William Marcondes Facchinatto

Preparação e Caracterização de Nanosuspensões e Hidrogéis de *N,O*-metoxipoli(etilenoglicol)-*g*-quitosana para aplicação em Sistemas de Liberação de Fármacos Antitumorais

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

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se 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: 07/03/16

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

Facchinatto, William Marcondes

Preparação e caracterização de canosuspensões e hidrogéis de N,O-metoxipoli(etilenoglicol)-g-quitosana para aplicação em sistemas de liberação de fármacos antitumorais. / William Marcondes Facchinatto. — São Carlos, 2016.

139 f.

Dissertação (Mestrado em Físico-Química) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2016.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho

1. Quitosana. 2. Biopolímeros. I. Título.

*Referências Bibliográficas
conferidas pelo SBI/IQSC*

AGRADECIMENTOS

A minha namorada Carla Ferezin pelo constante incentivo, amor e carinho, minha cachorra Diva pela dose de alegria diária essencial e a todos meus familiares pelo apoio e boas lembranças.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho pela orientação, confiança durante todo o desenvolvimento do trabalho e contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA/ DQ/ UFSCar) pela colaboração e disponibilidade para uso do ICP OES, supervisionado pela técnica Lucimar.

Ao Prof. Dr. Ernesto Rafael Gonzalez e à Profa. Dra. Joelma Perez, ambos do Grupo de Eletroquímica do IQSC, pela disponibilidade para uso do Malvern Zetasizer®.

A Profa. Dra. Ana Maria Plepis e à técnica Virgínia da Conceição Martins, ambas do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC, pela disponibilidade para uso do Reômetro.

Aos técnicos do IQSC: André Luiz Tognon, Gabriel Christiano da Silva, Luiz Antônio Ramos, Marcelo Luiz Calegaro e Sylvana Cardoso por toda colaboração prestada.

Aos amigos Químicos Experimentais: Anderson, Andrea, Daniella, Danilo, Fernando, Flávio, Joice, Lívia, Rachel, Tonimar e Virgínia, pelo acolhimento, valiosas discussões científicas, profissionalismo, estímulo e excelentes momentos de descontração.

Aos meus amigos Alexandre Polizello, Aline Marques, Christiane Tragante, Felipe da Silva, Felipe Fontana, Fernando Conceição, Gustavo Targino, Idelma Terra, Josiane Torres, Luciano Falqueto, Luíz Gustavo D'Aloia, Marcos Felipe Sampaio, Raphael Caface, Tatiana Massaro e outros não menos importantes pelo companheirismo e bons momentos.

A Dra. Débora Terezia Balogh por toda colaboração profissional e acadêmica compartilhada até o momento.

Ao Instituto de Química de São Carlos e à Profa. Dra. Elisabete Frollini pela infraestrutura oferecida para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado e ao PROEX/ CAPES pelo apoio financeiro.

Meus sinceros agradecimentos a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigado!

“Aplausos, quando os não fundamenta o mérito, afagam certamente o espírito, e dão algum verniz de celebridade; mas quem tem vontade de aprender e quer fazer alguma coisa, prefere a lição que melhora ao ruído que lisonjeia.”

MACHADO DE ASSIS,
Ressurreição

“... Porque ter a mente boa não é o bastante; o principal é aplicá-la bem. As maiores almas são capazes tanto das maiores virtudes quanto dos maiores vícios, e aqueles que marcham lentamente podem avançar muito mais, se seguirem o caminho certo, do que os que correm porém dele se afastam.”

DESCARTES,
Discurso sobre o método, parte I

RESUMO

Dados do Instituto Nacional do Câncer revelam 14,1 milhões de casos novos de câncer em 2012 em todo o mundo, e a estimativa para 2014/2015 no Brasil aponta para mais 500 mil novos casos. Assim, pesquisas voltadas à produção de nanopartículas e hidrogéis, constituídos de polímeros naturais ou sintéticos, são importantes para o desenvolvimento de sistemas destinados à liberação controlada de fármacos antitumorais. Nesse sentido, este estudo visou produzir derivados hidrofílicos de quitosanas, *N,O*-metoxi(polietilenoglicol)-*g*-quitosana, destinados ao encapsulamento e à liberação de fármacos antitumorais. As características estruturais e físico-químicas dos polímeros foram avaliadas por FTIR, RMN ^1H , solubilidade em função do pH, viscosimetria, DRX e TGA. As quitosanas de partida, com diferentes graus médios de desacetilação e massas molares médias viscosimétricas, QD1x ($\overline{GD} = 64,0 \pm 1,1 \%$ e $\overline{M}_v = 495,6 \pm 6,3 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), QD2x ($\overline{GD} = 75,8 \pm 0,8 \%$ e $\overline{M}_v = 346,8 \pm 5,8 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) e QD3x ($\overline{GD} = 92,3 \pm 0,9 \%$ e $\overline{M}_v = 501,9 \pm 5,9 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), produzidas pela aplicação do processo DAIUS à β -quitina, e quitosana comercial, Q ($\overline{GD} = 94,7 \pm 0,7 \%$ e $\overline{M}_v = 82,9 \pm 2,0 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), foram avaliadas quanto aos teores de metais pesados por ICP OES e os resultados comparados aos limites permitidos pela ANVISA e Farmacopeia norte-americana. Teores significativos de metais foram detectados nas quitosanas QD1x, QD2x e QD3x (Ti e Al) e na quitosana comercial (Ni). O emprego de α -metoxipoli(etilenoglicol)- ω -carboxi possibilitou a síntese dos derivados PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ, que apresentaram graus médios de substituição semelhantes ($\overline{GS}_T \approx 40\%$). Os derivados foram hidrossolúveis em amplo intervalo de pH (1 – 11) e apresentaram viscosidades intrínsecas significativamente inferiores quando comparados às quitosanas. Foi observado que a estabilidade térmica e a cristalinidade das quitosanas são inferiores às de beta-quitina, enquanto os derivados exibiram maior cristalinidade e são termicamente mais estáveis quando comparados às quitosanas. Em geral, o aumento da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$ empregada na preparação das nano e microsuspensões de polímero/TPP pelo método de gelificação iônica resultou no aumento da densidade de cargas positivas nas superfícies das partículas. Entretanto, a ocorrência de numerosas cadeias de mPEG nos polímeros *N,O*-mPEG-*g*-quitosana levou à predominância das cadeias laterais hidrofílicas nas superfícies das partículas, blindando as cargas positivas, favorecendo a hidratação das partículas e o aumento dos diâmetros hidrodinâmicos médios. A influência das viscosidades intrínsecas dos polímeros e das concentrações poliméricas foi avaliada através do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$). Essa avaliação revelou que os diâmetros hidrodinâmicos médios das partículas são diretamente afetados por $c[\eta]$ nos casos dos sistemas quitosana/TPP, enquanto as viscosidades intrínsecas dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana são determinantes nos sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP. O estudo do comportamento reológico dos hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana revelou que $G' > G''$ nos casos de PgQD3x, PgQD1x e PgQ, o que é característico de gel rígido, enquanto que no caso de PgQD2x foi observado $G'' > G'$, indicando a predominância do comportamento viscoso sobre o elástico. O ponto de *crossover* foi observado acima de 38,2 °C, indicando a formação de hidrogel estruturado termosensível. Assim, pesquisas futuras poderão investigar a influência das características estruturais e físico-químicas destes carreadores poliméricos, visando melhor eficiência de incorporação e liberação *in vitro* de fármacos antitumorais.

Palavras-chave: *N,O*-metoxi(polietilenoglicol)-*g*-quitosana; nanosuspensões; hidrogéis; fármacos antitumorais.

ABSTRACT

Data from National Institute of Cancer show an increase of 14.1 million new cases of cancer over the world in 2012, and the estimate for 2014/2015 in Brazil points to over 500,00 new cases. Thus, research focused on the production of nanoparticles and hydrogels, consisting by natural or synthetic polymers, are important for the development of systems for controlled release of antitumoral drugs. Therefore, this study aimed to produce systems based on hydrophilic derivative of chitosan, *N,O*-methoxy(polyethyleneglycol)-*g*-chitosan, for the encapsulation and release of antitumor drugs. The structural and physicochemical characteristics of the chitosan and the polymers were analyzed by FTIR, ^1H NMR, solubility as function of pH, viscosimetry, XRD and TGA. The parent chitosan with different average degrees of deacetylation and viscosimetric average molecular weight, QD1x ($\overline{DD} = 64,0 \pm 1,1$ % e $\overline{M}_v = 495,6 \pm 6,3 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), QD2x ($\overline{DD} = 75,8 \pm 0,8$ % e $\overline{M}_v = 346,8 \pm 5,8 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) e QD3x ($\overline{DD} = 92,3 \pm 0,9$ % e $\overline{M}_v = 501,9 \pm 5,9 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$), produced applying the USAD to β -chitin, and the commercial chitosan, Q ($\overline{DD} = 94,7 \pm 0,7$ % e $\overline{M}_v = 82,9 \pm 2,0 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$) were analyzed for heavy metal content by ICP OES and the results compared to the limits allowed by ANVISA and US Pharmacopoeial. Significant levels of metals were detected in chitosan QD1x, QD2x and QD3x (Ti and Al) and commercial chitosan (Ni). The use of α -methoxypoly(ethyleneglycol)- ω -carboxy enabled the synthesis of derivatives PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x and PgQ, which had similar average degree of substitution ($\overline{DS}_T \approx 40\%$). The derivatives were soluble in a broad pH range (1-11) and presented significantly lower intrinsic viscosities as compared to chitosan. It was observed that the thermal stability and crystallinity of chitosan are inferior to β -chitin, while the derivatives exhibit higher crystallinity and are more thermally stable as compared to chitosan. In general, increasing molar ratio of $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$ in the preparation of nano- and microsuspensions of polymer/TPP by ionic gelation method, resulted in an increased positive charge density on the surfaces of the particles. However, the occurrence of a great number of chains of mPEG along the *N,O*-mPEG-*g*-chitosan chains led to the predominance of hydrophilic side chains on the surfaces of the particles, shielding the positive charges, favoring the hydration of the particles and the increasing the average hydrodynamic diameter. The influence of the intrinsic viscosities of the polymers and polymer concentrations were evaluated by the overlapping parameter ($c[\eta]$). This assessment revealed that the average hydrodynamic diameter of the particles are directly affected by $c[\eta]$ in the case of chitosan/TPP systems, while the intrinsic viscosities of the derivatives *N,O*-mPEG-*g*-chitosan are essential for *N,O*-mPEG-*g*-chitosan/TPP systems. The study of the rheological behavior of the hydrogels of *N,O*-mPEG-*g*-chitosan revealed that $G' > G''$ in the case of PgQD3x, PgQD1x and PGQ which is characteristic of structured gel, whereas in the case of PgQD2x it was observed $G'' > G'$ indicating the predominance of the viscous behavior over the elastic. The crossover point was observed above 38.2 °C, indicating the formation of structured thermosensitive hydrogel. Thus, future research will investigate the influence of structural and physicochemical characteristics of polymeric carriers, aiming a better incorporation and release *in vitro* efficiency of antitumor drugs.

Keywords: *N,O*-methoxy(polyethylenoglycol)-*g*-chitosan; nanosuspensions; hydrogels; antitumoral drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura idealizada da quitosana, onde “n” refere-se à quantidade arbitrária de unidades GlcN e “1-n”, às unidades GlcNAc. O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) representa quantidade de unidades GlcN ao longo da cadeia de quitosana.	19
Figura 2 – Lula da espécie <i>Doryteuthis</i> , com destaque para a localização do gládio na estrutura do molusco.	20
Figura 3 – Endotélio vascular fenestrado permite que nanopartículas extravasem para o meio externo localizado em sítios patogênicos, como células cancerosas (efeito EPR). O mesmo processo é impedido no endotélio vascular contínuo.	25
Figura 4 – Carreadores poliméricos a base de PEG em sistemas de liberação de bioativos.	27
Figura 5 – Esquema representativo do mecanismos de liberação de bioativos a partir de sistemas particulados.	30
Figura 6 – Esquema simplificado de formação de nanopartículas carreadoras à base de mPEG-g-quitosana.	35
Figura 7 – Esquema representativo do processo DAIUS. O sonotrodo (diâmetro 22 mm) é inserido no reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 3,5 cm), contendo a suspensão de amostra inicial (β -quitina, QD1x e QD2x) em NaOH 40% (m/v).	41
Figura 8 – Espectro de RMN ^1H característico da quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) a 85 °C.	46
Figura 9 – Espectro de RMN ^1H de <i>N,O</i> -mPEG-g-quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C.	47
Figura 10 – Curva de titulação condutimétrica característico da quitosana.	49
Figura 11 – Espectros de RMN ^{13}C das amostras de mPEG e mPEG-COOH em D_2O a 25°C.	51
Figura 12 – Reometria aplicada ao modelo hipotético de escoamento de camadas concêntricas de um fluido.	59
Figura 13 – Concentração (ppm) de Pb, Hg, Ni e Cr nos gládios de lulas (GL), β -quitina (βQ), e nas amostras QD1x, QD2x e QD3x, comparada a concentração limite permitida pela ANVISA e Farmacopeia norte-americana.	65
Figura 14 – Concentração (ppm) de Cu, Al e Ti nos gládios de lula (GL), β -quitina (βQ), e nas amostras QD1x, QD2x e QD3x, comparada a concentração limite permitida pela ANVISA e Farmacopéia norte-americana.	66

Figura 15 – Concentração em ppm de Pb, Cr, Mn, Cu e Ni nas amostras QN e Q, comprada a concentração limite permitida pela ANVISA e Farmacopeia norte-americana.	67
Figura 16 – Reação de ativação do mPEG segundo o mecanismo de acilação catalisada por DMAP mais aceito atualmente.	68
Figura 17 – Mecanismo da síntese do derivado N,O-mPEG-g-Quitossana.	69
Figura 18 – Espectro na região do infravermelho da amostra Q.	72
Figura 19 – Espectros na região do infravermelho das amostras QD1x, QD2x, QD3x e β -quitina na região de 1700 cm^{-1} a 1200 cm^{-1}	73
Figura 20 – Espectros na região do infravermelho das amostras mPEG e mPEG-COOH.	74
Figura 21 – Espectros na região do infravermelho das amostras Q, PgQ e mPEG-COOH.	75
Figura 22 – Espectros na região do infravermelho das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x na região de 2000 cm^{-1} a 1000 cm^{-1}	76
Figura 23 – Espectro de RMN ^1H da quitossana (amostra Q) em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C	78
Figura 24 - Espectro de RMN ^1H das amostras QD1x, QD2x e QD3x em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C	79
Figura 25 – Espectros de RMN ^1H das amostras de mPEG e mPEG-COOH em D_2O a 25°C	81
Figura 26 – Espectros de RMN ^{13}C das amostras de mPEG e mPEG-COOH em D_2O a 25°C	82
Figura 27 – Cálculo da área relativa dos sinais dos carbonos C(f) e C(f)' do espectro de RMN ^{13}C da amostra mPEG-COOH. Valores relativos ajustados por deconvolução de funções de Lorentz através do software MagicPlot Pro [®]	83
Figura 28 – Espectro de RMN ^1H da amostra PgQ em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C	84
Figura 29 – Cálculo da área relativa dos sinais dos hidrogênios H1, H1' e H1'' do espectro de RMN ^1H da amostra PgQ. Valores relativos ajustados por deconvolução de funções de Lorentz através do software MagicPlot Pro [®]	85
Figura 30 - Espectro de RMN ^1H das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) à 85°C	87
Figura 31 – Solubilidade das amostras de quitossana e dos derivados N,O-mPEG-g-quitossana em função do pH.	90
Figura 32 – Esquema representativo da auto-agregação do derivado N,O-mPEG-g-quitossana, favorecida em meio básico e neutro por interações hidrofílicas e hidrofóbicas de grupos presentes nas cadeias de quitossana.	91

Figura 33 – Curvas de viscosidade reduzida (η_{red}) versus concentração das amostras QD1x, QD2x, QD3x e Q.....	92
Figura 34 – Curvas de viscosidade reduzida (η_{red}) versus concentração das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.	93
Figura 35 – Difrátogramas de raios X das amostras de β -quitina, QD1x, QD2 e QD3x.	96
Figura 36 – Difrátogramas de raios X das amostras QD3x e Q.	96
Figura 37 – Difrátogramas de raios X das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x, PgQ e mPEG-COOH.	99
Figura 38 – Curvas termogravimétricas das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	100
Figura 39 – Curvas DTG das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	100
Figura 40 – Curvas termogravimétricas das amostras dos derivados <i>N,O</i> -mPEG- <i>g</i> -quitosana e mPEG-COOH, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	102
Figura 41 – Curvas DTG das amostras dos derivados <i>N,O</i> -mPEG- <i>g</i> -quitosana e mPEG-COOH, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$	103
Figura 42 – Viscosidade específica (η_{sp}) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) das amostras de quitosana e derivados em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de sódio.	104
Figura 43 – Potencial zeta (mV) em função do razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.....	106
Figura 44 – Potencial zeta (mV) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.....	106
Figura 45 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função da razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.	107
Figura 46 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.	108
Figura 47 – Potencial zeta (mV) em função da razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.....	110

Figura 48 – Potencial zeta (mV) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.	111
Figura 49 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função da razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.	112
Figura 50 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.	112
Figura 51 - Viscosidade dinâmica (μ) pela taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) dos hidrogéis PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.	114
Figura 52 - Viscosidade dinâmica (μ) pela temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para os hidrogéis das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.	115
Figura 53 - Determinação do LVR a partir dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da deformação oscilatória.	116
Figura 54 - Ensaio de frequência oscilatória para os hidrogéis das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.	117
Figura 55 - Dependência dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') com a temperatura ($^{\circ}\text{C}$).	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sistemas de liberação de bioativos a base de quitosana e os respectivos métodos de preparação.	29
Tabela 2 – Reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento do trabalho.	39
Tabela 3 – Dimensão de partículas de β -quitina (D) obtidas após o peneiramento com a respectiva proporção mássica e rendimento relativo.	63
Tabela 4 – Número de onda dos principais modos vibracionais contido nos espectros na região do infravermelho das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina.	73
Tabela 5 – Número de onda dos principais modos vibracionais contido nos espectros na região do infravermelho das amostras mPEG-COOH, PgQ, PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x.	77
Tabela 6 – Grau médio de desacetilação da β -quitina obtido por RMN ^1H e das amostras de quitosana, obtidos por RMN ^1H ($\overline{GD}$) e titulação condutimétrica ($\overline{GD}_C$).	80
Tabela 7 – Grau médio de substituição ($\overline{GD}$) das amostras de quitosana e grau médio de <i>N</i> -substituição ($\overline{GS}_{N/}$) e total ($\overline{GS}_T$) das amostras de <i>N,O</i> -mPEG- <i>g</i> -quitosana.	88
Tabela 8 - Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), grau médio de substituição total ($\overline{GS}_T$), viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v$) das amostras β -quitina, quitosanas (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e derivados <i>N,O</i> -mPEG- <i>g</i> -quitosana.	94
Tabela 9 – Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) e índice de cristalinidade (I_{cr}) das amostras de β -quitina, QD1x, QD2x, QD3x e Q.	98
Tabela 10 – Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), grau médio de substituição total ($\overline{GS}_T$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), índice de cristalinidade (I_{cr}), temperatura inicial (T_{onset}), temperatura de degradação máxima ($T_{máx}$) e teor de água (%) das amostras de quitosana, derivados <i>N,O</i> -mPEG- <i>g</i> -quitosana, β -quitina e mPEG-COOH.	101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BEC – Concentração equivalente ao sinal de fundo

DAIUS – Desacetilação Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

DMAPI – 4-(Dimetilamino)piridina

DTG – Análise termogravimétrica derivada

EDC·HCl – *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

EPR – Efeito de permeabilidade e retenção

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho por Transformada de Fourier

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

$\overline{GD}$ – Grau médio de desacetilação calculado por RMN ^1H

$\overline{GD}_C$ – Grau médio de desacetilação calculado por titulação condutimétrica

GlcN – 2-amino-2-desoxi-D-glicopirranose

GlcNAc – 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

$\overline{GS}$ – Grau médio de substituição total

$\overline{GS}_N$ – Grau médio de substituição nos grupos $-\text{NH}_2$

$\overline{GS}_O$ – Grau médio de substituição nos grupos $-\text{OH}$ mais cadeias de mPEG-COOH livres (L)

HOBT·H₂O – 1-hidroxibenzotriazol monoidratado

IARC – *International Agency for Research on Cancer*

ICP OES – Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente

INCA – Instituto Nacional do Câncer

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LOD – Limite de detecção

LVR – Região de viscoelasticidade linear

$\bar{M}_v$ – Massa molar média viscosimétrica

mPEG – α -metoxipoli(etilenoglicol)- ω -hidroxi ou poli(etilenoglicol) metil éter

mPEG-COOH – α -metoxipoli(etilenoglicol)- ω -carboxi

NPs – Nanopartículas

PDI – Índice de polidispersão

PEG – Poli(etileno glicol)

PgQ – derivado *N,O*-mPEG-*g*-quitosana obtido a partir da QP

PgQD1x – derivado *N,O*-mPEG-*g*-quitosana obtido a partir da QD1x

PgQD2x – derivado *N,O*-mPEG-*g*-quitosana obtido a partir da QD2x

PgQD3x – derivado *N,O*-mPEG-*g*-quitosana obtido a partir da QD3x

Q – Quitosana comercial (Yue Planting) purificada na forma neutra

QD1x – Quitosana DAIUS obtida a partir de 1 sonicação

QD2x – Quitosana DAIUS obtida a partir de 2 sonicações

QD3x – Quitosana DAIUS obtida a partir de 3 sonicações

QN – Quitosana comercial (Yue Planting) não purificada

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

RMN ^{13}C – Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13

SBR – Razão sinal analítico/sinal de fundo

TGA – Análise termogravimétrica

TPP – Tripolifosfato de sódio

UV-Vis – Espectroscopia na região do Ultravioleta e do Visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	Quitina e Quitosana: Aspectos Gerais	17
1.1.1	Métodos de Obtenção da Quitosana	19
1.1.2	Propriedades e Potenciais Aplicações da Quitosana	21
1.2	Sistemas de Liberação de Bioativos	23
1.2.1	O Poli(etilenoglicol) como carreador de Biomoléculas	25
1.2.2	Avanços da Quitosana no Desenvolvimento de Sistemas de Liberação	28
1.2.3	Derivatização da Quitosana com cadeias de PEG	32
2	MOTIVAÇÃO	36
3	OBJETIVOS	38
4	PARTE EXPERIMENTAL	39
4.1	Materiais e Reagentes.....	39
4.2	Extração da β-Quitina	40
4.3	Obtenção de Quitosanas via Processo DAIUS	40
4.4	Purificação da Quitosana Comercial	41
4.5	Quantificação de Metais Pesados	41
4.5.1	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)	41
4.6	Síntese de mPEG-COOH	43
4.7	Síntese de N,O-mPEG-g-Quitosana	43
4.8	Caracterizações	44
4.8.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	44
4.8.2	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H)	44
4.8.3	Titulação Condutimétrica	48
4.8.4	Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C)	50
4.8.5	Solubilidade em função do pH	52
4.8.6	Viscosimetria Capilar	52
4.8.7	Difração de Raios X (DRX)	54
4.8.8	Análise Termogravimétrica (TGA)	55
4.9	Produção das Nanosuspensões	55
4.9.1	Potencial Zeta (ζ)	56
4.9.2	Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).....	57
4.10	Produção dos Hidrogéis	57
4.10.1	Ensaio Reológicos em Fluxo	58
4.10.2	Ensaio Reológicos Oscilatórios	60
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1	Extração da β-Quitina	62
5.2	Obtenção de Quitosanas via Processo DAIUS	63

5.3	<i>Purificação da Quitosana Comercial</i>	64
5.4	<i>Quantificação de Metais Pesados</i>	64
5.4.1	<i>Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)</i>	64
5.5	<i>Síntese de mPEG-COOH</i>	67
5.6	<i>Síntese de N,O-mPEG-g-Quitosana</i>	68
5.7	<i>Caracterizações</i>	71
5.7.1	<i>Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	71
5.7.2	<i>Caracterização Estrutural por RMN ¹H, RMN ¹³C e Condutimetria</i>	77
5.7.3	<i>Solubilidade em função do pH</i>	89
5.7.4	<i>Viscosimetria Capilar</i>	92
5.7.5	<i>Difração de Raios X (DRX)</i>	95
5.7.6	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	99
5.8	<i>Produção das Nanosuspensões</i>	103
5.8.1	<i>Sistemas Quitosana/TPP</i>	105
5.8.2	<i>Sistemas N,O-mPEG-g-quitosana/TPP</i>	108
5.9	<i>Produção dos Hidrogéis</i>	113
5.9.1	<i>Ensaio Reológicos em Fluxo</i>	113
5.9.2	<i>Ensaio Reológicos Oscilatórios</i>	115
6	<i>CONCLUSÃO</i>	120
	<i>REFERÊNCIAS</i>	123
	<i>APÊNDICE</i>	139

1 INTRODUÇÃO

A quitosana é um aminopolissacarídeo linear constituído por unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN), unidas por ligações $\beta(1\rightarrow4)$, sendo obtida a partir de quitina, abundantemente presente em fontes renováveis, tais como exoesqueletos de insetos, crustáceos e paredes celulares de fungos (RINAUDO, 2006). Devido a propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade e mucoadesividade, a quitosana atrai o interesse da indústria farmacêutica para a aplicação em sistemas de liberação controlada e/ ou sustentada de bioativos como proteínas, peptídeos, fármacos hidrofóbicos e vacinas (DODANE; VILIVALAM, 1998; DASH et al., 2011; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012; VERT et al., 2012).

Entretanto, a quitosana apresenta algumas limitações, especialmente quanto a sua insolubilidade em valores de $\text{pH} > 6,3$ (pKa) dos grupos amino de suas unidades GlcN (RINAUDO, 2006). A solubilidade e outras propriedades físico-químicas da quitosana sofrem influência da massa molar e do conteúdo de unidades GlcNAc e GlcN, sendo a derivatização da cadeia polimérica uma das principais alternativas para o aprimoramento de propriedades desejadas da quitosana (AGNIHOTRI et al., 2004). A busca por melhor desempenho e aplicação biomédica inclui vários métodos de derivatização da quitosana, tais como a carboximetilação e a *O*-hidroxialquilação, e copolimerização com ácido poliacrílico, vinilpirrolidona, 3-*O*-dodecil-D-glucose e *N*-isopropilacrilamida. A derivatização com cadeias hidrofílicas de α -metoxi-poli(etilenoglicol)- ω -hidroxi (mPEG) configura uma promissora alternativa para o aumento da solubilidade da quitosana em ampla faixa de pH , aumento da biocompatibilidade e tempo de circulação dos bioativos, além de favorecer a redução da imunogenicidade, antigenicidade e susceptibilidade à degradação enzimática. Carreadores de biomoléculas à base do copolímero grafitizado metoxipoli(etilenoglicol)-*g*-quitosana mostram-se eficientes quanto à incorporação e perfis de liberação de poliânions e espécies hidrofóbicas em diferentes locais no organismo (CASSETTARI et al., 2012; CHO et al., 2012).

Polímeros naturais e de origem sintética integram os principais sistemas destinados à liberação controlada ou sustentada de bioativos hidrofóbicos com limitada estabilidade e bioviabilidade no organismo (BAMRUNGSAP et al., 2012; DESAI, 2012). Nano ou micropartículas e hidrogéis poliméricos a base de quitosana representam ainda recursos terapêuticos em amplo desenvolvimento para o tratamento de diferentes tipos de câncer (HALEY; FRENKEL, 2008; TA et al., 2008; YALLAPU et al., 2012), a principal causa de

óbito mundial, de acordo com Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) (BRAY et al., 2013; “INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER”, 2014).

A maioria das nano ou microformulações disponíveis no mercado ou em testes clínicos avançados para o tratamento de diferentes doenças são constituídas de poli(etilenoglicol), PEG, o qual é aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) (KNOP et al., 2010). Atualmente, existem ao menos 15 testes clínicos em andamento de sistemas de liberação de bioativos à base de quitosana (GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012), sendo dispositivos à base de mPEG-g-quitosana promissores constituintes de carreadores destinados à liberação controlada ou sustentada de proteínas e espécies hidrofóbicas (Casettari et al., 2012). Assim sendo, este projeto visa à produção de micro ou nanopartículas em suspensão e hidrogéis a partir de *N,O*-mPEG-g-quitosana, ambos voltados para incorporação de bioativos, em especial fármacos hidrofóbicos com atividade antitumoral.

1.1 Quitina e Quitosana: Aspectos Gerais

A quitina foi isolada pela primeira vez em 1811 pelo francês Henri Braconnot (1780-1855). Em seu estudo, a espécie *Agaricus volcaccus* e outros fungos superiores foram submetidos a tratamento à quente com álcali aquoso, possibilitando a extração da “fungina” levemente contaminada com proteínas. A extração da quitina por Lassaigue (1843) a partir de exoesqueletos da espécie *Bombyx mori* (bicho da seda) demonstrou a presença de nitrogênio na sua estrutura. Em 1878, Ledderhose indicou que a quitina é composta por glucosamina e ácido acético. Entretanto, a presença de unidades de glucosamina foi confirmada por Gilson apenas em 1894 (MUZZARELLI, 1977; MUZZARELLI et al., 2012).

O polímero quitina é definido como um aminopolissacarídeo formado predominantemente por unidades repetitivas de GlcNAc e está presente na matriz esquelética de organismos invertebrados como anelídeos, moluscos, algas diatomáceas e paredes celulares de fungos dos grupos taxonômicos zigo-, asco-, basidio-, e deuteromicetos, na forma de microfibrilas cristalinas. Assim como a celulose, a quitina atua como polissacarídeo estrutural, sendo que na quitina grupos acetamido estão presentes na posição C-2 das unidades estruturais, enquanto grupos hidroxila ocorrem em celulose (RINAUDO, 2006; MUZZARELLI et al., 2012).

Dentre os diferentes estados polimórficos existentes na natureza, a α -quitina (estrutura ortorrômbica) é a mais abundante e apresenta até 92% de cristalinidade, enquanto que a β -quitina (estrutura monoclinica), de menor abundância, apresenta aproximadamente 72% de cristalinidade (CAMPANA-FILHO et al., 2007). A análise detalhada de um terceiro alomorfo, a γ -quitina, sugere que esta seja apenas uma variação entre os estados α e β (ATKINS, 1985). Embora ambas as polimorfias, α - e β -quitina sejam insolúveis em água e em solventes orgânicos usuais, a β -quitina apresenta maior solubilidade em sistemas à quente na presença de sais neutros ou de ácidos clorados, e maior capacidade de intumescimento em relação à α -quitina (SAITO, Y. et al., 1997; RINAUDO, 2006; CAMPANA-FILHO et al., 2007). Embora seja possível a conversão $\beta \rightarrow \alpha$, o processo reverso não ocorre (SAITO, Y. et al., 1997). A maior estabilidade de α -quitina é atribuída ao empacotamento denso proporcionado pela maior associação de grupos hidroximetil adjacentes ao longo do parâmetro b da célula unitária. Outras numerosas ligações hidrogênio inter e intramoleculares que favorecem empacotamento são estabelecidas devido à disposição antiparalela das cadeias da α -quitina nos domínios cristalinos, que são organizados em folhas ou lamelas (MINKE; BLACKWELL, 1978). Entretanto, devido à disposição paralela das cadeias de β -quitina, o estabelecimento de ligações hidrogênio é desfavorecido, resultando em maior capacidade de intumescimento e acessibilidade aos sítios reativos (GARDNER; BLACKWELL, 1975; SAITO et al., 2000). A β -quitina extraída da diatomácea *Thalassiosira fluviatilis* é o único caso relatado do polissacarídeo, constituído inteiramente por unidades GlcNAc, segundo indicado pela sua susceptibilidade à quitinase (MUZZARELLI, 2011), enzima que catalisa a hidrólise das ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ (ATTWOOD et al., 2006).

Dentre as possíveis aplicações, os principais desenvolvimentos se inserem na confecção de materiais curativos à base de filmes e fibras de quitina (JAYAKUMAR et al., 2011). Entretanto, devido a sua solubilidade restrita a solventes como hexafluoroacetona e N,N-dimetilacetamida contendo 5-8% LiCl (KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006), a quitina apresenta pouco interesse para demais aplicações industriais (MIMA et al., 1983; DODANE; VILIVALAM, 1998; DASH et al., 2011). Nesse sentido, a reação de N-desacetilação, uma das principais reações de derivatização da quitina, resulta na hidrólise dos grupos acetamido das unidades GlcNAc e a formação de unidades GlcN. Assim, quando essa conversão atinge 40-60%, o produto é denominado quitosana, o qual apresenta solubilidade em soluções aquosas diluídas de ácidos, tais como ácido glutâmico, clorídrico, láctico e acético, devido à protonação dos grupos $-NH_2$ (MUZZARELLI, 1977; RINAUDO et al., 1999; KUMAR, 2000). Até o momento uma nomenclatura descritiva em função do grau médio de

desacetilação ($\overline{GD}$) ainda não foi estabelecida, considerando que a quitosana é um termo aplicado à quitina com diferentes graus médios de desacetilação e de estrutura química idealizada em relação à composição exata (Figura 1). Em soluções com $\text{pH} < \text{pKa}$ ($\sim 6,5$) e força iônica reduzida, a quitosana ($40\% < \overline{GD} < 98\%$) forma um polieletrólito e exibe solubilidade. Nestas condições, em geral, valores de $\overline{GD} > 80\text{-}85\%$ proporcionam uma solubilidade completa, enquanto que $\overline{GD} < 40\%$ o polímero torna-se totalmente insolúvel. Adicionalmente, a distribuição das unidades GlcNAc/GlcN, a extensão da cadeia polimérica, procedência/ processamento da biomassa, condições empregadas no isolamento de quitina e em sua desacetilação, também influenciam na qualidade e solubilidade final da quitosana (AIBA, 1991; ILLUM, 1998; AGNIHOTRI et al., 2004; ROWE et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura idealizada da quitosana, onde “n” refere-se à quantidade arbitrária de unidades GlcN e “1-n”, às unidades GlcNAc. O grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) representa quantidade de unidades GlcN ao longo da cadeia de quitosana.

Existem quitosanas comerciais com grau médio de desacetilação de 66% a 95% e massas molares de 3,8 kDa a 1000 kDa (5, 28–30).

1.1.1 Métodos de Obtenção da Quitosana

As fontes comerciais mais utilizadas para a produção de quitina são as carapaças de caranguejos e cascas de camarões, abundantes resíduos gerados pela indústria pesqueira (RINAUDO, 2006; GONIL; SAJOMSANG, 2012). Geralmente, os processos industriais de extração de quitina da biomassa envolvem as etapas de desmineralização, que corresponde à eliminação de fosfatos e carbonatos de cálcio por tratamento com ácidos, de desproteinização, que visa à eliminação de proteínas por tratamento com álcali, e de despigmentação, que visa à eliminação de pigmentos, seja por extração com solventes orgânicos ou por oxidação

(LAVALL et al., 2007; KAUR; DHILLON, 2014). Os gládios ou plumas de lulas do gênero *Doryteuthis* (Figura 2) (AGUIAR et al., 2012) que são ricos em β -quitina, geralmente são submetidos apenas ao processo de desproteinização, pois apresentam baixos teores de minerais e pigmentos. Independentemente da biomassa, as condições empregadas em cada etapa de extração devem ser suficientemente brandas a fim de evitar a despolimerização e desacetilação, quando indesejadas (LAVALL et al., 2007).

Figura 2 – Lula da espécie *Doryteuthis*, com destaque para a localização do gládio na estrutura do molusco.

Em laboratórios de pesquisa e em processos industriais de média escala, a quitina é tratada em meio alcalino concentrado e em temperaturas elevadas, de forma a alcançar a hidrólise parcial dos grupos acetamido das unidades GlcNAc. Entretanto, devido às estas condições, a despolimerização ocorre de forma simultânea e, adicionalmente a reação de *N*-desacetilação é um processo heterogêneo que favorece a formação de produtos não reprodutíveis. Assim, diversas pesquisas propõem metodologias para o aumento da eficiência de reação, bem como a minimização da despolimerização e que incluem o uso de atmosfera inerte e soluções alcalinas menos concentradas (SANNAN et al., 1975), extrusão reativa (ROGOVINA et al., 1998), explosão de vapor (FOCHER et al., 1990), irradiação de microondas (SAHU et al., 2009). Entretanto, o processo conhecido como *freeze – pump – thaw* (FTP), no qual a quitina, em meio a uma solução alcalina concentrada, é submetida a ciclos de congelamento instantâneo com nitrogênio líquido, seguido de baixas razões de aquecimento até alcançar a temperatura ambiente, permite obter quitosana extensivamente desacetilada ($\overline{GD} > 98,0\%$) e com elevada massa molar média ($\overline{M} > 4,5.10^5 \text{ g mol}^{-1}$) (LAMARQUE et al., 2005, 2007).

Ao longo dos últimos 15 anos, o Grupo de Físico-Química Orgânica do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/ USP) desenvolve trabalhos visando à obtenção de quitosanas empregando irradiação de ultrassom de alta intensidade (CARDOSO et al., 2001;

CAMPANA-FILHO et al., 2002). Atualmente, são produzidas quitosanas a partir de reações de desacetilação da quitina extraída de gládios de lulas das espécies *Doryteuthis plei* e *Doryteuthis sampaulensis* através do processo chamado de Desacetilação Assistida por Irradiação de Ultrassom de Alta Intensidade (DAIUS), sendo possível obter quitosanas com $\overline{GD} > 90,0\%$ (DELEZUK et al., 2011; DELEZUK, 2013). As principais aplicações do ultrassom são em síntese orgânica, degradação de polímeros, emulsificação de soluções, formação de radicais livres (sonólise) e preparação de catalisadores (CHEN et al., 2012).

1.1.2 Propriedades e Potenciais Aplicações da Quitosana

A quitosana exibe propriedades raramente encontradas em polímeros sintéticos, além de ser proveniente de fonte renovável. Apresenta biocompatibilidade comparável à sacarose, com LD_{50} testado em camundongos por via oral acima de 16 g kg^{-1} , biodegradabilidade e toxicidade dependentes do grau médio de desacetilação e massa molar (DODANE; VILIVALAM, 1998; ILLUM, 1998; AGNIHOTRI et al., 2004; DASH et al., 2011). Embora não apresente efeitos tóxicos significativos *in vivo* e seja mundialmente aceita como atóxica para humanos (RAO; SHARMA, 1997; KUMAR, 2000), em valores de grau médio de desacetilação elevados, a toxicidade da quitosana é relacionada a massa molar e a concentração, enquanto que em valores reduzidos, a toxicidade é menos pronunciada e menos associada a massa molar (SCHIPPER et al., 1996). A degradação enzimática da quitosana é menos eficiente conforme a diminuição do grau médio de desacetilação, porém a taxa de degradação é reduzida segundo uma distribuição homogênea dos grupos acetamido (HIRANO et al., 1989; AIBA, 1992). A máxima susceptibilidade à hidrólise por lisozimas é alcançada quando $\overline{GD} \approx 70\%$ (SASHIWA et al., 1990).

Em geral, baixos valores de massa molar e altos valores de grau médio de desacetilação proporcionam maior efetividade da quitosana contra o crescimento e multiplicação de microorganismos. Os grupos $-\text{NH}_2$ atuam como centros ativos capazes de interagir com cátions divalentes e estabilizar membranas externas de bactérias gram-negativas (G^-), enquanto que cadeias de menor extensão, contendo grupos $-\text{NH}_3^+$, proporcionam sítios de interações eletrostática com as superfícies aniônicas de bactérias. Quitosanas e derivados são capazes ainda de promover a desorganização de paredes celulares de bactérias como *Escherichia coli* (G^-) e *Staphylococcus aureus* (G^+) (GOY et al., 2009; ZHONG et al., 2009).

A introdução de cargas positivas permanentes pela adição de um grupo amônio quaternário, ou a quaternização de grupos -NH_2 da quitosana de baixa massa molar, adiciona propriedades antioxidantes (XING et al., 2008). Espécies reativas de oxigênio, ROS (*Reactive oxygen species*), como superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila ($\text{OH}^\cdot$) e H_2O_2 são responsáveis pela destruição de membranas lipídicas, modificação funcional de proteínas e sucessivas degradações de moléculas de ADN. A interação destas espécies com os hidrogênios dos grupos -NH_2 e -OH , da quitosana resulta na formação de radicais macromoleculares estáveis (KONG et al., 2010).

A extensão da cadeia, a flexibilidade conformacional dependente da força iônica do meio, a susceptibilidade a interações eletrostáticas, a formação de ligações hidrogênio através dos grupos -OH e -NH_2 e a energia de superfície favorável são propriedades da quitosana consideradas essenciais à mucoadesão, a qual se refere à permeação ou interação não-específica com mucosas de tecidos biológicos (LEHR et al., 1992; HE et al., 1998). Possivelmente relacionada a esta propriedade e à interação com membranas celulares, a quitosana apresenta atividade hemostática e potencial aplicação em excipientes curativos como agente promotor de cicatrizações (RAO; SHARMA, 1997; DODANE; VILIVALAM, 1998), sendo aprovada em 2003 pela agência regulatória FDA (*Food and Drug Administration*) para confecção de bandagens curativas pela empresa HemCon[®], destinadas às operações militares norte-americanas no Iraque e Afeganistão (WEDMORE et al., 2006). Atualmente outros produtos curativos à base de quitina, quitosana e derivados se encontram disponíveis comercialmente, tais como: Tegasorb[®] e Tegaderm[®] da 3M; Chitopack C[®] e Chitopack S[®] da Eisai Co. (Japão); Trauma DEX[®] da Medafor; Beschitin[®] da Unitika Co. (Japão), entre outros (ILLUM, 1998; JAYAKUMAR et al., 2011).

Outra importante área de aplicação refere-se ao uso da quitosana e derivados na forma de pó, géis e filmes, em Engenharia de Tecidos. De acordo recomendação da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) (VERT et al., 2012), a definição do termo Engenharia de Tecidos pode ser traduzida como: “o uso de uma combinação de células, engenharia e métodos materiais, fatores físico-químicos e bioquímicos para aperfeiçoar ou substituir funções biológicas”. Esta definição se estende para o reparo e/ ou reposição de porções ou tecidos biológicos inteiros, sendo as propriedades da quitosana extensivamente exploradas para regeneração de tecidos ósseo, cartilaginoso, nervoso, em vasos sanguíneos, pele e tecidos de órgãos como o fígado e bexiga (DASH et al., 2011; VERT et al., 2012).

A quitosana é visada ainda pelas indústrias cosmética, odontológica e oftalmológica quanto a sua aplicação na forma de filmes para recobrimento e/ ou confecção de lentes

(ALLAN et al., 1984; ILLUM, 1998; KUMAR, 2000), em pesquisas ligadas à questões ambientais para aplicação como quelante e remoção de metais tóxicos de resíduos, na agroindústria como antiviral para plantas, aditivo para fertilizantes, proteção de culturas através do revestimento de frutas e como constituinte de produtos alimentícios e dietéticos, particularmente no Japão, Itália e Finlândia (FUKADA et al., 1991; DODANE; VILIVALAM, 1998; ILLUM, 1998; BRITTO; ASSIS, 2012), sendo reconhecida como um biomaterial seguro, de acordo com a designação GRAS (*Generally Recognized as Safe*), para uso em ração animal (SHEPHERD et al., 1997).

1.2 Sistemas de Liberação de Bioativos

Atualmente, polímeros naturais e de origem sintética representam a principal classe de materiais destinados à produção de sistemas de liberação controlada ou sustentada de agentes que exibem atividade terapêutica ou princípios ativos (bioativos), tais como fármacos, peptídeos e proteínas. O desenvolvimento de carreadores poliméricos biocompatíveis objetiva suprir e aperfeiçoar propriedades como bioviabilidade, bioadesão e toxicidade de bioativos, favorecendo a eficiência da biodistribuição com liberação prolongada por meio do direcionamento destes a sítios como células que exibem atividade específica.

Para viabilizar esta estratégia, entretanto, é necessário dispor de carreadores com distribuição de tamanho e ordem de grandeza similar a proteínas e estruturas macromoleculares, de forma que o transporte, biodistribuição e liberação do agente encapsulado, disperso, absorvido ou conjugado na matriz polimérica, atinja uma performance adequada e segura (QIU; BAE, 2006; BAMRUNGSAP et al., 2012; DESAI, 2012). Após a administração, é importante assegurar que os carreadores sejam significativamente menores que 5 μm , de modo a evitar a formação de agregados e a possibilidade de embolismo (SINGH; LILLARD, 2009). Carreadores nanoestruturados menores que 20-30 nm, no entanto, são rapidamente excretados pelo sistema renal, enquanto que aqueles acima de 200 nm são susceptíveis ao reconhecimento por macrófagos no sistema retículoendotelial (RES, ou sistema mononuclear fagocitário, MPS). Partículas com dimensões no intervalo 150 - 300 nm, podem acumular-se na região do fígado e baço, e próximo a 400 nm são eliminados rapidamente do organismo pelo sistema hepático (MOGHIMI et al., 2001; GAUMET et al., 2008). Entretanto, conforme o caso estudado, nanopartículas (NPs) com distribuição normal entre 70 e 200 nm oferecem benefícios, como o maior efeito de permeabilidade e retenção

(EPR) em microambientes de células tumorais (STORM et al., 1995; HALEY; FRENKEL, 2008), inflamações ou sítios infectados. O efeito EPR envolve o sistema linfático deficiente de sítios associados a células e tecidos em situação patológica, o qual contribui para a seletividade e acúmulo das NPs através de longos períodos de circulação no organismo (MOGHIMI et al., 2001; BAMRUNGSAP et al., 2012; DESAI, 2012). Diferentemente da característica contínua do endotélio vascular saudável, tecidos com inflamações ou originados a partir de células cancerígenas possuem endotélis vasculares com fenestrações (Figura 3), as quais possibilitam o aumento da permeação das NPs (HIRANO et al., 1994; GAUMET et al., 2008). O crescimento de um tumor pode induzir a descontinuidade do endotélio com fenestrações desde 200 a 780 nm (HOBBS et al., 1998).

Para que as NPs alcancem o sítio alvo, é necessário ainda transpor barreiras biológicas de acordo com a rota de administração ou forma de dosagem *in vivo* pretendida, as quais ocorrem principalmente por via oral, parenteral, nasal e ocular. Em todos os casos, a composição da superfície (carga, hidrofobicidade e grupos funcionais) e o delineamento de um carreador em escala submicrométrica afetam a eficiência do transporte do bioativo através das mucosas (ALONSO, 2004). Entretanto, mesmo quando alcança a corrente sanguínea ou quando é administrado por via parenteral, especificamente pela rota intravenosa, vários componentes sanguíneos, como a albumina, fibrogênios, apolipoproteínas e anticorpos IgG, podem recobrir sua superfície hidrofílica, no processo chamado de opsonização, tornando-as mais hidrofóbicas e reconhecíveis por macrófagos (RES). Partículas hidrofóbicas, por sua vez, são reconhecidas e eliminadas por macrófagos rapidamente (STORM et al., 1995; MOGHIMI et al., 2001; SINGH; LILLARD, 2009; DESAI, 2012).

Figura 3 – Endotélio vascular fenestrado permite que nanopartículas extravasem para o meio externo localizado em sítios patogênicos, como células cancerosas (efeito EPR). O mesmo processo é impedido no endotélio vascular contínuo.

Fonte: Adaptado de GAUMET et al., 2008, p. 1-9.

Embora o planejamento de sistemas de liberação ofereça benefícios terapêuticos como a diminuição da dosagem, dos efeitos colaterais e custos, em particular associados aos princípios ativos, a maior parte das pesquisas tecnicamente avançadas não dispõem do mesmo progresso em testes clínicos e ainda encontram numerosos desafios até alcançarem a formulação comercial (DESAI, 2012).

1.2.1 O Poli(etilenoglicol) como carreador de Biomoléculas

O poli(etilenoglicol), PEG, representa atualmente o principal polímero hidrofílico sintético e não-iônico destinado à síntese e administração de carreadores ou excipientes de bioativos, influenciando diretamente na farmacocinética e eficiência terapêutica do mesmo. Por meio da conjugação direta polímero-bioativo, ou pelo recobrimento da espécie bioativa com uma matriz polimérica, o carreador nano ou microestruturado adquire alta solubilidade aquosa e oferece um obstáculo estérico ou “nuvem conformacional” capaz de impedir o reconhecimento do sistema imunológico através da supressão de interações não específicas de

componentes sanguíneos (opsonização), diminuindo a susceptibilidade a enzimas proteolíticas e anticorpos, além de reduzir a toxicidade do bioativo (HARRIS; CHESS, 2003).

A biocompatibilidade de carreadores a base de PEG é dependente da massa molar e do índice de polidispersão (PDI) do polímero. Por conta da demanda farmacêutica para produtos homogêneos, atualmente os PEGs são produzidos através da polimerização aniônica do óxido de etileno, garantindo $PDI \approx 1,1$ (VERONESE; PASUT, 2005). Cadeias de maior extensão (entre 20 e 50 kDa) são usualmente destinadas para conjugação com moléculas pequenas, como siARN e oligonucleotídeos, enquanto que cadeias de menor extensão (de 1 a 5 kDa) são utilizadas para impedir a opsonização, eliminação pelo RES e redução da degradação enzimática de bioativos maiores como sistemas nanoparticulados ou anticorpos (KNOP et al., 2010). Geralmente, as cadeias de PEG entre 20-30 kDa são eliminadas de forma intacta pelo organismo através do rins, ou pelo sistema digestório. Estudos indicam que cada subunidade ou mero de PEG é capaz de se associar com até três moléculas de água, favorecendo o aumento da partícula entre 5 a 10 vezes o tamanho original do bioativo. Logo, o volume hidrodinâmico adquirido pelo carreador e a extensão das cadeias de PEG são fatores determinantes para o aumento do tempo de circulação sanguínea da biomolécula e da probabilidade desta alcançar o sítio de ação antes de ser reconhecido e eliminado pelo organismo (KOZLOWSKI; MILTON HARRIS, 2001; HARRIS; CHESS, 2003; KNOP et al., 2010). A Figura 4 apresenta um esquema ilustrativo de estruturas tridimensionais de carreadores poliméricos a base de PEG.

Apesar dos benefícios, o PEG apresenta algumas desvantagens, tais como seu caráter não-biodegradável e a geração de metabólitos tóxicos por dehidrogenases a partir de cadeias com tamanho inferior a 400 Da (HEROLD, D. A.; KEIL, K.; BRUNS, 1989). Sua toxicidade devido à degradação oxidativa se reduz conforme o aumento da extensão do polímero, entretanto deve-se manter abaixo de 40-60 kDa de modo a evitar acúmulo no fígado. Cadeias com tamanho superior a 20 kDa são lentamente removidas pelo fígado, enquanto que aquelas abaixo de 20 kDa costumam ser facilmente secretadas pela urina. Há a necessidade ainda do uso de PEG em grau farmacêutico, já que o residual de óxido de etileno pode levar a formação dos subprodutos 1,4-dioxano e formaldeído, possivelmente carcinogênicos de acordo com a IARC. Importante ressaltar a carência de estudos sistemáticos e específicos acerca dos efeitos deletérios no organismo devido ao uso de PEG como carreador de bioativos (KNOP et al., 2010).

Figura 4 – Carreadores poliméricos a base de PEG em sistemas de liberação de bioativos.

Fonte: Adaptado de KNOP et al., 2010, p. 6288-6308.

Os primeiros estudos acerca da aplicação do PEG na área biomédica datam de 1950 a 1970 (HARRIS; CHESS, 2003; VERONESE; PASUT, 2005; KNOP et al., 2010). Entretanto, o desenvolvimento de microesferas à base de PEG para uso farmacêutico foi impulsionada por um estudo reportado em 1994, no qual foi observado que 66% das partículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), não incorporados nas nanoesferas, foram removidos pelo fígado alguns minutos após a ingestão (GREF et al., 1994). Por outro lado, menos de 30% das partículas revestidas com cadeias de PEG (20 kDa) foram removidos após 2 horas. Atualmente, a maioria das formulações lipossômicas, micelares ou de espécies conjugadas disponíveis no mercado ou em testes clínicos avançados são constituídas de PEG, sendo este um constituinte aprovado pela FDA para administração de formulações por via nasal, retal, parenteral ou para uso tópico (HARRIS; CHESS, 2003; KNOP et al., 2010). Efeitos colaterais e instabilidades do PEG foram observados apenas em uma pequena parcela de pacientes, o quais não foram submetidos a uma triagem médica bem documentada. Uma relação das formulações comerciais de sistemas de liberação de bioativos aprovados nos EUA e União Européia à base de PEG e a respectiva enfermidade a que se destinam, pode ser consultada na literatura (VERONESE; PASUT, 2005; KNOP et al., 2010).

1.2.2 Avanços da Quitosana no Desenvolvimento de Sistemas de Liberação

O crescente interesse no uso da quitosana para produção de sistemas de liberação de bioativos provém essencialmente do seu comportamento em solução dependente do pH, biocompatibilidade, biodegradabilidade e atoxicidade. A maioria dos excipientes poliméricos destinados à liberação sustentada de fármacos tais como poliacrilatos, alginatos ou carboximetilcelulose sódica, possui caráter aniônico e, com isso, interagem com biomoléculas catiônicas. A protonação dos grupos $-NH_2$ da quitosana, por outro lado, favorece a interação com fármacos aniônicos, proteínas com as subestruturas de ácido siálico e sulfônico presentes em superfícies de mucosas, resultando em uma acentuada mucoadesividade, como destacado anteriormente, se comparada com excipientes aniônicos. Devido a sensibilidade em resposta à alteração do pH, a quitosana é capaz de interagir com membranas celulares, em junções intercelulares de tecidos epiteliais (*tight junctions*), além de caracterizar um promissor excipiente para transfecção de poliânions como moléculas de ADN e siARN em terapias gênicas. Embora o mecanismo de interação ainda não seja bem compreendido, a capacidade de permeação está associada a maiores valores de grau médio de desacetilação e massa molar da quitosana (RICHARDSON et al., 1999; DASH et al., 2011; BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012). Em vista destas propriedades da quitosana e da necessidade do desenvolvimento tecnológico de sistemas de liberação de bioativos, a Tabela 1 lista os diferentes sistemas atualmente existentes e seus respectivos métodos de preparação. Uma relação abrangente de métodos de preparação e das biomoléculas envolvidas pode ser consultada na literatura (AGNIHOTRI et al., 2004; DASH et al., 2011).

Tabela 1 – Sistemas de liberação de bioativos a base de quitosana e os respectivos métodos de preparação.

Sistema de Liberação de Bioativos	Método de Preparação
Pastilhas	Revestimento de matriz
Cápsulas	Invólucro capsular
Microesferas/micropartículas	Reticulação de emulsão Acumulação/ precipitação <i>Spray-drying</i> Gelificação iônica
Nanopartículas	Coalescência de emulsão de gotículas Acumulação/ precipitação Gelificação iônica Micela reversa
Grãos	Acumulação/ precipitação
Filmes	<i>Casting</i> de solução
Hidrogéis	Entrecruzamento químico ou físico

Fonte: AGNIHOTRI et al., 2004, p. 5-28 e DASH et al. 2011, p. 981-1014.

A preparação de sistemas particulados à base de quitosana, a partir dos métodos destacados na Tabela 1, depende de fatores como tamanho de partícula, estabilidade química e térmica do bioativo, do produto final e da reprodutibilidade da cinética de liberação. Micropartículas (microcápsulas ou microesferas) ou implantes de sistemas à base de géis configuram formulações de sistemas de liberação sustentada ou controlada (TA et al., 2008; BHATTARAI et al., 2010). Nestes sistemas, o bioativo hidrofílico ou hidrofóbico é fisicamente incorporado durante a preparação das partículas ou é encapsulado em etapa posterior. Dentre os métodos listados, a máxima eficiência de carregamento da partícula geralmente é obtida durante a incorporação da biomolécula e formação de uma mistura homogênea.

A liberação do bioativo em sistemas particulados frequentemente ocorre por mais de um mecanismo, como ilustrado na Figura 5. No caso da liberação do bioativo adsorvido ou aprisionado na superfície da partícula, ocorre a dissolução deste para o meio externo. De forma semelhante ocorre quando a liberação do mesmo depende da erosão das camadas superficiais da partícula. Ambos os casos levam à ruptura da matriz, sendo alcançada uma liberação mais lenta no segundo caso. Na liberação através do intumescimento da matriz, ocorre a penetração de moléculas do solvente, favorecendo a transição do estado vítreo do

polímero para borrachoso e, conseqüentemente, a difusão do bioativo imerso no interior da matriz para o meio externo (AGNIHOTRI et al., 2004; DASH et al., 2011).

Figura 5 – Esquema representativo do mecanismos de liberação de bioativos a partir de sistemas particulados.

Fonte: Adaptado de AGNIHOTRI et al., 2004, p. 5-28

Os sistemas de liberação são desenvolvidos segundo a via de administração e sítios de aplicação nos quais exercerão suas atividades biológicas (BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012). Quitosanas de baixa massa molar e altamente purificadas em formulações injetáveis não resultam na hemólise quando administradas por via intravenosa. Estudos sugerem que esta via de administração é efetiva para fármacos que são rapidamente excretados, devido ao baixo acúmulo em tecidos e boa retenção na corrente sanguínea (RICHARDSON et al., 1999). Formulações injetáveis à base de sistemas que apresentam a propriedade de gelificação *in situ*, como hidrogéis de quitosana, oferecem vantagens para o tratamento local de diversos tipos de câncer, como os: de mama, pulmão, cervical e fibrosarcoma. Nestes casos, fármacos citotóxicos com atividade antitumorais ou agentes quimioterápicos, imersos na matriz do hidrogel são injetados em região subcutânea próximo ao tumor, ou intratumoral. A liberação do fármaco contido no hidrogel ocorre em resposta à sensibilidade destes às condições do ambiente em que está inserido. Com isso, estímulos químicos como alteração do pH e/ ou força iônica, e físicos como temperatura, campo elétrico ou luz UV, propiciam a gelificação *in situ* e intumescimento do hidrogel. Dessa forma, reduzem a toxicidade gerada pela rápida exposição do medicamento quando este é aplicado de

forma sistêmica (TA et al., 2008; BHATTARAI et al., 2010; DELIGKARIS et al., 2010; AHMED, 2015).

Um hidrogel é constituído por grupos de materiais poliméricos de estrutura hidrofílica em rede tridimensional, capazes de aprisionar grande quantidade de água (AHMED, 2015). Para tanto, cadeias de homo ou copolímeros são química ou fisicamente entrecruzados. No primeiro caso, ligações covalentes entre as cadeias geralmente oferecem maior estabilidade mecânica. No segundo caso, o entrecruzamento físico é baseado em regiões de interações não-covalentes, estabelecidas pela pequena distância entre as cadeias poliméricas. Interações eletrostáticas, hidrofóbicas ou ligações hidrogênio, essencialmente mais fracas que ligações covalentes, configuram as principais formas de entrecruzamento físico (DELIGKARIS et al., 2010). Em todos os casos, é possível desenvolver matrizes de hidrogel em que o biotivo esteja ligado covalentemente, encapsulado ou seja capaz de permear a rede polimérica. Hidrogéis à base de quitosana desenvolvidos para liberação via ocular oferecem prolongado tempo de residência e maior biodistribuição na superfície devido à hidratação do carreador e rápida transição para um estado gel viscoso em pH ~ 7,4 após o uso tópico (CAMPOS et al., 2001). A liberação via nasal, por sua vez, oferece menor susceptibilidade a atividade enzimática e maior permeação na mucosa e tempo de residência devido à propriedade de mucoadesividade das cadeias de quitosana (ILLUM, 1998). Hidrogéis à base de quitosana configuram ainda formulações para liberação de agentes terapêuticos através da cavidade oral e trato gastrointestinal (BHATTARAI et al., 2010).

A potencial aplicação de carreadores à base de quitosana se estende para liberação de antígenos, bioativos no cérebro, na mucosa bucal, intravesical e vaginal. Apesar das propriedades favoráveis da quitosana, estas podem ainda ser intensificadas e outras adicionadas por reações de derivatização, a citar o derivado hidroxipropil-quitosana, o qual integra a formulação do Ciclopoli[®] da Polichem[®], utilizado para o tratamento de infecções fúngicas (BULGHERONI et al., 2015). Atualmente existem ao menos 15 testes clínicos em andamento, os quais são esperados resultados definitivos para regulamentação de sistemas de liberação de bioativos à base de quitosana para uso humano (GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012).

1.2.3 Derivatização da Quitosana com cadeias de PEG

A principal limitação para a aplicação da quitosana em sistemas de liberação de bioativos é a sua solubilidade, que é restrita a pH ~ 4-5. Apesar de a quitosana mostrar-se eficaz em favorecer a absorção de proteínas e peptídeos *in vivo* em ambientes ácidos, como na cavidade nasal, a absorção destes por via oral é prejudicada conforme o aumento da massa molar, baixa estabilidade hidrolítica e insolubilidade em pH ~ 7,4, na região terminal do trato gastrointestinal (íleo) (CASETTARI et al., 2012). Para suprir essa deficiência, é empregado o derivado quaternizado, *N,N,N*-trimetilquitosana, que aumenta a solubilidade da quitosana a pH ~ 9,0 devido à presença de cargas positivas permanentes, aumentando a mucoadesividade e permeabilidade do sistema de liberação. Entretanto, estudos mostram que este derivado com alto grau de quaternização apresenta elevada toxicidade (HAGENAARS et al., 2009; CHO et al., 2012).

A busca por melhor desempenho e aplicabilidade biomédica inclui vários métodos de derivatização da quitosana, tais como a carboximetilação e a *O*-hidroxialquilação, e copolimerização com ácido poliacrílico, vinilpirrolidona, 3-*O*-dodecil-D-glucose e *N*-isopropilacrilamida. A inserção de cadeias de PEG na estrutura da quitosana, por sua vez, apresenta diversas vantagens, tais como: o aumento da solubilidade a um intervalo de pH 1,0 a 11,0, dependente do grau médio de substituição ($\overline{GS}$), aumento da biocompatibilidade e tempo de circulação dos bioativos, bem como a redução da imunogenicidade, antigenicidade e degradação enzimática (CASETTARI et al., 2012). As cadeias de PEG favorecem o aumento relativo da mucoadesão da quitosana devido ao efeito sinérgico de interpenetração do polímero ramificado com glicoproteínas presentes em mucosas (GOTO et al., 2006). A copolimerização com PEG reduz ainda a citotoxicidade em relação à estrutura inicial de quitosana, resultando em diversas vantagens sobre o derivado *N,N,N*-trimetilquitosana (HU et al., 2005; MAO et al., 2005; CASETTARI et al., 2010).

Existem diferentes rotas sintéticas para derivatização da quitosana com cadeias de PEG tanto nos grupos -OH, presentes nos carbonos C6 e C3, quanto nos grupos -NH₂ no carbono C2 das unidades estruturais do polímero. Na maioria dos casos, é utilizado o precursor comercial α -monometóxi ω -hidróxi-PEG (mPEG), o qual apresenta apenas uma extremidade com um grupo -OH e um grupo metila incapaz de reagir com os terminais reativos da quitosana e de proporcionar a reticulação entre as cadeias poliméricas (LEBOUC et al., 2005). Entretanto, para que a síntese do derivado de quitosana ocorra de forma efetiva, é necessário

desenvolver a ativação do terminal reativo do mPEG, a fim de garantir reatividade suficiente entre os polímeros. O terminal reativo consiste de um *linker* entre as cadeias poliméricas (CASSETTARI et al., 2012). Os derivados ativados de mPEG podem conter terminais aldeído (HARRIS et al., 1984; SUGIMOTO et al., 1998; DENG et al., 2007), ácido carboxílico (OUCHI et al., 1998; YOKSAN et al., 2003; FANGKANGWANWONG, J et al., 2006), *N*-hidroxisuccinimida (NHS) (JEONG et al., 2008; CASSETTARI et al., 2010), iodeto (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004; HU et al., 2005), carbonato (SAITO, H. et al., 1997), entre outros (CASSETTARI et al., 2012; CHO et al., 2012).

A derivatização com cadeias de mPEG geralmente resulta na *N*-substituição em razão da maior nucleofilicidade dos grupos $-NH_2$ da quitosana (SUGIMOTO et al., 1998). O primeiro estudo referente à síntese do derivado mPEG-*g*-quitosana proposto, baseou-se na formação de base de Schiff nos grupos $-NH_2$ (HARRIS et al., 1984). Entretanto, a instabilidade do mPEG-aldeído resultou em baixo grau médio de substituição (5-6%), sendo o isolamento desta espécie em DMSO anidro, uma alternativa para contornar o problema da baixa eficiência de reação (DENG et al., 2007). A formação de derivados PEG-NHS é o método mais utilizado para a síntese do mPEG-*g*-quitosana, no qual há uma primeira etapa de ativação que resulta na formação de um terminal carboxílico (ω -carboxi), mPEG-COOH. Através da derivatização da quitosana com mPEG-NHS através da reação de acoplamento com o reagente organossolúvel *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) em DMSO foi possível obter graus médios de substituição entre 5-20% (JEONG et al., 2008). De forma análoga, a reação de acoplamento com o reagente hidrossolúvel *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC·HCl), resultou em graus médios de substituição entre 1,5-7% (CASSETTARI et al., 2010). Em ambos os casos, o derivado mPEG-*g*-quitosana foi solúvel em meio neutro e alcalino.

Rotas sintéticas que visam a *O*-substituição da quitosana, embora menos exploradas, preservam a maioria dos grupos $-NH_2$, os quais permanecem disponíveis para interação com membranas celulares e superfícies de mucosas, influenciando na densidade de carga e eficiência de absorção de sistemas de liberação (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004; HU et al., 2005; MAKUŠKA; GOROCHOVCEVA, 2006). O primeiro estudo referente à *O*-substituição de quitosana empregou a reação de eterificação com PEG utilizando CH_3I e Ag_2O como catalisador (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004). Entretanto, foi constatado que os produtos obtidos por este método apresentaram solubilidade satisfatória apenas em grau médio de substituição elevado, além de encontrar traços do catalisador dispersos na matriz (HU et al., 2005). Como alternativa, foi proposto um mecanismo no qual utilizou-se a

reação com anidrido ftálico para proteção dos grupos -NH_2 e desproteção através da reação com hidrazina monoidratada, envolvendo a reação intermediária nos grupos -OH (NISHIMURA et al., 1991). No entanto, foi observado que o processo de proteção/desproteção não se completa, sendo encontrado até 20% de grupos ftaloil no produto final (LEBOUC et al., 2005), além de produtos parcialmente degradados (MAKUŠKA; GOROCHOVCEVA, 2006). Apesar disso, alguns estudos utilizam deste método sintético a partir de quitosanas de alta massa molar, a fim de obter um derivado mPEG-g-quitosana com características anfifílicas para produção de carreadores micelares (YOKSAN et al., 2004; EL-SHERBINY; SMYTH, 2012), favorecendo a *N,O*-substituição devido à baixa eficiência de proteção com os grupos *N*-ftaloil (YOKSAN et al., 2003). Esta rota foi explorada anos mais tarde com a supressão do processo de proteção/desproteção, resultando em derivado solúvel em extensa faixa de pH (2-10) e permitindo alcançar $\overline{GS} \approx 42\%$ (FANGKANGWANWONG, J et al., 2006).

O derivado mPEG-g-quitosana não somente é solúvel em amplo intervalo de pH, como pode exibir a propriedade de transição sol-gel em função da temperatura e do grau médio de substituição. Foi constatado que para a quitosana com $\overline{GD} = 85\%$, $\overline{M}_w = 190$ kDa e derivatização acima de 40% (m/m), a partir de mPEG 2,0 kDa, é possível obter um derivado capaz de transitar para um estado de hidrogel semirígido a 37 °C (BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005). Em virtude da interação entre as cadeias de PEG e a partir de interações de origem hidrofóbica e ligações hidrogênio entre os grupos -OH e -NH_2 da quitosana, todas de caráter reversível com a temperatura, este hidrogel foi aplicado para liberação sustentada de proteínas. Neste estudo, a albumina de soro bovino (BSA) exibiu um perfil de liberação linear *in vitro* durante 70 horas (BHATTARAI; RAMAY; et al., 2005).

Devido a propriedades como o efeito de auto-agregação e formação de polímeros com espécies negativamente carregadas (OUCHI et al., 1998), o derivado mPEG-g-quitosana foi explorado nos últimos anos como potencial carreador de proteínas, peptídeos, oligonucleotídeos, para uso tópico em mucosas, transfeção gênica e fármacos hidrofóbicos, como insulina e heparina (CASETTARI et al., 2012; CHO et al., 2012). Nanocarreadores menores que 300 nm foram produzidas a partir da quitosana *N*-substituída ($\overline{M}_w = 200$ kDa) com mPEG 2 kDa para incorporação do fármaco anticarcinogênico metotrexato (YANG et al., 2008). Neste estudo, foi demonstrada a influência do grau de substituição na eficiência de carregamento do bioativo, sendo obtido um perfil de liberação com duração de até 48 horas. Assim, como ilustrado na Figura 6 e de acordo com a Tabela 1, também é possível produzir nanocarreadores de mPEG-g-quitosana a partir do método de gelificação iônica.

Nanopartículas do derivado de quitosana com tripolifosfato de sódio (TPP) foram produzidos para administração e liberação controlada de insulina por via intravenosa (ZHANG et al., 2008). Neste estudo foi constatada a dependência da liberação do biativo com a temperatura e grau médio de substituição do derivado. Nanopartículas à base de mPEG-g-quitosana/ TPP favorecem ainda o aumento da estabilidade do hormônio calcitonina de salmão em fluidos gastrointestinais, além de prolongar sua absorção intestinal (PREGO et al., 2006).

Figura 6 – Esquema simplificado de formação de nanopartículas carreadoras à base de mPEG-g-quitosana.

Fonte: Adaptado de CHO et al. et al. In: SARMENTO, B. e das NEVES, J., 2012, p. 301-317

Diferentes estudos mostram que carreadores formados a partir do derivado mPEG-g-quitosana geralmente apresentam morfologia esférica em solução e tamanho inferior a 400 nm. Adicionalmente, a tendência apresentada pela incorporação e pelos perfis de liberação de poliânions e espécies hidrofóbicas comprova a eficiência do derivado para fins biofarmacêuticos (CASSETTARI et al., 2012; CHO et al., 2012).

2 MOTIVAÇÃO

De acordo com a IARC, o câncer é uma das principais causas de óbito mundial. Um estudo divulgado em 2013 pela Agência de Pesquisa em Câncer de Lyon, França, relacionou o predomínio de diferentes tipos de cânceres na população adulta de 27 países em 2008. De acordo com a estimativa, o câncer de pulmão configura o tipo predominante na maioria dos países em âmbito global, enquanto que o de colo de útero acomete principalmente a África Subsaariana e o sul da Ásia; o câncer de próstata é predominante na América do Norte, Oceania e Europa Ocidental, enquanto que o câncer de boca predomina na Índia e o de estômago na Ásia Oriental (BRAY et al., 2013). Dados recentes divulgados pelo INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014) revelam aumento de 14,1 milhões de casos novos de câncer, acarretando em um total de 8,2 milhões de óbitos em todo o mundo no ano de 2012. No Brasil, a estimativa para 2014/ 2015 aponta para a incidência de mais de 500 mil novos casos de câncer.

Diante deste cenário, o investimento em pesquisas relacionadas a novas tecnologias, que proporcionem menores efeitos colaterais relativos à administração quimioterápica ou sistêmica de fármacos citotóxicos para o tratamento de câncer, configura uma necessidade global. Nesse sentido, a produção de nano ou micropartículas e hidrogéis, constituídos de polímeros naturais ou de origem sintética e destinados à liberação controlada ou sustentada de bioativos com atividade antitumoral, mostra-se em amplo desenvolvimento para o tratamento de diferentes tipos de câncer. A bioviabilidade do bioativo pode ser aperfeiçoada através do planejamento do carreador ou matriz polimérica, sendo a aplicação de polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e de caráter atóxico, como a quitosana, uma potencial alternativa para o desenvolvimento de sistemas de liberação (HALEY; FRENKEL, 2008; TA et al., 2008; BAMRUNGSAP et al., 2012; DESAI, 2012; YALLAPU et al., 2012; VERT et al., 2012).

As propriedades da quitosana como sua mucoadesividade e capacidade de interação com membranas celulares podem ser aperfeiçoadas pela derivatização das cadeias. (ILLUM, 1998; AGNIHOTRI et al., 2004; DASH et al., 2011; BERNKOP-SCHNÜRCH; DÜNNHAUPT, 2012; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012). A derivatização com cadeias de mPEG, por sua vez, favorece o aumento da solubilidade da quitosana para pH > 7,4, aumento da biocompatibilidade, estabilidade e tempo de circulação dos bioativos, e redução da imunogenicidade, antigenicidade e degradação enzimática. Com isso, derivados mPEG-g-

quitosana configuram modificações estruturais que levam ao aperfeiçoamento de propriedades de interesse biofarmacêutico (CASETTARI et al., 2012; CHO et al., 2012).

Formulações constituídas de PEG são aprovadas pela FDA (KNOP et al., 2010), enquanto que a quitosana é reconhecida pela designação GRAS (SHEPHERD et al., 1997; LÓPEZ-LÁRAZO, 2008). Atualmente, existem ao menos 15 testes clínicos em andamento de sistemas de liberação à base de quitosana (GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2012), sendo os sistemas à base de mPEG-g-quitosana promissores constituintes de nano ou micropartículas e formulações de hidrogéis termosensíveis, destinados à liberação de bioativos (BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005; BHATTARAI et al., 2010; CASETTARI et al., 2012; EL-SHERBINY; SMYTH, 2012).

3 OBJETIVOS

Esta pesquisa visa obter derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana a partir de quitosanas com diferentes graus médios de desacetilação e massas molares viscosimétricas, voltados para o desenvolvimento de sistemas de liberação de bioativos, em especial fármacos hidrofóbicos que apresentem atividade antitumoral. Tanto as amostras de quitosana, quanto dos derivados são avaliados conforme suas propriedades de superfície e hidrodinâmicas na constituição de partículas em suspensão. São investigadas ainda as propriedades reológicas das amostras de hidrogéis dos derivados.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para o desenvolvimento deste trabalho são identificados na Tabela 2. A β -quitina foi extraída de gládios de lulas das espécies *Doriteuthis plei* e *Doriteuthis sampaulensis*, armazenados a -20°C até a sua utilização. Com exceção da quitosana comercial (amostra Q), os demais insumos foram empregados sem purificação prévia.

Tabela 2 – Insumos utilizados para o desenvolvimento do trabalho.

Material/ Reagente	Marca
Ácido Clorídrico 36,5-38% (P.A.)	Qhemis
Ácido Nítrico 65% (P.A. A.C.S.)	Qhemis
Ácido Perclórico 72% (P.A. A.C.S.)	Qhemis
Água Deuterada (D_2O)	Cambridge Isotope Laboratories
Anidrido Succínico	Sigma-Aldrich
Brometo de Potássio	Spectrum
4-(Dimetilamino)piridina (DMAP) 99%	Sigma-Aldrich
<i>N,N'</i> -Dimetilformamida (DMF)	Qhemis
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Qhemis
<i>N</i> -(3-Dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida (EDC·HCl) 98%	Sigma-Aldrich
Éter Etílico	Synth
Gládios de lula (<i>Doriteuthis plei</i> e <i>Doriteuthis sampaulensis</i> .)	Miami Pescados (Cananéia/ SP)
1-Hidroxibentriazol monoidratado ($\text{HOBt}\cdot\text{H}_2\text{O}$)	Sigma-Aldrich
Peróxido de Hidrogênio 30% (v/v)	Synth
Poli(etilenoglicol) metil éter (mPEG) M_n 5000 g mol^{-1}	Sigma-Aldrich
Quitosana Comercial	Yue Planting Co. (China)
Tripolifosfato de Sódio (TPP)	Sigma-Aldrich

4.2 Extração da β -Quitina

Inicialmente, os gládios de lulas foram lavados para a remoção de resíduos de carne e secos em estufa de circulação de ar a 30°C. Na etapa de desproteínização, 200 g de gládios triturados em moinho de facas (MA-048, Micromoinho de rotor vertical com facas móveis, Marconi) foram suspensos em solução aquosa 1,0 mol L⁻¹ de NaOH e mantidos sob agitação mecânica (400 rpm) por 18 horas à temperatura ambiente (CHAUSSARD; DOMARD, 2004; LAVALL et al., 2007). O sólido em suspensão foi lavado com água destilada até atingir a neutralidade e seco em estufa de circulação de ar a 30 °C por 48 horas. Após secagem, a β -quitina foi triturada em moinhos de facas, peneirada e classificada de acordo com as dimensões das partículas (D): $D < 0,125 \text{ nm}^2$, $0,125 \text{ nm}^2 < D < 0,250 \text{ nm}^2$ e $D > 0,250 \text{ nm}^2$.

4.3 Obtenção de Quitosanas via Processo DAIUS

A obtenção de quitosanas com diferentes graus médios de desacetilação foi possível através da reação de desacetilação da β -quitina via processo DAIUS (DELEZUK et al., 2011; DELEZUK, 2013). Inicialmente, 5,0 g de β -quitina ($0,125 \text{ nm}^2 < D < 0,250 \text{ nm}^2$) foram suspensos em solução aquosa de NaOH 40% (m/v) na proporção 1:10 (massa de quitina/solução NaOH, g mL⁻¹), vertida em reator de vidro encamisado acoplado em banho termostático (60 °C $\pm$ 1°C). Em seguida, a suspensão foi submetida à irradiação de ultrassom por 50 minutos no interior da caixa de isolamento acústico do dispositivo de ultrassom modelo Hielscher Sonifier UP400S ($\nu = 24 \text{ kHz}$), acoplado a um sonotrodo de 22 mm de diâmetro, com irradiação pulsada (0,5) e potência ajustada em 200 W. A reação foi cessada após a imersão da suspensão em uma mistura de água e etanol contendo cubos de gelo de água destilada (-10°C). A suspensão foi neutralizada com ácido clorídrico concentrado, lavada com etanol 80% (v/v), filtrada e seca em estufa de circulação de ar a 30 °C por 48 horas. A quitosana obtida foi denominada amostra QD1x. O processo DAIUS foi repetido sobre 5,0 g da quitosana QD1x, resultando na quitosana QD2x e sobre 5,0 g desta última para obtenção da quitosana QD3x. A Figura 7 apresenta um esquema representativo do aparato experimental composto pelo sonotrodo sobre o vidro encamisado, contendo as suspensões das amostras submetidas ao processo DAIUS.

Figura 7 – Esquema representativo do processo DAIUS. O sonotrodo (diâmetro 22 mm) é inserido no reator de vidro encamisado (diâmetro interno de 3,5 cm), contendo a suspensão de amostra inicial (β -quitina, QD1x e QD2x) em NaOH 40% (m/v).

Fonte: Adaptado de DELEZUK et al., 2011, p. 903-909.

4.4 Purificação da Quitosana Comercial

Suspensão de quitosana formada a partir da adição gradativa do polímero (3,0 g, amostra QN) em 1,0 L de solução de ácido acético 1 % (v/v), foi mantida sob agitação constante por aproximadamente 24 horas de modo a assegurar a completa dissolução. A solução resultante foi então filtrada sob pressão positiva em membrana de porosidade 0,45 μm (Millipore – White SCWP) e, em seguida, neutralizada pela adição de solução concentrada de NaOH 1,0 mol L⁻¹, resultando na precipitação de quitosana. O precipitado foi filtrado, sequencialmente lavado com soluções de etanol/água a 75%, 80%, 90% (v/v), etanol absoluto e seco em estufa a 25 °C (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998). A quitosana comercial purificada foi denominada amostra Q.

4.5 Quantificação de Metais Pesados

4.5.1 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)

A quantificação de metais pesados nas amostras gládios de lulas, β -quitina e quitosanas (QD1x, QD2x, QD3x, QN e Q) foi realizada por ICP OES. Os ensaios foram realizados em triplicata a partir da decomposição das amostras por via úmida em recipiente aberto,

empregando o método de digestão nitro-perclórica padronizado pela EMBRAPA (CHITOLINA et al., 2001; SILVA et al., 2007). As análises foram conduzidas no Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA/ DQ/ UFSCar).

Assim, 10,0 mL de H_2O_2 30% (v/v) foram adicionados ao frasco contendo aproximadamente 500 mg de amostra o qual permaneceu em repouso a 25 °C por 24 horas em ambiente sem luminosidade. Em seguida foram adicionados 8,0 mL de HNO_3 65% (P.A. A.C.S.) e cada sistema foi gradativamente aquecido até alcançar 180-200 °C. Após o resfriamento, foram adicionados 5,0 mL de $HClO_4$ 72% (P.A. A.C.S.) ao frasco que foi novamente aquecido a 180-200 °C. O conteúdo foi lentamente filtrado a frio em microfibras de vidro (WHATMAN®, GF/D, ϕ = 47 mm) e transferido para balão volumétrico de 50,0 mL, preenchido com água deionizada (Milli-Q®). As amostras digeridas foram introduzidas por nebulização na câmara de detecção do espectrômetro com configuração axial (modelo Vista AX, Varian Inc., Mulgrave, Victoria, Australia), equipado com interface *end-on* (fluxo frontal de argônio constantemente introduzido ao plasma).

A seleção dos metais a serem analisados baseou-se no critério de maior incidência e/ ou interação com matrizes de quitosana (RHAZI et al., 2002), e também em razão dos limites de máxima concentração por dosagem permitida para administração de fármacos e excipientes de acordo com a ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010) e com a Farmacopéia norte-americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION, 2013).

Foram preparadas soluções nas concentrações 0,05, 0,1, 0,5, 1,0 e 10,0 ppm para a construção das curvas de calibração dos metais, sendo que todas as curvas apresentaram coeficientes de determinação $R^2 > 0,999$. Uma solução de 20,0 ppm foi utilizada como referência para determinação do limite de detecção do aparelho (LOD, *limit of detection*) a partir dos valores calculados da concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC, *background equivalent concentration*) e da razão sinal analítico/ sinal de fundo (SBR, *signal-to-background ratio*), de acordo com as Equações 1, 2 e 3, respectivamente (SILVA et al., 2002).

$$LOD = \frac{3(BEC)(R.S.D.)}{100} \quad \text{Equação 1}$$

$$BEC = \frac{C_{rs}}{SBR} \quad \text{Equação 2}$$

$$SBR = \frac{I_{sr} - I_{branco}}{I_{branco}} \quad \text{Equação 3}$$

sendo:

LOD = limite de detecção;

BEC = concentração equivalente ao sinal de fundo;

SBR = razão sinal analítico/ sinal de fundo;

C_{sr} = concentração da solução de referência (20 ppm);

I_{sr} = intensidade do sinal obtido para cada metal da solução de referência;

I_{branco} = intensidade do sinal obtido para cada metal da solução branco;

R.S.D. = desvio padrão relativo a 10 medidas da solução branco (0 ppm);

4.6 Síntese de mPEG-COOH

A ativação das cadeias de mPEG consistiu na introdução do grupo carboxila (–COOH) através da reação de abertura de anel do anidrido succínico com grupo hidroxila (–OH) do polímero, segundo o método já existente (YOKSAN et al., 2003), com algumas adaptações (CASETTARI et al., 2010; EL-SHERBINY; SMYTH, 2012).

O polímero mPEG (M_n 5000 g mol⁻¹, 35 g, 7,0 mmol) foi dissolvido em 100 mL de *N,N'*-dimetilformamida (DMF) a 40 °C. O sistema permaneceu sob agitação até atingir 25 °C e em seguida foi adicionado excesso de anidrido succínico (1,3 g, 13,0 mmol). Somente após a homogeneização do sistema, o catalisador 4-(dimetilamino)-piridina (DMAP, 0,86 g, 7,0 mmol) foi acrescentado. A reação em meio homogêneo procedeu por 48 horas sob atmosfera de argônio, sendo o produto mPEG-COOH recuperado por precipitação em 2,0 L de éter etílico mantido a 0-4 °C sob agitação mecânica (400 rpm) por 1 hora. O precipitado foi coletado por filtração, seco em estufa a vácuo a 30 °C por 24 horas, resultando em mPEG-COOH.

4.7 Síntese de *N,O*-mPEG-g-Quitossana

A síntese dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitossana foi desenvolvida empregando as quitosanas QD1x, QD2x, QD3x e Q em única etapa (*one-pot*) em meio aquoso homogêneo,

através do método de acoplamento de ésteres ativos (FANGKANGWANWONG, J et al., 2006). Para confirmação da reprodutibilidade da reação, a mesma foi efetuada em triplicata.

Inicialmente, cada amostra de quitosana (500 mg, 3,07 mmol) foi dispersa em 90 mL de água deionizada, seguido da adição do reagente de acoplamento 1-hidroxibenzotriazol monoidratado (HOBt·H₂O, 940 mg, 6,14 mmol) para a formação do complexo solúvel quitosana-HOBt·H₂O (pH = 4,4). À suspensão homogênea, foi inserido o polímero ativado mPEG-COOH (4,69 g, 0,92 mmol). Em seguida, e após a completa dissolução do mPEG-COOH, uma solução de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida (EDC·HCl, 530 mg, 2,76 mmol) foi preparada e imediatamente em 10 mL de água deionizada e gotejada por aproximadamente 10 minutos ao meio reacional. A reação foi mantida a 25 °C sob agitação constante por 24 horas e dialisada por 15 dias em membrana de celulose (M_w 12000 g mol⁻¹ cut off), resultando nos derivados PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ obtidos por liofilização.

4.8 Caracterizações

4.8.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os modos vibracionais de grupos funcionais e as mudanças estruturais devido às reações de ativação das cadeias de mPEG e de *N*-substituição dos grupos –NH₂ da quitosana foram caracterizadas por espectroscopia no infravermelho.

Para obtenção dos espectros, pastilhas de KBr (amostra/KBr 1:100) foram preparadas e previamente secas em estufa a 30 °C por 24 horas. As amostras foram analisadas no espectrofotômetro BOMEM MB-102, com acúmulo de 48 varreduras e resolução de 4 cm⁻¹, no intervalo de 4000 – 400 cm⁻¹.

4.8.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio de alta resolução (RMN ¹H) foi utilizada para análise das estruturas químicas, determinação do grau médio de desacetilação, $\overline{GD}$, das amostras QD1x, QD2x, QD3x e Q e do grau médio de substituição, $\overline{GS}$, das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ. Nos casos das amostras de mPEG e mPEG-COOH, aproximadamente 15,0 mg foram dissolvidos em 1,0 mL de D₂O e os

espectros foram adquiridos a 25 °C, enquanto que para as amostras de quitosana e *N,O*-mPEG-*g*-quitosana, 10,0 mg foram dissolvidos em 600 µL de D₂O/HCl 1% (v/v) e os espectros foram adquiridos a 85 °C. Todos os casos permaneceram sob agitação magnética constante por 24 horas. A referência utilizada foi o sinal do solvente (DOH) (GOTTLIEB et al., 1997). Para a caracterização de β-quitina, 10,0 mg foram dissolvidos em 1,0 mL de D₂O/DCl 20 % (v/v), permanecendo sob agitação magnética constante a 70 °C por 18 horas. Foi adicionado ácido 2,2-dimetil-2-silapentano-5-sulfônico (DSS) como padrão interno de referência e o espectro foi adquirido a 80°C (DELEZUK, 2013).

Os espectros foram adquiridos a partir das soluções transferidas para tubos de quartzo (Aldrich 527-PP, $\phi = 5$ mm) no espectrômetro AGILENT 400/54, operando a 400 MHz para o núcleo de hidrogênio. Para a análise quantitativa dos espectros (RMNq-¹H), utilizou-se a sequência pulso S2PUL que consistiu no pulso de 90° (*pulse angle*) com número de transientes (aquisições) registrados (64 a 192) e acúmulo de varreduras (26 a 42) variável em função das características intrínsecas de cada amostra. A janela espectral utilizada foi 6,4 kHz (14 a -2 ppm), tempo de relaxação médio de 30 s e tempo de aquisição médio de 5 s (VELOSO et al., 1999).

A Figura 8 apresenta o espectro de RMN ¹H característico da quitosana. O valor de $\overline{GD}$ foi calculado a partir da razão entre as áreas dos sinais atribuídos aos hidrogênios metílicos do grupo acetamida (–C(O)CH₃) em 2,0 ppm e da soma das áreas dos hidrogênios ligados aos carbonos C2 a C6 do anel glicopiranosídico (H2-H6), registrados no intervalo de 3,0 a 4,2 ppm, como apresentado na Equação 4 (HIRAI et al., 1991).

Figura 8 – Espectro de RMN ^1H característico da quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) a 85 °C.

$$\% \overline{GD} = 100 - \left[\left(\frac{\frac{1}{3} A_{\text{CH}_3}}{\frac{1}{6} A_{\text{H2-H6}}} \right) \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

sendo:

$\% \overline{GD}$ = grau médio de desacetilação;

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

$A_{\text{H2-H6}}$ = área dos sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos C2 a C6 do anel glicopiranosídico.

O grau médio de substituição ($\overline{GS}$) de N,O -mPEG-g-quitosana se refere à porcentagem relativa de cadeias de mPEG-COOH ligadas aos grupos $-\text{NH}_2$ e $-\text{OH}$ da quitosana. Como a análise procede em temperatura elevada (85 °C), o sinal referente ao hidrogênio ligado ao carbono C1 da quitosana (H1) é desdobrado em mais dois sinais H1' e H1'', que correspondem aos sinais dos hidrogênios H1 pertencentes às unidades com substituição no grupo $-\text{NH}_2$ (GlcNPEG) e às unidades GlcNAc, respectivamente (DESBRIÈRES et al., 1996) (Figura 9). Através do cálculo das áreas relativas destes sinais obtém-se o grau de substituição

das cadeias de mPEG-COOH nos grupos $-\text{NH}_2$ da quitosana, $\overline{GS}_N$, como mostra a Equação 5. Para o cálculo, os sinais dos hidrogênios foram ajustados pela deconvolução de funções de Lorentz através do software MagicPlot Pro[®].

Figura 9 – Espectro de RMN ^1H de *N,O*-mPEG-g-quitosana em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C.

$$\% \overline{GS}_N = \left(\frac{A_{H1'}}{A_{H1} + A_{H1''}} \right) \cdot 100$$

Equação 5

sendo:

$\% \overline{GS}_N$ = grau médio de *N*-substituição;

A_{H1} = área do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos C1 das unidades GlcN;

$A_{H1'}$ = área do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos C1 das unidades *N*-substituídas (GlcNPEG);

$A_{H1''}$ = área do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos C1 das unidades GlcNAc.

O grau médio de substituição nos grupos –OH pode ser obtido ao considerar o cálculo da área do sinal dos hidrogênios metílicos da extremidade não-reativa do mPEG-COOH (H(a)) relativa à soma dos hidrogênios H1, H1' e H1''. Como este sinal praticamente não sofre alteração de ambiente químico devido à reação de derivatização, havendo pouca alteração devido à temperatura de análise, não é possível distingui-lo dos hidrogênios metílicos das cadeias de mPEG-COOH que permaneceram sem reagir, já que ambos os sinais sobrepõem-se no espectro. Também não é possível distinguir os sinais dos hidrogênios metílicos referente às cadeias ligadas aos grupos –NH₂. Portanto, a *O*-substituição, acompanhada pela parcela residual de cadeias de mPEG-COOH livres (L), $\overline{GS}_O$, pode ser obtida indiretamente ao desconsiderar a contribuição do $\overline{GS}_N$, como mostra o cálculo proposto pela Equação 6.

$$\% \overline{GS}_O = \left[\left(\frac{\frac{1}{3} A_{H(a)}}{A_{H1} + A_{H1'} + A_{H1''}} \right) - \left(\frac{A_{H1'}}{A_{H1} + A_{H1''}} \right) \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

sendo:

$\% \overline{GS}_O$ = grau médio de *O*-substituição mais a quantidade de cadeias de mPEG-COOH livres residuais;

$A_{H(a)}$ = área do sinal dos hidrogênios metílicos do terminal não reativo do mPEG-COOH;

Em função das rotas sintéticas desenvolvidas geralmente proporcionarem um derivado com substituição regioselectiva no grupo –NH₂ (BHATTARAI; RAMAY; et al., 2005; LEBouc et al., 2005; JEONG et al., 2008; YANG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010), ou nos grupos –OH (MALHOTRA et al., 2011; EL-SHERBINY; SMYTH, 2012; NAJAFABADI et al., 2014), o cálculo do grau médio de substituição total, $\overline{GS}_T$, envolve diretamente o sinal dos hidrogênios metílicos (H(a)) do mPEG-COOH.

4.8.3 Titulação Condutimétrica

A titulação condutimétrica foi utilizada para determinação do grau médio de desacetilação das amostras QD1x, QD2x, QD3x e Q. Aproximadamente 100 mg de amostra de quitosana seca em estufa a vácuo a 30 °C por 24 horas foram dissolvidas em 100 mL de solução de HCl 0,05 mol L⁻¹, permanecendo sob agitação por 24 horas. O conteúdo foi

titulado com uma solução de NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a $25,0 \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$, previamente padronizada com biftalato de potássio, através do titulador automático Schott-Geratte Universal com precisao de $0,01 \text{ mL}$. As medidas de condutividade foram registradas pelo condutivímetro modelo Schott-Geratte Handylab LF1 (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998; SANTOS et al., 2003). A curva de condutividade das amostras de quitosana, segundo o volume de base (titulante) adicionado  representada pela Figura 10.

Figura 10 – Curva de titulação condutimétrica característico da quitosana.

A dissolução da amostra de quitosana em HCl diluído ($\text{pH} < 2,0$) resultou na protonação de todos os grupos $-\text{NH}_2$ da cadeia. A primeira inclinação da curva (Figura 10) refere-se ao consumo do H^+ em excesso presente na solução, pela neutralização com o titulante. A partir do primeiro ponto de inflexão da curva em V_1 (ponto de viragem), a nova inclinação adotada refere-se ao consumo do ácido fraco, representado pelos grupos $-\text{NH}_3^+$ presentes ao longo das cadeias de quitosana. O ligeiro aumento da condutividade registrado nesta etapa é devido a desprotonação dos grupos $-\text{NH}_3^+$. O segundo ponto de viragem em V_2 representa o fim da neutralização dos grupos amônio e conseqüentemente a terceira inclinação registra um elevado aumento da condutividade devido aumento da concentração de OH^- em solução (SANTOS et al., 2003). Dessa forma, a Equação 7 foi utilizada para o cálculo do grau médio de desacetilação da quitosana.

$$\% \overline{GD}_c = \left(\frac{M_{GlcN} [OH^-] (V_2 - V_1)}{m} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 7}$$

sendo:

$\% \overline{GD}_c$ = grau médio de desacetilação obtido por titulação condutimétrica;

M_{GlcN} = massa molar média das unidades GlcN das quitosanas ($161,0 \text{ g mol}^{-1}$);

$[OH^-]$ = concentração da base titulante (mol L^{-1});

$(V_2 - V_1)$ = volume de base consumido para neutralizar a quitosana (mL);

m = massa de quitosana contida na amostra titulada.

4.8.4 *Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13 (RMN ^{13}C)*

A análise por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono 13 de alta resolução (RMN ^{13}C) foi efetuada para confirmação estrutural do mPEG e mPEG-COOH e cálculo do rendimento da reação de ativação ($\%R_{\text{ativação}}$). De acordo com a Equação 8, o $\%R_{\text{ativação}}$ foi calculado a partir da área relativa do carbono ligado ao grupo do terminal reativo inicial ($-\text{OH}$) porém localizados em ambientes químicos distintos de ambas as estruturas (C(f) e C(f')), como apresentado na Figura 11. Para o cálculo, os sinais dos carbonos foram ajustadas pela deconvolução de funções de Lorentz através do software MagicPlot Pro[®].

Figura 11 – Espectros de RMN ^{13}C das amostras de mPEG e mPEG-COOH em D_2O a 25°C .

$$\%R_{ativação} = \left(\frac{A_{C(f)'}}{A_{C(f)} + A_{C(f)'}} \right) \cdot \%R_{mássico} \quad \text{Equação 8}$$

sendo:

$\%R_{ativação}$ = rendimento da reação de ativação;

$\%R_{mássico}$ = rendimento em massa da reação de ativação;

$A_{C(f)}$ = área do sinal do carbono ligado ao grupo $-\text{OH}$ do mPEG;

$A_{C(f)'}$ = área do sinal do carbono equivalente e adjacente ao grupo $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ do mPEG-COOH.

Aproximadamente 300 mg das amostras de mPEG e mPEG-COOH foram dissolvidos em 600 μL de D_2O e analisados a 75°C (LEBOUC et al., 2005). Geralmente é utilizado o solvente deuterado para efetuar o ajuste da homogeneidade do campo magnético (*shimming*) (LIÃO et al., 2010).

Os espectros foram adquiridos a partir das soluções transferidas para tubos de quartzo (Aldrich 527-PP, $\phi = 5\text{ mm}$) no espectrômetro AGILENT 400/54, operando a 100 MHz para o núcleo de carbono 13. Para a análise quantitativa dos espectros, utilizou-se a sequência de pulso S2PUL que consistiu no pulso de 90° (*pulse angle*) com número de transientes

(aquisições) variável registrados (2600 a 3000) em função da amostra e acúmulo de 60 varreduras. A janela espectral utilizada foi $2,5 \cdot 10^4$ Hz (235 a -15 ppm), o tempo de relaxação foi de 20 s e o tempo de aquisição foi de 1,30 s (VELOSO et al., 1999).

4.8.5 Solubilidade em função do pH

A determinação da solubilidade das amostras de quitosana e derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana em meio aquoso em função do pH foi baseada na turbidez das soluções. Para tanto, aproximadamente 100 mg de amostra foram suspensos em 50 mL de solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e mantidos sob agitação magnética por 24 horas. O pH das soluções foi gradativamente elevado pela adição de hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, sendo registrado o valor da transmitância em $\lambda = 600 \text{ nm}$. As medidas de pH foram registradas com o auxílio de um pHmetro digital GEHAKA modelo PG1800, previamente calibrado com soluções-tampão de pH 10,00, 7,00 e 4,00 a 25°C e precisão relativa de 0,05%. A transmitância foi determinada através do espectrofotômetro UV-Vis-NIR modelo UV-3600 da SHIMADZU, em cela de quartzo de 1,0 cm. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

O pouco volume de solução de NaOH adicionado para cada pH registrado não proporciona variações significativas na concentração inicial do conteúdo que resulte em valores de transmitância discrepantes (JINTAPATTANAKIT et al., 2008; LV et al., 2014).

4.8.6 Viscosimetria Capilar

Para a determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar média viscosimétrica ($\bar{M}_v$) das amostras de quitosana, cerca de 15 mg das amostras QD1x, QD2x e QD3x e 50 mg da amostra Q foram suspensos em 25 mL de soluções de ácido acético $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação magnética por 24 horas e, em seguida, foram adicionados 25 mL de uma solução acetato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Após 24 horas sob agitação magnética constante, a solução resultante foi filtrada sob pressão positiva em membrana de porosidade $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore – White SCWP). Alíquota de 15 mL foi transferida para o viscosímetro capilar de vidro modelo Ubbelohde ($\varphi = 0,53 \text{ mm}$) e as medidas de tempo de escoamento (t_c) foram determinadas empregando viscosímetro AVS-360 acoplado a diluidor automático modelo TITRONIC AVS-20 universal, ambos da Schott-Geräte. Para a realização do mesmo ensaio com a amostra de β -quitina, 7,5 mg do polímero foram suspensos em 30 mL de *N,N*-

dimetilacetamida/ LiCl (5%), permanecendo sob agitação magnética por 24 horas. Uma alíquota desta solução foi transferida para o viscosímetro capilar de vidro modelo Ubbelohde ($\varphi = 0,84 \text{ mm}$).

A $[\eta]$ das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ foi determinada de forma semelhante ao procedimento desenvolvido para as amostras de quitosana. Nestes casos, aproximadamente 500 mg de polímero foram suspensos em 15 mL de ácido acético $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ por 24 horas, seguido da adição de 15 mL de acetato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Os valores de t_c para uma determinada concentração C de polímero foram obtidos a partir sucessivas diluições isoiônicas com a solução-tampão realizadas a $25,00 \pm 0,01 \text{ }^\circ\text{C}$. O valor de t_0 e cada t_c , correspondente à média de três determinações independentes com variação menor que 0,5%, foram ajustados automaticamente pela correção de Hangenbach, na qual se considera o diâmetro do capilar de vidro utilizado.

Para soluções poliméricas diluídas, a densidade da solução é muito próxima a densidade do solvente e, neste caso, a viscosidade relativa (η_{rel}) da solução pode ser determinada segundo a Equação 9 (KULICHE; CLASEN, 2004).

$$\eta_{rel} \cong \frac{t_c}{t_0} \quad \text{Equação 9}$$

sendo:

η_{rel} = viscosidade relativa à concentração C;

t_c = tempo de escoamento da solução à concentração C;

t_0 = tempo de escoamento do solvente

Como a quitosana apresenta um comportamento de polieletrólito em solução, em sistemas diluídos com força iônica elevada, viscosidade relativa apresenta tendência linear tipicamente entre 1,2 e 1,8. Nestas condições, é possível determinar a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) através da equação empírica de Huggins (Equação 10) (HUGGINS, 1942). Embora as amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ não apresentem características exclusivamente de polieletrólito, a viscosidade intrínseca foi determinada a partir da regressão linear deste mesmo intervalo.

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = \frac{t_c - t_0}{t_0 C} = [\eta] + k_H \cdot [\eta]^2 \cdot C \quad \text{Equação 10}$$

sendo:

η_{sp}/C = viscosidade reduzida (η_{red}) da solução (mL g⁻¹);

$[\eta]$ = viscosidade intrínseca da solução (mL g⁻¹);

k_H = constante de Huggins;

C = concentração da solução (g mL⁻¹).

A viscosidade específica (η_{sp}), de acordo com a IUPAC, pode ser entendida como um incremento da viscosidade relativa da solução. Mesmo em sistemas diluídos, a viscosidade reduzida (η_{red}) não é independente da concentração e, portanto, apenas através da extrapolação para o regime de diluição infinita ($C \rightarrow 0$) é possível obter a viscosidade intrínseca que, segundo a IUPAC, traduz a viscosidade limite na qual há uma cadeia polimérica em solução idealmente diluída (KULICHE; CLASEN, 2004). Dessa forma, a viscosidade intrínseca satisfaz a relação de Mark-Houwink (Equação 11) para determinação da massa molar viscosimétrica ($\bar{M}_v$) do polieletrólito.

$$[\eta] = K' \cdot \bar{M}_v^\alpha \quad \text{Equação 11}$$

onde K' e α são constantes dependentes da temperatura e que indicam a qualidade do solvente utilizado para dissolução do polímero (RINAUDO et al., 1993).

4.8.7 Difração de Raios X (DRX)

A cristalinidade das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana foi estimada pela análise de DRX. As medidas foram realizadas em difratômetro BRUKER modelo D8 Advance em modo de aquisição *step scan*, com incremento de 0,03° e tempo de irradiação de 0,4 s por passo. O intervalo de aquisição foi de 5° < 2θ < 50°, a tensão de 40 kV e a corrente de 40 mA. O índice de cristalinidade, I_{cr} das amostras de quitosana e β-quitina foi calculado de acordo com a Equação 12 (FOCHER et al., 1990).

$$I_{cr}(\%) = \left(\frac{I_{220} - I_{am}}{I_{220}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 12}$$

sendo:

$I_{cr}(\%)$ = índice de cristalinidade;

I_{220} = intensidade máxima (em unidades arbitrárias) da difração de rede (220) em $2\theta \sim 20^\circ$;

I_{am} = intensidade (em unidades arbitrárias) de regiões não ordenadas em $2\theta \sim 16^\circ$.

4.8.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. As medidas foram realizadas em suporte de amostra de platina no equipamento TGA-50 da SHIMADZU a partir de 8,0 mg de polímero, previamente seco a 30 °C por 24 horas, em atmosfera de N₂ à vazão de 50 mL min⁻¹. As amostras foram aquecidas à razão de 10 °C min⁻¹, de 25 a 110 °C, seguido de uma isoterma de 10 minutos nesta temperatura para eliminação da água, sendo novamente aquecida de 110 a 800 °C (SANTOS et al., 2003).

4.9 Produção das Nanosuspensões

Foi utilizado o método de gelificação iônica para produção das nanosuspensões (CALVO et al., 1997), com algumas modificações (MALHOTRA et al., 2009; KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015). Este método é de processamento controlável, atóxico, livre de solventes orgânicos e permite a incorporação de bioativos hidrofílicos ou hidrofóbicos, auxiliando no controle da taxa de liberação e eficiência terapêutica (FAN et al., 2012).

As variáveis externas ao sistema foram controladas de modo a minimizar a influência destas nas características estruturais e de superfície durante a formação das nanopartículas de polímero/ TPP (MALHOTRA et al., 2009; FAN et al., 2012). Assim, em todos os casos 10,0 mL de uma solução estoque de tripolifosfato de sódio (TPP) (0,35 mg mL⁻¹, pH = 8,3) foram adicionados a 25,0 mL de solução de polímero preparada em tampão de ácido acético 0,3 mol L⁻¹/ acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH = 4,5) por 10 minutos. Para tanto, foi utilizado o dosador automático modelo TITRONIC AVS-20 universal da Schott-Geräte. Durante e após a adição da solução de TPP, as suspensões de polímero/ TPP permaneceram sob agitação magnética constante em 400 rpm por 1 hora a 25°C, controlada por banho termostático.

As soluções das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana foram preparadas a partir da dissolução em 8 mL de ácido acético 0,6 mol mL⁻¹ e mantidas sob agitação magnética por 24 horas, seguida da adição de 8 mL de acetato de sódio 0,4 mol mL⁻¹, mantidas sob agitação por mais 24 horas. Em seguida, foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL e completadas com a solução-tampão. Todas as soluções foram preparadas de modo a obter uma concentração “c” nas razões 4:1, 6:1, 8:1 e 10:1 entre polímero/ TPP (m/m) no volume da solução final (35 mL).

Os efeitos da razão molar $-NH_3^+/TPP$ (Equação 13) e do parâmetro de recobrimento, ($c[\eta]$), foram avaliados através dos ensaios de potencial zeta (ζ) e espalhamento dinâmico de luz (DLS), a fim de correlacionar as propriedades de superfície e hidrodinâmicas das partículas com as características estruturais e comportamento em solução das cadeias poliméricas. Ambas as análises foram conduzidas no Grupo de Eletroquímica (IQSC/ USP) empregando o equipamento MALVERN Zetasizer[®] modelo NanoZS.

$$-NH_3^+/TPP = \left[\frac{m \cdot (F_{GlcN})}{M_{GlcN} \cdot n_{TPP}} \right] \quad \text{Equação 13}$$

sendo:

$-NH_3^+/TPP$ = razão molar entre grupos amino protonados e moléculas de TPP (grau de entrecruzamento);

F_{GlcN} = fração média de unidades GlcN nas cadeias de quitosana e de derivados;

m = massa da amostra de polímero;

M_{GlcN} = massa molar das unidades GlcN (161,0 g mol⁻¹);

n_{TPP} = número de mols de TPP na solução.

4.9.1 Potencial Zeta (ζ)

A determinação do potencial zeta (ζ) é realizada pela combinação das técnicas de eletroforese e velocimetria de laser Doppler, em que a variação na frequência da luz espalhada devido à variação da velocidade em que as partículas atravessam o feixe de laser de He-Ne a 633 nm é proporcional à mobilidade eletroforética da partícula. A cela de medida do equipamento consiste de sistema eletroforético, em que os eletrodos aplicam campos elétricos sobre as partículas. O potencial eletrostático existente no plano de cisalhamento entre a superfície da partícula e o meio dispersante (camada difusa) é chamado de potencial zeta

(HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). A reprodutibilidade da análise foi previamente verificada com o auxílio de soluções-padrão de KCl ($\zeta = 61,8 \pm 7,68$ mV). Todas as medidas foram realizadas em triplicata a 25°C.

4.9.2 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

A distribuição de diâmetro de partículas é obtida conforme a velocidade de difusão que estas adquirem em movimento Browniano (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). A intensidade da luz espalhada foi detectada a 173° para minimizar o efeito de espalhamento múltiplo, sendo o diâmetro médio de partícula avaliado pela relação de Stokes-Einstein, como mostra a Equação 14.

$$d = \frac{k_B T}{3\pi\eta_0 D} \quad \text{Equação 14}$$

sendo:

D = constante difusional;

k_B = constante de Boltzman;

T = temperatura absoluta;

η_0 = viscosidade do solvente;

A reprodutibilidade das análises foi verificada com o auxílio de soluções-padrão de poliestireno monodisperso. Os índices de refração (n) das nanosuspensões foram previamente determinados com o auxílio de um refratômetro. Todas as medidas foram realizadas em cubeta de poliestireno (caminho óptico de 12 mm), a partir de 1,0 mL de amostra em triplicata a 25°C.

4.10 Produção dos Hidrogéis

Os hidrogéis foram produzidos a partir dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. O método utilizado explora a capacidade de gelificação do copolímero proporcionada pelo entrecruzamento físico das cadeias (BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005). A determinação de propriedades viscoelásticas e transições sol-gel, importantes para o desenvolvimento de

hidrogéis injetáveis, podem ser determinadas através de ensaios reológicos (BHATTARAI; RAMAY; et al., 2005; DIEZ-SALES et al., 2007; TSAO et al., 2014).

Assim, proporções de 20 % (m/m) das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3 e PgQ foram preparadas em 1 mL de água deionizada e mantidas sob agitação por 48 horas a 25 °C. As soluções/ géis resultantes permaneceram em repouso por mais 12 horas a 4 °C e, em seguida, foram centrifugadas a 4000 rpm para remoção de bolhas de ar. Todas as amostras foram preparadas em triplicata

Os ensaios reológicos em fluxo e oscilatórios foram conduzidos no Grupo de Bioquímica e Biomateriais (IQSC/ USP) empregando reômetro modelo *TA Instruments AR 1000N* de deformação controlada, acoplado às geometrias cone-placa de 20 mm e 2°, com *gap* de 69 µm e placa paralela hachurada de 20 mm, com *gap* de 500 µm. Em ambos os casos, foi utilizado o reservatório de solvente (*solvent trap*) para saturação da atmosfera entre a amostra e o dispositivo *Peltier*, de forma a evitar o ressecamento dos hidrogéis durante as análises.

4.10.1 Ensaios Reológicos em Fluxo

Os ensaios em fluxo foram realizados a partir da variação da taxa de cisalhamento (*shear strain rate* ou simplesmente *shear rate*, $\dot{\gamma}$) no intervalo de 0,1 a 1000 s⁻¹ a 25 °C. Os ensaios de fluxo em função da temperatura foram realizadas no intervalo de 10 a 50 °C, à taxa de aquecimento de 4 °C min⁻¹ e $\dot{\gamma} = 1,0$ s⁻¹.

A aplicação de uma tensão sobre o material (em unidades de força), visualizada pelo modelo de camadas concêntricas (Figura 12), gera uma deformação (adimensional e representada por γ , %*strain*) sobre a área da secção transversal. Esta deformação permite que cada camada responda a uma determinada velocidade de escoamento. O ângulo formado com a normal (adotada como eixo das ordenadas) refere-se à deformação do material.

Figura 12 – Reometria aplicada ao modelo hipotético de escoamento de camadas concêntricas de um fluido.

Fonte: Adaptado de BARNES, 2000, 204 p.

A razão da força (F) aplicada sobre a área hipotética (A) é igual à tensão de cisalhamento (*shear stress*, representada por τ em unidades de pressão) ou simplesmente tensão. Em um sistema real, o incremento de τ resulta na alteração do ângulo γ em relação às camadas concêntricas. É a variação da deformação com o tempo, portanto, que resulta no gradiente de deformação ($d\gamma/dt$) ou taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$), a qual é proporcional à variação da velocidade de cada camada concêntrica pela variação com o tempo (taxa de deformação, representada por du/dt) e quantidade de camadas (dn). Assim, a τ é proporcional à taxa de deformação, sendo a constante de proporcionalidade (μ), chamada de coeficiente de viscosidade, viscosidade absoluta ou dinâmica.

A obtenção da viscosidade dinâmica em fluidos viscoelásticos é possível apenas em curtos intervalos de cisalhamento. A deformação aplicada nestes fluidos é irreversível, já que a energia é dissipada pelo próprio fluido na forma de calor, não havendo restauração pelo cessar da aplicação de tensão. Após determinado valor de taxa de cisalhamento crítico, a viscosidade aparente do sistema diminui. Esse fenômeno é decorrente do alinhamento das cadeias poliméricas no sentido do fluxo aplicado. Nesse ponto, é formado um primeiro platô ou região de comportamento newtoniano em que viscosidade dinâmica é independente da taxa de cisalhamento (*zero-shear*, μ_0). Para os ensaios oscilatórios subsequentes, é necessário um valor de viscosidade dinâmica contido neste intervalo a fim de eliminar a história cisalhante do material durante a amostragem. Este valor, em princípio, garante que amostras independentes iniciem o ensaio oscilatório a partir de deformações equivalentes (BARNES, 2000; MENARD, 2008). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

4.10.2 Ensaaios Reológicos Oscilatórios

Testes dinâmicos ou oscilatórios consistem na aplicação de uma tensão (τ) ou deformação (γ) mecânica de origem senoidal e de baixa amplitude sob o material viscoso, obtendo como resposta a deformação ou a tensão, respectivamente. Para um material viscoelástico, ao aplicar uma deformação oscilante (solicitação), a tensão oscilante (resposta) gera uma defasagem em um ângulo de fase (δ) entre as curvas senoidais. Por definição, a resistência à deformação total em materiais viscoelásticos é representada pelo módulo complexo, G^* , a qual é compreendida por um componente em fase (G') e fora de fase (G'') como indicado pela Equação 15.

$$G^* = G' + iG'' \quad \text{Equação 15}$$

sendo:

G^* = módulo complexo;

G' = módulo de armazenamento (*storage modulus*), ou energia armazenada por ciclo devido à contribuição elástica do material;

G'' = módulo de perda (*loss modulus*), ou energia dissipada por ciclo devido à contribuição viscosa do material.

A razão entre os módulos G'' e G' , representada pelo coeficiente $\tan(\delta)$ (Equação 16), possibilita a determinação da rigidez relativa dos hidrogéis.

$$\tan(\delta) = \frac{G''}{G'} \quad \text{Equação 16}$$

sendo:

$\tan(\delta)$ = tangente do ângulo de fase (δ);

Para efetuar os ensaios oscilatórios, é necessário conduzir as análises a partir de valores de viscosidade dinâmica no domínio newtoniano. Adicionalmente, a determinação prévia da região viscoelástica linear ou pseudo-linear (LVR) do material, através da variação da tensão oscilatória (*Stress Sweep Test*) ou deformação oscilatória (*Strain Sweep Test*), permite que a avaliação reológica do sistema seja conduzida em região independente da tensão ou deformação imposta. Esta resposta do sistema é alcançada pela aplicação de pequenas

amplitudes de cisalhamento (BARNES, 2000; MENARD, 2008). Dessa forma, esta etapa foi realizada sob a frequência de 1,0 Hz, com variação de τ no intervalo de 0,05 a 1000 Pa a 25 °C.

Em sequência à determinação destes parâmetros, os módulos G' e G'' foram obtidos em função da temperatura e frequência angular na região viscoelástica linear. A varredura de frequência (*Frequency Sweep Test*) foi realizada no intervalo de 0,1 a 100 rad s⁻¹ com tensão oscilatória de 10,0 Pa, enquanto que os ensaios de varredura de temperatura (*Temperature Sweep Test*), foram conduzidos de 10 a 50 °C, sob a frequência de 1,0 Hz, $\gamma = 10,0\%$ e razão de aquecimento de 2,0 °C min⁻¹. Antes de cada ensaio, foi estabelecido tempo de equilíbrio térmico de 5 minutos entre o cone/ placa, amostra e o dispositivo *Peltier* (TSAO et al., 2014). Todas as análises foram realizadas em triplicata

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo é dividido em três partes. A primeira parte compreende a obtenção da β -quitina extraída de gládios de lulas e a produção de quitosanas através da reação de desacetilação via processo DAIUS, em multi-etapas, para obtenção das amostras QD1x, QD2x e QD3x. Ainda nesta parte, são discutidas a purificação da quitosana comercial (amostra Q) e a síntese do mPEG-COOH obtido a partir da reação de ativação do precursor mPEG com anidrido succínico. As quatro amostras de quitosana foram derivatizadas a partir da reação entre o complexo quitosana-HOBt e mPEG-COOH, via conjugação com EDC·HCl resultando nos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana: PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.

A segunda parte contempla a produção de nanosuspensões das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana (PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ) a partir do método de gelificação iônica com tripolifosfato de sódio (TPP). As nanosuspensões foram caracterizadas segundo as propriedades de superfície e hidrodinâmicas das partículas, através das análises de potencial zeta (ζ) e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

A terceira parte contempla a produção de hidrogéis das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ em meio aquoso neutro e sem agente de entrecruzamento. Os hidrogéis foram caracterizados segundo suas propriedades viscoelásticas através de ensaios reológicos em fluxo e oscilatórios.

5.1 Extração da β -Quitina

A proporção em massa de β -quitina:proteínas nos gládios foi de aproximadamente 37%:63%, sendo coerente com o obtido em estudos anteriores (LAVALL et al., 2007; DELEZUK et al., 2011). A Tabela 3 apresenta a quantidade relativa de cada fração de β -quitina após o peneiramento, sendo aproximadamente 2 % associado a perdas durante a manipulação da amostra neste processo.

Tabela 3 – Dimensão de partículas de β -quitina (D) obtidas após o peneiramento com a respectiva proporção mássica e rendimento relativo.

Abertura (mm ²)	Massa (g)	Rendimento (%)
D > 0,250	9,99	12,94
0,125 < D < 0,250	49,35	63,91
D < 0,125	16,44	21,29
Total	75,78	98,14

Devido as partículas com dimensões menores que a abertura 0,125 mm² estarem sujeitas a maior aquecimento por cisalhamento, as cadeias poliméricas apresentam maior degradação quando comparadas as partículas com dimensões mais elevadas, refletindo diretamente em menores valores de massa molar média viscosimétrica, segundo estudos já conduzidos pelo Grupo. Adicionalmente, a moagem influencia no grau médio de desacetilação da β -quitina, sendo obtidos valores intermediários no intervalo de tamanho entre 0,250 e 0,125 mm² (DELEZUK, 2013). Com isso, e acrescido à maior predominância de partículas com dimensão entre 0,250 e 0,125 mm² (Tabela 3), foi selecionado este intervalo de tamanho de partículas para a produção de quitosana QD1x através da reação de desacetilação via processo DAIUS.

5.2 Obtenção de Quitosanas via Processo DAIUS

Em reações de hidrólise dos grupos acetamido da quitina, estima-se que o grau médio de desacetilação aumente nos primeiros minutos, alcançando um valor limite e constante conforme o aumento do tempo de reação. Estudos indicam que o tempo limite encontra-se abaixo de 1 hora de reação. Em processos termoquímicos convencionais o íon OH⁻ atua como nucleófilo forte por meio do mecanismo de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) (LAMARQUE et al., 2004).

Através do Processo DAIUS, entretanto, é possível obter massas molares elevadas (> 10⁵ g mol⁻¹) e graus médio de desacetilação elevados (> 10%) em intervalos de tempo de reação mais curtos (30-60 minutos) e temperaturas mais baixas (< 80 °C) (DELEZUK et al., 2011). No entanto, em vista da perda de eficiência de reação para obtenção de valores elevados de grau médio de desacetilação através de uma única sonicação, foram efetuadas duas repetições sob as mesmas condições e parâmetros de processo, de forma a obter quitosanas com características estruturais distintas (QD2x e QD3x). O rendimento mássico

após cada sonicação está inserido no intervalo de 74-80%, sendo coerente com o obtido em estudos anteriores (DELEZUK, 2013).

5.3 Purificação da Quitosana Comercial

A demanda por matrizes poliméricas com elevado grau de pureza é uma exigência para aplicação nas áreas médica e biofarmacêutica (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998). Nesse sentido, foi realizada a purificação da quitosana comercial (amostra QN) na forma neutra. O rendimento mássico obtido no processo foi de 92,7 % (amostra Q).

5.4 Quantificação de Metais Pesados

5.4.1 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP OES)

Devido à aplicação do derivado para fins biofarmacêuticos, a determinação do teor de metais por grama de amostra foi comparada com os limites permitidos por dosagem de fármacos e/ ou excipientes farmacêuticos via administração parenteral descrito na Farmacopeia nacional (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010) e norte-americana (THE UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION, 2013). O intuito da análise visa não somente complementar a justificativa da etapa de purificação desenvolvida para a amostra Q, quanto minimizar as restrições proibitivas ao uso das demais amostras de quitosana para fins biofarmacêuticos.

Em relação ao procedimento de digestão da amostra, o pré-tratamento com H₂O₂ 30 % (v/v) em temperatura ambiente auxilia na eliminação de material orgânico, reduzindo significativamente a perda por volatilização de compostos inorgânicos quando comparada ao tratamento convencional, que emprega aquecimento acima de 550 °C. A mistura digestora de HNO₃/HClO₄ proporciona a completa oxidação da matéria orgânica além de solubilizar compostos inorgânicos solúveis, como sulfetos, carbonatos entre outros, com exceção apenas à baixa incidência de metais ocluídos em silicatos. A proporção dos ácidos em relação a quantidade de amostra mostrou-se adequada para o presente caso, assim como especificado em estudos anteriores (CHITOLINA et al., 2001; SILVA et al., 2007).

As Figuras 13, 14 e 15 apresentam a concentração de metais acima do LOD para as amostras de gládios de lula (GL), β -quitina (β Q), e quitosanas (QD1x, QD2x, QD3x, QN e

Q), comparadas às concentrações limites indicadas pela ANVISA e Farmacopéia norte-americana. Uma listagem completa dos metais analisados com a concentração limite permitida, incluindo os respectivos valores de incerteza e os casos em que foram registradas concentrações abaixo do LOD, pode ser consultada nas Tabelas 1A e 2A (APÊNDICE).

Figura 13 – Concentração (ppm) de Pb, Hg, Ni e Cr nos gládios de lulas (GL), β -quitina (β Q), e nas amostras QD1x, QD2x e QD3x, comparada a concentração limite permitida pela ANVISA e Farmacopeia norte-americana.

Através da Figura 13 é possível notar significativa diminuição da concentração de mercúrio nos gládios de lula para a amostra de β -quitina, removido durante o processo de desproteinização. Já o processo de lavagem dos produtos obtidos pelo processo DAIUS, amostras QD1x, QD2x e QD3x, auxilia na diminuição da concentração do mercúrio para abaixo do limite indicado pela ANVISA e Farmacopeia norte-americana. Tendência semelhante pode ser observada para chumbo, enquanto que se observa um aumento na concentração de níquel e cromo após a segunda sonicação (amostra QD2x) e pouca alteração após a terceira sonicação (amostra QD3x). Em todos os casos apresentados na Figura 13, as concentrações de metais pesados das amostras QD1x, QD2x e QD3x, estão abaixo ou muito próximo às concentrações limites indicadas.

Figura 14 – Concentração (ppm) de Cu, Al e Ti nos gládios de lula (GL), β -quitina (β Q), e nas amostras QD1x, QD2x e QD3x, comparada a concentração limite permitida pela ANVISA e Farmacopéia norte-americana.

A Figura 14 revela um significativo aumento da concentração de titânio e alumínio nas amostras QD1x, QD2x e QD3x em relação aos gládios de lula e β -quitina. Esse resultado está de acordo com a especificação indicada para a constituição da liga metálica do sonotrodo empregado no processo DAIUS, sendo possível inferir que houve liberação de partículas metálicas. De acordo com o fabricante, a liga é composta por 91,7 % de titânio, 3,89 % de alumínio e 4,42 % de vanádio, sendo que a lavagem dos produtos após cada processo de sonicação consecutivo não se mostra eficaz para uma extensiva remoção destes contaminantes. Entretanto, não há indicação para a concentração limite de ambos os metais tanto na ANVISA, quanto na Farmacopeia norte-americana, já que em especial o composto TiO_2 é classificado como biologicamente inerte para humanos e animais, além de ser aprovado pela FDA como ingrediente inativo em pastas dentárias, capsulas orais, suspensões e em medicamentos não-parenterais (SKOCAJ et al., 2011). Ainda na Figura 14, é observada significativa diminuição na concentração de cobre presente nos gládios de lula em relação à β -quitina. O consecutivo aumento da concentração de cobre nas amostras QD1x, QD2x e QD3x pode ser atribuída à contaminação durante o procedimento, porém ainda permanece abaixo da concentração limite indicada pela ANVISA.

Figura 15 – Concentração em ppm de Pb, Cr, Mn, Cu e Ni nas amostras QN e Q, comprada a concentração limite permitida pela ANVISA e Farmacopeia norte-americana.

De acordo com o apresentado na Figura 15, houve significativa remoção de cobre e manganês presente na amostra QN em relação à amostra Q devido ao processo de purificação, ambos para abaixo do limite permitido segundo indicado pela ANVISA e pela Farmacopeia norte-americana. Não houve significativa diminuição de cromo e chumbo, embora a concentração de ambos permaneça próxima aos limites estabelecidos. É possível que a concentração relativamente elevada de níquel esteja relacionada às condições de obtenção da quitosana as quais não são informadas pelo fabricante.

5.5 Síntese de mPEG-COOH

A etapa de ativação das cadeias de mPEG refere-se à acilação do grupo $-OH$ (ω -hidroxi) do polímero, a qual envolve a reação entre este grupo terminal com um dos carbonos da carbonila do anidrido succínico, gerando um terminal $-COOH$ (ω -carboxi). Esta etapa é fundamental para que o polímero alcance a reatividade desejada frente aos grupos funcionais reativos das cadeias de quitosanas.

O mecanismo de reação de acilação catalisada por DMAP mais aceito atualmente envolve duas etapas: a primeira leva à formação do intermediário acetilpiridina/ acetato através do ataque nucleofílico do DMAP a um dos grupos carbonila e a abertura do anel do

anidrido succínico; a etapa determinante envolve o ataque nucleofílico do grupo –OH do polímero ao catalisador acetilado e a consequente regeneração do DMAP (XU et al., 2005). O rendimento mássico obtido ($\%R_{\text{mássico}}$) foi de 95,4%. A Figura 16 descreve o mecanismo destas duas etapas.

Figura 16 – Reação de ativação do mPEG segundo o mecanismo de acilação catalisada por DMAP mais aceite atualmente.

5.6 Síntese de *N,O*-mPEG-g-Quitosana

O mecanismo da síntese dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana compreende três etapas principais de reação, como ilustrado no esquema da Figura 17 (SEHGAL; VIJAY, 1994; FANGKANGWANWONG, J et al., 2006; FANGKANGWANWONG, JUTHATHIP et al., 2006).

Figura 17 – Mecanismo da síntese do derivado N,O-mPEG-g-Quitossana.

1ª Etapa: Formação do complexo quitossana-HOBt

2ª Etapa: Formação dos compostos *O*-acilisourea e *N*-acilureia

A primeira etapa do mecanismo (verde) corresponde à reação entre os grupos amino das unidades GlcN de quitossana e o reagente de acoplamento 1-hidroxibenzotriazol monoidratado HOBt·H₂O, levando a redução do pH e a uma tonalidade amarelada da suspensão, devido à

formação do complexo hidrossolúvel quitosana-HOBt. Este complexo permite a funcionalização da quitosana com outros compostos, especialmente com grupos amino, hidroxí ou carboxí de ésteres ativos (CARPINO, 1993; FANGKANGWANWONG, JUTHATHIP et al., 2006). Foi observado que as suspensões somente atingiram um caráter homogêneo na razão molar de 1:2 de quitosana:HOBt e pH ~ 4,3.

A segunda etapa do mecanismo (azul) corresponde à reação entre as cadeias de mPEG-COOH com o intermediários do agente de acoplamento hidrossolúvel *N*-(3-diaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida (EDC·HCl). Assim como destacado, este intermediário de EDC apresenta carbocátion suscetível ao ataque nucleofílico do grupo hidroxila da carboxila terminal do polímero mPEG-COOH. Entretanto, para que a reação de acoplamento entre as espécies mPEG-COOH e quitosana-HOBt seja bem sucedida, a espécie *O*-acilisourea deve se manter estável no meio. Estudos indicam que a presença de HOBt bem como o meio ácido (pH 4-5) favorecem a reação de acoplamento e, portanto, a formação da *O*-acilisourea, em detrimento do seu rearranjo intramolecular ou hidrólise que levam à formação do aduto termodinamicamente mais estável *N*-acilureia (vermelho) (SEHGAL; VIJAY, 1994; FANGKANGWANWONG, J et al., 2006; FANGKANGWANWONG, JUTHATHIP et al., 2006). A formação de *N*-acilureia embora minimizada é inevitável, sendo portanto inserida razão estequiométrica de EDC:mPEG-COOH entre 2:1 e 3:1 (YOKSAN et al., 2003; FANGKANGWANWONG, J et al., 2006; CASETTARI et al., 2010; EL-SHERBINY; SMYTH, 2012).

A terceira etapa do mecanismo (preto) corresponde à etapa final e, com isso, a formação do derivado não-regiosseletivo *N,O*-mPEG-*g*-quitosana, já que não há limitação imposta pelo sistema para ocorrer a copolimerização tanto pela reação de amidação em C2, quanto de esterificação em C3 e/ou C6 das unidades repetitivas de quitosana. Entretanto, em função do maior impedimento estérico do grupo –OH em C3, é provável que a esterificação não alcance grande extensão neste grupo. Por outro lado, devido à maior nucleofilicidade dos grupos amino, é previsto maior extensão da reação de amidação em relação à esterificação em C6, a qual é favorecida pelo aumento da razão estequiométrica de mPEG-COOH:quitosana (mol/mol) (FANGKANGWANWONG, J et al., 2006).

5.7 Caracterizações

5.7.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A partir da análise por espectroscopia na região do infravermelho é possível caracterizar os principais modos vibracionais. A Figura 18 apresenta o espectro de FTIR da amostra Q. A banda alargada e intensa no intervalo $3600\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ está relacionada aos estiramentos axiais de --O--H em ligações hidrogênio e --N--H , a banda em 2871 cm^{-1} é atribuído ao estiramento axial da ligação C--H , enquanto que em 1423 e 1327 cm^{-1} , ocorrem as bandas de estiramentos C--H e C--N , respectivamente.

Próximo à região de impressão digital (*fingerprint*) do espectro, a banda centrada em 1650 cm^{-1} (amida I) corresponde à deformação axial de carbonila do grupo acetamido, em 1593 cm^{-1} (amida II) e em 1379 cm^{-1} (amida III) ocorrem as bandas devidas aos estiramentos simétricos de --NH e N--C , respectivamente. As demais bandas correspondem aos modos vibracionais das ligações glicosídicas em 1155 cm^{-1} (C--O--C), do anel glicopiranosídico em 1085 cm^{-1} (C--O--C) e da hidroxila primária ($\text{--CH}_2\text{OH}$) em 1031 cm^{-1} (BHATTARAI; RAMAY; et al., 2005; YANG et al., 2008; VASCONCELOS et al., 2011).

Figura 18 – Espectro na região do infravermelho da amostra Q.

A Figura 19 apresenta os espectros das amostras QD1x, QD2x, QD3x e β -quitina na região de 1700 a 1200 cm^{-1} , na qual foram observadas as alterações mais significativas. É possível notar que a intensidade da banda da amida I (1656 cm^{-1}), diminui da β -quitina à amostra QD3x. A mesma tendência é observada na intensidade relativa da banda da amida II, bem como um deslocamento de 1558 à 1597 cm^{-1} . As bandas correspondentes à amida III (1379 cm^{-1}) e ao estiramento C-N (1317 cm^{-1}) apresentam comportamento semelhante ao observado anteriormente, sendo possível inferir que houve diminuição de grupos GlcNAc devido à reação de desacetilação empregando o processo DAIUS. A Tabela 4 apresenta o número de onda dos principais modos vibracionais das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina.

Figura 19 – Espectros na região do infravermelho das amostras QD1x, QD2x, QD3x e β -quitina na região de 1700 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} .

Tabela 4 – Número de onda dos principais modos vibracionais contido nos espectros na região do infravermelho das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina.

Atribuição	Número de Onda (cm^{-1})				
	β -quitina	QD1x	QD2x	QD3x	Q
$\nu\text{O-H}$ e $\nu\text{N-H}$	3600-3000	3600-3000	3600-3000	3600-3000	3600-3000
$\nu\text{C-H}$	2883	2883	2883	2883	2871
$\delta\text{C=O}$	1656	1656	1656	1656	1650
(amida I)					
$\nu\text{-N-H}$	1558	1558	1597	1597	1593
(amida II)					
$\nu\text{C-H}$	1425	1425	1425	1425	1423
$\nu\text{N-C}$	1379	1379	1379	1379	1379
(amida III)					
$\nu\text{C-N}$	1317	1317	1317	1317	1327
C-O-C	1159 e 1082	1159 e 1082	1159 e 1082	1159 e 1082	1155 e 1085
$-\text{CH}_2\text{OH}$	1031	1031	1031	1031	1031

Para avaliar as principais modificações estruturais devido à reação de ativação, os espectros de FTIR de mPEG e mPEG-COOH são apresentados na Figura 20. Através da análise comparativa dos espectros é observada que a presença da banda em 1735 cm^{-1} representa o estiramento C=O da ligação éster, resultante da modificação estrutural na cadeia. As bandas características em 2887 cm^{-1} (estiramento C-H), 1467 cm^{-1} , 1342 cm^{-1} , 1278 cm^{-1} , 960 cm^{-1} e 840 cm^{-1} , resultantes de diferentes modos vibracionais da unidade $\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-}$, não apresentaram modificações significativas, assim como a banda em 1122 cm^{-1} (estiramento C-O-C) (YOKSAN et al., 2003; LEBouc et al., 2005; YANG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010; NAJAFABADI et al., 2014).

Figura 20 – Espectros na região do infravermelho das amostras mPEG e mPEG-COOH.

As principais modificações estruturais devidos à inserção das cadeias de mPEG-COOH nas cadeias da amostra Q são evidenciadas no espectro da amostra PgQ na Figura 21. A banda de estiramento C-H é observada em 2887 cm^{-1} , ligeiramente deslocada para maior número de onda em relação ao modo vibracional equivalente no espectro da quitosana (2871 cm^{-1}). A

presença das bandas em 2887, 1735, 1278, 960 e 840 cm^{-1} com intensidades relativamente menores no espectro do derivado, permite inferir que as características associadas a estrutura das cadeias de mPEG-COOH foram preservadas.

Em relação às bandas em 1650 cm^{-1} (amida I, deformação axial -C=O) e 1593 cm^{-1} (amida II, estiramento -NH-) houve uma nítida alteração da intensidade relativa, o que evidencia modificação estrutural no grupo -NH_2 devido a amidação com mPEG-COOH. Estes resultados comprovam que a reação de derivatização foi bem sucedida (BHATTARAI; RAMAY; et al., 2005; YANG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010; NAJAFABADI et al., 2014). Não é possível confirmar a *O*-substituição apenas pela análise dos espectros apresentados na Figura 21.

Figura 21 – Espectros na região do infravermelho das amostras Q, PgQ e mPEG-COOH.

A Figura 22 apresenta os espectros das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x na região de 2000 a 1000 cm^{-1} . A banda referente ao estiramento -C=O da ligação éster em 1734 cm^{-1} e as bandas de amidas I e II centradas em 1662 e 1571 cm^{-1} , respectivamente indicam

que a derivatização das cadeias de quitosana ocorreu. A pequena alteração existente entre as intensidades relativas das bandas das amidas I e II, não permite estimar possíveis diferenças entre os valores de grau de substituição entre as amostras.

As bandas presentes no intervalo $1500\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ apresentaram pequenas variações nas intensidades relativas, não sendo possível atribuir estas diferenças às características de cada amostra devido à sobreposição de bandas. A Tabela 5 apresenta o número de onda dos principais modos vibracionais das amostras dos derivados e mPEG-COOH.

Figura 22 – Espectros na região do infravermelho das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x na região de 2000 cm^{-1} a 1000 cm^{-1} .

Tabela 5 – Número de onda dos principais modos vibracionais contido nos espectros na região do infravermelho das amostras mPEG-COOH, PgQ, PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x.

Atribuição	Número de Onda (cm ⁻¹)				
	mPEG-COOH	PgQ	PgQD1x	PgQD2x	PgQD3x
ν O–H e ν N–H	3600-3000	3600-3000	3600-3000	3600-3000	3600-3000
ν O–H	3487	3487	3487	3487	3487
ν C–H	2887	2887	2887	2887	2887
δ C=O	1735	1735	1734	1734	1734
δ C=O	-	1650	1662	1662	1662
(amida I)					
ν -N–H	-	1593	1571	1571	1571
(amida II)					
	1467	1467	1467	1467	1467
	1342	1342	1342	1342	1342
–CH ₂ –O–CH ₂ –	1278	1278	1278	1278	1278
	960	960	962	962	962
	840	840	842	842	842
C–O–C	1155	1155	1149	1149	1149
	1122	1122	1107	1107	1107

5.7.2 Caracterização Estrutural por RMN ¹H, RMN ¹³C e Condutimetria

A análise quantitativa por RMN ¹H foi efetuada para determinação do grau médio de desacetilação das amostras de quitosana e do grau médio de substituição das amostras dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. Em todos os casos, a posição relativa do sinal do solvente (DOH) nos espectros de RMN ¹H, embora varie em função da temperatura de análise, é reprodutível e independente do pH do meio. Por essa razão, o sinal do DOH foi utilizado como referência (GOTTLIEB et al., 1997). A temperatura de análise, geralmente no intervalo 70-90 °C, contribui para a melhor resolução do espectro devido à diminuição da viscosidade além de deslocar o sinal do solvente para uma região no espectro onde não há sobreposição com os sinais do hidrogênio ligado ao carbono C1 das unidades GlcN (H1) em 4,84 ppm (HIRAI et al., 1991; LAVERTU et al., 2003).

O sinal em 4,84 ppm no espectro de RMN ¹H da amostra Q (Figura 23) refere-se especificamente ao hidrogênio H1 das unidades GlcN, enquanto o sinal em 2,00 ppm corresponde ao sinal do hidrogênios metílicos do grupo –C(O)CH₃ de unidades GlcNAc. Os demais sinais indicados correspondem aos hidrogênios presentes tanto nas unidades GlcN quanto GlcNAc (HIRAI et al., 1991; DESBRIÈRES et al., 1996; LAVERTU et al., 2003; KASAAI, 2010). O grau médio de desacetilação obtido através do cálculo da Equação 4 foi

$94,7 \pm 0,7$ %. Devido ao elevado grau de desacetilação, o sinal de H1 das unidades GlcNAc em $\approx 4,6$ ppm não é observado.

Figura 23 – Espectro de RMN ^1H da quitosana (amostra Q) em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C .

A Figura 24 apresenta os espectros de RMN ^1H das amostras QD1x, QD2x e QD3x. Em todos os casos, foi efetuada a supressão do sinal do solvente (DOH) a fim de melhorar a resolução dos demais sinais. A diminuição dos sinais referentes aos hidrogênios metílicos do grupo $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ das unidades GlcNAc é devido à reação de desacetilação resultante do processo aplicação em multi-etapas. Dessa forma, e assim como esperado, a diminuição dos grupos $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ ao longo da cadeia implica em um correspondente aumento do sinal de H2 referente aos hidrogênios ligados aos carbonos das unidades de GlcN. Nos espectros apresentados na Figura 24 observa-se o sinal referente aos hidrogênios ligados ao carbono C1 das unidades GlcNAc (H1”), sendo este diretamente proporcional ao sinal de $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$. Os valores de grau médio de desacetilação calculados através da Equação 4 foram: $64,0 \pm 1,1$ %, $75,8 \pm 0,8$ % e $92,3 \pm 0,9$ % para as amostras QD1x, QD2x e QD3x, respectivamente. Como todas as amostras de quitosana apresentaram $\overline{GD} > 50$ %, é provável que a frequência de repetição das unidades GlcNAc siga uma tendência totalmente aleatória ao longo das cadeias (VARUM et al., 1991).

Figura 24 - Espectro de RMN ^1H das amostras QD1x, QD2x e QD3x em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C.

A Tabela 6 apresenta os valores de grau médio de desacetilação das amostras QD1x, QD2x, QD3x e Q, obtidos por RMN ^1H ($\overline{GD}$) e titulação condutimétrica ($\overline{GD}_c$) e, de acordo com as Equações 4 e 7. Assim como esperado, os valores obtidos por ambas as técnicas foram próximos.

Tabela 6 – Grau médio de desacetilação da β -quitina obtido por RMN ^1H e das amostras de quitosana, obtidos por RMN ^1H ($\overline{GD}$) e titulação condutimétrica ($\overline{GD}_c$).

Amostras	Grau médio de desacetilação (%)	
	RMN ^1H	Titulação Condutimétrica
β -quitina	19,3	-
QD1x	$64,0 \pm 1,1$	$61,3 \pm 0,6$
QD2x	$75,8 \pm 0,8$	$69,5 \pm 0,4$
QD3x	$92,3 \pm 0,9$	$88,4 \pm 0,7$
Q	$94,7 \pm 0,7$	$90,2 \pm 0,2$

A análise comparativa dos espectros de RMN ^1H das amostras mPEG e mPEG-COOH permite a confirmação da modificação estrutural devido à reação de ativação (Figura 25). As análises foram realizadas a 25 °C a fim de impedir a sobreposição entre o sinal do solvente e os das amostras. O sinal em 3,38 ppm refere-se ao deslocamento químico dos hidrogênios (H(a)) presentes no grupo $-\text{CH}_3$ (extremidade não-reativa), não sendo observado alteração no valor de δ devido à ativação (LEBOUC et al., 2005; JEONG et al., 2008). Como consequência da reação, entretanto, houve deslocamento de sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos da extremidade reativa. O deslocamento para campo magnético menos intenso observado para a unidade o $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{H}$ ($\text{H(f)} \rightarrow \text{H(f)'}\text{'}$) é resultado da alteração do ambiente químico devido à adição da estrutura $-\text{O}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-$ após a reação de ativação (PAVIA et al., 2007).

O multiplete centrado em 2,67 ppm (H(g) e H(h)) e o valor da integral calculada (3,80) em relação ao valor de referência (3,00) do grupo $-\text{CH}_3$ (H(a)), confirma a presença da unidade $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ originalmente pertencente ao anidrido succínico (JEONG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010). O singlete em 3,20 ppm pode referir-se ao DMF contaminante (GOTTLIEB et al., 1997).

Figura 25 – Espectros de RMN ^1H das amostras de mPEG e mPEG-COOH em D_2O a 25°C .

Os espectros de RMN ^{13}C (Figura 26) revelam que os carbonos das carbonilas das extremidades reativas de mPEG-COOH apresentaram dois sinais distintos, em 176,8 ppm (C(i)) e 174,9 ppm (C(j)) (LEBOUC et al., 2005; JEONG et al., 2008). Esse resultado comprova que ambos os carbonos provenientes da molécula simétrica de anidrido succínico, possuem agora ambientes químicos distintos devido à nova posição em que se encontram na cadeia e aos novos grupos funcionais gerados: éster e ácido, respectivamente (PAVIA et al., 2007). Os sinais de baixa intensidade em 32,0 (CH), 37,3 (CH_3) e 165,2 ppm (CH_3) confirmam a presença de DMF contaminante (GOTTLIEB et al., 1997).

Figura 26 – Espectros de RMN ^{13}C das amostras de mPEG e mPEG-COOH em D_2O a 25°C .

Assim como para os hidrogênios $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{H}$ houve um deslocamento para maiores valores de δ em função da modificação estrutural para $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{C}(\text{O})-$, é verificado o deslocamento do sinal de C(f) de 61,2 ppm para 64,6 ppm ($\text{C}(\text{f}) \rightarrow \text{C}(\text{f}')$), devido à mesma alteração de ambiente químico analisada anteriormente (Figura 25). Entretanto, ainda é possível observar um sinal de baixa intensidade em 61,2 ppm remanescente da estrutura inicial no espectro do mPEG-COOH, sugerindo que mesmo com excesso estequiométrico de anidrido succínico, ainda existem cadeias de mPEG que permaneceram sem reagir. A diferença estrutural de ambos é pequena se comparada à extensão do polímero para se considerar uma boa separação (LEBOUC et al., 2005). Através do cálculo das áreas relativas entre os sinais de C(f) e C(f') (Figura 27) obtém-se que 91,0% do conteúdo de mPEG foi devidamente ativado, resultando em um rendimento total de reação ($\%R_{\text{ativação}}$) de 86,8% (Equação 8).

Figura 27 – Cálculo da área relativa dos sinais dos carbonos C(f) e C(f)' do espectro de RMN ^{13}C da amostra mPEG-COOH. Valores relativos ajustados por deconvolução de funções de Lorentz através do software MagicPlot Pro[®].

A derivatização da quitosana (amostra Q) através da reação com mPEG-COOH é confirmada pelo espectro de RMN ^1H apresentado na Figura 28. É possível observar que houve sobreposição de sinais dos hidrogênios H3 a H6 do anel glicopiranosídico com os hidrogênios H(b), H(c) e H(d) ligados aos carbonos presentes no mero da estrutura do mPEG-COOH, na região de 3,4 a 4,0 ppm (JEONG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010). Essa sobreposição é devido, principalmente, à semelhança entre os ambientes químicos das estruturas $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$, $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$ e $-\text{CH}_2-\text{OH}$ presentes em ambos os polímeros (quitosana e mPEG-COOH) (PAVIA et al., 2007).

Os sinais dos hidrogênios H1 (unidades GlcN) e $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (unidades GlcNAc) apresentaram δ próximos aos observados no espectro da amostra Q (Figura 23), assim como os sinais dos hidrogênios H(a) e H(f)' aos equivalentes no espectro do mPEG-COOH (Figura 25) (JEONG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010). É possível observar que o sinal de H(f)' foi sobreposto pelo sinal do solvente. (FANGKANGWANWONG, JUTHATHIP et al., 2006).

Figura 28 – Espectro de RMN ^1H da amostra PgQ em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) obtido à 85°C .

O sinal referente ao hidrogênio H1 do anel glicopiranosídico foi desdobrado em mais dois sinais que correspondem aos hidrogênios na posição equivalente nas unidades *N*-substituídas (H1') e GlcNAc (H1''). A *N*-monosubstituição encontra-se em posição intermediária aos outros dois sinais (H1 e H1'') devido à maior semelhança entre os ambientes químicos das ligações amida envolvidos (DESBRIÈRES et al., 1996; PAVIA et al., 2007). O grau de *N*-substituição, $\overline{GS}_N$, obtido a partir do cálculo por deconvolução das áreas de H1, H1' e H1'' (Figura 29) através da Equação 5 foi de $28,2 \pm 0,5 \%$, enquanto que o grau de *O*-substituição, $\overline{GS}_O$ (considerando cadeias de mPEG-COOH não-reagidas), calculado através da Equação 6 proposta foi de $11,0 \pm 0,7 \%$. Portanto, foi obtida aproximadamente uma razão de 3:1 para $\overline{GS}_N$: $\overline{GS}_O$ e grau médio de substituição total, $\overline{GS}_T$, de $39,2 \pm 0,6 \%$.

Figura 29 – Cálculo da área relativa dos sinais dos hidrogênios H1, H1' e H1'' do espectro de RMN ^1H da amostra PgQ. Valores relativos ajustados por deconvolução de funções de Lorentz através do software MagicPlot Pro[®].

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios H(g) e H(h) estão localizados entre os sinais dos hidrogênios H2 (unidades GlcN) e $-\text{C}(\text{O})\text{CH}_3$ (unidades GlcNAc) (JEONG et al., 2008; CASETTARI et al., 2010). No entanto, nos trabalhos em que foram desenvolvidas sínteses regioseletivas, geralmente de *N*-substituição, é observado único sinal nesta região espectral, diferentemente do observado no espectro da Figura 28. A soma das áreas dos sinais em 2,81 ppm (indicado por *) e 2,62 ppm (H(g)-H(h)) em relação à área do sinal de H(a) resulta em uma razão de 4:3, contemplando a razão entre os hidrogênios de todas as estruturas $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ e $-\text{CH}_3$, pertencentes às espécies mPEG-CO-R (com R = $-\text{OH}$, $-\text{O}-$ ou $-\text{NH}-$) existentes. Já a área do sinal em 2,62 ppm em relação à soma dos sinais H(g)-H(h) resulta em razão de 3:1.

Assim, e de acordo com o obtido para a razão entre $\overline{GS}_N$: $\overline{GS}_O$, é possível inferir que o sinal em 2,62 ppm seja atribuído aos hidrogênios da estrutura $-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}(\text{O})-$ pertencente às cadeias de mPEG-COOH *N*-substituídas, enquanto que o sinal em 2,81 ppm seja atribuído à estrutura equivalente das cadeias *O*-substituídas e cadeias de mPEG-COOH não-reagidas. Adicionalmente e de acordo com o cálculo proposto pelas Equações 17 e 18, obtém-se os valores médios de $29,2 \pm 0,6\%$ e $10,5 \pm 0,6\%$, os quais são próximos aos valores

calculados anteriormente para o grau de *N*-substituição e *O*-substituição através das Equações 5 e 6.

$$\% \overline{GS}_N' = \left(\frac{\frac{1}{4} A_{H(g)-H(h)}(2,62 \text{ ppm})}{A_{H1} + A_{H1'} + A_{H1''}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 17}$$

$$\% \overline{GS}_O' = \left(\frac{\frac{1}{4} A_{H(g)-H(h)}(2,81 \text{ ppm})}{A_{H1} + A_{H1'} + A_{H1''}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 18}$$

sendo:

$\% \overline{GS}_N'$ = grau médio de *N*-substituição considerando o método proposto

$\% \overline{GS}_O'$ = grau médio de *O*-substituição mais quantidade de cadeias de mPEG-COOH não-reagidas considerando o método proposto;

A_{H1} = área do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos C1 das unidades GlcN;

$A_{H1'}$ = área do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos C1 das unidades *N*-substituídas (GlcNPEG);

$A_{H1''}$ = área do sinal dos hidrogênios ligados aos carbonos C1 das unidades GlcNAc.

A Figura 30 apresenta os espectros de RMN ^1H das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x. Novamente foi efetuada a supressão do sinal do solvente (DOH) a fim de melhorar a resolução dos demais sinais.

Figura 30 - Espectro de RMN ^1H das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x em $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ 1% (v/v) à 85°C .

Os sinais dos hidrogênios dos grupos $-C(O)CH_3$ (unidades GlcNAc) apresentam a mesma tendência observada nos espectros das amostras QD1x, QD2x e QD3x (Figura 24), assim como a relação inversamente proporcional existente entre os sinais dos hidrogênios H2 (unidades GlcN). Adicionalmente, a mesma tendência é observada na proporção relativa entre os sinais H1 e H1'', mesmo havendo sobreposição entre os sinais H1 e H1'. Essa sobreposição, diferentemente do que foi observado no espectro de PgQ na (Figura 28), não permite a obtenção do grau médio de *N*-substituição através do cálculo da Equação 5, sendo necessário determinar apenas através da Equação 17. Como não é possível observar o sinal em 2,81 ppm para os três casos apresentados na Figura 30, é possível que o grau médio de *O*-substituição (Equação 18) tenha pequena ou nenhuma contribuição para o grau médio de substituição total dessas amostras. A Tabela 7 relaciona os valores obtidos de grau médio de desacetilação (RMN 1H), grau médio de *N*-substituição e grau médio de substituição total das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. A pouca variação $\overline{GS}_N'$ e $\overline{GS}_T'$ das amostras PgQD1x, PgQD2x e PgQD3x demonstra que apesar da diferente quantidade de unidades GlcNAc nas cadeias das quitosana de partida, estes pouco influenciaram na acessibilidade e reatividade dos grupos $-NH_2$ disponíveis.

Tabela 7 – Grau médio de substituição ($\overline{GD}$) das amostras de quitosana e grau médio de *N*-substituição ($\overline{GS}_N'$) e total ($\overline{GS}_T'$) das amostras de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana.

Amostras	$\overline{GD}$ (%)	$\overline{GS}_N'$ (%)	$\overline{GS}_T'$ (%)
QD1x	64,0 $\pm$ 1,1	-	-
QD2x	75,8 $\pm$ 0,8	-	-
QD3x	92,3 $\pm$ 0,9	-	-
Q	94,7 $\pm$ 0,7	-	-
PgQD1x	25,5 $\pm$ 0,8	38,5 $\pm$ 0,5	41,6 $\pm$ 0,7
PgQD2x	38,5 $\pm$ 0,8	37,3 $\pm$ 0,7	40,4 $\pm$ 0,6
PgQD3x	52,3 $\pm$ 0,7	40,0 $\pm$ 0,4	42,7 $\pm$ 0,9
PgQ	65,5 $\pm$ 0,8	29,2 $\pm$ 0,9	39,2 $\pm$ 0,6

É necessário grau médio de substituição superior a 24 % para que o derivado mPEG-*g*-quitosana apresente completa solubilidade em solventes como DMF e dimetilsulfóxido (DMSO) (HU et al., 2005). Os derivados sintetizados confirmam esta constatação, pois todos foram solúveis em ambos os solventes.

5.7.3 Solubilidade em função do pH

A derivatização da quitosana com cadeias hidrofílicas de mPEG geralmente confere aumento da solubilidade em meio aquoso e em solventes orgânicos como etanol e acetona, em função do grau de substituição obtido (OUCHI et al., 1998; FANGKANGWANWONG, J et al., 2006). A Figura 31 apresenta os perfis de solubilidade das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana, registrados através da transmitância em $\lambda = 600$ nm, em função do pH.

O valor de transmitância da luz é consistente com a formação de agregados insolúveis, pois, conforme o aumento do tamanho e quantidade dos particulados na suspensão, menor a intensidade de radiação luminosa coletada devido ao aumento dos fenômenos de difração e espalhamento da luz (HIEMENZ; RAJAGOPALAN, 1997). Portanto, a redução da transmitância observada para a amostra de quitosana em valores de pH > 6,3 é um indicativo de insolubilidade do polímero.

Para a quitosana em meio ácido, os grupos $-\text{NH}_3^+$ favorecem a formação de uma conformação rígida que impede a agregação das cadeias do polímero. Em valores de pH > 6,3 os grupos $-\text{NH}_3^+$ são neutralizados e, conseqüentemente, as cadeias tornam-se mais flexíveis permitindo que interações inter e intramoleculares levem à agregação das cadeias e à diminuição da solubilidade do polímero conforme o aumento do pH da solução. A baixa afinidade pelo solvente polar prótico (água) também possibilita a formação de insolúveis, pois cadeias poliméricas sem carga tendem a se agregarem. (RINAUDO et al., 1999). Todas as amostras de quitosana formaram agregados insolúveis em pH > 7,00.

Figura 31 – Solubilidade das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana em função do pH.

A solubilidade aquosa dos derivados em todo intervalo de pH analisado está de acordo com o obtido em estudos anteriores (SUGIMOTO et al., 1998; JEONG et al., 2008), sendo consequência direta da extensão da cadeia lateral (mPEG, $M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$) e grau de substituição das cadeias de quitosana. O comportamento da amostra PgQD1x é resultado da ligeira turbidez apresentada em todo intervalo de análise. Mesmo com grau de substituição semelhante às demais amostras ($\overline{GS}_T = 41,6 \pm 0,6 \%$), este derivado apresentou o menor grau de desacetilação do conjunto ($\overline{GD} = 64,0 \pm 1,1 \%$), sendo possível inferir que não somente a estrutura do mPEG, mas a quantidade de grupos $-\text{NH}_2$ disponíveis no composto afetam a solubilidade da amostra. Conforme o aumento de grupos $-\text{NH}_2$ disponíveis, foi possível obter compostos completamente solúveis em todo intervalo de análise, como observado para as amostras PgQD2x, PgQD3x e PgQ.

Embora a relação entre rigidez/ flexibilidade e a formação de agregados em solução destacada anteriormente ainda ocorra entre as cadeias do derivado, as partículas em meio alcalino são relativamente estáveis devido ao efeito de volume excluído proporcionado pelas cadeias laterais de mPEG, as quais estão posicionadas de forma que haja o máximo recobrimento do “núcleo” formado essencialmente por cadeias de quitosana. A *N*-substituição

com cadeias de mPEG permite ainda que os grupos -NH- diretamente ligados não sejam protonados em meio ácido, aumentando a flexibilidade das cadeias (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004; DENG et al., 2007).

O derivado mPEG-g-quitosana leva à formação de partículas auto-estruturadas, cujo mecanismo de auto-agregação pode ser favorecido por fracas interações entre os grupos -NH-CO- e -OH através de ligações hidrogênio entre cadeias de quitosana presentes no “núcleo” da partícula e pela densidade de cadeias de mPEG presentes na estrutura. Grupos hidrofóbicos presentes no derivado, tais como $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$, grupos acetamido e a estrutura da glicosídica também podem influenciar no processo de auto-agregação (OUCHI et al., 1998; DENG et al., 2007; YANG et al., 2008). A derivatização da quitosana com cadeias de mPEG de maior extensão ($M_n = 5000 \text{ g mol}^{-1}$) também favorece a formação de partículas de menor tamanho, quando comparado à cadeias de menor extensão (YOKSAN et al., 2003; CHOOCHOTTIROS et al., 2009). A Figura 32 apresenta um esquema representativo da auto-agregação do derivado *N,O*-mPEG-g-quitosana.

Figura 32 – Esquema representativo da auto-agregação do derivado *N,O*-mPEG-g-quitosana, favorecida em meio básico e neutro por interações hidrofílicas e hidrofóbicas de grupos presentes nas cadeias de quitosana.

5.7.4 Viscosimetria Capilar

As curvas de viscosidade reduzida (η_{red}) versus concentração das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana, em tampão de ácido acético 0,3 mol L⁻¹/ acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹, são apresentadas nas Figura 33 e 34, respectivamente. O solvente escolhido para a análise mostrou-se adequado para a dissolução das amostras, visto que os valores de k_H (Tabela 8) foram menores que 0,8 em todos os casos (“bom solvente”) (KULICHE; CLASEN, 2004).

Figura 33 – Curvas de viscosidade reduzida (η_{red}) versus concentração das amostras QD1x, QD2x, QD3x e Q.

Figura 34 — Curvas de viscosidade reduzida (η_{red}) versus concentração das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.

De acordo com o apresentado nas Figuras 33 e 34, a viscosidade reduzida dos derivados é significativamente inferior quando comparada às quitosanas iniciais. Como a viscosidade intrínseca ($[\eta]$) é uma medida direta do volume hidrodinâmico efetivo, sua expressiva diminuição pode indicar ocorrência de despolimerização simultânea à derivatização da quitosana. A Tabela 8 apresenta os valores de grau médio de desacetilação, grau médio de substituição total calculados anteriormente, viscosidade intrínseca, k_H e massa molar média viscosimétrica ($\bar{M}_v$). (RINAUDO et al., 1993). É possível notar que o processo DAIUS proporciona não somente a hidrólise dos grupos acetamido durante as sucessivas sonicações como provoca a despolimerização via clivagem das ligações glicosídicas, refletindo consequentemente nos valores de viscosidade intrínseca e massa molar viscosimétrica. (CARDOSO et al., 2001). Não é possível calcular massa molar viscosimétrica dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana através da relação de Mark-Houwink (Equação 11).

Tabela 8 - Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), grau médio de substituição total ($\overline{GS}_T$), viscosidade intrínseca ($[\eta]$) e massa molar viscosimétrica ($\overline{M}_v$) das amostras β -quitina, quitosanas (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana.

Amostras	$\overline{GD}$ (%)	$\overline{GS}_T$ (%)	$[\eta]$ (mL g ⁻¹)	$\overline{M}_v \cdot 10^3$ (g mol ⁻¹)	k_H
β -quitina	19,7	-	5197,1	1340,0	-
QD1x	64,0 $\pm$ 1,1	-	1576,5 $\pm$ 8,5	495,6 $\pm$ 6,3	0,50
QD2x	75,8 $\pm$ 0,8	-	1201,6 $\pm$ 6,7	346,8 $\pm$ 5,8	0,41
QD3x	92,3 $\pm$ 0,9	-	1634,3 $\pm$ 10,2	501,9 $\pm$ 5,9	0,44
Q	94,7 $\pm$ 0,7	-	449,0 $\pm$ 5,1	82,9 $\pm$ 2,0	0,21
PgQD1x	25,5 $\pm$ 0,8	41,6 $\pm$ 0,7	74,4 $\pm$ 6,7	-	0,77
PgQD2x	38,5 $\pm$ 0,8	40,4 $\pm$ 0,6	53,9 $\pm$ 2,7	-	0,33
PgQD3x	52,3 $\pm$ 0,7	42,7 $\pm$ 0,9	105,2 $\pm$ 3,3	-	0,74
PgQ	65,5 $\pm$ 0,7	39,2 $\pm$ 0,6	23,4 $\pm$ 1,6	-	0,52

A formação dos grupos $-\text{NH}_3^+$ em meio ácido contribui para repulsão eletrostática entre as moléculas, impedindo a formação de agregados insolúveis, como visto anteriormente. Entretanto, a *N*-substituição de cadeias de mPEG resulta em menor repulsão eletrostática em meio ácido, já que a derivatização implica no consumo de grupos $-\text{NH}_2$ disponíveis. Adicionalmente, o rápido movimento conformacional das cadeias enxertadas de mPEG favorece a compactação das cadeias do derivado, impedindo a aproximação de outras cadeias (OUCHI et al., 1998; GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004; DENG et al., 2007). A formação de partículas auto-estruturadas é dependente da densidade de cadeias de PEG enxertadas na estrutura da quitosana (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004). Tanto a menor repulsão eletrostática, quanto a maior compactação das cadeias, favorecem diretamente na redução da viscosidade intrínseca dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana em relação aos valores obtidos para as quitosanas de partida. Na Tabela 8, em todos os casos o valor de viscosidade intrínseca da quitosana de partida é aproximadamente vinte vezes maior que a viscosidade intrínseca do correspondente derivado. Apesar da semelhança entre o grau médio de substituição total, os valores de massa molar viscosimétrica e grau médio de desacetilação calculados para as quitosanas iniciais definitivamente influenciam no perfil viscosimétrico de cada derivado sintetizado.

Estudo mostram que a quitosana altamente substituída com cadeias de mPEG (GS = 197%) nos grupos $-\text{OH}$, a viscosidade reduzida diminui com o aumento da concentração até aproximadamente 32 mg mL⁻¹, quando é registrado um ligeiro incremento da viscosidade em concentrações mais elevadas (GOROCHOVCEVA; MAKUŠKA, 2004). Este resultado, por sua vez, reflete um comportamento de copolímero ramificado em solução, responsável pelo aumento da densidade dos agregados macromoleculares formados conforme o aumento da

concentração, em oposição ao típico comportamento de polieletrólito. Para o intervalo de concentração entre 10-30 mg mL⁻¹ em soluções de ácido acético, a viscosidade reduzida do derivado mPEG-g-quitosana permanece quase constante, sendo o comportamento de polietrólito extensivamente reduzido em concentrações mais baixas e praticamente inexistente para GS > 22 % (DENG et al., 2007). No presente estudo, os derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana apresentaram $\overline{GS}_T \approx 40$ % e viscosidade reduzida diretamente proporcional à concentração polimérica em toda faixa de análise. A maior compactação das cadeias destes derivados em solução permitiu aumento na concentração entre 10 a 30 vezes, em relação às concentrações das soluções das quitosanas de partida para obtenção da viscosidade relativa (η_{rel}) no intervalo de 1,2-1,8, diferentemente do que seria esperado para o comportamento de um polieletrólito em solução (KULICHE; CLASEN, 2004). Portanto, o pequeno incremento de viscosidade reduzida destes derivados (Figura 34) em relação ao observado para as amostras de quitosana (Figura 33), em função da concentração, sugere que os derivados conservam características de polieletrólito e copolímero ramificado.

5.7.5 Difração de Raios X (DRX)

A análise de difração de raios X foi utilizada para investigar alterações na cristalinidade das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana. As Figuras 35 e 36 apresentam os difratogramas das amostras de quitosana e β -quitina.

Figura 35 – Difratomogramas de raios X das amostras de β -quitina, QD1x, QD2 e QD3x.

Figura 36 – Difratomogramas de raios X das amostras QD3x e Q.

O difratograma da β -quitina (Figura 35) apresenta um pico cristalino característico em $2\theta = 8,13^\circ$ que corresponde ao plano $(020)_h$ referente aos cristais hidratados, e o pico em $2\theta \approx 19,5^\circ$ que correspondem aos cristais anidro da estrutura. Estes dois planos constituem a estrutura de um polimorfo di-hidratado semicristalino (FOCHER et al., 1990; OSORIO-MADRAZO et al., 2010; PAPADIMITRIOU et al., 2012). Os difratogramas das amostras QD1x, QD2x e QD3x (Figura 35) apresentam a característica comum evidenciada pela supressão do pico cristalino em $2\theta \approx 8^\circ$ e pelo aparecimento do pico em $2\theta \approx 10^\circ$. Esta alteração configura a transição da estrutura do polimorfo di-hidratado para estruturas mono-hidratadas em decorrência do processo DAIUS. O pico em $2\theta = 9,42^\circ$ na amostra QD1x é deslocado para $2\theta = 10,54^\circ$ na amostra QD2x, evidenciando a perda de água de hidratação (SAITO, Y. et al., 1997), enquanto que na amostra QD3x este pico menos intenso em $2\theta = 11,07^\circ$ evidencia a significativa supressão da cristalinidade em decorrência da diminuição de cristais hidratados. A amostra Q (Figura 36) apresenta o pico de menor intensidade referente aos cristais hidratados em $2\theta = 10,72^\circ$, sendo, portanto, um pico cristalino existente em quitosanas de procedências distintas.

Através dos difratogramas da Figura 36, torna-se evidente que apenas as amostras QD3x e Q apresentam contribuição dos planos $(200)_h$ e $(220)_h$ referente aos cristais anidros em $2\theta \approx 20,1^\circ$ e $\approx 21,8^\circ$, respectivamente. Estas amostras apresentaram os maiores valores de grau médio de desacetilação, porém massas molares viscosimétricas bastante distintas (Tabela 9), evidenciando a dependência da cristalinidade da quitosana e, conseqüentemente, do empacotamento das cadeias através das interações resultantes da incidência de unidades GlcNAc (FOCHER et al., 1990; KUMIRSKA et al., 2010) e extensão da cadeia polimérica. Os valores de desacetilação e índice de cristalinidade (I_{cr}) das amostras de β -quitina e quitosanas, calculados através da Equação 12, são listados na Tabela 9. É possível observar que o processo DAIUS favorece não somente a reação de desacetilação, como a diminuição da cristalinidade em cada etapa desenvolvida. Esses resultados sugerem que o processo DAIUS provoca alterações nos domínios cristalinos da β -quitina e nas quitosanas resultantes das sucessivas etapas de sonicação (CARDOSO et al., 2001).

Tabela 9 – Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$) e índice de cristalinidade (I_{cr}) das amostras de β -quitina, QD1x, QD2x, QD3x e Q.

Amostras	$\overline{GD}$ (%)	$\overline{M}_v \cdot 10^3$ (g mol ⁻¹)	I_{cr} (%)
β -quitina	19,7	1340,0	78,4
QD1x	64,0 $\pm$ 1,1	495,6 $\pm$ 6,3	69,8
QD2x	75,8 $\pm$ 0,8	346,8 $\pm$ 5,8	60,6
QD3x	92,3 $\pm$ 0,9	501,9 $\pm$ 5,9	58,3
Q	94,7 $\pm$ 0,7	82,9 $\pm$ 2,0	68,3

É possível observar a redução da intensidade dos picos dos cristais hidratados e anidros no difratograma dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana (Figura 37) (LIU et al., 2009). A modificação dos domínios amorfo e cristalino da quitosana torna-se mais evidente em função do aparecimento dos picos cristalinos em 19,5° e 23,7°, característicos da estrutura inicial de mPEG-COOH. Não é possível observar diferenças decorrentes das características estruturais de cada amostra, sendo que estes picos são tanto mais intensos e menos alargados quanto maior o grau médio de substituição (DENG et al., 2007; PAPADIMITRIOU et al., 2012). Devido ao $\overline{GS}_T \approx 40$ %, é possível inferir o que o padrão de difração dos derivados é predominantemente influenciado pela estrutura cristalina das cadeias de mPEG. A semelhança entre os difratogramas das estruturas de mPEG-COOH e dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana pode ser atribuída à presença de microfases formadas por cadeias de quitosana e cristais de mPEG (DENG et al., 2007; LIU et al., 2009). Nestes casos, a alteração na intensidade dos picos entre 15 e 25° indica o rompimento dos domínios cristalinos dos polímeros iniciais em função da ligação química existente entre ambas as estruturas levando, conseqüentemente, a maior homogeneidade entre as cadeias de mPEG e quitosana em nível molecular (BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005).

Figura 37 – Difratomogramas de raios X das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x, PgQ e mPEG-COOH.

Devido a alteração estrutural acarretada pela adição das cadeias de mPEG-COOH, não é possível determinar o I_{cr} através da Equação 12. Entretanto, e através do perfil apresentado pelos difratogramas na Figura 37, é possível estimar que essa modificação estrutural favoreça o relativo aumento da cristalinidade dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana em relação às amostras das quitosanas iniciais.

5.7.6 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica foi utilizada para avaliar a estabilidade térmica em atmosfera de N_2 das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. As Figuras 38 e 39 apresentam as curvas termogravimétricas das amostras de quitosana e de β -quitina.

Figura 38 – Curvas termogravimétricas das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

Figura 39 – Curvas DTG das amostras de quitosana (QD1x, QD2x, QD3x e Q) e β -quitina, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$.

O primeiro evento térmico (Figura 38), correspondente ao intervalo $35\text{-}130^\circ\text{C}$, refere-se à desidratação dos polímeros, enquanto o segundo evento térmico, correspondente ao

intervalo 200-400 °C, refere-se à decomposição térmica dos mesmos. A temperatura do início da decomposição (T_{onset}), a qual evidencia a estabilidade térmica relativa das amostras, está relacionada ao grau de enovelamento das cadeias poliméricas. Quanto maior o enovelamento, maior a restrição dos movimentos macromoleculares e menor a dissipação térmica, levando ao aumento da probabilidade de quebra de ligações químicas em temperaturas mais baixas (PAOLI, 2009). Desse modo, é observado que a conversão da β -quitina na amostra QD1x através do processo DAIUS diminui a estabilidade térmica do polímero, assim como observado para as amostras QD2x e QD3x. Estes resultados são coerentes com a sucessiva diminuição da cristalinidade dessas amostras (Tabela 10). As amostras QD3x e Q apresentam os menores valores de T_{onset} , visto que a maior presença de unidades GlcN contribui para diminuição da estabilidade térmica. Estes fatores, bem como a massa molar influenciam diretamente no comportamento térmico do polímero. A diminuição da massa molar viscosimétrica está relacionada a menores valores de T_{onset} . A Tabela 10 lista os principais parâmetros obtidos anteriormente, com os valores de T_{onset} , temperatura de degradação máxima ($T_{máx}$) e o teor de água das amostras.

Tabela 10 – Grau médio de desacetilação ($\overline{GD}$), grau médio de substituição total ($\overline{GS}_T$), massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), índice de cristalinidade (I_{cr}), temperatura inicial (T_{onset}), temperatura de degradação máxima ($T_{máx}$) e teor de água (%) das amostras de quitosana, derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana, β -quitina e mPEG-COOH.

Amostras	$\overline{GD}$ (%)	$\overline{GS}_T$ (%)	$\overline{M}_v \cdot 10^3$ (g mol ⁻¹)	I_{cr} (%)	T_{onset} (°C)	$T_{máx}$ (°C)	Teor de água (%)
β -quitina	19,7	-	1340	78,4	290	358	10,5
QD1x	64,0 $\pm$ 1,1	-	495,6 $\pm$ 6,3	69,8	254	308	11,6
QD2x	75,8 $\pm$ 0,8	-	346,8 $\pm$ 5,8	60,6	256	310	11,2
QD3x	92,3 $\pm$ 0,9	-	501,9 $\pm$ 5,9	58,3	223	282	10,6
Q	94,7 $\pm$ 0,7	-	82,9 $\pm$ 2,0	68,3	231	305	7,4
PgQD1x	25,5 $\pm$ 0,8	41,6 $\pm$ 0,7	-	-	267	406	2,2
PgQD2x	38,5 $\pm$ 0,8	40,4 $\pm$ 0,6	-	-	268	401	2,4
PgQD3x	52,3 $\pm$ 0,7	42,7 $\pm$ 0,9	-	-	265	391	2,1
PgQ	65,5 $\pm$ 0,7	39,2 $\pm$ 0,6	-	-	240	415	2,2
mPEG-COOH	-	-	-	-	354	429	0,5

Assim como apresentado nas Figuras 40 e 41 o comportamento térmico dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana é nitidamente modificado em relação ao comportamento das quitosanas de partida. O aumento relativo de T_{onset} (Tabela 10) ocorre devido à quebra das ligações hidrogênio existentes entre as cadeias de quitosana e à formação de novas interações proporcionadas pela introdução de cadeias de mPEG-COOH de alta cristalinidade (Figura 37), e alta estabilidade térmica ($T_{\text{onset}} = 354^{\circ}\text{C}$) (DENG et al., 2007). Segundo estudos, comportamento semelhante é observado, porém com menores valores de T_{onset} devido a menores valores de grau médio de substituição (1,5 a 7 %) (CASETTARI et al., 2010). O grau médio de substituição semelhante nos derivados ($\overline{GS}_T \approx 40\%$) sintetizados favoreceu o aumento de T_{onset} em relação às quitosanas de partida. Dessa forma, é possível inferir que quanto maior o grau médio de substituição, maior o caráter cristalino proveniente das cadeias de mPEG e, conseqüentemente, maior a estabilidade térmica do derivado em relação à quitosana partida.

Figura 40 – Curvas termogravimétricas das amostras dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana e mPEG-COOH, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$.

Figura 41 – Curvas DTG das amostras dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana e mPEG-COOH, obtidas em atmosfera de N_2 com vazão de 50 mL min^{-1} e razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$.

5.8 Produção das Nanosuspensões

Nesta etapa, são avaliadas as influências das características estruturais das amostras de quitosana e dos derivados *N,O*-mPEG-g-quitosana sobre as propriedades de superfície e hidrodinâmicas das partículas em suspensão. Para tanto, a dependência da razão molar – NH_3^+/TPP (Equação 13) e do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) foram avaliados através dos ensaios de potencial zeta (ζ) e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Através das análises de ζ é possível estimar a distribuição de cargas nas superfícies das partículas em suspensão. A variação da densidade de carga das partículas permite o controle de propriedades como adesão, estabilidade coloidal em meios biológicos e determinação da rota de administração de sistema de liberação de bioativos. Já as análises de DLS, é possível estimar a influência de características estruturais sobre a propriedades hidrodinâmicas dos sistemas polímero/TPP. Partículas carregadas e com intervalo de tamanho definido influenciam na eficiência da biodistribuição e mucoadesividade de carreadores de bioativos (KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015).

As suspensões de partículas foram produzidas através da interação entre os grupos NH_3^+ das cadeias de quitosana e moléculas de tripolifosfato de sódio (TPP). Essa interação é baseada na transição líquido-gel da quitosana proporcionada pelo entrecruzamento eletrostático espontâneo com poliânions. O entrecruzamento eletrostático, que resulta na gelificação iônica e produção de nanopartículas, prescinde do uso de emulsificantes ou agentes de entrecruzamento que se ligam covalentemente às cadeias de quitosana, os quais em muitos casos são tóxicos e podem resultar em reações colaterais e modificações irreversíveis em bioativos (CALVO et al., 1997; FAN et al., 2012; KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015).

A Figura 42 apresenta a dependência da viscosidade específica com o parâmetro de recobrimento das amostras de quitosana e derivados. É possível observar a dependência linear a qual representa o regime diluído. Estudos recentes mostram que a transição para o regime semi-diluído, estabelecido pela concentração crítica (c^*) do polímero em solução, é verificado em valores de $c^*[\eta] > 1,27$, para quitosanas com diferentes massas molares e graus médios de desacetilação (KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015). O aumento da concentração no regime semi-diluído favorece a aproximação das cadeias poliméricas de modo que o estabelecimento de interações polímero-polímero resulta na sobreposição das cadeias. Nesse sentido, o parâmetro de recobrimento representa a fração do espaço ocupado pelo polímero em solução, o qual traduz o efeito de compressão e interpenetração das cadeias conforme o aumento da concentração.

Figura 42 – Viscosidade específica (η_{sp}) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) das amostras de quitosana e derivados em $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de sódio.

A estabilidade dos sistemas quitosana/TPP e *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP foram avaliadas semanalmente por 30 dias, não sendo encontradas alterações significativas nas medidas de potencial zeta (ζ) e diâmetro hidrodinâmico médio (nm).

5.8.1 Sistemas Quitosana/TPP

A Figura 43 expressa a dependência de potencial zeta (ζ) dos sistemas quitosana/TPP em função da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$. O aumento na proporção de quitosana induz ao aumento de ζ , sendo este efeito consequência da menor quantidade de cargas negativas no sistema, provenientes das moléculas de TPP, com o aumento da concentração de quitosana. É possível observar ainda que as posições relativas das curvas estão diretamente relacionadas aos graus médios de desacetilação, visto que as quitosanas QD3x e Q, as quais apresentam maior quantidade média de grupos $-\text{NH}_3^+$ por cadeia, resultaram em sistemas que exibem maiores valores de ζ em todo intervalo de análise. Entretanto, a rigidez/ flexibilidade e dinâmica conformacional das cadeias de quitosana também afetam a distribuição de cargas no sistema quitosana/TPP. Assim, a maior quantidade de unidades GlcNAc não somente diminui a quantidade de grupos $-\text{NH}_3^+$ disponíveis para interação eletrostática com TPP, como afeta a exposição de cargas positivas nas superfícies das partículas (RODRIGUES et al., 2012; KLEINE-BRUEGGENEY et al., 2015).

A Figura 44 apresenta a dependência de ζ em função do parâmetro de recobrimento dos sistemas quitosana/TPP. A menor fração de espaço efetivo ocupado pela amostra Q em regime diluído (Figura 42) está diretamente relacionada à menor massa molar média viscosimétrica. Nesse sentido, é possível que as partículas de Q/TPP formadas no intervalo analisado sejam constituídas por menor quantidade de cadeias sobrepostas, quando comparado às partículas formadas por cadeias de maior extensão. As amostras QD1x e QD3x, de elevada massa molar viscosimétrica, apresentaram significativa interpenetração das cadeias no intervalo analisado, representado pelo aumento do parâmetro de recobrimento com o aumento na proporção mássica de quitosana/TPP, sendo esta uma consequência da maior agregação das cadeias. A curva Q/TPP *versus* $c[\eta]$ resultou em dependência linear com uma forte pendente positiva com $c[\eta] < 1,0$, isto é, no regime diluído. Entretanto, as curvas correspondentes aos sistemas QD1x/TPP e QD2x/TPP apresentam tendências diferentes, caracterizadas pelo acentuado aumento de ζ a partir de $c[\eta] > 1,0$, isto é, no regime semidiluído, enquanto no sistema QD3x/TPP esta tendência é menos evidente.

Figura 43 – Potencial zeta (mV) em função do razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas QD1x/ TPP, QD2x/ TPP, QD3x/ TPP e Q/ TPP.

Figura 44 – Potencial zeta (mV) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.

A Figura 45 apresenta a dependência do diâmetro hidrodinâmico médio dos sistemas quitosana/TPP em função da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$. O diâmetro médio das nanopartículas do sistema Q/TPP apresentou pequena variação com o aumento da razão molar, sendo este efeito decorrente da compactação das cadeias da quitosana Q com moléculas de TPP. A variação do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas do sistema QD2x/TPP (200-600 nm) é linear com pendente positiva no intervalo analisado. Entretanto, os sistemas QD1x/TPP e QD3x/TPP apresentaram comportamento aproximadamente linear até $-\text{NH}_3^+/\text{TPP} \approx 12$ com diâmetro hidrodinâmico médio atingindo ≈ 600 nm, seguido de um crescimento assintótico do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas com o aumento do excesso de cargas positivas e gerando partículas com dimensões micrométricas.

Figura 45 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função da razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.

A Figura 46 apresenta a dependência do diâmetro hidrodinâmico médio dos sistemas quitosana/TPP em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$). A formação de partículas de menor tamanho do sistema Q/TPP está diretamente relacionada ao menor recobrimento das cadeias, visto que os eventos que conduzem à sobreposição e interpenetração das cadeias são menos pronunciados em regime diluído. Com isso, pode-se inferir que o aumento da concentração da quitosana Q resulta em denso empacotamento das cadeias poliméricas com

as moléculas de TPP, de forma que razão quitosana/TPP para esse sistema proporciona partículas de diâmetro hidrodinâmico semelhante, porém com variação na densidade de carga na superfície, como visto anteriormente. Entretanto, elevados valores de massa molar média viscosimétrica, em especial para os sistemas QD1x/TPP e QD3x/TPP, favorecem a elevação do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas conforme o aumento da concentração de quitosana, visto que são estabelecidas interações polímero-polímero em regime semi-diluído, como observado pelo crescimento assintótico em $c[\eta] > 1,0$. No caso do sistema QD2x/TPP, é inicialmente observada tendência semelhante aos sistemas QD1x/TPP e QD3x/TPP, entretanto, em concentrações mais elevadas de quitosana não se observa perfil acentuado de crescimento resultante de interações em regime semidiluído.

Figura 46 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas QD1x/TPP, QD2x/TPP, QD3x/TPP e Q/TPP.

5.8.2 Sistemas *N,O*-mPEG-g-quitosana/TPP

A menor densidade de cargas positivas nos sistemas *N,O*-mPEG-g-quitosana/TPP (Figura 47) em comparação com os sistemas quitosanas/TPP (Figura 43), decorre da *N*-substituição das cadeias de quitosana, o que leva à diminuição do número médio de sítios –NH₂ disponíveis para protonação, aumenta a flexibilidade das cadeias poliméricas pela

diminuição das repulsões eletrostáticas intramoleculares e resulta na maior exposição das cadeias de mPEG na superfície das partículas, levando a menor exposição das cargas positivas na superfície. De fato, em outros estudos (CALVO et al., 1997; ZHANG et al., 2008) também foi observada a diminuição da densidade de cargas positivas nas partículas devido à *N*-substituição. A literatura também registra que ζ decresce com o aumento de grau médio de substituição de derivados de quitosana, sendo coerente com o consumo de grupos -NH_2 e com a consequente diminuição da exposição das cargas positivas na superfície das partículas (MAO et al., 2005; DENG et al., 2007). Adicionalmente, valores elevados de ζ são obtidos com aumento da *O*-substituição em detrimento da *N*-substituição, já que o excedente de grupos -NH_3^+ atua no aumento da densidade de carga positiva. (NAJAFABADI et al., 2014).

Os valores de ζ relativamente maiores nos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP e PgQD3x/TPP quando comparados ao sistema PgQ/TPP (Figura 47), sugerem que as elevadas massas molares viscosimétricas das quitosanas de partida (QD1x, QD2x e QD3x) favoreçam a disposição de cargas positivas nas superfícies das partículas. No caso do sistema PgQD1x não é observada variação de ζ em função do aumento da razão molar $\text{-NH}_3^+/\text{TPP}$, o que é decorrente do menor teor de unidades GlcN em relação aos demais sistemas. No caso do sistema PgQ/TPP é observado um ligeiro aumento de ζ com o aumento da razão molar $\text{-NH}_3^+/\text{TPP}$, entretanto o eficiente revestimento dos núcleos, formados por cadeias de quitosana e moléculas de TPP, com cadeias de mPEG diminui a exposição de cargas positivas nas superfícies das partículas. Os sistemas PgQD2x/TPP e PgQD3x/TPP apresentam comportamentos distintos dos discutidos anteriormente, sendo observado nestes casos significativo aumento de ζ com o aumento da razão *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP. Isso ocorre devido à maior quantidade de unidades GlcN, visto que as correspondentes quitosanas de partida têm maiores graus médios de desacetilação que QD1x, além de possuírem elevadas massas molares médias viscosimétricas, como já mencionado.

Figura 47 – Potencial zeta (mV) em função da razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.

A Figura 48 apresenta a dependência de ζ em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP. É observado que, com exceção do sistema PgQD3x/TPP, os demais sistemas apresentam baixa dependência de ζ com o parâmetro de recobrimento, considerando os erros das medidas. De fato, todos os sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP foram preparados em regime muito diluído ($c[\eta] \ll 1,0$) e apenas o sistema PgQD3x/TPP mostra variação de ζ com o aumento de $c[\eta]$, pois o derivado PgQD3x é o que apresenta a maior viscosidade intrínseca (Tabela 8). Entretanto, tendência linear (*master curve*, reta tracejada na Figura 48) é observada em todos os sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP, evidenciando a dependência de ζ com as viscosidades intrínsecas dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana.

Figura 48 – Potencial zeta (mV) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.

A Figura 49 apresenta a dependência do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas dos sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP em função da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$. De modo geral, é possível observar uma tendência de aumento linear do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas em função do aumento da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$, com exceção do sistema PgQD2x/TPP.

A Figura 50 apresenta a dependência do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP, que se assemelha à dependência do diâmetro hidrodinâmico médio em função da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$ (Figura 49). Conforme esses dados, o diâmetro hidrodinâmico médio das nanopartículas aumenta com o aumento do parâmetro de recobrimento, exceto no caso do sistema PgQD2x/TPP, o que é atribuído à exposição das cadeias do substituinte hidrofílico mPEG nas superfícies das partículas expandindo a camada de hidratação. Desse modo, as posições relativas das curvas dos sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP tem correspondência com os valores de viscosidade intrínseca dos derivados. Assim, quanto maior a viscosidade intrínseca do derivado, maior o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas.

Figura 49 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função da razão molar ($-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.

Figura 50 – Diâmetro hidrodinâmico médio (nm) em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$) dos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP, PgQD3x/TPP e PgQ/TPP.

5.9 Produção dos Hidrogéis

Nesta etapa, são avaliadas as influências das características estruturais dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana sobre as propriedades viscoelásticas dos hidrogéis através dos ensaios reológicos em fluxo e oscilatórios.

Os hidrogéis dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana formados sem entrecruzamento covalente ou eletrostático, apresentam conjunto de forças de curto alcance capazes de suportar a formação de redes poliméricas (BHATTARAI et al., 2010; DELIGKARIS et al., 2010). As forças associativas envolvidas incluem interações hidrofóbicas entre as cadeias de quitosana, ligações hidrogênio entre grupos $-OH$, $-NH_2$ e acetamido e interações intermoleculares entre as cadeias laterais de mPEG. Como os derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana apresentaram graus médio de substituição semelhantes ($\overline{GS}_T \approx 40\%$), os diferentes comportamento reológicos dos hidrogéis foram atribuídos às características estruturais das cadeias de quitosana de partida. De modo a obter maior fluidez no material preparado, os polímeros foram dissolvidos em meio neutro ($pH \approx 7,0$), resultando no aumento da flexibilidade das cadeias (CHENITE et al., 2001; BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005).

5.9.1 Ensaios Reológicos em Fluxo

A Figura 51 apresenta a dependência da viscosidade dinâmica (μ) dos hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana em função da taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$). Em todos os casos é observada a diminuição da viscosidade devido ao alinhamento das cadeias, resultando na diminuição da resistência ao fluxo submetido, conforme o aumento da taxa de cisalhamento (CONTRI et al., 2014; RUOCCO et al., 2015). É possível inferir que elevados teores de unidades GlcN favorecem interações de curto alcance (ligações hidrogênio), as quais atuam de forma efetiva sobre a fricção hidrodinâmica das cadeias, resultando em maiores valores de viscosidade dinâmica e pronunciado comportamento pseudoplástico dos hidrogéis PgQD3x ($\overline{GD} = 52,3 \pm 0,7 \%$) e PgQ ($\overline{GD} = 65,5 \pm 0,7 \%$). Apesar das cadeias poliméricas do hidrogel PgQD1x ($\overline{GD} = 25,5 \pm 0,8 \%$) apresentarem maior teor de unidades GlcNAc em comparação com PgQD2x ($\overline{GD} = 38,5 \pm 0,8 \%$), a viscosidade intrínseca mais elevada de PgQD1x ($[\eta] = 74,4 \pm 6,7 \text{ mL g}^{-1}$) está relacionada a valores relativamente maiores de viscosidade dinâmica (NOVOA-CARBALLAL et al., 2013). Assim, valores elevados de viscosidade dinâmica dos hidrogéis PgQD3x e PgQ estão associadas à forças de curto alcance estabelecidas entre unidades GlcN,

enquanto maiores teores de unidade GlcNAc estão associadas a menores valores de viscosidade dinâmica. É possível ainda observar região de comportamento típico newtoniano acima de 10 s^{-1} no hidrogel PgQD2x.

Figura 51 - Viscosidade dinâmica (μ) pela taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$) dos hidrogéis PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.

A Figura 52 apresenta a dependência da viscosidade dinâmica dos hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana em função da temperatura ($^{\circ}\text{C}$). Nota-se que em todos os casos, o aumento da temperatura no intervalo de 10 a 50°C não influenciou significativamente na variação da viscosidade dinâmica dos hidrogéis. Nestes casos, a estrutura hidrofílica dos derivados contribui para a retenção das moléculas de água na superfície de hidratação das cadeias, diminuindo a influência do aumento da temperatura sobre a viscosidade dinâmica do hidrogel. Os hidrogéis PgQD3x, PgQ e PgQD1x apresentaram perfis semelhantes, enquanto que PgQD2x apresentou maior fluidez devido aos menores valores de viscosidade dinâmica, sendo que este resultado possivelmente está relacionado à quantidade intermediária de unidades GlcNAc e de viscosidade intrínseca do polímero.

Figura 52 - Viscosidade dinâmica (μ) pela temperatura ($^{\circ}\text{C}$) para os hidrogéis das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.

5.9.2 Ensaios Reológicos Oscilatórios

A Figura 53 apresenta o primeiro ensaio oscilatório para determinação da região de viscoelasticidade linear ou pseudolinear (LVR) dos hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. A variação na deformação do hidrogel é acompanhada pela variação simultânea e em fase da tensão oscilatória no LVR. Neste intervalo, os módulos de armazenamento (G') e perda (G'') são independentes destas variáveis. Valores de G' e G'' acima do LVR indicam o colapso da estrutura do hidrogel devido à alta amplitude da tensão oscilatória aplicada e a consequente deformação fora de fase (BARNES, 2000; MENARD, 2008).

Através do perfil das curvas apresentadas na Figura 53, é possível observar que a contribuição elástica (G') dos hidrogéis PgQD3x e PgQ é maior que a contribuição viscosa (G'') em todo intervalo do LVR. Nestes casos, e de acordo com a Equação 16, valores de $\tan(\delta) < 1,0$ indicam elevada rigidez da rede polimérica (CONTRI et al., 2014). Já o hidrogel PgQD1x apresentou $G'' \approx G'$ ($\tan(\delta) \approx 1,0$), enquanto que PgQD2x apresentou $G'' > G'$ ($\tan(\delta) > 1,0$). Nestes, a presença de maior quantidade de domínios hidrofóbicos (unidades GlcNAc) contribuiu para maior fluidez. Tanto a contribuição elástica (G'), quanto a

contribuição viscosa (G'') dos hidrogéis segue tendência semelhante à encontrada para viscosidade dinâmica (Figura 51). Com isso, maior quantidade de unidades GlcN está relacionado à maior coesão da estrutura do hidrogel (PgQD3x e PgQ) e à maior contribuição para a rigidez do material.

Nas curvas da Figura 53, a linha tracejada indica um valor comum de tensão oscilatória em fase utilizado nos demais ensaios oscilatórios.

Figura 53 - Determinação do LVR a partir dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') em função da deformação oscilatória.

A Figura 54 apresenta os resultados dos experimentos de frequência oscilatória dos hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. Assim como nos experimentos em que foi avaliado os efeitos da deformação oscilatória sobre os módulos G' e G'' (Figura 53), os hidrogéis das amostras PgQD3x, PgQ e PgQD1x apresentaram $G' > G''$ em todo intervalo de variação de frequência. A ausência de pontos de *crossover* indica que estes hidrogéis apresentam essencialmente estrutura de gel e comportamento típico de cadeias poliméricas em rede tridimensional (DIEZ-SALES et al., 2007; KONO; TESHIOGI, 2015). A força coesiva do gel está associada à diferença entre os módulos G' e G'' para cada valor de frequência. Conforme o aumento da frequência, a aproximação das curvas G' e G'' versus frequência

indica o rompimento e a diminuição das estruturas em rede polimérica dos hidrogéis (CHENITE et al., 2001; KONO; TESHIOGI, 2015; RUOCCO et al., 2015).

Em valores intermediários de frequência, o hidrogel PgQD2x (Figura 54) apresentou $G'' > G'$. A predominância do comportamento viscoso sobre o elástico, com maior incremento de G' sobre G'' , resulta em hidrogéis não-estruturados (DIEZ-SALES et al., 2007), com comportamento líquido-sólido (pre-gel) (SOARES et al., 2014). Devido ao maior incremento de G' , acima de 10 rad s^{-1} , observa-se transição para um estado gel (ponto sol-gel), em que $G' = G''$ e $\tan(\delta) \approx 1,0$ até aproximadamente 100 rad s^{-1} . Neste intervalo, o sistema apresenta maior tempo de relaxação, necessário para alcançar um estado de equilíbrio após aplicação de uma tensão e deformação de baixa amplitude. Com isso, após o ponto sol-gel, forma-se um hidrogel estruturado e o sistema adquire maior estabilidade e rigidez (CONTRI et al., 2014). Assim como nos experimentos anteriores, nota-se que quantidades intermediárias de unidades GlcNAc ($\overline{GD} = 38,5 \pm 0,8 \%$) e de viscosidade intrínseca ($[\eta] = 53,9 \pm 2,7 \text{ mL g}^{-1}$) no derivado PgQD2x resultam em balanço adequado de interações hidrofílicas e hidrofóbicas intermoleculares, as quais favoreceram a formação de hidrogel que apresenta transição sol-gel.

Figura 54 - Ensaio de frequência oscilatória para os hidrogéis das amostras PgQD1x, PgQD2x, PgQD3x e PgQ.

A Figura 55 apresenta o comportamento dos módulos G' e G'' dos hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana em função da temperatura. Acima de 25 °C as amostras PgQ e PgQD1x apresentaram tendência semelhante, em que tanto a contribuição elástica (G') quanto a viscosa (G'') aumentam conforme o aumento da temperatura. Nestes casos, a contribuição de ambos os módulos se mantém constante em todo intervalo de variação de temperatura. Este comportamento sugere que as ligações hidrogênio estabelecidas entre as cadeias de polímero e as moléculas de água são gradualmente substituídas por interações do tipo polímero-polímero (BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005). Com isso, a posição relativa das curvas pode ser atribuída à intensidade relativa das forças de curto alcance, pois no hidrogel PgQD1x há maior contribuição de interações hidrofóbicas das unidades GlcNAc, enquanto que no hidrogel PgQ, predominam ligações hidrogênio. Interações hidrofóbicas de menor intensidade resultam em menor coesão da estrutura do hidrogel, visto que durante o aquecimento ambos os módulos do hidrogel PgQD1x mostraram-se inferiores em comparação ao hidrogel PgQ.

Figura 55 - Dependência dos módulos de armazenamento (G') e perda (G'') com a temperatura (°C).

Os módulos G' e G'' do hidrogel PgQD3x são pouco afetados pela variação da temperatura (Figura 55), sendo possível inferir que a elevada rigidez deste hidrogel possibilitou a retenção das moléculas de água na sua estrutura. De fato, o aumento

temperatura no intervalo de análise não foi suficiente para desidratar o gel durante o experimento.

No caso do hidrogel PgQD2x é observada a ocorrência do ponto de *crossover*, caracterizando a transição sol-gel (Figura 55). De forma semelhante a estudos anteriores (BHATTARAI; MATSEN; et al., 2005; TSAO et al., 2014), foi possível no presente estudo desenvolver o hidrogel de um derivado *N,O*-mPEG-g-quitosana termosensível, em que se observa a mudança do comportamento viscoso em temperatura ambiente ($G'' > G'$) para comportamento elástico em temperatura acima de 38,2 °C ($G' > G''$), sendo esta uma característica de grande utilidade para o desenvolvimento de hidrogéis injetáveis voltados para liberação sustentada ou controlada de bioativos *in situ*.

6 CONCLUSÃO

Quitosanas com diferentes características estruturais foram produzidas pelo processo DAIUS, aplicado à β -quitina extraída de gládios de lulas, para obtenção das amostras QD1x ($\overline{GD} = 64,0 \pm 1,1$ % e $\overline{M}_v = 495,6 \pm 6,3 \cdot 10^3$ g mol⁻¹), QD2x ($\overline{GD} = 75,8 \pm 0,8$ % e $\overline{M}_v = 346,8 \pm 5,8 \cdot 10^3$ g mol⁻¹) e QD3x ($\overline{GD} = 92,3 \pm 0,9$ % e $\overline{M}_v = 501,9 \pm 5,9 \cdot 10^3$ g mol⁻¹). A amostra de quitosana comercial (QN) foi purificada na forma neutra para obtenção da amostra Q ($\overline{GD} = 94,7 \pm 0,7$ % e $\overline{M}_v = 82,9 \pm 2,0 \cdot 10^3$ g mol⁻¹). Com exceção da incidência significativa de titânio e alumínio nas amostras QD1x ($109,2 \pm 10,9$ e $746,1 \pm 56,3$ ppm), QD2x ($139,0 \pm 7,3$ e $1122,5 \pm 39,2$ ppm) e QD3x ($120,2 \pm 11,5$ e $1223,5 \pm 115,7$ ppm) e níquel na amostra Q ($42,4 \pm 1,2$ ppm), a incidência dos demais metais analisados em cada caso mostrou-se abaixo dos limites de concentrações estabelecidas pela ANVISA e Farmacopéia norte-americana.

A reação de ativação para obtenção do mPEG-COOH apresentou rendimento (%R_{ativação}) de 86,8 %, enquanto que a formação dos complexos de quitosana-HOBt possibilitou a síntese dos derivados *N,O*-mPEG-*g*-quitosana. Embora o grau médio de *N*-substituição obtido para a amostra PgQ ($29,2 \pm 0,9$ %) seja inferior ao obtido para as amostras dos derivados PgQD1x ($38,5 \pm 0,5$ %), PgQD2x ($37,3 \pm 0,7$ %), PgQD3x ($40,0 \pm 0,4$ %), todas apresentam graus médios de substituição semelhantes ($\overline{GS}_T \approx 40$ %), evidenciando que os diferentes graus médios de desacetilação e massas molares médias viscosimétricas influenciaram pouco na reatividade e acessibilidade aos grupos reativos da quitosana.

A orientação das cadeias hidrofílicas de mPEG impediu a formação de agregados insolúveis em pH > pK_a e permitiu maior compactação das cadeias em solução, levando a diminuição da viscosidade intrínseca das amostras PgQD1x ($74,4 \pm 6,7$ mL g⁻¹), PgQD2x ($53,9 \pm 2,7$ mL g⁻¹), PgQD3x ($105,2 \pm 3,3$ mL g⁻¹) e PgQ ($23,4 \pm 1,6$ mL g⁻¹) em relação às quitosanas de partida QD1x ($1576,5 \pm 8,5$ mL g⁻¹), QD2x ($1201,6 \pm 6,7$ mL g⁻¹), QD3x ($1634,3 \pm 10,2$ mL g⁻¹) e Q ($449,0 \pm 5,1$ mL g⁻¹). Devido à pequena variação da viscosidade reduzida, estes derivados possuem características tanto de polieletrólito, quanto de copolímero ramificado.

Foi observada a diminuição da cristalinidade (I_{cr}) das amostras QD1x (69,8 %), QD2x (60,6 %) e QD3x (58,3 %) em relação à β -quitina (78,4 %). A diminuição do teor de unidades GlcNAc nas amostras QD3x e Q conferiu melhor definição do pico cristalino em $2\theta \sim 21^\circ$, bem como diminuiu a estabilidade térmica ($T_{onset} = 223$ e 231 °C, respectivamente), quando comparadas às amostras QD1x (254 °C) e QD2x (256 °C). Por outro lado, a presença de

domínios cristalinos proveniente das cadeias de mPEG ($T_{\text{onset}} = 354\text{ }^{\circ}\text{C}$) possibilitou o aumento da cristalinidade e, conseqüentemente, da estabilidade térmica dos derivados PgQD1x (267 $^{\circ}\text{C}$), PgQD2x (268 $^{\circ}\text{C}$), PgQD3x (265 $^{\circ}\text{C}$) e PgQ (240 $^{\circ}\text{C}$) em relação as quitosanas de partida. Portanto, quanto maior a cristalinidade do polímero, maior a sua estabilidade térmica.

De modo geral, o aumento da razão molar $-\text{NH}_3^+/\text{TPP}$ nos sistemas particulados de quitosana/TPP resultou no aumento dos valores de potencial zeta (ζ). As curvas que apresentaram valores mais elevados de ζ em todo intervalo de análise correspondem aos sistemas QD3x/TPP e Q/TPP, os quais são formados pelas quitosanas com os maiores graus médios de desacetilação. Entretanto, a elevada variação de ζ em função do parâmetro de recobrimento ($c[\eta]$), compreendido em regime diluído ($c[\eta] < 1,0$), sugere que as partículas de Q/TPP, com o diâmetro hidrodinâmico médio independente da concentração de quitosana, sejam constituídas por menor quantidade de cadeias poliméricas sobrepostas. Significativa interpenetração de cadeias foi observada nos sistemas QD1x/TPP e QD3x/TPP, revelando forte dependência das interações polímero-polímero com a massa molar média viscosimétrica, as quais favorecem o aumento do diâmetro hidrodinâmico médio das partículas, principalmente em regime semi-diluído ($c[\eta] > 1,0$).

Menores valores de ζ nos sistemas *N,O*-mPEG-*g*-quitosana/TPP decorrem da *N*-substituição e consumo de grupos $-\text{NH}_2$, e ao conseqüente aumento da flexibilidade dos polímeros que resulta na menor exposição das cargas positivas na superfície em função da camada externa de cadeias de mPEG. Valores elevados de massas molares médias viscosimétricas nos sistemas PgQD1x/TPP, PgQD2x/TPP e PgQD3x/TPP favoreceram a disposição das cargas positivas nas superfícies das partículas, enquanto que o eficiente revestimento por cadeias de mPEG no sistema PgQ/TPP resultou em menor exposição das cargas nas superfícies das partículas. Foi observado ainda que o aumento do parâmetro de recobrimento da camada de hidratação favorece o aumento do tamanho hidrodinâmico médio das partículas, e que tanto ζ quanto o diâmetro hidrodinâmico médio das partículas expressam tendência crescente e linear com o aumento da viscosidade intrínseca dos derivados.

Em todos os hidrogéis de *N,O*-mPEG-*g*-quitosana a pseudoplasticidade é tanto mais pronunciada quanto maior o teor de unidades GlcN. A diminuição da coesão do hidrogel está relacionada ao caráter hidrofóbico, o qual por sua vez, se relaciona diretamente ao maior teor de unidades GlcNAc dos hidrogéis PgQD1x e PgQD2x. Entretanto, os menores valores de viscosidade dinâmica do hidrogel PgQD2x em função da temperatura poder estar associados ao teor intermediário de unidades GlcNAc e de viscosidade intrínseca. A relação $G' > G''$

($\tan(\delta) < 1,0$) dos hidrogéis PgQD3x, PgQD1x e PgQ é constante em todo intervalo de variação de frequência, indicando que estes hidrogéis apresentam estrutura de gel rígido. Já a relação $G'' > G'$ para o hidrogel PgQD2x indica predominância do comportamento viscoso sobre o elástico. O ponto de *crossover* que indica a formação de hidrogel termosensível foi verificado em 38,2 °C. O comportamento elástico acima de 37 °C ($G' > G''$) e maior fluidez à 25°C ($G'' > G'$) revelam o potencial de aplicação destes hidrogéis para produção de sistemas injetáveis por via subcutânea ou intratumoral voltados para liberação sustentada ou controlada de bioativos com propriedades antitumorais.

As correlações estabelecidas entre os polímeros utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, em função das propriedades observadas nos sistemas de liberação (nanosuspensões e hidrogéis) permitem inferir que o controle das características estruturais e físico-químicas influencia diretamente nas condições desejadas para o carreador de bioativos. Assim, pesquisas futuras poderão investigar a influência das características estruturais e físico-químicas destes carreadores poliméricos, visando melhor eficiência de incorporação e liberação *in vitro* de fármacos antitumorais.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. Brasília, 2010. 545 p.

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

AGUIAR, D. C.; ROSSI-WONGTSCHOWSKI, C. L. D. B.; PEREZ, J. A. A. Validation of daily growth increments of statoliths of Brazilian squid *Doryteuthis plei* and *D. sanpaulensis* (Cephalopoda : Loliginidae). **Bioikos**, v. 26, n. 1, p. 13-21, 2012.

AHMED, E. M. Hydrogel: preparation, characterization, and applications: a review. **Journal of Advanced Research**, v. 6, n. 2, p. 105-121, 2015.

AIBA, S. Studies on chitosan: 3. Evidence for the presence of random and block copolymer structures in partially N-acetylated chitosans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 13, n. 1, p. 40-44, 1991.

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

ALLAN, G. G.; ALTMAN, L. C.; BENSINGER, R. E.; GHOSH, D. K.; HIRABAYASHI, Y.; NEOGI, A. N.; NEOGI, S. Biomedical application of chitin and chitosan. In: ZIKAKIS, J. P. (Ed.). **Chitin, chitosan and related enzymes**. London: Academic Press, 1984, p.119-134.

ALONSO, M. J. Nanomedicines for overcoming biological barriers. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, n. 3, p. 168-172, 2004.

ATKINS, E. Conformations in polysaccharides and complex carbohydrates. **Journal of Biosciences**, v. 8, n. 1-2, p. 375-387, 1985.

ATTWOOD, T. K.; CAMMACK, R.; CAMPBELL, P. N.; PARISH, J. H.; SMITH, A. D.; STIRLING, J. L.; VELLA, F. **Oxford dictionary of biochemistry and molecular biology**. Oxford: Oxford University, 2006. 738 p.

BAMRUNGSAP, S.; ZHAO, Z.; CHEN, T.; WANG, L.; Li, C.; FU, T.; TAN, W. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7, n. 8, p. 1253-1271, 2012.

BARNES, H. A. **A Handbook of elementary rheology**. Aberystwyth: University of Wales, Institute of Non-Newtonian Fluid Mechanics, 2000. 204 p.

BERNKOP-SCHNÜRCH, A.; DÜNNHAUPT, S. Chitosan-based drug delivery systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 3, p. 463-469, 2012.

BHATTARAI, N.; GUNN, J.; ZHANG, M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 83-99, 2010.

BHATTARAI, N.; MATSEN, F. A.; ZHANG, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermoreversible hydrogel. **Macromolecular Bioscience**, v. 5, n. 2, p. 107-111, 2005.

BHATTARAI, N.; RAMAY, H. R.; GUNN, J.; MATSEN, F. A.; ZHANG, M. PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. **Journal of Controlled Release**, v. 103, n. 3, p. 609-24, 2005.

BRAY, F.; REN, J. S.; MASUYER, E.; FERLAY, J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133-45, 2013.

BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. Chemical, biochemical, and microbiological aspects of chitosan quaternary salt as active coating on sliced apples. **Ciência e Tecnologia de Polímeros**, v. 32, n. 3, p. 599-605, 2012.

BULGHERONI, A.; FRISENDA, L.; SUBISSI, A.; MAILLAND, F. A Hydroxypropyl chitosan (HPCH) based medical device prevents fungal infections: evidences from an in vitro human nail model. **The Open Dermatology Journal**, v. 9, n. 1, p. 4-9, 2015.

CALVO, P.; REMUNAN-LOPEZ, C.; VILA-JATO, J. L.; ALONSO, M. J. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 1, p. 125-132, 1997.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; MARCOS, V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SOGNINI, R. 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.; CARDOSO, M. B. 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.

CAMPOS, A. M.; SÁNCHEZ, A.; ALONSO, M. J. Chitosan nanoparticles : a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 224, n. 1-2, p. 159-168, 2001.

CARDOSO, M. B.; SIGNINI, R.; CAMPANA-FILHO, S. P. On the sonication of chitin: effects on its structure and morphology and influence on its deacetylation. **Polymer Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 183-190, 2001.

CARPINO, L. A. 1-Hydroxy-7-azabenzotriazole. An efficient peptide coupling additive. **Journal of the American Chemical Society**, v. 115, n. 10, p. 4397-4398, 1993.

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

CASETTARI, L.; VLLASALIU, D.; MANTOVANI, G.; HOWDLE, S. M.; STOLNIK, S.; ILLUM, L. Effect of PEGylation on the toxicity and permeability enhancement of chitosan. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 2854-2865, 2010.

CHAUSSARD, G.; DOMARD, A. New aspects of the extraction of chitin from squid pens. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 559-564, 2004.

CHEN, D.; SHARMA, S. K.; MUDHOO, A. **Handbook on applications of ultrasound: sonochemistry for sustainability**. Boca Raton: CRC, 2012. 739 p.

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

CHENITE, A.; CHAPUT, C.; WANG, D.; COMBES, C.; BUSCHMANN, M. D.; HOEMANN, C. D.; LEROUX, J. C.; ATKINSON, B. L.; BINETTE, F.; SELMANI, A. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. **Biomaterials**, v. 21, n. 21, p. 2155-2161, 2000.

CHITOLINA, J. C.; SILVA, F. C.; ABREU, M. F.; PALMA, F. M. S.; CARMO, J. B. **Decomposição da matéria orgânica de compostos de lixo urbano e posterior preparo de extratos nítrico-perclórico**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2001. p. 1-8 (Circular técnica, ISSN 1677-8480).

CHO, H. J.; KIM, G.; KWON, H. S.; OH, Y. K. Functional PEGylated chitosan systems for biopharmaceuticals. In: SARMENTO, B; NEVES, J. (Ed.); **Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: delivery, targeting and polymer therapeutics**. Chichester: John Wiley, 2012. p.301-317.

CHOOCHOTTIROS, C.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Amphiphilic chitosan nanospheres: factors to control nanosphere formation and its consequent pH responsive performance. **Polymer**, v. 50, n. 8, p. 1877-1886, 2009.

CONTRI, R. V.; SOARES, R. M. D.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Structural analysis of chitosan hydrogels containing polymeric nanocapsules. **Materials Science & Engineering C**, v. 42, p. 234-242, 2014.

DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 8, p. 981-1014, 2011.

DELEZUK, J. A. M. **Produção de quitosanas com características controladas utilizando a irradiação de ultrassom de alta intensidade**. 2013. 210 f. Tese (Doutorado em Físico-Química) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.

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

DELIGKARIS, K.; TADELE, T. S.; OLTHUIS, W.; VAN DEN BERG, A. Hydrogel-based devices for biomedical applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 147, n. 2, p. 765-774, 2010.

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

DESAI, N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. **Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 14, n. 2, p. 282-295, 2012.

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

DIEZ-SALES, O.; DOLZ, M.; HERNÁNDEZ, M. J.; CASANOVAS, A.; HERRAEZ, M. Rheological characterization of chitosan matrices: influence of biopolymer concentration. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, n. 4, p. 2121-2128, 2007.

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 1, n. 6, p. 246-253, 1998.

EL-SHERBINY, I. M.; SMYTH, H. D. C. Controlled release pulmonary administration of curcumin using swellable biocompatible microparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 9, n. 2, p. 269-280, 2012.

FAN, W.; YAN, W.; XU, Z.; NI, H. Formation mechanism of monodisperse, low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, p. 21-27, 2012.

FANGKANGWANWONG, J.; AKASHI, M.; KIDA, T.; CHIRACHANCHAI, S. One-pot synthesis in aqueous system for water-soluble chitosan-graft-poly (ethylene glycol) methyl ether. **Biopolymers**, v. 82, n. 6, p. 580-586, 2006.

FANGKANGWANWONG, J.; AKASHI, M.; KIDA, T.; CHIRACHANCHAI, S. Chitosan-hydroxybenzotriazole aqueous solution: a novel water-based system for chitosan functionalization. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, n. 13, p. 1039-1046, 2006.

FOCHER, B.; BELTRAME, P. L.; NAGGI, A.; TORRI, G. Alkaline N-deacetylation of chitin enhanced by flash treatments. reaction kinetics and structure modifications. **Carbohydrate Polymers**, v. 12, n. 4, p. 405-418, 1990.

FUKADA, Y.; KIMURA, K.; AYAKI, Y. Effect of chitosan feeding on intestinal bile acid metabolism in rats. **Lipids**, v. 26, n. 5, p. 395-399, 1991.

GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. Chitosan-based drug nanocarriers: where do we stand? **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 2, p. 496-504, 2012.

GARDNER, K. H.; BLACKWELL, J. Refinement of the structure of β -chitin. **Biopolymers**, v. 14, n. 8, p. 1581-1595, 1975.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GONIL, P.; SAJOMSANG, W. Applications of magnetic resonance spectroscopy to chitin from insect cuticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 514-522, 2012.

GOROCHOVCEVA, N.; MAKUŠKA, R. Synthesis and study of water-soluble chitosan-O-poly(ethylene glycol)-graft-copolymers. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 4, p. 685-691, 2004.

GOTO, T.; MORISHITA, M.; KAVIMANDAN, N. J.; TAKAYAMA, K.; PEPPAS, N. A. Gastrointestinal transit and mucoadhesive characteristics of complexation hydrogels in rats. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 95, n. 2, p. 462-469, 2006.

GOTTLIEB, H. E.; KOTLYAR, V.; NUDELMAN, A. NMR chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 7512-7515, 1997.

GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A Review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.

GREF, R.; MINAMITAKE, Y.; PERACCHIA, M. T.; TRUBETSKY, V.; TORCHILIN, V.; LANGER, R. Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. **Science**, v. 263, n. 5153, p. 1600-1603, 1994.

HAGENAARS, N.; VERHEUL, R. J.; MOOREN, I.; DE JONG, P. H. J. L. F.; MASTROBATTISTA, E.; GLANSBEEK, H. L.; HELDENS, J. G. M.; VAN DEN BOSCH, H.; HENNINK, W. E.; JISKOOT, W. Relationship between structure and adjuvanticity of N,N,N-trimethyl chitosan (TMC) structural variants in a nasal influenza vaccine. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 140, n. 2, p. 126-133, 2009.

HALEY, B.; FRENKEL, E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 26, n. 1, p. 57-64, 2008.

HARRIS, J. M.; CHESS, R. B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 214-221, 2003.

HARRIS, J. M.; STRUCK, E. C.; CASE, M. G.; AL, H. E. T. Synthesis and characterization of poly(ethylene glycol) derivatives. **Journal of Polymer Science**, v. 22, n. 2, p. 341-352, 1984.

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

HEROLD, D. A.; KEIL, K.; BRUNS, D. E. Oxidation of polyethylene glycols by alcohol dehydrogenase. **Biochemical Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 73-76, 1989.

HIEMENZ, P. C.; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. New York: Marcel Dekker, 1997. 703 p.

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, A.; KAWANANI, T.; LLENA, J. F. Electron microscopy of the blood-brain barrier in disease. **Microscopy Research and Technique**, v. 27, n. 6, p. 543-556, 1994.

HIRANO, S.; TSUCHIDA, H.; NAGAO, N. N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis. **Biomaterials**, v. 10, n. 8, p. 574-576, 1989.

HOBBS, S. K.; MONSKY, W. L.; YUAN, F.; ROBERTS, W. G.; GRIFFITH, L.; TORCHILIN, V. P.; JAIN, R. K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, 1998, Cambridge. **Proceedings...** Massachusetts: The National Academy of Sciences of the USA, 1998. p. 4607-4612.

HU, Y.; JIANG, H.; XU, C.; WANG, Y.; ZHU, K. Preparation and characterization of poly(ethylene glycol)-g-chitosan with water- and organosolubility. **Carbohydrate Polymers**, v. 61, n. 4, p. 472-479, 2005.

HUGGINS, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. dependence on concentration. **Journal of the American Chemical Society**, v. 64, n. 1, p. 2716-2718, 1942.

ILLUM, L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 9, p. 1326-1331, 1998.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2014. p. 126.

JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; SUDHEESH KUMAR, P. T.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 3, p. 322-337, 2011.

JEONG, Y. I.; KIM, D. G.; JANG, M. K.; NAH, J. W. Preparation and spectroscopic characterization of methoxy poly(ethylene glycol)-grafted water-soluble chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 2, p. 282-289, 2008.

JINTAPATTANAKIT, A.; MAO, S.; KISSEL, T.; JUNYAPRASERT, V. B. Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 70, n. 2, p. 563-571, 2008.

KASAAI, M. R. Determination of the degree of N-acetylation for chitin and chitosan by various NMR spectroscopy techniques: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 79, n. 4, p. 801-810, 2010.

KAUR, S.; DHILLON, G. S. The versatile biopolymer chitosan: potential sources, evaluation of extraction methods and applications. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 155-175, 2014.

KLEINE-BRUEGGENEY, H.; ZORZI, G. K.; FECKER, T.; EL GUEDDARI, N. E.; MOERSCHBACHER, B. M.; GOYCOOLEA, F. M. A rational approach towards the design of chitosan-based nanoparticles obtained by ionotropic gelation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 99-108, 2015.

KNOP, K.; HOOGENBOOM, R.; FISCHER, D.; SCHUBERT, U. S. Poly(ethylene glycol) in drug delivery: pros and cons as well as potential alternatives. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, n. 36, p. 6288-6308, 2010.

KONG, C. S.; KIM, J. A.; AHN, B.; BYUN, H. G.; KIM, S. K. Carboxymethylations of chitosan and chitin inhibit MMP expression and ROS scavenging in human fibrosarcoma cells. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 2, p. 179-186, 2010.

KONO, H.; TESHIROGI, T. Cyclodextrin-grafted chitosan hydrogels for controlled drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 299-308, 2015.

KOZLOWSKI, A.; MILTON HARRIS, J. Improvements in protein PEGylation: pegylated interferons for treatment of hepatitis C. **Journal of Controlled Release**, v. 72, n. 1-3, p. 217-224, 2001.

KULICHE, W. M.; CLASEN, C. **Viscosimetry of polymers and polyelectrolytes**. Hamburg: Springer, 2004. 132 p.

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

KUMIRSKA, J.; CZERWICKA, M.; KACZYŃSKI, Z.; BYCHOWSKA, A.; BRZOZOWSKI, K.; THÖMING, J.; STEPNOWSKI, P. Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. **Marine Drugs**, v. 8, n. 5, p. 1567-1636, 2010.

LAMARQUE, G.; CRETENET, M.; VITON, C.; DOMARD, A. New route of deacetylation of α - and β -chitins by means of freeze - pump out - thaw cycles. **Biomacromolecules**, v. 6, n. 3, p. 1380-1388, 2005.

LAMARQUE, G.; DOMARD, A.; BERNARD, C.; LATARJET, B. A. Thermodynamic aspects of the heterogeneous deacetylation of β -chitin: reaction mechanisms. **Biomacromolecules**, v. 8, n. 6, p. 1942-1950, 2007.

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

LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. Beta-chitin from the pens of *Loligo* sp.: extraction and characterization. **Bioresource technology**, v. 98, n. 13, p. 2465-2472, 2007.

LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A. WANG, D.; BUSCHMANN, M. D.; GUPTA, A. A validated ^1H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, 2003.

LEBOUC, F.; DEZ, I.; DESBRIÈRES, J.; PICTON, L.; MADEC, P.-J. Different ways for grafting ester derivatives of poly(ethylene glycol) onto chitosan: related characteristics and potential properties. **Polymer**, v. 46, n. 3, p. 639-651, 2005.

LEHR, C. M.; BOUWSTRA, J. A.; SCHACHT, E. H.; JUNGINGER, H. E. In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 78, n. 1-3, p. 43-48, 1992.

LIÃO, L. M.; CHOZE, R.; CAVALCANTE, P. P. A.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de high resolution magic angle spinning (HR-MAS). **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 634-638, 2010.

LIU, L.; XU, X.; GUO, S.; HAN, W. Synthesis and self-assembly of chitosan-based copolymer with a pair of hydrophobic/hydrophilic grafts of polycaprolactone and poly(ethylene glycol). **Carbohydrate Polymers**, v. 75, n. 3, p. 401-407, 2009.

LÓPEZ-LÁRAZO, M. Anticancer and carcinogenic properties of curcumin: considerations for its clinical development as a cancer chemopreventive and chemotherapeutic agent. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 52, n. 1, p. 103-127, 2008.

LV, J.; QIAO, W.; XIONG, C. Synthesis and surface properties of a pH-regulated and pH-reversible anionic gemini surfactant. **Langmuir**, v. 30, n. 28, p. 8258-8267, 2014.

MAKUŠKA, R.; GOROCHOVCEVA, N. Regioselective grafting of poly(ethylene glycol) onto chitosan through C-6 position of glucosamine units. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 319-327, 2006.

MALHOTRA, M.; KULAMARVA, A.; SEBAK, S.; PAUL, A.; BHATHENA, J.; MIRZAEI, M.; PRAKASH, S. Ultrafine chitosan nanoparticles as an efficient nucleic acid delivery system targeting neuronal cells. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 35, n. 6, p. 719-726, 2009.

MALHOTRA, M.; LANE, C.; TOMARO-DUCHESNEAU, C.; SAHA, S.; PRAKASH, S. A novel method for synthesizing PEGylated chitosan nanoparticles: strategy, preparation, and in vitro analysis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p. 485-494, 2011.

MAO, S.; SHUAI, X.; UNGER, F.; SIMON, M.; Bi, D.; KISSEL, T. Synthesis, characterization and cytotoxicity of poly(ethylene glycol)-graft-trimethyl chitosan block copolymers. **Biomaterials**, v. 26, n. 32, p. 6343-6356, 2005.

MENARD, K. P. **Dynamic mechanical analysis: a Practical introduction**. New York: CRC, 2008. 214 p.

MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWA, S. Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal of the Applied Polymer Science**, v. 28, n. 6, p. 1909-1917, 1983.

MINKE, R.; BLACKWELL, J. The structure of α -Chitin. **Journal of Molecular Biology**, v. 120, n. 2, p. 167-181, 1978.

MOGHIMI, S. M.; HUNTER, A. C.; MURRAY, J. C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 283-318, 2001.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin**. London: Pergamon Press, 1977. 310 p.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitin nanostructures in living organisms. In: GUPTA, N. S (Ed.). **Chitin: formation and diagenesis**. New York: Springer, 2011. p. 1-34.

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

NAJAFABADI, A. H.; ABDOUSS, M.; FAGHIHI, S. Preparation and characterization of PEGylated chitosan nanocapsules as a carrier for pharmaceutical application. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, n. 3, p. 2312-2317, 2014.

NISHIMURA, S. I.; KOHGO, O.; KURITA, K.; KUZUHARA, H. Chemospecific manipulations of a rigid polysaccharide: syntheses of novel chitosan derivatives with excellent solubility in common organic solvents by regioselective chemical modifications. **Macromolecules**, v. 24, n. 17, p. 4745-4748, 1991.

NOVOA-CARBALLAL, R.; RIGUERA, R.; FERNANDEZ-MEGIA, E. Chitosan hydrophobic domains are favoured at low degree of acetylation and molecular weight. **Polymer**, v. 54, n. 8, p. 2081-2087, 2013.

OSORIO-MADRAZO, A.; DAVID, L.; TROMBOTTO, S.; LUCAS, J. M.; PENICHE-COVAS, C.; DOMARD, A. Kinetics study of the solid-state acid hydrolysis of chitosan: evolution of the crystallinity and macromolecular structure. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 5, p. 1376-1386, 2010.

OUCHI, T.; NISHIZAWA, H.; OHYA, Y. Aggregation phenomenon of PEG-grafted chitosan in aqueous solution. **Polymer**, v. 39, n. 21, p. 5171-5175, 1998.

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

PAPADIMITRIOU, S. A.; ACHILIAS, D. S.; BIKIARIS, D. N. Chitosan-g-PEG nanoparticles ionically crosslinked with poly(glutamic acid) and tripolyphosphate as protein delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, n. 1-2, p. 318-327, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**. Bellingham: Brooks/ Cole, Cengage Learning, 2007. 744 p.

PREGO, C.; TORRES, D.; FERNANDEZ-MEGIA, E.; NOVOA-CARBALLAL, R.; QUIÑOÁ, E.; ALONSO, M. J. Chitosan-PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. Effect of chitosan pegylation degree. **Journal of Controlled Release**, v. 111, n. 3, p. 299-308, 2006.

QIU, L. Y.; BAE, Y. H. Polymer architecture and drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 1, p. 1-30, 2006.

RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 34, n. 1, p. 21-28, 1997.

RHAZI, M.; DESBRIÈRES, J.; TOLAIMATE, A.; RINAUDO, M.; VOTTERO, P.; ALAGUI, A.; EL MERAY, M. Influence of the nature of the metal ions on the complexation with chitosan. **European Polymer Journal**, v. 38, n. 8, p. 1523-1530, 2002.

RICHARDSON, S. C. W.; KOLBE, H. V. J.; DUNCAN, R. Potential of low molecular mass chitosan as a DNA delivery system : biocompatibility , body distribution and ability to complex and protect DNA. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 178, n. 2, p. 231-243, 1999.

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

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

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

RODRIGUES, S.; COSTA, A. M. R. DA; GRENHA, A. Chitosan/carrageenan nanoparticles: effect of cross-linking with tripolyphosphate and charge ratios. **Carbohydrate Polymers**, v. 89, n. 1, p. 282-289, 2012.

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.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; OWEN, S. C. **Handbook of pharmaceutical excipients**. London: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 2006. 944 p.

RUOCCO, N.; FRIELINGHAUS, H.; VITIELLO, G.; D'ERRICO, G.; LEAL, L. G.; RICHTER, D.; ORTONA, O.; PADUANO, L. How hydrophobically modified chitosans are stabilized by biocompatible lipid aggregates. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 452, p. 160-168, 2015.

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.

SAITO, H.; WU, X.; HARRIS, J. M.; HOFFMAN, A. S. Graft copolymers of poly (ethylene glycol) (PEG) and chitosan. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 18, n. 7, p. 547-550, 1997.

SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. L. Structural data on the intra-crystalline swelling of β -chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 28, n. 1, p. 81-88, 2000.

SAITO, Y.; PUTAUX, J.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H. Structural aspects of the swelling of β chitin in HCl and its conversion into α chitin. **Macromolecules**, v. 30, p. 3867-3873, 1997.

SANNAN, T.; KURITA, L.; IWAKURA, Y. Studies on chitin, 1. Solubility change by alkaline treatment and film casting. **Die Makromolekulare Chemie**, v. 176, n. 4, p. 1191-1195, 1975.

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

SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y.; OGAWA, R.; TOKURA, S. Lysozyme susceptibility of partially deacetylated chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 12, n. 5, p. 295-296, 1990.

SCHIPPER, N. G. M.; VARUM, K. M.; ARTURSSON, P. Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1: influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells. **Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 11, p. 1686-1692, 1996.

SEHGAL, D.; VIJAY, I. K. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. **Analytical Biochemistry**, v. 218, n. 1, p. 87-91, 1994.

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

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

SILVA, F. C.; WEBER-NETO, J.; ZANFELICI, M. R. Comparação metodológica para abertura de resíduos sólidos orgânicos urbanos na determinação dos teores totais de metais pesados. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ENGINEERING AND COMPUTER EDUCATION, 2007, Santos. **Anais...** Clackamas: Science and Education Research Council, 2007, p. 501-504.

SILVA, F. V.; TREVIZAN, L. C.; SILVA, C. S.; NOGUEIRA, A. R. A.; NÓBREGA, J. A. Evaluation of inductively coupled plasma optical emission spectrometers with axially and radially viewed configurations. **Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy**, v. 57, n. 12, p. 1905-1913, 2002.

SINGH, R.; LILLARD, J. W. Nanoparticle-based targeted drug delivery. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 86, n. 3, p. 215-223, 2009.

SKOCAJ, M.; FILIPIC, M.; PETKOVIC, J.; NOVAK, S. Titanium dioxide in our everyday life; is it safe? **Radiology and Oncology**, v. 45, n. 4, p. 227-247, 2011.

SOARES, P. A. G.; BOURBON, A. I.; VICENTE, A. A.; ANDRADE, C. A. S.; BARROS, W.; CORREIA, M. T. S.; PESSOA, A.; CARNEIRO-DA-CUNHA, M. G. Development and characterization of hydrogels based on natural polysaccharides: policaju and chitosan. **Materials Science and Engineering: C**, v. 42, p. 219-226, 2014.

STORM, G.; BELLLOT, S. O.; DAEMEN, T.; LASIC, D. D. Surface modification of nanoparticles to oppose uptake by the mononuclear phagocyte system. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 17, n. 95, p. 31-48, 1995.

SUGIMOTO, M.; MORIMOTOB, M.; SASHIWAB, H.; SAIMOTOB, H.; SHIGEMASABL, Y. Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 36, n. 1, p. 49-59, 1998.

TA, H. T.; DASS, C. R.; DUNSTAN, D. E. Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 126, n. 3, p. 205-216, 2008.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIAL CONVENTION. **Revision Bulletin <232> Elemental Impurities - Limits**. Rockville, 2013. Disponível em:
< http://www.usp.org/sites/default/files/usp_pdf/EN/USPNF/key-issues/c232_final.pdf>.
Acesso em: 20 mar. 2015.

TSAO, C.; KIEVIT, F. M.; RAVANPAY, A.; ERICKSON, A. E.; JENSEN, M. C.; ELLENBOGEN, R. G.; ZHANG, M. Thermoreversible poly(ethylene glycol)-g-chitosan hydrogel as a therapeutic T lymphocyte depot for localized glioblastoma immunotherapy. **Biomacromolecules**, v. 15, n. 7, p. 2656-2662, 2014.

VARUM, K. M.; ANTHONSEN, M. W.; GRASDALEN, H.; SMIDSROD, 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.

VASCONCELOS, C. L.; BEZERRIL, P. M.; PEREIRA, M. R.; GINANI, M. F.; FONSECA, J. L. C. Viscosity-temperature behavior of chitin solutions using lithium chloride/DMA as solvent. **Carbohydrate Research**, v. 346, n. 5, p. 614-618, 2011.

VELOSO, D. P.; SEIDL, P. R.; CABRAL DE MENEZES, S. M. Parâmetros e símbolos a serem utilizados em ressonância magnética nuclear. **Química Nova**, v. 22, n. 4, p. 622-629, 1999.

VERONESE, F. M.; PASUT, G. PEGylation , successful approach to drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 21, p. 1451-1458, 2005.

VERT, M.; DOI, Y.; HELLWICH, K. H.; HESS, M.; HODGE, P.; KUBISA, P.; RINAUDO, M.; SCHUÉ, F. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012). **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 2, p. 377-410, 2012.

WEDMORE, I.; MCMANUS, J. G.; PUSATERI, A. E.; HOLCOMB, J. B. A special report on the chitosan-based hemostatic dressing: experience in current combat operations. **The Journal of Trauma Injury, Infection, and Critical Care**, v. 60, n. 3, p. 655-658, 2006.

XING, R.; LIU, S.; GUO, Z.; YU, H.; ZHONG, Z.; JI, X.; LI, P. Relevance of molecular weight of chitosan-N-2-hydroxypropyl trimethyl ammonium chloride and their antioxidant activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 2, p. 336-340, 2008.

XU, S.; HELD, I.; KEMPF, B.; MAYR, H.; STEGLICH, W.; ZIPSE, H. The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols - A mechanistic study (DMAP = 4-(dimethylamino)pyridine). **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 16, p. 4751-4757, 2005.

YALLAPU, M. M.; JAGGI, M.; CHAUHAN, S. C. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. **Drug Discovery Today**, v. 17, n. 1-2, p. 71-80, 2012.

YANG, X.; ZHANG, Q.; WANG, Y.; CHEN, H.; ZHANG, H.; GAO, F.; LIU, L. Self-aggregated nanoparticles from methoxy poly(ethylene glycol)-modified chitosan: synthesis; characterization; aggregation and methotrexate release in vitro. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 61, n. 2, p. 125-131, 2008.

YOKSAN, R.; AKASHI, M.; HIWATARI, K.; CHIRACHANCHAI, S. Controlled hydrophobic / hydrophilicity of chitosan for spheres without specific processing. **Biopolymers**, v. 69, n. 3, p. 386-390, 2003.

YOKSAN, R.; MATSUSAKI, M.; AKASHI, M.; CHIRACHANCHAI, S. Controlled hydrophobic/hydrophilic chitosan: colloidal phenomena and nanosphere formation. **Colloid & Polymer Science**, v. 282, n. 4, p. 337-342, 2004.

ZHANG, X. G.; TENG, D. Y.; WU, Z. M.; WANG, X.; WANG, Z.; YU, D. M.; LI, C. X. PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein release. **Journal of Materials Science. Materials in Medicine**, v. 19, n. 12, p. 3525-3533, 2008.

ZHONG, Z.; LI, P.; XING, R.; LIU, S. Antimicrobial activity of hydroxylbenzenesulfonamides derivatives of chitosan, chitosan sulfates and carboxymethyl chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 45, n. 2, p. 163-168, 2009.

APÊNDICE

Tabela 1A - Concentrações dos metais analisados nas amostras antes e depois da purificação (QN e Q, respectivamente) em relação aos limites permitidos pela ANVISA e Farmacopeia (EUA) para administração de fármacos e excipientes por via parenteral.

Metal	LOD (ppb)	QN (ppm)	Q (ppm)	ANVISA (ppm)	Farmacopeia (EUA) (ppm)
Al	31,596	39,896 ± 1,218	32,896 ± 4,682	-	-
As	1,729	< 1,729.10 ⁻³	< 1,729.10 ⁻³	0,15	0,15
Cd	0,628	< 0,628.10 ⁻³	< 0,628.10 ⁻³	0,05	0,25
Co	1,898	< 1,898.10 ⁻³	< 1,898.10 ⁻³	-	-
Cr	2,563	1,716 ± 0,089	1,569 ± 0,322	2,5	25
Cu	2,468	11,131 ± 0,979	5,674 ± 0,628	25	10
Hg	16,636	< 16,636.10 ⁻³	< 16,636.10 ⁻³	0,15	0,15
Mn	3,830	1,911 ± 0,085	< 3,830.10 ⁻³	25	-
Mo	0,596	< 0,596.10 ⁻³	< 0,596.10 ⁻³	2,5	1,0
Ni	6,822	46,574 ± 2,462	42,376 ± 1,155	2,5	5,0
Pb	9,567	0,342 ± 0,457	0,057 ± 0,078	0,1	0,5
Ti	11,271	< 11,271.10 ⁻³	< 11,271.10 ⁻³	-	-

Tabela 2A - Concentrações dos metais analisados nos gládios de lula (GL), β-quitina (βQ) e nas amostras QD1x, QD2x e QD3x.

Metal	GL (ppm)	βQ (ppm)	QD1x (ppm)	QD2x (ppm)	QD3x (ppm)
Al	12,581 ± 3,732	35,775 ± 3,534	109,29 ± 10,915	139,033 ± 7,318	120,264 ± 11,475
As	1,803 ± 1,630	0,139 ± 0,458	< 1,729.10 ⁻³	< 1,729.10 ⁻³	< 1,729.10 ⁻³
Cd	5,680 ± 0,102	< 0,628.10 ⁻³	< 0,628.10 ⁻³	< 0,628.10 ⁻³	< 0,628.10 ⁻³
Co	0,064 ± 0,020	< 1,898.10 ⁻³	< 1,898.10 ⁻³	< 1,898.10 ⁻³	< 1,898.10 ⁻³
Cr	0,590 ± 0,411	0,840 ± 0,087	2,022 ± 0,045	3,296 ± 0,305	3,363 ± 0,459
Cu	48,710 ± 2,473	7,566 ± 0,184	17,582 ± 5,290	20,413 ± 1,434	17,773 ± 3,609
Hg	9,180 ± 3,320	1,762 ± 0,534	< 16,636.10 ⁻³	< 16,636.10 ⁻³	< 16,636.10 ⁻³
Mn	0,442 ± 0,050	0,021 ± 0,098	< 3,830.10 ⁻³	< 3,830.10 ⁻³	< 3,830.10 ⁻³
Mo	2,673 ± 0,253	0,871 ± 1,193	< 0,596.10 ⁻³	< 0,596.10 ⁻³	< 0,596.10 ⁻³
Ni	2,570 ± 0,532	0,376 ± 0,066	0,659 ± 0,222	3,637 ± 0,182	2,144 ± 0,204
Pb	0,530 ± 0,400	0,459 ± 0,137	0,242 ± 0,061	0,224 ± 0,092	< 9,567.10 ⁻³
Ti	1,892 ± 1,102	< 11,271.10 ⁻³	746,0641 ± 56,339	1122,528 ± 39,225	1223,479 ± 115,646