline{GA} \approx 2,8\%$), com alta massa molar média ponderal ($\overline{M_w}$ 640.000 g mol $^{-1}$), baixo índice de dispersividade ($D \approx 1,34$) e teor de água de aproximadamente $10 \pm 1\%$ (g/g).

A formação de hidrogéis a partir da neutralização de soluções viscosas de quitosana é um processo físico-químico complexo, que envolve uma variedade de interações moleculares. Em solução ácida a pH $\approx 4-5$ abaixo do pKa de unidades aminas (pKa $\approx 6,5$), as cadeias de quitosana estão carregadas positivamente devido à protonação dos grupos amino de unidades *GlcN*. Entretanto, para favorecer a formação de hidrogéis físicos de quitosana (Montembault, Viton *et al.*, 2005), a densidade de carga das cadeias de quitosana deve ser reduzida de modo a promover interações hidrofóbicas e o estabelecimento de ligações hidrogênio, porém evitando atingir o completo desemaranhamento e/ou colapso das cadeias poliméricas.

Durante o processo de gelificação, foi observado visualmente um deslocamento gradual da interface esbranquiçada (neutralizada) solução/gel a partir da superfície para o fundo das placas de Petri, evidenciando que o processo de gelificação é uma neutralização por difusão da solução alcalina. Após a lavagem foi observado que os hidrogéis eram materiais mais duros ou mais macios de acordo com a concentração de quitosana e processo de gelificação utilizado (Figura 54).

Figura 54 – Hidrogéis de quitosana (HQS-z-w) obtidos a partir de diferentes concentrações de solução polimérica (2,0, 3,5 ou 5,0% (g/g)) e gelificados por dois modos diferentes de neutralização ("N" para gelificação induzida por solução de NaOH e "A" para gelificação induzida por vapor de NH_3).

Os hidrogéis preparados a partir de soluções de quitosana na concentração de 0,5% (g/g), independentemente do processo de gelificação, foram extremamente frágeis, quebrando-se espontaneamente em fragmentos durante a lavagem e manipulação. Em contraste, a produção de hidrogéis com concentração inicial da solução de quitosana de 10,0% (g/g) resultou em hidrogéis não homogêneos, uma vez que era difícil de espalhar a solução de quitosana homogeneamente nas placas de Petri, devido à alta viscosidade da solução.

Os hidrogéis produzidos a partir de soluções com concentração de quitosana entre 1,0 e 5,0% (g/g) foram homogêneos. No entanto, os hidrogéis gelificados a partir de vapor de NH_3 (HQs-A) foram constituídos por duas camadas (**Figura 55b**), uma camada externa resistente (com espessura 0,10-0,15 mm) formada na superfície da solução (interface solução / vapor de NH_3), enquanto a camada interna, constituída por um hidrogel mais esbranquiçado, se mostrou macio e quebradiço ao se curvar o hidrogel (**Figura 55**). Em concentrações elevadas de quitosana ($C_p \geq 5,0\%$ (g/g)), não há a separação das duas camadas formadas (**Figura 55a**), entretanto em menores concentrações poliméricas ($C_p \leq 3,5\%$ (g/g)) as duas camadas formadas são facilmente separadas (**Figura 55b**).

Figura 55 – Estrutura bicamada macroscópica dos hidrogéis: (a) HQs-5,0-A com concentração polimérica inicial de 5,0% (g/g) e (b) HQs-3,5-A com concentração polimérica inicial de 3,5% (g/g), ambos gelificado por vapores de NH_3 .

A estrutura em duas camadas só foi obtida por gelificação induzida por vapor de NH_3 , sendo a formação da camada externa atribuída à rápida neutralização da superfície da solução de quitosana pela formação da NH_4OH . Entretanto, o gel interno foi formado a partir da difusão lenta do NH_4OH através da membrana formada. Com a lenta difusão, houve tempo suficiente para o desemaranhamento parcial das cadeias, produzindo assim hidrogéis mais macios e menos resistentes.

A esterilização por vapor a quente não induziu alterações visíveis de cor ou forma aos hidrogéis. Contudo, ao armazenar os hidrogéis à temperatura ambiente em água deionizada, a camada interna dos hidrogéis HQs-1,0-A-St e HQs-1,5-A-St começaram a se quebrar e separar completamente após 3 a 4 semanas, sendo que a camada superficial permaneceu intacta e o hidrogel interno foi parcial ou completamente fragmentado.

10.1 Teste de Armazenamento

A partir das curvas de cromatografia de exclusão de tamanho (SEC) normalizadas em função do tempo de eluição (**Figura 56**), é possível observar que a quitosana de partida apresenta uma distribuição unimodal e simétrica, e o tratamento quantitativo de tais curvas SEC resultou em massa molar ponderal média ($\overline{M}_w$) $\approx 640.000 \text{ g mol}^{-1}$ e baixo índice de dispersidade ($\mathcal{D} \approx 1,3$). Após o processo de gelificação, o hidrogel de quitosana resultante (HQs-3,5-N) exibiu uma ligeira redução da $\overline{M}_w$ para $\approx 610.000 \text{ g mol}^{-1}$ e aumento do $\mathcal{D}$ para $\approx 1,5$, evidenciando que o processo de gelificação levou a degradação polimérica em baixa extensão. No entanto, a execução do processo de esterilização por vapor quente, levou a uma diminuição significativa da $\overline{M}_w$ para $\approx 375.000 \text{ g mol}^{-1}$ e um aumento do $\mathcal{D}$ para $\approx 1,8$ (**Figura 57**).

Figura 56 – Evolução das curvas SEC normalizadas de eluição em função do tempo de armazenamento dos hidrogéis esterilizados (HQs-3,5-N-St) em água deionizada.

Entretanto, um aumento significativo na $\overline{M}_w$ durante o armazenamento de hidrogéis esterilizados (HQs-3,5-N-St) é claramente evidenciada em contraste com hidrogéis não-esterilizados (HQs-3,5-N) (**Figura 57**). Tal comportamento provavelmente se deve à formação de intermediários reativos durante a esterilização, o que permite a ocorrência de uma reticulação lenta das cadeias de polímero. Assim, esta poderia estar relacionada com várias alterações de cadeias de quitosana, tais como a oxidação de álcoois primários para grupos aldeído, produção de radicais livres e/ou formação da ligação dupla com subsequente reação lenta com oxigênio.

Figura 57 – Evolução da massa molar média ponderal ($\bar{M}_w$) em função ao tempo de armazenamento dos hidrogéis de quitosana não esterelizados (HQs-3,5-N) e esterilizados (HQs-3,5-N-St) em água deionizada.

10.2 Espessura dos Hidrogéis e Testes de Concentração Polimérica Final

Durante o processo de lavagem, os hidrogéis podem hidratar ou excluir água da rede polimérica, o que pode levar a alterações significativas na concentração final do polímero, espessura do hidrogel e, assim, afetar suas propriedades físico-químicas e mecânicas. Para acompanhar a ocorrência de tal fenômeno, foram feitas marcas nas bordas externas das placas de Petri empregadas na preparação dos hidrogéis de tal maneira a permitir observar a alteração do volume inicialmente contido nas placas. Tal experimento revelou que não houve variação na espessura das bordas do hidrogéis, entretanto, as espessuras dos hidrogéis na região central das placas são menores e, assim, a partir de cortes radiais e medidas de

espessura, foi possível observar a ocorrência de variação de espessura das bordas para o centro dos hidrogéis, resultando em perfil semelhante ao de menisco (**Figura 58**).

Figura 58 – Espessuras do hidrogel de quitosana (HQs-2,0-N) em função dos diferentes cortes radiais.

Assim, com o objetivo de avaliar a ocorrência de hidratação ou de contração dos hidrogéis após a lavagem, as espessuras no centro dos hidrogéis foram medidas e relacionadas com as massas das soluções de quitosana adicionadas às placas de Petri (**Figura 59**).

Figura 59 – Espessuras no centro dos hidrogéis em função das massas de géis adicionadas às placas de Petri (diâmetro de 3,5 cm). A linha contínua representa a estimativa teórica da espessura na ausência de encolhimento e efeito menisco.

A partir da regressão múltipla dos dados mostrados na **Figura 59**, foi possível obter as equações que descrevem a variação da espessura de hidrogéis em relação à massa adicionada de gel (no intervalo de 1,2 a 3,0 g) e a concentração polimérica inicial (no intervalo de 1,0 a 5,0% (g/g)) para os hidrogéis HQs-N (**equação 13**) e hidrogéis HQs-A (**equação 14**) ajustada com ($R^2 > 0,97$ em ambos os casos).

$$\text{Espessura } N = 0.969 MG + 0.118 C_p - 0.546 \quad (13)$$

$$\text{Espessura } A = 1.086 MG + 0.191 C_p - 1.398 \quad (14)$$

onde “*Espessura N*” corresponde à espessura resultante para os hidrogéis produzidos pelo processo de gelificação induzida pela solução de NaOH, “*Espessura A*” corresponde à espessura resultante dos hidrogéis produzidos pelo processo de gelificação induzido pelo vapor de NH_3 , *MG* corresponde à massa de gel adicionada à placa de Petri e C_p corresponde à concentração polimérica inicial.

A partir da análise das **equações 13** e **14** é observado que as espessuras dos hidrogéis são proporcionais às massas de gel adicionado (*MG*). Com respeito à concentração polimérica utilizada (C_p), as espessuras dos hidrogéis de HQs-A apresentaram dependência da C_p aproximadamente 1,6 vezes maiores do que os hidrogéis HQs-N, provavelmente devido à rápida neutralização pela solução de NaOH, que provocou um forte gradiente de pH inicial, resultando na maior remoção de água no hidrogel.

Devido à contração, ambos os hidrogéis apresentam contribuição negativa no intercepto, entretanto, HQs-A apresenta valor de intercepto cerca de 2,5 vezes mais negativo do que os hidrogéis HQt-N, provavelmente devido à perda de massa que ocorre na "camada interna" em menores valores de concentrações poliméricas inicial.

A esterilização também conduziu à reduções de massa ($\approx 16\%$) e nas espessuras de todos os hidrogéis quando comparados com os hidrogéis antes da esterilização.

As variações da concentração polimérica final nos hidrogéis antes e depois de esterilizados em função da concentração polimérica nas soluções iniciais de quitosana são apresentadas na **Figura 60**.

Figura 60 – Variação da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) nos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois de esterilizados (HQs-N-St e HQs-A-St) em função da concentração polimérica nas soluções iniciais ($[Quitosana]_{Sol}$).

No intervalo de concentração polimérica inicial estudada (1,0 a 5,0% (g/g)), a variação da concentração polimérica final em função da concentração inicial em solução (**Figura 60**) apresenta comportamento linear (inclinação de $\approx 1,6$), independentemente do modo de gelificação. Após a esterilização, houve aumento na concentração de todos os hidrogéis, e aumento da inclinação da curva ($\approx 1,9$ para hidrogéis HQs-N-St; e $\approx 2,0$ para hidrogéis HQs-A-St), evidenciando que após a esterilização, os hidrogéis perderam água, resultando em maiores concentrações poliméricas finais após esterilização.

10.3 Análises Reológicas

As medidas reológicas foram realizadas com o objetivo de avaliar os módulos de armazenamento e de perda dos hidrogéis. No caso dos hidrogéis físicos de quitosana, estudos têm relatado a ocorrência de ligeiro decréscimo de G' e aumento de G'' a baixas frequências (Clark e Rossmurphy, 1987; Montembault, Viton *et al.*, 2005), entretanto, no geral, estes módulos são quase independentes dos valores de frequência utilizados, também sendo observado um platô de G' e G'' para os hidrogéis em altos valores de frequência (**Figura 61**).

Figura 61 – Variação de G' e G'' em função da frequência para o hidrogel de quitosana HQs-2,0-N.

A influência da concentração polimérica dos hidrogéis antes e depois da esterilização foi caracterizada através da medida do módulo de armazenamento no equilíbrio G_e (**Figura 62**), que corresponde ao valor médio da região platô de G' .

Figura 62 – Influência da concentração polimérica das soluções iniciais ($[Quitosana]_{Sol}$) no módulo de armazenamento no equilíbrio (G_e) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).

No intervalo de concentração investigado, foi observado que G_e aumentou com o aumento da concentração polimérica independentemente do processo de processo de gelificação e da esterilização, entretanto, os hidrogéis HQs-A apresentam menores valores de G_e (Figura 62). Além disso, foi observado que as curvas para os hidrogéis HQs-A-St atingem um ponto crítico em $[Quitosana]_{Sol} \approx 2,0\%$, e acima desta concentração polimérica, um forte aumento dos valores de G_e foi observado. Tal resultado é corroborado pelo estudo de Montembault, Viton *et al.* (2005) que observaram a ocorrência de ponto crítico de concentração polimérica ($\approx 1,8\%$) utilizado para produzir hidrogéis através da gelificação induzida por vapor de NH_3 . Acima da concentração crítica, o tempo para atingir o ponto de gel foi significativamente reduzido (Montembault, Viton *et al.*, 2005), resultando em alta viscosidade e elevado número de emaranhamentos das cadeias, favorecendo a formação de uma hidrogel com elevada densidade de nós físicos. Entretanto, na gelificação induzida por

solução de NaOH, devido à rápida difusão e neutralização dos grupos amino protonados das cadeias de quitosana, o desemaranhamento das cadeias de polímero durante a neutralização foi muito reduzido, resultando em géis mais rígidos.

Foi também observado que os hidrogéis esterilizados apresentaram maiores valores de G_e quando comparados com os correspondentes hidrogéis não-esterilizados, independentemente do processo de gelificação (**Figura 63**). Assim, as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis são dependentes do método de gelificação e da concentração polimérica final dos hidrogéis.

Figura 63 – Influência da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) no módulo de armazenamento no equilíbrio (G_e) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).

10.4 Propriedades Mecânicas de Tração

Os testes de tração foram realizados à temperatura ambiente para estabelecer o comportamento mecânico dos hidrogéis (espessura $\approx 1,0$ mm). Os hidrogéis apresentaram comportamento semelhante a elastômeros, com elevados valores de alongamento e aumento contínuo da resistência à tração (**Figura 64 e 66**).

Também foi observado que o aumento da concentração polimérica levou a aumento significativo tanto da tração quanto do alongamento máximo na ruptura. Os testes de tração evidenciaram que os hidrogéis HQs-N são mais resistentes quando comparados aos hidrogéis HQs-A.

Figura 64 – Curvas de resistência mecânica à tração dos hidrogéis físicos de quitosana HQs-N à temperatura ambiente.

*Resistencia máxima do equipamento (18 N) alcançada sem a ruptura do hidrogel HQs-10,0-N.

No decorrer dos testes de tração dos hidrogéis HQs-5,0-N e HQs-10,0-N, foi observado o aparecimento de gotas de água na superfície do hidrogel (**Figura 65**), provavelmente devido à ocorrência de ponto crítico de força (ponto 3 da **Figura 65**) em aproximadamente 0,75 MPa, na qual a força aplicada ao hidrogel foi mais elevada que a força que mantém a água presa à matriz do material, ocasionando a expulsão das moléculas de água na forma de pequenas gotas na superfície do hidrogel. Entretanto, não foi observado a ocorrência do aparecimento de gotas de água na superfície dos hidrogéis de HQs-A e nos hidrogéis HQs-N com concentração inferior a 5,0% (HQs-1,0-N, HQs-1,5-N, HQs-2,0-N e HQs-3,5-N), pois em nenhum destes casos, a resistência máxima à tração alcançou este valor crítico de 0,75 MPa, rompendo-se sempre abaixo deste valor.

Figura 65 – Curva de resistência mecânica à tração do hidrogel HQs-5,0-N à temperatura ambiente, e as imagens dos estágios específicos destacados no ensaio de tração: estágios 1 e 2, início da rampa de força com o alongamento; estágios 3 e 4, formação de gotas de água visíveis na superfície do corpo de prova; e estágio 5, ruptura do corpo de prova.

Figura 66 – Curvas de resistência mecânica à tração dos hidrogéis físicos de quitosana HQs-A à temperatura ambiente.

No decorrer dos testes de tração dos hidrogéis HQs-5,0-A e HQs-10,0-A, foi observada a ocorrência de pequenas quedas no valor de tração (destacado por setas na **Figura 66**), seguidas da continuidade da curva de tração até a ruptura. Nos hidrogéis HQs-A, a camada superficial do hidrogel é o principal componente dos valores de tração e responsável pelo alongamento máximo à ruptura em todos os casos, já a camada interna (mais frágil) começa a se romper em valores de alongamento superiores a 40-50%, sendo possível observar graficamente o momento do rompimento desta membrana interna (**Figura 67**).

Figura 67 – Curva de resistência mecânica à tração do hidrogel HQs-5,0-A à temperatura ambiente, e a imagem dos estágios específicos destacados do ensaio de tração: estágios 1 e 2, início da rampa de força com o alongamento; estágios 3 e 4, fratura da camada interna do hidrogel; e estágio 5, ruptura do corpo de prova.

A partir da avaliação específica das propriedades mecânicas das camadas superficiais dos hidrogéis de HQs-A em separado, estas exibiram comportamento comparáveis (ou mesmo superiores) às daquelas de hidrogéis HQs-N nas mesmas concentrações poliméricas. Assim, a camada superficial do hidrogel HQs-3,5-A (espessura $\approx 0,14 \pm 0,01$ mm) apresenta valores de resistência máxima à tração e alongação máxima na ruptura de $1,42 \pm 0,16$ MPa e $65,1 \pm 3,4\%$, respectivamente, enquanto que o hidrogel HQs-3,5-N (espessura $\approx 0,99 \pm 0,03$ mm) apresentou resistência máxima à tração de $0,87 \pm 0,08$ MPa e alongamento máximo na ruptura de $56,8 \pm 4,9\%$. Estes valores evidenciam a ocorrência de neutralização rápida na superfície dos hidrogéis HQs-N produziram estruturas mais densas e altamente emaranhadas, similares aos hidrogéis HQs-N.

O estudo visando avaliar a resistência à tração dos hidrogéis evidenciou acentuada dependência da concentração polimérica e do modo de gelificação, apresentando maiores valores de resistência máxima à tração com o aumento da concentração polimérica (**Figura 68**).

Figura 68 – Resistência máxima à tração em função da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).

O alongamento máximo na ruptura dos hidrogéis aumentou com o aumento da concentração polimérica final, independentemente do processo de gelificação (**Figura 69**). Entretanto, os comportamentos dos hidrogéis HQs-N podem ser separados em dois regimes com diferentes valores de inclinação da reta, evidenciando a ocorrência de ponto crítico em $[Quitosana]_{Hidrogel} \approx 4,5\%$ (ou seja, $[Quitosana]_{Sol} = 2,0\%$; **Figura 69**) enquanto acima desta concentração crítica, o alongamento máximo à ruptura aumenta fortemente com o aumento da concentração polimérica, como resultado do aumento da densidade de emaranhamento das cadeias poliméricas. Nos hidrogéis HQs-A, a formação de duas estruturas diferentes, resultou em altos valores de alongamento máximo na ruptura aparente, exibindo menor dependência da concentração polimérica em todos os casos.

Figura 69 – Alongamento máximo na ruptura em função da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).

As curvas que expressam a dependência do módulo de elasticidade (E) em função da concentração polimérica final dos hidrogéis de quitosana (**Figura 70**) evidenciam comportamento similar quando comparado ao módulo de armazenamento no equilíbrio (G_e) obtido a partir das análises reológicas, com razão $E/G_e \approx 3$ para todos os hidrogéis estudados.

Figura 70 – Módulo de elasticidade em função da concentração polimérica final ($[Quitosana]_{Hidrogel}$) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).

10.1 Teste de Sutura

Para aplicações dos hidrogéis em procedimentos cirúrgicos, em muitos casos, faz-se necessário o uso de sutura de modo a fixa-lo eficientemente ao local de aplicação desejado, exigindo assim que os biomateriais apresentem capacidade de resistir à sutura, sendo este parâmetro essencial para determinar a viabilidade de sua aplicação. Neste sentido, foram realizadas suturas frouxas nos hidrogéis de quitosana a 3 mm da borda inferior (**Figura 71**), e estes submetidos à rampa de força, de modo a determinar a força máxima de tensão na sutura à qual o hidrogel resiste.

Figura 71 – Curva de resistência mecânica à sutura do hidrogel HQs-3,5-N à temperatura ambiente, e imagens dos estágios específicos destacados no ensaio de tração: estágios 1 e 2, início da rampa de força com o alongamento; estágios 3 e 4, início do rasgo na sutura; e estágio 5, ruptura do corpo de prova.

A partir da análise da curva de sutura do hidrogel HQs-3,5-N (**Figura 71**), é possível observar que no início do estiramento da sutura, há a deformação/elongação com alta inclinação da curva, indicando que nesta região, o hidrogel apresenta alta resistência sem a ocorrência de grande deformação da sutura. Entretanto, ao aumentar ainda mais a força, ocorre o início do rasgo do hidrogel (estágio 2 da **Figura 71**) que se propaga com o aumento da força aplicada à sutura até a ruptura total (estágio 5 da **Figura 71**).

De modo a avaliar o efeito da espessura na resistência máxima à sutura (**Figura 72**), hidrogéis HQs-3,5-N e HQs-3,5-A foram confeccionados com variadas espessuras a partir do ajuste de massa de solução de quitosana adicionada à placa de Petri.

Figura 72 – Curvas de resistência mecânica à sutura em função da espessura dos hidrogéis HQs-3,5-N e HQs-3,5-A à temperatura ambiente.

A **Figura 72** mostra a variação linear da resistência máxima à sutura com o aumento da espessura, independentemente do modo de gelificação, os hidrogéis HQs-3,5-N e HQs-3,5-A apresenta correlação linear com valor de inclinação da reta de $63,3 \text{ gf mm}^{-1}$ e $10,9 \text{ gf mm}^{-1}$, respectivamente. Como a membrana superficial dos hidrogéis HQs-3,5-A tem espessura constante ($0,14 \pm 0,01 \text{ mm}$), e a resistência máxima à sutura foi fracamente afetada pela espessura total do hidrogel e a inclinação da curva foi pequena, confirmando que a camada superficial do hidrogel HQt-3,5-A é a principal responsável pelas propriedades mecânicas de sutura.

A evolução da resistência máxima à sutura (normalizada com relação à espessura do hidrogel (gf mm^{-1}) em função da concentração polimérica final (**Figura 73**) mostra que a resistência máxima à sutura aumenta drasticamente com o aumento da concentração polimérica final.

Figura 73 – Resistência máxima à sutura normalizada em função da concentração polimérica final ($[\text{Quitosana}]_{\text{Hidrogel}}$) dos hidrogéis antes (HQs-N e HQs-A) e depois da esterilização (HQs-N-St e HQs-A-St).

A esterilização levou à diminuição da resistência máxima à sutura para todos os hidrogéis. Aparentemente, a diminuição da massa molar média ponderal resultante do processo de esterilização teve impacto maior na resistência à sutura do que o aumento da concentração polimérica final provocada pela esterilização.

Testes preliminares indicaram que as aplicações biológicas dos hidrogéis HQs-N preparados a partir de soluções com concentração polimérica inicial superior a 1,5% (g/g) foram suturáveis sem a observação de rompimento da sutura durante os procedimentos experimentais *in vivo*. Entretanto, hidrogéis HQs-N com concentração polimérica inicial superior a 2,0%, foram extremamente rígidos, não sendo adequados para a aplicação nos testes *in vivo*, pois ao suturar sobre o coração do rato, estes hidrogéis não se deformaram, forçando o músculo cardíaco, e levando à morte dos animais testados.

10.1 Estudo *in vivo*

Com a finalidade de testar a biocompatibilidade e biofuncionalidade dos hidrogéis de quitosana, estes foram testados *in vivo*, utilizando-se modelo de infarto do miocárdio em ratos. Os hidrogéis HQs-1,5-N-St e HQs-2,0-N-St foram implantados na superfície do epicárdio cobrindo toda a área infartada nos ratos. Um mês após a aplicação do hidrogel, estes foram macroscopicamente visualizados na superfície do coração (**Figura 14a-d**). Para uma análise mais aprofundada, 20 secções por coração foram geradas e alguns desses cortes foram corados com hematoxilina-eosina para analisar a resposta em relação à inflamação, reação granulomatosa e fibrose do epicárdio. Todos os hidrogéis implantados foram visíveis na superfície do coração um mês após o implante, sendo observado a degradação parcial do hidrogel HQs-1,5-N-St, entretanto nenhuma degradação macroscópica foi observada nos hidrogéis HQs-2,0-N-St (**Figura 14a-d**). A degradação dos hidrogéis HQs-1,5-N-St foi acompanhada por infiltração de células predominantemente compostas por células mononucleares (**Figura 14C-D**). Em contraste, os hidrogéis HQs-2,0-N-St foram encapsulados por tecido fibroso com o acúmulo de células gigantes multinucleadas (ver seta na **Figura 14b**) demonstrando a presença de reação de corpo estranho moderada (**Figura 14a-b**).

Figura 74 – Avaliação da biocompatibilidade cardíaca de hidrogéis de quitosana um mês após a implantação. A coloração com hematoxilina-eosina demonstrou a presença de hidrogéis de quitosana (em vermelho) na superfície do coração. Observa-se a presença de tecido fibroso, células gigantes multinucleadas (seta em **b**) e incorporação parcial (asterisco em **b**) nos hidrogéis HQs-2,0-N-St (**a-b**). Em contraste, hidrogéis HQs-1,5-N-St foram perfeitamente incorporados e apresentaram degradação parcial acompanhada por infiltração de células mononucleares (**c-d**).

Figura 75 – A avaliação da função cardíaca do modelo infartado (a) do volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VDFVE) e (b) da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE,%) dos hidrogéis HQs-2,0-N-St e HQs-1,5-N-St.

Adicionalmente à avaliação morfológica, testes de ecocardiografia transtorácica foram realizados de modo a avaliar a ocorrência ou não de efeitos prejudiciais dos hidrogéis HQs-1,5-N-St e HQs-2,0-N-St sobre a função cardíaca. Os resultados desses testes (**Figura 75**), mostram que não houveram diferenças significativas entre os grupos controle e teste, demonstrando assim a biocompatibilidade e segurança de hidrogéis de quitosana para esta aplicação. Após a compilação dos resultados morfológicos e funcionais, pode ser concluído que os hidrogéis HQs-1,5-N-St foram os mais apropriados para a aplicação.

11 CONCLUSÃO: PARTE 3

Hidrogéis físicos contendo apenas quitosana e água, isentos de agentes de reticulação e/ou solventes orgânicos, foram preparados com sucesso através de processos de gelificação induzida por solução de NaOH ou vapor de NH_3 . De acordo com a concentração polimérica inicial e o modo de gelificação, os hidrogéis exibiram propriedades físico-químicas e mecânicas distintas.

A esterilização por vapor a quente dos hidrogéis de quitosana induziu a diminuição da massa molar média ponderal, no entanto observou-se que o aumento lento da massa molar média ponderal com o aumento do tempo de armazenamento em água dos hidrogéis esterilizados, indicando que estes hidrogéis podem ser armazenados por longos períodos, com pequena melhora das propriedades mecânicas. O aumento da concentração polimérica inicial levou à melhoria das propriedades mecânicas para todos os hidrogéis estudados, sendo observada a ocorrência de ponto de concentração crítica de quitosana ($\approx 2,0\%$), acima da qual o módulo de elasticidade e o alongamento máximo à ruptura aumentam fortemente com o aumento da concentração polimérica, como resultado do aumento da densidade de emaranhamento das cadeias poliméricas.

Hidrogéis preparados a partir de soluções de quitosana com concentração polimérica inicial de 1,5% (g/g) (HQs-1,5-N-St) foram incorporados e apresentaram degradação parcial acompanhada por infiltração de células mononucleares.

Tais resultados demonstram que é possível modular espessura, concentração polimérica final, propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas a partir do controle da concentração polimérica inicial, modo de gelificação e esterilização destes hidrogéis físicos de quitosana, objetivando a aplicações em engenharia de tecidos.

12 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A primeira parte do presente estudo tem como principal contribuição a produção de quitosana pelo processo multi-etapas de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom de alta intensidade (DAIUS) da beta-quitina, permitindo a produção de quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GA} \leq 5\%$) com massa molar excepcionalmente elevada ($\overline{M_w} \geq 900.000 \text{ g mol}^{-1}$), sem a utilização de aditivos, atmosfera inerte, e sob condições brandas quanto a temperatura (60°C) e tempo de reação (50 min./etapa).

A segunda parte do presente estudo evidenciou a importância da utilização de polímeros com elevada massa molar na confecção membranas, sendo que as membranas de carboximetilquitosana produzidas a partir de carboximetilquitosana de elevada massa molar (CMQs-0) exibiram as melhores propriedades mecânicas (resistência máxima à tração $\geq 300 \text{ kPa}$ e elongação máxima na ruptura $\geq 65\%$), elevada capacidade de hidratação ($\overline{GH} \geq 1.700\%$) e alta susceptibilidade à degradação enzimática ($[-\text{NH}_2]_{\text{max}} \geq 800 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). Importante ressaltar que tais membranas possuem baixo grau de reticulação ($\overline{GR} \leq 5\%$), evidenciando que com a utilização de carboximetilquitosana de alta massa molar, menores quantidades de agente reticulante foram necessárias para formação de membranas autossustentadas com excelentes propriedades físico-químicas, e alta susceptibilidade à ação enzimática.

A terceira e última parte do presente estudo evidenciou que as propriedades físico-químicas e mecânicas dos hidrogéis de quitosana podem ser controladas a partir da variação da concentração polimérica e de diferentes vias de gelificação, sendo que a avaliação biológica de tais hidrogéis para a regeneração do miocárdio enfartado mostrou que o hidrogel HQs-1,5-N-St ($C_p = 1,5\%$, gelificado a partir da solução de NaOH e esterilizado) foi perfeitamente incorporado sobre a superfície do epicárdio do coração e apresentou degradação parcial acompanhada por infiltração de células mononucleares, evidenciando a viabilidade de aplicação deste hidrogel para a regeneração do miocárdio após o enfarto.

13 PERSPECTIVA PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo cinético do processo de desacetilação assistida por irradiação de ultrassom (DAIUS), de modo a compreender melhor o mecanismo e a ação da irradiação de ultrassom no processo de desacetilação.
- Estudo cinético e parametrização do processo de despolimerização via irradiação de ultrassom para quitosana e carboximetilquitosana, de modo a obter polímeros com valores específicos de massa molar média a partir do polímero de quitosana e/ou carboximetilquitosana com diferentes massas molares, graus de acetilação e substituição.
- Estudo *in vivo* da eficácia das membranas de N,O-carboximetilquitosana reticuladas para a prevenção das aderências pericárdicas pós-cirúrgicas.
- Estudo da influência do grau de acetilação, grau de substituição e concentração polimérica das membranas de carboximetilquitosana sobre as propriedades físico-químicas e biológicas.
- Produção de hidrogéis de carboximetilquitosana reticulados e/ou blends de quitosana/carboximetilquitosana.
- Produção de hidrogéis com variado grau de acetilação, de modo a avaliar sua influência sobre as propriedades físicas, químicas e principalmente biológicas, já que a biodegradabilidade da quitosana é dependente do grau de acetilação.

14 REFERÊNCIAS

AGBULUT, O.; VANDERVELDE, S.; AL ATTAR, N.; LARGHERO, J.; GHOSTINE, S.; LEOBON, B.; ROBIDEL, E.; BORSANI, P.; LE LORC'H, M.; BISSERY, A.; CHOMIENNE, C.; BRUNEVAL, P.; MAROLLEAU, J. P.; VILQUIN, J. T.; HAGEGE, A.; SAMUEL, J. L.; MENASCHE, P. Comparison of human skeletal myoblasts and bone marrow-derived CD133(+) progenitors for the repair of infarcted myocardium. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 44, n. 2, p. 458-463, 2004.

AGULLÓ, E.; PENICHE, C.; TAPIA, C.; HERAS, A.; ROMÁN, J. S.; ARGÜELLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M.; MAYORGA, A.; NAKAMATSU, J.; ABRAM, A. P. **Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones**. Perú: Pontificia Universidad Católica Del Perú, 2004. 312 p.

AGUSTINA ALDANA, A.; GONZALEZ, A.; STRUMIA, M. C.; MARTINELLI, M. Preparation and characterization of chitosan/genipin/poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) films for controlled release drugs. **Materials Chemistry and Physics**, v. 134, n. 1, p. 317-324, 2012.

AIBA, S.-I. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 14, n. 4, p. 225-228, 1992.

AL SAGHEER, F. A.; AL-SUGHAYER, M. A.; MUSLIM, S.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from marine sources in Arabian Gulf. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 410-419, 2009.

AN, N. T.; THIEN, D. T.; DONG, N. T.; DUNG, P. L. Water-soluble N-carboxymethylchitosan derivatives: Preparation, characteristics and its application. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 489-497, 2009.

BAO, D.; CHEN, M.; WANG, H.; WANG, J.; LIU, C.; SUN, R. Preparation and characterization of double crosslinked hydrogel films from carboxymethylchitosan and carboxymethylcellulose. **Carbohydrate Polymers**, v. 110, p. 113-120, 2014.

BENNETT, S. L.; MELANSON, D. A.; TORCHIANA, D. F.; WISEMAN, D. M.; SAWHNEY, A. S. Next-generation hydrogel films as tissue sealants and adhesion barriers. **Journal of Cardiac Surgery**, v. 18, n. 6, p. 494-499, 2003.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, 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.; 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, n. 3, p. 644-650, 2007.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Efeito de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p. 169-173, 2001.

CAMPANA-FILHO, S. P.; SIGNINI, R. Effects of additives and inert gas bubbling on the deacetylation of chitosan. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 8, p. 701-709, 2002.

CAMPANA FILHO, S. P.; SIGNINI, R.; BARRETO, M. Effects of sonication on the reactivity of chitin toward its heterogeneous deacetylation. **International Journal of Polymeric Materials**, v. 51, n. 8, p. 695-700, 2002.

CHEN, L.; DU, Y.; ZENG, X. Relationships between the molecular structure and moisture-absorption and moisture-retention abilities of carboxymethyl chitosan: II. Effect of degree of deacetylation and carboxymethylation. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 4, p. 333-340, 2003.

CHEN, S. C.; WU, Y. C.; MI, F. L.; LIN, Y. H.; YU, L. C.; SUNG, H. W. A novel pH-sensitive hydrogel composed of N,O-carboxymethyl chitosan and alginate cross-linked by genipin for protein drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 96, n. 2, p. 285-300, 2004.

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.

CHEN, X. G.; WANG, Z.; LIU, W. S.; PARK, H. J. The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. **Biomaterials**, v. 23, n. 23, p. 4609-4614, 2002.

CLARK, A. H.; ROSSMURPHY, S. B. Structural and mechanical-properties of bio-polymer gels. **Advances in Polymer Science**, v. 83, p. 57-192, 1987.

DE ABREU, F. R.; CAMPANA, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 2, p. 214-221, 2009.

DELEZUK, J. A. D.; CARDOSO, M. B.; DOMARD, A.; CAMPANA, S. P. Ultrasound-assisted deacetylation of beta-chitin: influence of processing parameters. **Polymer International**, v. 60, n. 6, p. 903-909, 2011.

DEMARCHI, C. A.; DEBRASSI, A.; BUZZI, F. D. C.; CORREA, R.; CECHINEL FILHO, V.; RODRIGUES, C. A.; NEDELKO, N.; DEMCHENKO, P.; SLAWSKA-WANIEWSKA, A.; DLUZEWSKI, P.; GRENECHE, J.-M. A magnetic nanogel based on O-carboxymethylchitosan for antitumor drug delivery: synthesis, characterization and in vitro drug release. **Soft Matter**, v. 10, n. 19, p. 3441-3450, 2014.

DRAGET, K. I.; VARUM, K. M.; MOEN, E.; GYNNILD, H.; SMIDSROD, O. Chitosan cross-linked with Mo(VI) polyoxyanions - a new gelling system. **Biomaterials**, v. 13, n. 9, p. 635-638, 1992.

DRURY, J. L.; MOONEY, D. J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 24, p. 4337-4351, 2003.

DUNCAN, D. A.; YAACOBI, Y.; GOLDBERG, E. P.; MINES, M.; OBRIEN, D.; CONGDON, F.; CARMICHAEL, M. J. Prevention of postoperative pericardial adhesions with hydrophilic polymer-solutions. **Journal of Surgical Research**, v. 45, n. 1, p. 44-49, 1988.

FU, D.; HAN, B.; DONG, W.; YANG, Z.; LV, Y.; LIU, W. Effects of carboxymethyl chitosan on the blood system of rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 408, n. 1, p. 110-114, 2011.

FUJIKAWA, S.; YOKOTA, T.; KOGA, K.; KUMADA, J. The continuous hydrolysis of geniposide to genipin using immobilized beta-glucosidase on calcium alginate gel. **Biotechnology Letters**, v. 9, n. 10, p. 697-702, 1987.

FUJITA, M.; ISHIHARA, M.; MORIMOTO, Y.; SIMIZU, M.; SAITO, Y.; YURA, H.; MATSUI, T.; TAKASE, B.; HATTORI, H.; KANATANI, Y.; KIKUCHI, M.; MAEHARA, T. Efficacy of photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 in a rabbit model of chronic myocardial infarction. **Journal of Surgical Research**, v. 126, n. 1, p. 27-33, 2005.

GALLO, J. I.; ARTINANO, E.; DURAN, C. M. G. Clinical-experience with glutaraldehyde-preserved heterologous pericardium for the closure of the pericardium after open-heart surgery. **Thoracic and Cardiovascular Surgeon**, v. 30, n. 5, p. 306-309, 1982.

GARRETT, H. E.; MATTHEWS, J. Reoperative median sternotomy. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 48, n. 2, p. 305-305, 1989.

GE, H. C.; LUO, D. K. Preparation of carboxymethyl chitosan in aqueous solution under microwave irradiation. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 7, p. 1351-1356, 2005.

GONSALVES, A. D. A.; MELO ARAUJO, C. R.; SOARES, N. A.; FONSECA GOULART, M. O.; DE ABREU, F. C. Different strategies for crosslinking of chitosan. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ¹H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, n. 1, p. 87-94, 1991.

HIRANO, S.; KONDO, S.; OHE, Y. Chitosan gel: a novel polysaccharide gel. **Polymer**, v. 16, n. 8, p. 622, 1975.

HJERDE, R. J. N.; VARUM, K. M.; GRASDALEN, H.; TOKURA, S.; SMIDSROD, O. Chemical composition of O-(carboxymethyl)-chitins in relation to lysozyme degradation rates. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, n. 3, p. 131-139, 1997.

ISHIHARA, M.; OBARA, K.; ISHIZUKA, T.; FUJITA, M.; SATO, M.; MASUOKA, K.; SAITO, Y.; YURA, H.; MATSUI, T.; HATTORI, H.; KIKUCHI, M.; KURITA, A. Controlled release of fibroblast growth factors and heparin from photocrosslinked chitosan hydrogels and subsequent effect on in vivo vascularization. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 64A, n. 3, p. 551-559, 2003.

JARRY, C.; CHAPUT, C.; CHENITE, A.; RENAUD, M. A.; BUSCHMANN, M.; LEROUX, J. C. Effects of steam sterilization on thermogelling chitosan-based gels. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 58, n. 1, p. 127-135, 2001.

KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n. 3, p. 477-488, 2007.

KIM, K. W.; THOMAS, R. L.; LEE, C.; PARK, H. J. Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. **Journal of Food Protection**, v. 66, n. 8, p. 1495-1498, 2003.

KRAUSE, T. J.; ZAZANIS, G.; MALATESTA, P.; SOLINA, A. Prevention of pericardial adhesions with N-O carboxymethylchitosan in the rabbit model. **Journal of Investigative Surgery**, v. 14, n. 2, p. 93-97, 2001.

KUMIRSKA, J.; WEINHOLD, M. X.; SAUVAGEAU, J. C. M.; THOEMING, J.; KACZYNSKI, Z.; STEPNOWSKI, P. Determination of the pattern of acetylation of low-molecular-weight chitosan used in biomedical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 50, n. 4, p. 587-590, 2009.

LADET, S. G.; TAHIRI, K.; MONTEBAULT, A. S.; DOMARD, A. J.; CORVOL, M. T. M. Multi-membrane chitosan hydrogels as chondrocytic cell bioreactors. **Biomaterials**, v. 32, n. 23, p. 5354-5364, 2011.

LAMARQUE, G.; LUCAS, J. M.; VITON, C.; DOMARD, A. Physicochemical behavior of homogeneous series of acetylated chitosans in aqueous solution: Role of various structural parameters. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 1, p. 131-142, 2005.

LAMARQUE, G.; VITON, C.; DOMARD, A. Comparative study of the first heterogeneous deacetylation of alpha- and beta-chitins in a multistep process. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 3, p. 992-1001, 2004.

LEDUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIERES, J. Water-soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 24, n. 3, p. 209-214, 1994.

LI, Q.; WANG, X.; LOU, X.; YUAN, H.; TU, H.; LI, B.; ZHANG, Y. Genipin-crosslinked electrospun chitosan nanofibers: Determination of crosslinking conditions and evaluation of cytocompatibility. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 166-174, 2015.

LI, X.; NAN, K.; SHI, S.; CHEN, H. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan cross-linking composite membrane intended for tissue engineering. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2012.

LIN, Y. H.; LIANG, H. F.; CHUNG, C. K.; CHEN, M. C.; SUNG, H. W. Physically crosslinked alginate/N,O-carboxymethyl chitosan hydrogels with calcium for oral delivery of protein drugs. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 2105-2113, 2005.

LIU, X.; WANG, Q.; ZHUANG, X.; WU, B.; YANG, F.; ZENG, A. Study on antibacterial activity of O-carboxymethyl chitosan sodium salt and spinnability of O-carboxymethyl chitosan sodium salt/cellulose polyblends in N-methylmorpholine-N-oxide system. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 104-110, 2012.

LIU, X. F.; GUAN, Y. L.; YANG, D. Z.; LI, Z.; DE YAO, K. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324-1335, 2001.

LIU, Y.-F.; HUANG, K.-L.; PENG, D.-M.; DING, P.; LI, G.-Y. Preparation and characterization of glutaraldehyde cross-linked O-carboxymethylchitosan microspheres for controlled delivery of pazufloxacin mesilate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 1, p. 87-93, 2007.

LOPES, J. B.; DALLAN, L. A. O.; CAMPANA-FILHO, S. P.; LISBOA, L. A. F.; GUTIERREZ, P. S.; MOREIRA, L. F. R.; OLIVEIRA, S. A.; STOTF, N. A. G. Keratinocyte growth factor: a new mesothelial targeted therapy to reduce postoperative pericardial adhesions. **European Journal of Cardio-Thoracic Surgery**, v. 35, n. 2, p. 313-318, 2009.

LOPES, J. B.; DALLAN, L. A. O.; MOREIRA, L. F. P.; CAMPANA FILHO, S. P.; GUTIERREZ, P. S.; LISBOA, L. A. F.; DE OLIVEIRA, S. A.; STOLF, N. A. G. Synergism between keratinocyte growth factor and carboxymethyl chitosan reduces pericardial adhesions. **Annals of Thoracic Surgery**, v. 90, n. 2, p. 566-572, 2010.

LU, G.; KONG, L.; SHENG, B.; WANG, G.; GONG, Y.; ZHANG, X. Degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan and its potential application for peripheral nerve regeneration. **European Polymer Journal**, v. 43, n. 9, p. 3807-3818, 2007.

LU, G.; SHENG, B.; WANG, G.; WEI, Y.; GONG, Y.; ZHANG, X. Controlling the degradation of covalently cross-linked carboxymethyl chitosan utilizing bimodal molecular weight distribution. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 23, n. 5, p. 435-451, 2009.

MASUOKA, K.; ISHIHARA, M.; ASAZUMA, T.; HATTORI, H.; MATSUI, T.; TAKASE, B.; KANATAMI, Y.; FUJITA, M.; SAITO, Y.; YURA, H.; FUJIKAWA, K.; NEMOTO, K. The interaction of chitosan with fibroblast growth factor-2 and its protection from inactivation. **Biomaterials**, v. 26, n. 16, p. 3277-3284, 2005.

MI, F.-L.; TAN, Y.-C.; LIANG, H.-C.; HUANG, R.-N.; SUNG, H.-W. In vitro evaluation of a chitosan membrane cross-linked with genipin. **J. Biomater. Sci., Polym. Ed.**, v. 12, n. 8, p. 835-850, 2001.

MI, F.-L.; TAN, Y.-C.; LIANG, H.-F.; SUNG, H.-W. In vivo biocompatibility and degradability of a novel injectable-chitosan-based implant. **Biomaterials**, v. 23, n. 1, p. 181-191, 2002.

MI, F. L.; SHYU, S. S.; PENG, C. K. Characterization of ring-opening polymerization of genipin and pH-dependent cross-linking reactions between chitosan and genipin. **Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 1985-2000, 2005.

MILGALTER, E.; URETZKY, G.; SIBERMAN, S.; APPELBAUM, Y.; SHIMON, D. V.; KOPOLOVIC, J.; COHEN, D.; JONAS, H.; APPELBAUM, A.; BORMAN, J. B. Pericardial meshing - an effective method for prevention of pericardial adhesions and epicardial reaction after cardiac operations. **Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 90, n. 2, p. 281-286, 1985.

MONTEMBAULT, A.; TAHIRI, K.; KORWIN-ZMIJOWSKA, C.; CHEVALIER, X.; CORVOL, M. T.; DOMARD, A. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering. **Biochimie**, v. 88, n. 5, p. 551-564, 2006.

MONTEMBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Physico-chemical studies of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. **Biomaterials**, v. 26, n. 8, p. 933-943, 2005.

MONTEMBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in aqueous solution without cross-linking agent. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 2, p. 653-662, 2005.

MOORE, G. K.; ROBERTS, G. A. F. Chitosan gels .2. Mechanism of gelation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 2, n. 2, p. 78-80, 1980.

MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 1, p. 1-9, 2009.

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

NORDTVEIT, R. J.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Degradation of fully water-soluble, partially N-acetylated chitosans with lysozyme. **Carbohydrate Polymers**, v. 23, n. 4, p. 253-260, 1994.

OBARA, K.; ISHIHARA, M.; ISHIZUKA, T.; FUJITA, M.; OZEKI, Y.; MAEHARA, T.; SAITO, Y.; YURA, H.; MATSUI, T.; HATTORI, H.; KIKUCHI, M.; KURITA, A. Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. **Biomaterials**, v. 24, n. 20, p. 3437-3444, 2003.

RABEA, E. I.; BADAWY, M. E. T.; STEVENS, C. V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as antimicrobial agent: Applications and mode of action. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 6, p. 1457-1465, 2003.

REVES, B. T.; BUMGARDNER, J. D.; HAGGARD, W. O. Fabrication of crosslinked carboxymethylchitosan microspheres and their incorporation into composite scaffolds for enhanced bone regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part B-Applied Biomaterials**, v. 101B, n. 4, p. 630-639, 2013.

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

RINAUDO, M.; DUNG, P. L.; GEY, C.; MILAS, M. Substituent distribution on O, N-carboxymethylchitosans by ^1H and ^{13}C n.m.r. **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.

ROBERTS, G. A. F. **Chitin Chemistry**. London: Macmillan Press, 1992. p. 350.

ROBERTS, G. A. F.; TAYLOR, K. E. Chitosan gels .3. The formation of gels by reaction of chitosan with glutaraldehyde. **Makromolekulare Chemie-Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 190, n. 5, p. 951-960, 1989.

ROGOVINA, S. Z.; AKOPOVA, T. A.; VIKHOREVA, G. A. Investigation of properties of chitosan obtained by solid-phase and suspension methods. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 70, n. 5, p. 927-933, 1998.

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

SAN JUAN, A.; MONTEMBAULT, A.; GILLET, D.; SAY, J. P.; ROUIF, S.; BOUET, T.; ROYAUD, I.; DAVID, L. Degradation of chitosan-based materials after different sterilization treatments. In: 6th EEIGM INTERNATIONAL CONFERENCE ON ADVANCED MATERIALS RESEARCH, 2011, Nancy . **Proceedings...** Bristol: IOP Conference Series-Materials Science and Engineering, 2012, v. 31, p. 1-5.

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, n. 4, p. 242-249, 2003.

SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y.; TOKURA, S. N-acetyl group distribution in partially deacetylated chitins prepared under homogeneous conditions. **Carbohydrate Research**, v. 242, p. 167-172, 1993.

SCHATZ, C.; VITON, C.; DELAIR, T.; PICHOT, C.; DOMARD, A. Typical Physicochemical Behaviors of Chitosan in Aqueous Solution. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 3, p. 641-648, 2003.

SEEGER, J. M.; KAELIN, L. D.; STAPLES, E. M.; YAACOB, Y.; BAILEY, J. C.; NORMANN, S.; BURNS, J. W.; GOLDBERG, E. P. Prevention of postoperative pericardial adhesions using tissue-protective solutions. **Journal of Surgical Research**, v. 68, n. 1, p. 63-66, 1997.

SIGNINI, R.; CAMPANA, S. P. On the preparation and characterization of chitosan hydrochloride. **Polymer Bulletin**, v. 42, n. 2, p. 159-166, 1999.

SMITH, L. O. Prevention of surgically induced pericardial adhesions with combined dexamethasone and promethazine therapy. **The Journal of the Florida Medical Association**, v. 55, n. 5, p. 413-7, 1968.

SPEER, D. P.; CHVAPIL, M.; ESKELSON, C. D.; ULREICH, J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 14, n. 6, p. 753-764, 1980.

SUN, T.; ZHOU, D. X.; XIE, J. L.; MAO, F. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 3-4, p. 451-456, 2007.

SUNG, H. W.; CHEN, C. N.; HUANG, R. N.; HSU, J. C.; CHANG, W. H. In vitro surface characterization of a biological patch fixed with a naturally occurring crosslinking agent. **Biomaterials**, v. 21, n. 13, p. 1353-1362, 2000.

SUNG, H. W.; HUANG, D. M.; CHANG, W. H.; HUANG, R. N.; HSU, J. C. Evaluation of gelatin hydrogel crosslinked with various crosslinking agents as bioadhesives: In vitro study. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 46, n. 4, p. 520-530, 1999.

TERBOJEVICH, M.; CARRARO, C.; COSANI, A.; MARSANO, E. Solution studies of the chitin-lithium chloride-N,N-di-methylacetamide system. **Carbohydrate Research**, v. 180, n. 1, p. 73-86, 1988.

UPADHYAYA, L.; SINGH, J.; AGARWAL, V.; TEWARI, R. P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, n. 1, p. 452-466, 2013.

VACHOUD, L.; ZYDOWICZ, N.; DOMARD, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. **Carbohydrate Research**, v. 302, n. 3–4, p. 169-177, 1997.

VANDERSALM, T. J.; OKIKE, O. N.; MARSICANO, T. H.; COMPTON, C.; ESPINOZA, E. Prevention of postoperative pericardial adhesions - an animal study. **Archives of Surgery**, v. 121, n. 4, p. 462-467, 1986.

VÅRUM, K. M.; ANTOHONSEN, M. W.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Determination of the degree of N-acetylation and the distribution of N-acetyl groups in partially N-deacetylated chitins (chitosans) by high-field n.m.r. spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v. 211, n. 1, p. 17-23, 1991.

WANG, H.; SHI, J.; WANG, Y.; YIN, Y.; WANG, L.; LIU, J.; LIU, Z.; DUAN, C.; ZHU, P.; WANG, C. Promotion of cardiac differentiation of brown adipose derived stem cells by chitosan hydrogel for repair after myocardial infarction. **Biomaterials**, v. 35, n. 13, p. 3986-3998, 2014.

YAN, L.-P.; WANG, Y.-J.; REN, L.; WU, G.; CARIDADE, S. G.; FAN, J.-B.; WANG, L.-Y.; JI, P.-H.; OLIVEIRA, J. M.; OLIVEIRA, J. T.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Genipin-cross-linked collagen/chitosan biomimetic scaffolds for articular cartilage tissue engineering applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 95A, n. 2, p. 465-475, 2010.

ZHAO, D.; HUANG, J.; HU, S.; MAO, J.; MEI, L. Biochemical activities of N,O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 4, p. 832-837, 2011.