UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Latenciação de hidroximetilnitrofural com derivados de quitosana,
potencialmente ativos em leishmaniose e doença de Chagas

Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientador:
Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira

São Paulo
2005

18.276

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011174

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos
S237L. Latenciação de hidroximetilnitrofurais com derivados
de quitosana, potencialmente ativos em leishmaniose e doença de
Chagas / Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos. -- São
Paulo, 2005.

lv.(Várias paginações)

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Ferreira, Elizabeth Igne

I. Latenciação : Química farmacêutica 2. Polímeros :
Química farmacêutica 3. Fármaco : Planejamento : Química
farmacêutica I. T. II. Ferreira, Elizabeth Igne, orientador.

615.19 CDD

Kátia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos

Latenciação de hidroximetilnitrofural com derivados de quitosana,
potencialmente ativos em leishmaniose e doença de Chagas

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

3º. examinador

4º. examinador

São Paulo, ^{16/05/02} ____ de ____ de ____.

Dedico este trabalho:

*Primeiramente, a Deus,
pelo caminho traçado.
Costumo dizer que sinto a mão de Deus
guiando meus passos...*

*Aos meus amados pais,
Antonio e Elizete,
pelo amor com que conceberam minha vida,
pela dedicação,
pelo exemplo,
e pelo incentivo nos momentos mais difíceis.
Sinto muitas saudades por ter tido que me separar de vocês
para a realização deste trabalho...*

*Ao meu querido irmão,
Fábio,
de quem a saudade também é imensa,
reflexo do profundo amor que mantemos,
mesmo depois das brigas cinematográficas da infância...*

*Às minhas famílias,
Cardoso, Santos e Geraldí,
por todo amor, todo aporte e consolo.
Espero sempre merecer o orgulho que sentem por mim,
assim como o sinto por ser parte dessa história.
Amo todos vocês...*

*Ao meu noivo e futuro esposo,
Rodney,
pelo amor que você me devota,
por meus defeitos que você nem nota...
por meus valores que você aumenta,
por minha fé que você alimenta...
por esta paz que nós nos transmitimos
por este pão de amor que repartimos...
pelo silêncio que diz quase tudo,
por este olhar que me reprova mudo...
pela pureza dos seus sentimentos,
pela presença em todos os momentos...
por ser presente, mesmo quando ausente,
por ser feliz quando me vê contente...
por ficar triste, quando estou tristonha,
por rir comigo quando estou risonha...
por repreender-me quando estou errada,
mas por ter me dito durante a jornada:
"Anjinho, não se deixe abater.
Continue em frente e você vai ver!"*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Elizabeth Igne Ferreira, a Beth, orientadora, amiga, companheira, “mãe”, incentivadora nos momentos difíceis e grande idealizadora deste trabalho. Obrigada pela oportunidade, por acreditar em mim e me fazer acreditar.

À Profa. Dra. Maria Helena Gil, pela calorosa recepção, amizade, sugestões e orientação durante o Estágio de Doutorado “Sanduíche”, realizado em Portugal, no Laboratório de Biomateriais da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

À Profa. Dra. Tereza Neuma de Castro Dantas, indiretamente responsável por esta conquista, por ter me apresentado ao mundo científico e amadurecido minha vocação acadêmica durante a iniciação científica.

Aos professores Dr. Carlos Alberto Brandt, Dr. Roy Edward Bruns e Dra. Maria Amélia Barata da Silveira, pela amizade, pelos ensinamentos e valiosas contribuições em todas as fases deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Cotrim, à Mestre Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro e Juliana Ide Aoki, do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, não só pelos ensaios de atividade leishmanicida dos derivados sintetizados, mas pelo nítido interesse e apoio.

À Profa. Dra. Olga Zazuko Higa e Solange Lorenzetti, do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, pela presteza e ajuda na realização dos ensaios de citotoxicidade.

À Paula Ferreira e Isabel Pinto, pelas análises do potencial trombogênico e hemolítico, e Jorge Coelho, pela ajuda com a caracterização térmica dos compostos poliméricos, ambos da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra e amigos que fazem imensa falta.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos, do Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, por ceder o laboratório durante os fins de semana. Obrigada pelo apoio e compreensão.

À Profa. Dra. Rosângela Balaban Garcia, do Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, pela determinação da massa molecular das amostras de quitosana e pelos ensinamentos durante a graduação.

À, Nara Lúcia Ricelli, por ter me ajudado a ingressar nesta pós-graduação, sanando minhas dúvidas e repartindo material de estudo. Companheira de bancada, de sala de aula, de alegrias, de tristezas, de signo (gêmeos),..., obrigada por simplesmente ser minha amiga.

À Daniela Gonçalves Rando, por sempre dispor de respostas às minhas perguntas, pela ajuda na bancada, mas, principalmente, pela amizade que extravasa o laboratório e adentra nossa casa. Obrigada por repartir comigo até mesmo a alegria do lar.

À Ana Cláudia Melo Pompeu da Silva, Camila Garcel Pancote e Emmanuelle de Paiva Telemaco, antigas colegas de apartamento e de pós-graduação que representaram meu porto-seguro longe dos meus pais. Vocês também contribuíram para a realização deste sonho.

À Michelle Carneiro Polli, meus sinceros agradecimentos pela paciência em me apoiar nos primeiros momentos dentro do laboratório.

Ao amigo de longa data, Hêlio Santa Rosa Costa Silva, pela sintonia com que trabalhamos juntos, desde a iniciação científica, pelas dúvidas repartidas e pelas discussões filosóficas produtivas.

Ao Charles de Lima Brito, Kátia Cilene Botelho e Maria Inês de Almeida Gonçalves, pelo auxílio técnico.

Aos colegas de laboratório no Brasil, Carla, Claudia, Diogo, Fabrício, Guilherme, Gustavo, Jeanine, João Paulo, Juliana, Mauro, Mauro Júnior, Mayte, Mercedes, Priscila, Roberto e Vanesca, pela convivência e bons ensinamentos;

Aos amigos em Portugal, Ana Margarida, Antonio, Carla, Dulce, Isabel, Joana, João, Jorge Coelho, Prof. Dr. Jorge Lemos, Paula, Rosa e Zé Felipe, obrigada pelo carinho com que me receberam, minimizando as saudades de casa, e por tornar o trabalho no laboratório sempre uma grande brincadeira;

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Bete, Celi, Elaine, Jorge e Suzy, sempre solícitos e atenciosos;

Ao CNPq e à CAPES, pela concessão das bolsas de estudo no Brasil e no exterior, respectivamente;

Aos meus familiares, pelo apoio incondicional e pela torcida: aqui está ela!;

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, torceram por mim e colaboraram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigado.

*V*encer não é nada, se não se teve muito trabalho;
fracassar não é nada, se se fez o melhor possível.

Nadia Boulanger
pianista

RESUMO

Leishmaniose e doença de Chagas são parasitoses endêmicas causadas, respectivamente, pelos protozoários *Leishmania spp.* e *Trypanosoma cruzi*. Ante à escassez de quimioterápicos, à elevada toxicidade dos fármacos disponíveis e à baixa eficácia destes no combate às formas intracelulares, replicantes, dos parasitos há necessidade de buscar novas alternativas quimioterápicas. A atividade tripanomicida do hidroximetilnitrofural, base de Mannich do nitrofural, já era conhecida. O presente trabalho mostra que este derivado também apresenta atividade leishmanicida, quando ensaiado em formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. braziliensis*. Com o objetivo de obter pró-fármacos potencialmente ativos em doença de Chagas e leishmanioses visceral e mucocutânea, planejaram-se e foram sintetizados derivados hidrossolúveis de hidroximetilnitrofural e quitosana, polissacarídeo que apresenta, também, atividade imunomoduladora. Para a aplicação tópica em leishmaniose cutânea sintetizaram-se membranas de quitosana ligada ao hidroximetilnitrofural. Membranas de quitosana copolimerizadas com enxertos de ácido acrílico e metacrilato de hidroxietila foram sintetizadas e avaliadas quanto à biocompatibilidade – trombogenicidade, citotoxicidade e potencial hemolítico. Aquelas com maior teor em metacrilato de hidroxietila não se mostraram citotóxicas, tampouco hemolíticas; aquelas com maior proporção em ácido acrílico, por sua vez, apresentaram excelentes características de intumescimento, mas certo grau de citotoxicidade e hemólise, possivelmente devido à presença de monômeros que não reagiram no material. A ligação do hidroximetilnitrofural à quitosana, por meio de espaçante succínico, produziu pró-fármaco com propriedades filmogênicas para a aplicação tópica. Os derivados obtidos – pró-fármacos e transportadores (quitosanas modificadas) – foram analisados no infravermelho, por ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C) e por análise térmica – DMTA, TG, DSC. Ensaio de atividade tripanomicida e leishmanicida dos pró-fármacos poliméricos e membranas serão posteriormente efetuados.

SUMMARY

Leishmaniasis and Chagas' disease are endemic parasitosis provoked by the protozoa *Leishmania spp* and *Trypanosoma cruzi*, respectively. Due to the scarce chemotherapy, to the high toxicity of the available drugs and to their low effectiveness, mainly in the treatment of intracellular replicant forms of those parasites, the search for new chemotherapeutic alternatives is extremely important. Hydroxymethylnitrofurazone, a nitrofurazone Mannich basis, has proven to be active against trypanomycide before and its activity in cultures of *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. braziliensis* promastigotes was determined in this work. With the purpose of obtaining prodrugs potentially active in Chagas' disease and visceral and mucocutaneous leishmaniasis, hydrosoluble hydroxymethylnitrofurazone prodrugs have been designed and synthesized using chitosan, a polysaccharide showing immunomodulatory activity, as the carrier. Membranes from chitosan linked with hydroxymethylnitrofurazone have been synthesized for topical administration in cutaneous leishmaniasis. Membranes were obtained by graft copolymerization of hydroxyethylmethacrylate and acrylic acid onto chitosan and their biocompatibility – thrombogenicity, cytotoxicity and hemolysis potential – was evaluated. Those membranes with higher content of hydroxyethylmethacrylate showed to be neither cytotoxic nor hemolytic; those with higher content of acrylic acid showed good swelling properties, although a certain level of cytotoxicity and haemolysis has been detected, due to the presence of non-reacted monomers. The linkage of hydroxymethylnitrofurazone to chitosan by a succinyl spacer group led to a prodrug with filmogenic properties for topical administration. The derivatives obtained – prodrugs and carriers (modified chitosans) – were analyzed by infrared, nuclear magnetic resonance (^1H NMR and ^{13}C NMR) and by thermal analysis – DMTA, TG and DSC. Tests of trypanomycide and leishmanicide activity with polymer prodrugs and membranes will be further developed.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA II.1. Distribuição geográfica da co-infecção da leishmaniose visceral e HIV, em 1997.....	6
FIGURA II.2. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, em 1996.....	6
FIGURA II.3. Fotografias dos mosquitos (a) <i>Phlebotomus</i> e (b) <i>Lutzomyia</i>	7
FIGURA II.4. Formas (a) promastigotas e (b) amastigotas da <i>Leishmania spp.</i>	8
FIGURA II.5. Ciclo vital da <i>Leishmania spp.</i>	9
FIGURA II.6. Fotografias ilustrativas de casos de leishmaniose (a) visceral, (b) mucocutânea e (c) cutânea.....	10
FIGURA II.7. Distribuição geográfica da doença de Chagas.....	13
FIGURA II.8. Fotografia do <i>Triatoma infestans</i> no ato da hematofagia.....	14
FIGURA II.9. Micrografias das formas (a) amastigota, (b) epimastigota e (c) tripomastigota.....	14
FIGURA II.10. Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	15
FIGURA II.11. Ilustrações do (A) sinal de Romana da fase aguda, (B) Raio-X de tórax mostrando aumento do coração e (C) cardiomegalia da fase crônica da doença de Chagas.....	17
FIGURA II.12. NF ou NF ou 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona ou 2-[(5-nitro-2-furanil) metileno]-hidrazinocarboxamida.....	19
FIGURA II.13. NFOH.....	21
FIGURA II.14. Efeito de NF (5 e 10 μ M) e NFOH (5 e 10 μ M), comparados ao BZ (10 μ M), sobre o número de formas amastigotas de <i>T. cruzi</i> em cultura de células LLC-MK ² infectadas após 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias da infecção.....	22
FIGURA II.15. Efeito de NF (5 e 10 μ M) e NFOH (5 e 10 μ M), comparados ao BZ (10 μ M), sobre o número de formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> em cultura de células LLC-MK ² infectadas após 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias da infecção.....	22
FIGURA II.16. Possíveis estruturas do homopolímero e dos copolímeros compostos pelos monômeros hipotéticos A e B.....	25
FIGURA II.17. Representação esquemática dos polímeros ou copolímeros (a) linear, (b) ramificado ou (c) em forma de rede.....	26
FIGURA II.18. Polimerização em cadeia: (a) monômeros não-reagidos; (b) monômeros 50% reagidos; (c) monômeros 75% reagidos; (d) monômeros 100% reagidos.....	26
FIGURA II.19. Mecanismo de iniciação física pela decomposição térmica do monômero: colisões bimoleculares formam birradicais diméricos....	28
FIGURA II.20. Mecanismo de iniciação física pela radiação ultravioleta do monômero: formação de birradicais monoméricos.....	28
FIGURA II.21. Mecanismo de iniciação pela decomposição térmica (a) do peróxido de benzoíla, (b) da α,α' -azo-bis-isobutironitrila e (c) persulfato de potássio, seguido pelo mecanismo de ativação do monômero vinílico.....	30
FIGURA II.22. Mecanismo de iniciação por oxidorredução do persulfato com tiosulfato como agente redutor.....	31

FIGURA II.23. Mecanismo de iniciação aniônica provocada pelo butil-lítio.....	33
FIGURA II.24. Mecanismo de iniciação catiônica provocada pelo tetracloreto de titânio.....	34
FIGURA II.25. Mecanismo de iniciação catiônica provocada pelo sistema catalítico Ziegler-Natta.....	35
FIGURA II.26. Mecanismo de terminação em polimerização iniciada pelo sistema catalítico Ziegler-Natta.....	36
FIGURA II.27. Polimerização em etapas: (a) monômeros não-reagidos; (b) monômeros 50% reagidos; (c) monômeros 75% reagidos; (d) monômeros 100% reagidos.....	37
FIGURA II.28. Exemplos de importantes reações de policondensação por mecanismo de polimerização em etapas: (a) poliesterificação; (b) inter-esterificação; (c) poliamidação e (d) auto-condensação de um monômero A-B.....	38
FIGURA II.29. (a) polimerização em etapa de poliuretano por processo de adição e (b) polimerização em cadeia do diazometano por condensação.....	40
FIGURA II.30. Estruturas parciais da quitina e quitosana.....	41
FIGURA II.31. Processo de obtenção da quitosana.....	42
FIGURA II.32. Lisozima, normalmente produzida por macrófagos, hidrolisa quitosana a oligômeros que ativam macrófagos a produzir interferona, fator de necrose tumoral e interleucina-1.....	47
FIGURA II.33. Esquema da pele em corte transversal.....	57
FIGURA II.34. Representação esquemática do uso de pró-fármacos na terapia tópica.....	58
 FIGURA III.1. Representação esquemática do objetivo inicial de derivatização da quitosana com espaçantes succinóico, carboximetílico e carboxibutílico para posterior latenciação do NFOH.....	65
FIGURA III.2. Representação esquemática da síntese do pró-fármaco de NFOH sob filme de quitosana previamente formado pelo enxerto de AA e HEMA.....	66
FIGURA III.1. Representação esquemática da derivatização do NFOH com espaçantes succinóico para posterior latenciação na quitosana.....	67
 FIGURA V.1. Fotografia de cultura de macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> 4 dias após a administração de NFOH a 32 μ M.....	102
FIGURA V.2. Fotografia de cultura de macrófagos infectados com formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i> 4 dias após a administração de NFOH a 64 μ M.....	102
FIGURA V.3. Fotografia das amostras de quitosana (a) PADETEC, (b) Sigma AMM, (c) Sigma MMM e (d) Sigma BMM, solubilizadas em meio aquoso levemente ácido.....	107

FIGURA V.4. Fotografia das membranas de quitosana (M1), quitosana com enxerto de HEMA (M2), quitosana com enxerto de AA (M3) e quitosana com enxerto de HEMA e AA na proporção de 3:1 (M4), 1:3 (M5) e 1:1 (M6), obtidas na sexta série experimental, logo após secagem em estufa.....	142
FIGURA V.5. Fotografia das membranas de quitosana (M1), quitosana com enxerto de HEMA (M2), quitosana com enxerto de AA (M3) e quitosana com enxerto de HEMA e AA na proporção de 3:1 (M4), 1:3 (M5) e 1:1 (M6), obtidas na sexta série experimental, após etapa de neutralização.....	142
FIGURA VI.1. Representação química das moléculas de quitina, quitosana e SCQ.....	171
FIGURA VI.2. Diagrama do planejamento fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central (a) esquematizado de forma genérica e (b) representando as reais condições do planejamento nas ordenadas e os ensaios indicados com os respectivos números nos pontos correspondentes.....	175
FIGURA VI.3. Representação química da molécula de quitosana funcionalizada, que esquematiza, da esquerda para a direita, monômeros acetilado, desacetilado, substituído pela carboxibutílica e substituído pela 5-metilpirrolidinona.....	176
FIGURA VI.4. (a) Diagrama genérico do planejamento fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central com os ensaios indicados nos pontos correspondentes e (b) diagrama com as respostas do GS (%) da CBQ e 5-MPQ indicadas, respectivamente, em azul e vermelho, nos pontos equivalentes aos ensaios que correspondem..	177
FIGURA VI.5. (a) Diagrama genérico do planejamento fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central com os ensaios indicados nos pontos correspondentes e (b) diagrama de respostas do percentual relativo de CBQ (azul) e 5-MPQ (vermelho) ao GS total (CBQ + 5-MPQ).....	179
FIGURA VI.6. Representação da formação de radicais livres do nitrato de cério e amônio na imina e nas carboxilas C ₃ e C ₆ da quitosana.....	187
FIGURA VI.6. Ciclização do espaçante carboxibutílica provocada pelas carbodiimidas.....	200

LISTA DE TABELAS

TABELA II.1. Estruturas dos monômeros de ácido acrílico (AA) e metacrilato de hidroxietila (HEMA) e seus respectivos polímeros.....	24
TABELA II.2. Tipos de iniciação na polimerização por adição.....	28
TABELA II.3. Classificação genérica de alguns polímeros obtidos por reações de condensação.....	37
TABELA II.4. Comparação entre as polimerizações de condensação e adição.....	39
TABELA V.1. Comparação dos valores de IC ₅₀ dos compostos frente às diferentes espécies de <i>Leishmania</i>	101
TABELA V.2. Massa molar das amostras de quitosana determinada por viscosimetria.....	107
TABELA V.3. Grau de desacetilação determinado pela análise em IV de filmes de quitosana a 0,25%.....	109
TABELA V.4. Grau de desacetilação determinado por RMN.....	112
TABELA V.5. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da CBQ.....	119
TABELA V.6. Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da CBQ.....	120
TABELA V.7. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da 5-MPQ.....	121
TABELA V.8. Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da 5-MPQ.....	122
TABELA V.9. Solubilidade e teor de carboxila livre dos derivados poliméricos.....	131
TABELA VI.1. Condições para a síntese de SCQ.....	170
TABELA VI.2. Condições para a síntese de CBQ.....	172
TABELA VI.3. Planejamento fatorial 3 ² com quadruplicata no ponto central.....	175
TABELA VI.4. Percentual do GS da CBQ e 5-MPQ e percentual relativo de CBQ e 5-MPQ ao GS total (CBQ + 5-MPQ).....	178
TABELA VI.5. Condições para a síntese de CMQ.....	182
TABELA VI.6. Planejamento inicial de síntese dos copolímeros de enxerto.....	187
TABELA VI.7. Planejamento estequiométrico para a síntese dos copolímeros de enxerto.....	190
TABELA VI.8. Classificação do potencial hemolítico dos materiais, de acordo com o percentual de hemólise.....	197
TABELA A.1. Integrais dos espectros de RMN ¹ H dos ensaios para cálculo do GS da CBQ e 5-MPQ.....	xx

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA IV.1. Síntese do NFOH.....	72
ESQUEMA IV.2. Síntese do SCNFOH.....	72
ESQUEMA IV.3. Síntese do SCQ.....	73
ESQUEMA IV.4. Síntese da CBQ.....	74
ESQUEMA IV.5. Síntese da imina da CBQ.....	75
ESQUEMA IV.6. Síntese da CMQ.....	75
ESQUEMA IV.7. Síntese da MFQ.....	76
ESQUEMA IV.8. Síntese dos copolímeros de enxerto da quitosana com AA e HEMA.....	77
ESQUEMA IV.9. Síntese do pró-fármaco com a CBQ como transportador.....	79
ESQUEMA IV.10. Síntese da 5-MPQ com NFOH.....	80
ESQUEMA IV.11. Síntese da imina da CBQ com NFOH.....	81
ESQUEMA IV.12. Síntese da membrana de quitosana copolimerizada com AA com NFOH.....	81
ESQUEMA IV.13. Síntese da quitosana com SCNFOH.....	82
ESQUEMA IV.14. Síntese da MFQ com SCNFOH.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO V.1. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N ₂ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ do NFOH.....	99
GRÁFICO V.2. Curvas de inibição de crescimento de <i>L. chagasi</i> pelo NF, NFOH e SCNFOH.....	100
GRÁFICO V.3. Curvas de inibição de crescimento de <i>L. braziliensis</i> pelo NF, NFOH e SCNFOH.....	100
GRÁFICO V.4. Curvas de inibição de crescimento de <i>L. amazonensis</i> pelo NF, NFOH e SCNFOH.....	101
GRÁFICO V.5. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N ₂ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ do SCNFOH.....	106
GRÁFICO V.6. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N ₂ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ de filme de quitosana Sigma MMM.....	113
GRÁFICO V.7. Sobreposição das curvas obtidas na análise de DMTA para filmes de quitosana secados em estufa a vácuo por 24 horas (♦), com 15% (◊), 38% (◆) e 150% de umidade (♦).....	114
GRÁFICO V.8. Superfície de resposta para o grau de substituição da CBQ no polímero descrita pela equação linear $\hat{y} = 20,27 (\pm 1,35) - 5,82 (\pm 1,84) x_2$, no nível de 95% de confiança.....	119
GRÁFICO V.9. Superfície de resposta para o grau de substituição da CBQ no polímero descrita pela equação quadrática $\hat{y} = 24,66 (\pm 2,18) + 5,55 (\pm 1,87) x_1 - 6,93 (\pm 1,87) x_2 - 6,92 (\pm 2,90) x_1^2 - 0,75 (\pm 2,90) x_2^2 + 5,63 (\pm 2,23) x_1 x_2$, no nível de 95% de confiança.....	120
GRÁFICO V.10. Superfície de resposta para o grau de substituição da 5-MPQ no polímero descrita pela equação linear $\hat{y} = 6,44 (\pm 0,38) - 1,86 (\pm 0,52) x_1 + 1,44 (\pm 0,52) x_2$, no nível de 95% de confiança...	121
GRÁFICO V.11. Superfície de resposta para o grau de substituição da 5-MPQ no polímero descrita pela equação quadrática $\hat{y} = 6,54 (\pm 0,61) - 1,67 (\pm 0,52) x_1$, no nível de 95% de confiança.....	122
GRÁFICO V.12. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N ₂ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ da MFQ.....	130
GRÁFICO V.13. Sobreposição das curvas obtidas na análise de DMTA das membranas (♦) M1, com 15% de umidade, (♦) M2, (♦) M3, (♦) M4, (♦) M5 e (♦) M6, obtidas na execução da sexta série experimental.....	136
GRÁFICO V.14. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N ₂ e razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹ da M3.....	137
GRÁFICO V.15. Capacidade de intumescimento (Q) das membranas obtidas, em triplicatas, na sexta série experimental.....	143
GRÁFICO V.16. Citotoxicidade (IC) das membranas obtidas, em triplicatas, na sexta série experimental, sem lavagem em aparelho de soxhlet..	144
GRÁFICO V.17. Citotoxicidade (IC) das membranas, após lavagem em aparelho de soxhlet.....	144

LISTA DE ESPECTROS

ESPECTRO V.1. Espectro de IV do NFOH.....	96
ESPECTRO V.2. Espectro de RMN ^1H do NFOH.....	97
ESPECTRO V.3. Espectro de RMN ^{13}C do NFOH.....	98
ESPECTRO V.4. Espectro de IV do SCNFOH.....	103
ESPECTRO V.5. Espectro de RMN ^1H do SCNFOH.....	104
ESPECTRO V.6. Espectro de RMN ^{13}C do SCNFOH.....	105
ESPECTRO V.7. Espectro alinhados de IV de filmes das amostras de quitosana..	108
ESPECTRO V.8. Espectro de RMN ^1H da quitosana Sigma MMM a 70 °C.....	110
ESPECTRO V.9. Espectro de RMN ^{13}C da quitosana Sigma MMM a 70 °C.....	111
ESPECTRO V.10. Espectro de IV da SCQ.....	115
ESPECTRO V.11. Espectro de IV da CBQ.....	116
ESPECTRO V.12. Espectro de RMN ^1H da CBQ a 70 °C.....	117
ESPECTRO V.13. Espectro de RMN ^{13}C da CBQ a 70 °C.....	118
ESPECTRO V.14. Espectro de RMN ^1H da imina daCBQ a 70 °C.....	123
ESPECTRO V.15. Espectro de RMN ^{13}C imina da da CBQ a 70 °C.....	124
ESPECTRO V.16. Espectro de IV da CMQ.....	125
ESPECTRO V.17. Espectro de RMN ^1H da CMQ a 70 °C.....	126
ESPECTRO V.18. Espectro de RMN ^{13}C da CMQ a 70 °C.....	127
ESPECTRO V.19. Espectro de RMN ^1H da MFQ a 70 °C.....	128
ESPECTRO V.20. Espectro de RMN ^{13}C da MFQ a 70 °C.....	129
ESPECTRO V.21. Espectros alinhados de IV das membranas obtidas na execução da terceira série experimental.....	132
ESPECTRO V.22. Espectros alinhados de IV das membranas obtidas na execução da sexta série experimental.....	134
ESPECTRO V.23. Espectro de RMN ^1H a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.....	138
ESPECTRO V.24. Espectro de RMN ^{13}C a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.....	139
ESPECTRO V.25. Espectro de HETCOR a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.....	140
ESPECTRO V.26. Espectro DEPT a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.....	141
ESPECTRO V.27. Espectro de IV da tentativa de obtenção do pró-fármaco com CBQ por CTF com Herquat®	146
ESPECTRO V.28. Espectro de IV da tentativa de obtenção do pró-fármaco com CBQ por catálise enzimática com a protease Proleather®	147
ESPECTRO V.29. Espectro de IV da tentativa de obtenção do pró-fármaco com CBQ por formação de cloreto de ácido.....	148
ESPECTRO V.30. Espectro de RMN ^1H a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando quitosana como transportador.....	151

ESPECTRO V.31. Espectro de RMN ^{13}C a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando quitosana como transportador.....	152
ESPECTRO V.32. Espectro de RMN ^1H a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando MFQ como transportador.....	155
ESPECTRO V.32. Espectro de RMN ^{13}C a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando MFQ como transportador.....	156
ESPECTRO A.1. Espectro de IV do NF.....	ii
ESPECTRO A.2. Espectro de RMN ^1H do NF.....	iii
ESPECTRO A.3. Espectro de RMN ^1H da quitosana PADETEC.....	v
ESPECTRO A.4. Espectro de RMN ^1H da quitosana PADETEC a 70 °C.....	vi
ESPECTRO A.5. Espectro de IV da M1 neutralizada e lavada, obtida na execução da terceira série experimental.....	vii
ESPECTRO A.6. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 1.....	viii
ESPECTRO A.7. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 2.....	ix
ESPECTRO A.8. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 3.....	x
ESPECTRO A.9. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 4.....	xi
ESPECTRO A.10. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 5.....	xii
ESPECTRO A.11. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 6.....	xiii
ESPECTRO A.12. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 7.....	xiv
ESPECTRO A.13. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 8.....	xv
ESPECTRO A.14. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 9.....	xvi
ESPECTRO A.15. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 10.....	xvii
ESPECTRO A.16. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 11.....	xviii
ESPECTRO A.17. Espectro de RMN ^1H a 70 °C do produto de ensaio 12.....	xix
ESPECTRO A.18. Espectro de IV da mistura física da CBQ com NFOH.....	xxi
ESPECTRO A.19. Espectro de IV da mistura física da CBQ com o dobro em NFOH.....	xxi

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. LEISHMANIOSE.....	5
2.1.1. Generalidades.....	5
2.1.2. Epidemiologia.....	5
2.1.3. Vetores.....	7
2.1.4. Agente etiológico.....	8
2.1.5. Ciclo vital.....	8
2.1.6. Reservatórios.....	9
2.1.7. Manifestações clínicas.....	10
2.1.8. Quimioterapia.....	11
2.2. DOENÇA DE CHAGAS.....	12
2.2.1. Generalidades.....	12
2.2.2. Epidemiologia.....	12
2.2.3. Vetores.....	13
2.2.4. Agente etiológico.....	14
2.2.5. Ciclo vital.....	15
2.2.6. Reservatórios.....	16
2.2.7. Manifestações clínicas.....	17
2.2.8. Quimioterapia.....	18
2.3. NITROFURAL.....	18
2.4. HIDROXIMETILNITROFURAL.....	21
2.5. POLÍMEROS.....	23
2.5.1. Conceito.....	23
2.5.2. Classificação.....	24
2.5.3. Reações de polimerização.....	26
2.5.3.1. Polimerização em cadeia ou adição.....	26
2.5.3.1.1. Polimerização por radicais livres.....	29
2.5.3.1.2. Polimerização por compostos iônicos.....	32
a). Polimerização aniônica.....	32
b). Polimerização catiônica.....	33
2.5.3.1.3. Polimerização por complexos de coordenação.....	34
2.5.3.2. Polimerização em etapas ou condensação.....	36
2.6. QUITOSANA.....	40
2.6.1. Conceito.....	41
2.6.2. Processo de obtenção.....	42
2.6.3. Propriedades físico-químicas.....	43
2.6.4. Propriedades biológicas.....	44
2.6.5. Toxicidade.....	48
2.6.6. Emprego nos processos farmacêuticos.....	49
2.6.7. Derivados de quitosana.....	50
2.7. LATENCIAÇÃO.....	52
2.7.1. Conceitos.....	52
2.7.2. Polímeros na latenciação.....	54

2.7.3. Uso tópico de pró-fármacos.....	56
III. OBJETIVO E JUSTIFICATIVAS.....	60
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	68
4.1. MATERIAL.....	69
4.1.1. Reagentes, solventes e diversos.....	69
4.1.2. Equipamentos e acessórios.....	71
4.2. MÉTODOS.....	71
4.2.1. Síntese do hidroximetilnitrofural.....	71
4.2.2. Síntese do hemissuccinato de hidroximetilnitrofural.....	72
4.2.3. Tratamento da quitosana.....	72
4.2.3.1. Purificação.....	72
4.2.3.2. Preparação de filmes.....	73
4.2.4. Síntese dos derivados de quitosana.....	73
4.2.4.1. Succinilquitosana.....	73
4.2.4.2. Carboxibutilquitosana.....	74
4.2.4.3. Imina da carboxibutilquitosana.....	74
4.2.4.4. Carboximetilquitosana.....	75
4.2.4.5. Quitosana <i>N</i> -metilfosfônica.....	76
4.2.4.6. Quitosana copolimerizada com ácido acrílico e metacrilato de hidroxietila.....	76
4.2.4.6.1. Reação seguida de isolamento e ressolubilização.....	76
4.2.4.6.2. Reação <i>in situ</i>	77
4.2.5. Síntese dos pró-fármacos.....	78
4.2.5.1. A partir do hidroximetilnitrofural.....	78
4.2.5.1.1. Empregando carboxibutilquitosana como transportador.....	78
a). Reação com carbodiimida.....	78
b). Reação por catálise de transferência de fase.....	78
c). Reação por meio de cloreto de ácido.....	79
d). Reação por catálise enzimática.....	79
4.2.5.1.2. Empregando 5-metilpirrolidinonaquitosana como transportador.....	80
4.2.5.1.3. Empregando a imina da carboxibutilquitosana como transportador.....	80
4.2.5.1.4. Empregando membrana de quitosana copolimerizada com ácido acrílico como transportador.....	81
4.2.5.2. A partir do hemissuccinato de hidroximetilnitrofural.....	82
4.2.5.2.1. Empregando a quitosana como transportador.....	82
4.2.5.2.2. Empregando a quitosana <i>N</i> -metilfosfônica como transportador.....	82
4.2.6. Análises.....	83
4.2.6.1. Espectroscopia no infravermelho.....	83
4.2.6.2. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C	83
4.2.6.3. Análises térmicas.....	84
4.2.6.3.1. Termogravimetria (TG).....	84
4.2.6.3.2. Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	84

4.2.6.3.3. Análise térmica dinâmico-mecânica (DMTA).....	84
4.2.6.4. Faixa de fusão.....	85
4.2.6.5. Cromatografia em camada delgada.....	85
4.2.6.6. Determinação do grau de desacetilação.....	85
4.2.6.6.1. Por IV.....	85
4.2.6.6.2. Por RMN ¹ H.....	86
4.2.6.7. Determinação da massa molar viscosimétrica média.....	86
4.2.6.8. Determinação quantitativa das carboxilas livres nos polímeros funcionalizados.....	87
4.2.6.9. Determinação do grau de substituição dos polímeros funcionalizados.....	88
4.2.6.10. Determinação da capacidade de intumescimento das membranas em água.....	88
4.2.7. Ensaio de citotoxicidade.....	89
4.2.7.1. Preparação dos extratos.....	89
4.2.7.2. Teste de citotoxicidade.....	89
4.2.8. Ensaio de hemocompatibilidade.....	90
4.2.8.1. Trombogenicidade.....	90
4.2.8.2. Potencial hemolítico.....	90
4.2.9. Ensaio de atividade biológica dos fármacos contra <i>Leishmania spp</i> ...	91
4.2.9.1. Atividade contra as formas promastigotas de <i>Leishmania spp</i>	91
4.2.9.1.1. Cultura das formas promastigotas.....	91
4.2.9.1.2. Avaliação da atividade biológica dos fármacos.....	92
4.2.9.2. Atividade contra as formas amastigotas de <i>L. amazonensis</i>	92
4.2.9.2.1. Formas amastigotas intracelulares.....	92
a). Purificação das formas amastigotas.....	92
b). Cultura de macrófagos.....	93
c). Infecção dos macrófagos com as formas amastigotas.....	93
d). Avaliação da atividade biológica do hidroximetilnitrofural.....	94
4.2.9.2.2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas....	94
V. RESULTADOS.....	95
5.1. HIDROXIMETILNITROFURAL.....	96
5.2. HEMI-SUCCINATO DE HIDROXIMETILNITROFURAL.....	103
5.3. QUITOSANA.....	107
5.4. SUCCINILQUITOSANA.....	115
5.5. CARBOXIBUTILQUITOSANA.....	116
5.6. IMINA DA CARBOXIBUTILQUITOSANA.....	123
5.7. CARBOXIMETILQUITOSANA.....	125
5.8. QUITOSANA N-METILFOSFÔNICA.....	128
5.9. QUITOSANA COPOLIMERIZADA COM ENXERTO DE ÁCIDO ACRÍLICO E METACRILATO DE HIDROXIETILA.....	132
5.9.1. Reação seguida de isolamento e ressolubilização (3ª. Série).....	132
5.9.2. Reação <i>in situ</i> (6ª. Série).....	134
5.10. PRÓ-FÁRMACOS.....	146
5.10.1. Hidroximetilnitrofural com carboxibutilQUITOSANA.....	146

5.10.2. Hidroximetilnitrofural com membrana de quitosana enxertada com ácido acrílico.....	149
5.10.3. Hemissuccinato de hidroximetilnitrofural com quitosana.....	151
5.10.4. Hemissuccinato de hidroximetilnitrofural com quitosana <i>N</i> -metilfosfônica.....	155
VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	159
6.1. SÍNTESE DO HIDROXIMETILNITROFURAL.....	160
6.2. SÍNTESE DO HEMISSUCCINATO DE HIDROXIMETILNITROFURAL.....	162
6.3. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA.....	164
6.4. SÍNTESE DOS DERIVADOS DE QUITOSANA.....	169
6.4.1. Succinilquitosana.....	169
6.4.2. Carboxibutilquitosana.....	171
6.4.3. Imina da carboxibutilquitosana.....	181
6.4.4. Carboximetilquitosana.....	182
6.4.5. Quitosana	184
6.4.6. Membranas de quitosana copolimerizadas com enxerto de ácido acrílico e metacrilato de hidroxietila.....	185
6.5. SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS.....	199
6.5.1. Carboxibutilquitosana com hidroximetilnitrofural.....	199
6.5.2. 5-Metilpirrolidinonaquitosana com hidroximetilnitrofural.....	201
6.5.3. Imina da carboxibutilquitosana com hidroximetilnitrofural.....	202
6.5.4. Membrana de quitosana enxertada por ácido acrílico com hidroximetilnitrofural.....	202
6.5.5. Quitosana com hemissuccinato de hidroximetilnitrofural.....	203
6.5.6. Quitosana <i>N</i> -metilfosfônica com hemissuccinato de hidroximetilnitrofural.....	204
VII. CONCLUSÕES.....	206
VIII. PERSPECTIVAS.....	209
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	211
APÊNDICE A.....	i
A.1. NITROFURAL.....	ii
A.2. QUITOSANA.....	v
A.3. CARBOXIBUTILQUITOSANA.....	viii
A.4. MISTURA FÍSICA ENTRE HIDROXIMETILNITROFURAL E CARBOXIBUTILQUITOSANA.....	xxi
APÊNDICE B.....	xxiii

INTRODUÇÃO

I. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é, ainda hoje, doença de grande importância social e econômica, sendo, das parasitoses causadas por protozoários, provavelmente a segunda em importância, após a malária (Lainson, Shaw, 1978). Segundo relatórios da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), a leishmaniose é endêmica em 88 países, em 4 continentes. A incidência anual é estimada em 1 a 1,5 milhões de casos da forma cutânea e 500 mil da visceral. Só no Brasil, 35.000 casos da forma cutânea foram registrados em 2000.

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana representa um dos mais graves problemas médico-sanitários da América Latina (Chung, 1996). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), ocorre em 18 países da América Latina. A prevalência de humanos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* é estimada em 16 a 18 milhões de casos na América Latina e, no Brasil, a área endêmica atinge 44,5% do território nacional.

A quimioterapia atualmente disponível para o tratamento dessas parasitoses apresenta desvantagens, principalmente relacionadas à elevada toxicidade dos fármacos e à baixa eficácia no combate às formas teciduais, replicantes, dos parasitas.

O hidroximetilnitrofural (NFOH), que consiste na base de Mannich do nitrofural (NF), foi sintetizado neste laboratório por Chung (1996) como intermediário para a obtenção de pró-fármacos recíprocos de NF com primaquina aplicáveis no combate à doença de Chagas. Os ensaios para determinação da atividade antichagásica dos pró-fármacos mostrou que o NFOH foi mais ativo que o benznidazol (Chung, 1996), único fármaco antichagásico comercialmente disponível no Brasil. Além da atividade acentuada, o NFOH revelou-se 300 a 400% menos mutagênico que o NF (Guido *et al.*, 2001).

A Química Farmacêutica, por meio da modificação molecular, tem desempenhado importante papel na introdução de novos fármacos na terapêutica. Dentre os métodos empregados, a latenciação desperta interesse por ser uma importante ferramenta para solucionar problemas de formulação, baixa biodisponibilidade, falta de seletividade e toxicidade elevada de fármacos que já possuem atividade biológica estabelecida na terapêutica. Pode, ainda, ser empregada no desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada mediante a escolha de transportadores adequados, como, por exemplo, os polímeros.

A quitosana, obtida da desacetilação da quitina extraída principalmente do exoesqueleto de crustáceos, é polissacarídeo composto por copolímeros de glicosamina e *N*-acetilglicosamina (Singla, Chawla, 2001). Possui baixa toxicidade, é hipoalergênica e atua como antimicrobiano, pois provoca a inibição do crescimento de microrganismos (Ravi Kumar, 2000). Além disso, favorece a reepitelização com formação de cicatriz lisa (Kifune, 1991) e exerce propriedade imunomoduladora devido à sua capacidade de ativar macrófagos (Olsen *et al.*, 1988). Estas propriedades estão sendo exploradas no desenvolvimento de materiais comerciáveis para o tratamento de feridas (Ravi Kumar, 2000), mas seu papel na ativação de macrófagos pode ser aproveitado empregando a quitosana como transportador em pró-fármacos para o combate de parasitas intracelulares.

Frente ao exposto, o objetivo deste trabalho é latenciar o NFOH no polímero de quitosana, a fim de obter pró-fármaco eficaz contra os parasitas causadores da doença de Chagas e leishmaniose, sem, no entanto, perder de vista a via de administração adequada em cada caso. Na doença de Chagas, cuja infecção do parasita é sanguínea e macrofágica, é pré-requisito que o pró-fármaco obtido seja hidrossolúvel para que a administração se dê pela via peraneal. No caso da leishmaniose, que se manifesta sob as formas visceral, cutânea e muco-cutânea, são planejados os pró-fármacos hidrossolúveis, para administração parenteral em leishmaniose visceral e muco-cutânea, no caso de mucosas inacessíveis, além do pró-fármaco sob a forma de filme ou gel a ser aplicado topicamente sob as lesões cutâneas e muco-cutâneas acessíveis.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. LEISHMANIOSE

2.1.1. Generalidades

A leishmaniose, condição patológica provocada pela infecção por protozoários do gênero *Leishmania*, é, ainda hoje, doença de grande importância social e econômica, sendo, das parasitoses causadas por protozoários, provavelmente a segunda em importância, após a malária (Lainson, Shaw, 1978).

A leishmaniose visceral foi primeiro descrita em 1903, por Leishman e Donovan. Ambos, separada, mas simultaneamente, demonstraram parasitos em esfregaço do baço de pacientes, que sofriam de enfermidade semelhante à malária, sendo seu agente denominado *Leishmania donovani*. Isto não significa que a leishmaniose não exista antes de 1903, pelo contrário. Archibaldi, em 1922, descreveu uma epidemia de *kala-azar*, do sânscrito “febre negra”, que ocorria nas colinas de Garo de Assam, na Arábia Saudita, desde 1870. Cunningham, em 1885, registrou doença semelhante causada por um parasito, que foi posteriormente chamado *Leishmania tropica*, causador de leishmaniose cutânea. Nicolle, em 1908, relatou que mamíferos, incluindo cachorros, poderiam agir como reservatório e hospedeiro para o parasito. Swaminath e colaboradores, em 1942, usando voluntários humanos, provaram que o parasito poderia ser transmitido pela picada de flebotômídeos (Grimaudi Jr., Tesh, 1993).

2.1.2. Epidemiologia

Segundo relatórios da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2003), a leishmaniose é endêmica em 88 países, em 4 continentes. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral (Figura II.1) ocorrem em Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão e Brasil, e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Algéria, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria. Como a notificação é obrigatória somente em

32 dos 88 países afetados pela doença, número substancial de casos deixa de ser registrado. A incidência anual é, então, estimada em 1 a 1,5 milhões de casos da forma cutânea e 500 mil da visceral, mas somente 600 mil casos de leishmaniose são oficialmente declarados.

FIGURA II.1. Distribuição geográfica da co-infecção da leishmaniose visceral e HIV, em 1997 (WHO, 2003).

FIGURA II.2. Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea, em 1996 (WHO, 2003).

Outro fator que vem contribuir para novo perfil dessa doença nos últimos anos é a co-infecção com o vírus da AIDS (Laguna, Adrados, Alvar, 1997; Rosatelli, Souza, Soares, 1998).

Em muitas áreas do mundo, torna-se claro o aumento no número de casos de leishmaniose cutânea (Figura II.2). No Brasil, em 1998, 21.800 casos foram registrados, subindo para 30.550 em 1999 e 35.000 em 2000. Em Kabul, Afeganistão, eram 14.200 casos em 1994, subindo vertiginosamente para 200.000 casos em 1999. Em Aleppo, Síria, eram 3.900 casos em 1998, 4.700 em 1999 e 5.900 em 2000 (WHO, 2003).

2.1.3. Vetores

A leishmaniose é causada por diferentes espécies de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* (filo: *Protozoa*, ordem: *Kinetoplastida*, família: *Trypanosomatidae*) (Magill, 1995) e transmitidos pela picada de insetos, genericamente conhecidos como flebotomídeos (filo: *Diptera*, ordem: *Psycodidae*, família: *Phlebotomidae*) (Marzochi, Marzochi, Schubach, 1999). Dois gêneros de flebotomídeos estão diretamente envolvidos na transmissão da doença. Na Europa, Ásia e África tem-se, principalmente, o gênero *Phlebotomus* (Lainson, Shaw, 1987), de cujas espécies cerca de 30 foram identificadas como vetores da doença, e, nas Américas, o gênero *Lutzomyia* (Marzochi, Marzochi, Schubach, 1999).

FIGURA II.3. Fotografias dos mosquitos (A) *Phlebotomus* (<http://www.fit-for-travel.de/Reisemedizin/Krankheiten/leishmaniasis.htm>) e (B) *Lutzomyia* (<http://worldaidsday.nih.gov/newsroom/focuson/bugborne01/leish.htm>).

Estes insetos podem ser encontrados em quase todas as regiões de clima semitropical e temperado. A fêmea, hematófaga em função da necessidade de proteínas para a oviposição, deposita seus ovos em fezes, lixo, ruínas urbanas, troncos de árvores ou em qualquer lugar onde as larvas possam conseguir matéria orgânica, calor e umidade para se desenvolver (Carvalho, 2001).

2.1.4. Agente etiológico

Todas as espécies de *Leishmania* têm dois estágios distintos em seu ciclo vital, como se observa nas Figuras II.4a, II.4b e II.5: um estágio promastigota flagelado e móvel, de vida extracelular no trato alimentar do inseto vetor, e um estágio amastigota imóvel, em que o parasito reside no interior dos macrófagos do hospedeiro vertebrado (Marzochi, Marzochi, Schubach 1999).

FIGURA II.4. Formas (A) promastigota (<http://www.biosbcc.net/meyer/micro/bms127/36protozoa/page-id-2353.html>) e (B) amastigota da *Leishmania* spp. (<http://www.ucm.es/info/parasito/aTLAS.htm>).

2.1.5. Ciclo vital

Quatro a cinco dias após o repasto infectante de formas amastigotas de *Leishmania*, estas se transformam em promastigotas e migram para as partes anteriores do tubo digestivo do inseto, atingindo o aparelho picador-sugador. Ao picar outro animal, há a inoculação das formas promastigotas, que são englobadas por macrófagos do hospedeiro. Acredita-se que a saliva do inseto desempenhe papel potencializador na infectividade da *Leishmania*. Nas células fagocitárias do hospedeiro

vertebrado, os parasitos se transformam em formas amastigotas, que se multiplicam por fissão binária dentro dos vacúolos parasitóforos. A célula infectada multiplica-se, dividindo seus parasitos entre as células filhas, ou se rompe liberando amastigotas, que são, então, fagocitadas por outros macrófagos e tornam a se multiplicar. Na leishmaniose visceral, ocorre disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema fagocitário mononuclear como linfonodos, fígado, baço, medula óssea, placas de Payer, entre outras. Em outro repasto sangüíneo, novo flebótomo ingere macrófagos infectados, iniciando novo ciclo (Marzochi, Marzochi, Schubach, 1999).

FIGURA II.5. Ciclo vital da *Leishmania* spp. (WHO, 2003).

2.1.6. Reservatórios

Grande variedade de animais selvagens e domésticos pode servir como reservatório de *Leishmania*, como roedores, canídeos selvagens e domésticos, entre outros (Carvalho, 2001). Cachorros domésticos freqüentemente abrigam a *L. infantum*, que pode ser transmitida aos humanos, particularmente às crianças (Kirmse, Mahin, Lahrech, 1987). Animais infectados podem mostrar variedades de sintomas. Em geral,

as lesões se desenvolvem na pele exposta das orelhas, narinas, lábios e cauda (Schlein *et al.*, 1984).

2.1.7. Manifestações clínicas

A leishmaniose pode ser genericamente classificada em três principais manifestações: leishmaniose visceral, muco-cutânea e cutânea (WHO, 2003), causadas por diferentes espécies do parasita (Glew *et al.*, 1988).

A leishmaniose visceral (Figura II.6a), também conhecida como *kala-azar*, é causada pela *L. donovani* e caracteriza-se por febres de longa duração, substancial perda de peso, esplenomegalia e hepatomegalia e anemia ocasionalmente grave (WHO, 2003). A leishmaniose muco-cutânea (Figura II.6b) normalmente ocorre após a forma cutânea causada por *L. brasiliensis* em cerca de 3 a 10% dos casos, sendo mais comum no Brasil, Bolívia e Peru, onde é chamada “espundia”. Normalmente, nariz e lábios superiores são os primeiros a ser afetados, com endurecimento e ulceração indolores. A doença pode permanecer localizada ou, gradualmente, estender-se para a nasofaringe, palato, úvula, laringe e vias aéreas superiores (Marzochi, Marzochi, Schubach, 1999).

FIGURA II.6. Fotografias ilustrativas de casos de leishmaniose (A) visceral (http://www.kit.nl/biomedical_research/html/leishmaniasis.asp), (B) mucocutânea (http://www.acponline.org/bioterro/anthrax/cut_leis.htm) e (C) cutânea (<http://www.biofax.com/biofacts2001.html>).

A leishmaniose cutânea (Figura II.6c) normalmente produz úlceras na pele em áreas expostas do corpo, como a face, pernas e braços. Pode se formar grande número de lesões no corpo – algumas vezes superiores a 200 –que causam sério prejuízo estético e social, além de invalidar o paciente em alguns casos (WHO, 2003).

2.1.8. Quimioterapia

O controle da leishmaniose pode ser efetuado sob três aspectos: a eliminação do vetor, dos hospedeiros intermediários ou a cura da parasitemia no hospedeiro. A eliminação do vetor não tem se revelado eficiente, pois o inseto transmissor se distribui por ampla área geográfica. A eliminação dos hospedeiros intermediários, principalmente os silvestres, é impraticável, devido ao desequilíbrio ecológico que causaria nas florestas. A alternativa que se torna, então, mais adequada é o tratamento quimioterápico dos hospedeiros (Carvalho, Arribas, Ferreira, 2000).

O tratamento pode requerer até um ano de administração do fármaco, o que maximiza a ocorrência dos efeitos colaterais indesejáveis. Além disso, é freqüente a reincidência da parasitemia com conseqüente resistência do parasito ao fármaco utilizado no primeiro curso do tratamento (Carvalho, Arribas, Ferreira, 2000).

A quimioterapia de escolha ainda se baseia no uso de antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato sódico), apesar da elevada toxicidade, que envolve artralgia, mialgia, nefro e hepatotoxicidade (Carvalho, Arribas, Ferreira, 2000). Se o tratamento com antimoniais pentavalentes falha, recorre-se à pentamidina, mas a sua toxicidade e potenciais efeitos colaterais a tornam fármaco de segunda escolha (Gadelha, 1990). A anfotericina B é outro fármaco de segunda escolha. O nifurtimox, que é normalmente empregado como agente tripanossomicida em alguns países da América Latina, tem se mostrado eficaz em casos de leishmaniose mucocutânea na Colômbia e no Brasil, porém é comum o aparecimento de seus efeitos tóxicos. A mepacrina pode ser empregada no tratamento de todas as formas de lesões não inflamadas de leishmaniose cutânea, exceto as causadas por *L. aethiopica*, *L.*

amazonensis e *L. brasiliensis* (Carvalho, Arribas, Ferreira, 2000). O alopurinol isolado não tem se mostrado eficiente no tratamento da leishmaniose, mas sua ação sinérgica com estibogluconato sódico mostrou-se efetiva no tratamento de casos de leishmaniose visceral resistente a antimoniais no Quênia. O uso de aminosidina isolada e em associação com estibogluconato sódico também se revela eficaz no tratamento de resistência ao antimonial isolado (Davidson, 1998). O metronidazol pode ser utilizado no tratamento de pacientes infectados com cepas multi-resistentes, mas sua eficácia não está inteiramente comprovada. O cetoconazol é moderadamente eficaz na leishmaniose cutânea causada por certas espécies de *Leishmania*. O itraconazol tem efeito similar, porém é melhor tolerado (Carvalho, Arribas, Ferreira, 2000).

2.2. DOENÇA DE CHAGAS

2.2.1. Generalidades

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana, quase que 90 anos após sua descoberta, continua a representar um dos mais graves problemas médico-sanitários da América Latina (Chung, 1996). Descoberta por Carlos Chagas, em 1909, é uma parasitose tecidual e hematológica causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Korolkovas, 1988; Dias, 1994).

2.2.2. Epidemiologia

Segundo a organização mundial da saúde (WHO, 2003), ocorre em 18 países da América Latina (Figura II.7). Entretanto, atualmente, devido à intensa migração populacional das áreas endêmicas para países desenvolvidos, a doença corre risco de se expandir além das fronteiras geográficas tradicionais. Isso é especialmente relevante no contexto da transmissão pela transfusão sangüínea. A prevalência de humanos infectados pelo *T. cruzi* é estimada em 16 a 18 milhões de casos, e aproximadamente 120 milhões de pessoas, isto é, 25% da população latino-americana, correm o risco de contrair a infecção.

Mapa das Américas mostrando a distribuição da doença de Chagas. As áreas afetadas são coloridas em vermelho, incluindo o México, a América Central, a Colômbia, o Equador, o Peru, a Bolívia, o Paraguai, a Argentina e o Chile. As áreas não afetadas são coloridas em verde, incluindo os Estados Unidos, o Canadá e partes da América do Sul, como o Brasil e o Uruguai. A legenda indica "Áreas afetadas com a doença de Chagas" com um quadrado vermelho.

Fonte: WHO

2.2.3. Vetores

A transmissão se dá pelo contato com as fezes de triatomíneos ou “barbeiros” contaminadas com o parasito (Lana, Tafuri, 1991). Das 120 espécies descritas capazes de albergar o *T. cruzi*, 40 estão presentes no Brasil, sendo o *Triatoma infestans* (Figura II.8), *Pastrongylus megistrus* e *Triatoma brasiliensis* os representantes mais importantes (Forattini, 1980; Chung, 1996).

FIGURA II.8. Fotografia do *Triatoma infestans* no ato da hematofagia (<http://www.health.gov.mt/impaedcard/issue5/gilles/gilles.htm>).

2.2.4. Agente etiológico

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e compreende 3 estágios, diferenciados morfológicamente pela posição do flagelo em relação ao cinetoplasto e seu ponto de emergência do corpo do parasito (Hoare, Wallace, 1966) (Figura II.9). Nos hospedeiros vertebrados ocorrem os tripomastigotas de tipo sanguícola e os amastigotas intracelulares, enquanto que nos hospedeiros invertebrados e em meios de cultura predominam as formas epimastigotas, que se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos (Nascimento, 1985).

FIGURA II.9. Micrografias das formas (A) amastigota, (B) epimastigota e (C) tripomastigota (seta preta: cinetoplasto; vermelha: núcleo; azul: membrana ondulante; verde: flagelo) do *T. cruzi* (<http://www.ufrgs.br/para-site/especies/txtrypa.htm>).

2.2.5. Ciclo vital

O ciclo do *T. cruzi* (Figura II.10) compreende duas etapas (no inseto e no homem). Na primeira, o inseto é contaminado após ingerir sangue contendo formas tripomastigotas, que se diferenciam em epimastigotas. Estas se multiplicam no lume do intestino posterior do inseto e, após 3 a 4 semanas, as formas tripomastigotas metacíclicas estão presentes na ampola retal (Lana, Tafuri, 1991). Na segunda etapa, ocorre a infecção no homem.

FIGURA II.10. Ciclo evolutivo do *T. cruzi* (WHO, 2003).

Durante a picada, para o repasto sangüíneo, o vetor defeca e o homem, ao coçar o local da picada, leva as fezes contaminadas com formas tripomastigotas até a ferida, por onde o parasito penetra (Lana, Tafuri, 1991). Variedade de células e tecidos, especialmente fibras musculares lisas e estriadas, macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, constitui-se em alvo nesta fase inicial do ciclo no vertebrado. A interiorização na célula pelo parasito é feita por fagocitose mediada por receptores da membrana plasmática da célula hospedeira, fenômeno complexo que pressupõe etapas de adesão e reconhecimento. Uma vez ocorrida a penetração, o tripomastigota diferencia-se

rapidamente em amastigotas, formas replicativas intracelulares, por divisão binária. Estas se transformam em tripomastigotas antes da ruptura celular (Dias, 1999). Quando o indivíduo é sugado por outro inseto e as formas tripomastigotas sanguícolas chegam ao intestino do invertebrado, o ciclo se repete (Lana, Tafuri, 1991).

Apesar da transmissão vetorial da doença de Chagas se encontrar controlada no Brasil, a rota digestiva de contaminação pode ser responsável por novos casos de infecção por *T. cruzi* no homem (Camandaroba *et al.*, 2002). Alguns episódios epidêmicos, registrados em Teutonia – RS (Neves da Silva *et al.*, 1968), Catolé do Rocha – PB (Shikanai-Yasuda *et al.*, 1991) e na região amazônica (Crescente *et al.*, 1992), foram atribuídos à transmissão oral do parasito. Entretanto, a rota digestiva da doença foi razão de debate durante a última década, pois se acreditava que o suco gástrico destruísse o parasito. Estudos recentes provaram que algumas linhagens do *T. cruzi* são capazes de atravessar a mucosa gástrica, mesmo em contato com a acidez estomacal, e desenvolver a forma aguda da doença (Camandaroba *et al.*, 2002). A transmissão oral foi clinicamente constatada com a epidemia identificada no estado de Santa Catarina (Inoue, 2005). A Vigilância Sanitária do Estado confirmou que a contaminação se deu pela ingestão de caldo de cana contaminado com fezes do triatomíneo ou pela moagem dos vetores junto com a cana (Reis, 2005a). Foram 5 mortes e 41 casos confirmados (Inoue, 2005). No Amapá, os casos são consequência da ingestão de açaí triturado com o inseto ou com suas fezes no preparo do suco (Fadel *et al.*, 2005; Reis, 2005b). A rota oral de contaminação é especialmente importante porque conduz à forma aguda da doença, que está associada à alta letalidade dos pacientes, provavelmente devido ao envolvimento de maior carga parasitária na infecção (Reis, 2005a).

2.2.6. Reservatórios

Constituem-se reservatórios da tripanossomíase americana apenas os mamíferos, especialmente os de pequeno e médio porte. Cães, gatos e ratos são os mais importantes reservatórios domésticos que consolidaram a vinda do *T. cruzi* para o

ciclo doméstico. Os reservatórios silvestre são representados pelos marsupiais (gambás de diversas espécies, marmotas e cuicas), desdentados (tatus e tamanduás), roedores, morcegos e primatas (macacos e micos) (Lana, Tafuri, 1991).

2.2.7. Manifestações clínicas

A doença é caracterizada por fases aguda e crônica, separadas por estágio assintomático, denominado fase indeterminada (Lana, Tafuri, 1991). A maioria dos indivíduos apresenta apenas sintomas leves na fase aguda, como o chagoma, lesão inflamatória do local da picada (Dias, 1999). Entretanto, crianças e, menos freqüentemente, adultos podem desenvolver, após período de incubação de 7 a 14 dias, sintomas graves que incluem desenvolvimento do sinal de Romaña (Figura II.11a), conjuntivite, febre, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, náuseas, vômitos, diarreia e anorexia (Lana, Tafuri, 1991). Mesmo sem tratamento, os sintomas da fase aguda tendem a diminuir em 3 a 4 meses (Dias, 1999). Quinze a vinte anos ou mais podem transcorrer desde a contaminação até o aparecimento dos sintomas da fase crônica, na qual as manifestações cardíacas são as mais freqüentes e se iniciam com palpitações, vertigens, taquicardia e vários níveis de bloqueio cardíaco, que progridem para a cardiopatia crônica chagásica (Figura II.11b e II.11c).

FIGURA II.11. Ilustrações do (A) sinal de Romaña da fase aguda (WHO, 2003), (B) Raio-X de tórax mostrando aumento do coração e (C) cardiomegalia da fase crônica da doença de Chagas (<http://www.health.gov.mt/impaedcard/issue5/gilles/gilles.htm>).

Podem ocorrer, também, manifestações digestivas, como dilatações permanentes e difusas de vísceras ocas (megaesôfago, megacólon, megaduodeno, megabexiga) ou de canais (megabronquios, megauretra), acompanhados ou não de alongamentos (dodicocólon) da parede (Lana, Tafuri, 1991).

2.2.8. Quimioterapia

No momento, dois fármacos eventualmente disponíveis vêm sendo usados contra o *T. cruzi*: o nifurtimox e o benznidazol. Ambos são ativos contra formas sangüíneas do parasito e, também, provavelmente menos, sobre as teciduais (Dias, 1999).

Diversas outras classes de compostos manifestam atividade em tripanossomíase experimental, sem, contudo, ter emprego terapêutico (Korolkovas, 1988), como derivados nitroimidazólicos (metronidazol, megalol, fexinidazol), azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol), alopurinol, anfotericina B, clorpromazina, primaquina, NF, entre outros (Chung, 1996).

2.3. NITROFURAL

Antigamente chamado nitrofurazona, o NF (Figura II.12) corresponde à semicarbazida do nitrofuraldeído (Korolkovas, 2002). O espectro de ação do NF abrange microrganismos como *S. aureus*, *Streptococcus*, *E. coli*, *C. perfringens*, *Aerobacter aerogenes* e *Proteus* spp. (Zanini *et al.*, 1997). Além destes, foi relatado que o NF tem amplo espectro de atividade contra variedade de organismos Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo algumas espécies e linhagens de *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium*, *Erysipelothrix insidiosa*, *Gardnerella vaginalis*, *K. pneumoniae*, *Moraxella lacunata*, *Neisseria*, *Paracolonobactrum*, *S. marcescens*, *Salmonella*, *Shigella* (Nitrofurazone. Drug information fulltext, 2001).

FIGURA II.12. NF ou 5-nitro-2-furaldeído semicarbazona ou 2-[(5-nitro-2-furanil) metileno]-hidrazinocarboxamida (Merck index, 1996).

Seu uso tópico está indicado como adjuvante no tratamento de queimaduras de 2º e 3º graus, profilaxia de infecções cutâneas em regiões suscetíveis, como transplantes de pele (Zanini *et al.*, 1997; Nitrofurazone. Drug information fulltext, 2001), tratamento de infecções de feridas e úlceras de pele causadas por microrganismos sensíveis ao NF e de infecções estafilocócicas da pele resistentes a outros fármacos (Korolkovas, 2002). O NF não é significativamente absorvido pela pele e mucosas após a administração tópica (Marion-Landais *et al.*, 1975) e pode provocar dermatite de contato alérgica (Korolkovas, 2002).

Entretanto, de acordo com Crenshaw *et al.* (1976), NF, primeiramente usado em curativos de queimaduras e outras feridas durante a Segunda Guerra Mundial, revelou amplo espectro de atividade antibacteriana, baixa incidência de sensibilização e de resistência microbiana. A combinação desses e outros atributos faz do NF, quando aplicado via tópica, fármaco seguro, eficaz, indolor, de fácil aplicação e bem aceito pelos pacientes.

É utilizado sistemicamente contra tripanossomíase africana em estágios avançados e refratários ao melarsoprol (Zanini *et al.*, 1997), disenteria bacilar aguda e tumor testicular (Szcukowski, Daywitt, Elrick, 1958; Nitrofurazone. Drug information fulltext, 2001). Náusea, vômito, dores articulares, cefaléia e polineurite são efeitos tóxicos típicos após a administração oral e, em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PD), causa anemia hemolítica (World Health Organization, 1990). Por essas razões, NF foi retirado do comércio em alguns países e, em outros, como no Brasil, seu uso é permitido apenas por via tópica (Korolkovas, 2002). Reserva-

se o uso de NF sistêmico somente em nível hospitalar, mantendo vigilância do paciente e monitoramento periódico do hematócrito e concentração plasmática de G-6-PD (Zanini *et al.*, 1997).

Gherzi-Egea *et al.* (1998) realizaram experimentos para verificar a formação de radicais livres durante o metabolismo redutivo de xenobióticos capazes de sofrer redução pela transferência de um elétron, como o NF, utilizando extratos homogeneizados de cérebro de ratos Sprague-Dawley. Verificou-se que o primeiro radical gerado era o ânion superóxido, com significativa produção secundária de radical hidroxila a partir do superóxido, realçando as conseqüências toxicológicas e deletérias potenciais de tal metabolismo redutivo. A xantina oxidase, enzima presente na maioria dos tecidos de mamíferos, tem mostrado envolvimento na catálise dessas nitrorreduções por transferência de um elétron, também descritas como “O₂-sensíveis” (Ritter, Malejka-Giganti, 1998). Olive (1979) constatou que o metabolismo redutivo do grupamento nitro está diretamente correlacionado com a eletroafinidade da molécula. Fármacos que têm alta eletroafinidade são, em geral, mais citotóxicos e mutagênicos,. No entanto, também são biotransformados mais rapidamente, o que resulta na formação de metabólitos de rápida destoxificação, porém capazes de causar danos ao DNA. Gillette, Menard e Stripp (1973) observaram que o NF liga-se de forma covalente a macromoléculas dos tecidos devido à potência alquilante dos metabólitos, quando incubado com homogeneizado de fígado de ratos. Constataram, também, que o NF depleta a glutathiona do fígado de ratos, indicando que a esta amina inibe a ligação covalente.

Ainda assim, para medicamentos de uso tópico, NF é considerado um agente “ideal”: não é absorvido sistemicamente; não envolve sensibilização cruzada com outros agentes; não interfere nos processos de cicatrização natural; protege contra as mais comuns infecções e é relativamente barato (Crenshaw *et al.*, 1976).

2.4. HIDROXIMETILNITROFURAL

Em 1969, Andrade e Brener evidenciaram, pela primeira vez, a atividade antichagásica do NF. Alguns anos depois, Henderson e colaboradores (1988) observaram que derivados de naftoquinonas e nitrofuranos, incluindo o NF, devem sua atividade antichagásica à inibição da enzima tripanotiona redutase do *Trypanosoma cruzi*. Esses dados levaram Chung (1996) ao estudo de pró-fármacos recíprocos de primaquina e NF, utilizando diferentes dipeptídeos como espaçantes. Entretanto, da necessidade de inserir grupo hidroximetílico que permitisse a ligação do fármaco ao espaçante peptídico, sintetizou-se o NFOH (Figura II.13), obtido a partir da metodologia para síntese de bases de Mannich.

FIGURA II.13. NFOH (Chung, 1996).

Ensaio de atividade *in vitro* mostraram que o NFOH foi mais ativo que o NF e até que o benznidazol (BZ), único fármaco antichagásico comercialmente disponível no Brasil, tanto em amastigotas quanto em tripomastigotas (Figuras II.14 e II.15) (Chung, 1996; Guido *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003).

Uma das hipóteses para explicar a elevada atividade do NFOH consiste no aumento da captação do fármaco pelo parasita, facilitada pelo aumento da hidrossolubilidade desse derivado (Chung *et al.*, 2003). Realmente, derivados hidroximetilados, via de regra, são mais hidrossolúveis que seus protótipos. A substituição de um dos nitrogênios da amina terminal pelo grupo hidroximetílico pode diminuir as ligações de hidrogênio intra ou intermoleculares, provocando a conseqüente diminuição do ponto de fusão e aumento da solubilidade em água (Bundgaard, 1985). Foi determinada a hidrossolubilidade do NFOH ($0,992 \text{ mg.mL}^{-1}$), além do log P (0,23) e do PF (150 a 154 °C) e verificou-se, realmente, que este é cerca de 1,5 vez mais

solúvel em água que o NF ($0,657 \text{ mg.mL}^{-1}$), com $\log P = -0,19$ e $PF = 240$ a 244°C (Chung *et al.*, 2003).

FIGURA II.14. Efeito de NF (5 e $10 \mu\text{M}$) e NFOH ($5 \mu\text{M}$), comparados ao BZ ($10 \mu\text{M}$), sobre o número de formas amastigotas de *T. cruzi* em cultura de células LLC-MK₂ infectadas após 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias da infecção (Chung, 1996).

FIGURA II.15. Efeito de NF (5 e $10 \mu\text{M}$) e NFOH ($5 \mu\text{M}$), comparados ao BZ ($10 \mu\text{M}$), sobre o número de formas tripomastigotas de *T. cruzi* em cultura de células LLC-MK₂ infectadas após 6, 7, 8, 12, 14 e 15 dias da infecção (Chung, 1996).

Além da atividade acentuada contra todas as formas do *T. cruzi*, o NFOH revelou-se cerca de 4 vezes menos mutagênico que o NF (Guido *et al.*, 2001).

A acentuada atividade e menor mutagenicidade fazem do NFOH um derivado promissor no combate à doença de Chagas. Entretanto, NFOH apresenta instabilidade química em meio ácido (Chung, 1996; Chung *et al.*, 2003). O mecanismo geral de decomposição de derivados hidroximetilados é uma reação espontânea, que envolve a formação de um *N*-hidroximetil ânion intermediário que, após clivagem da ligação C–N, retorna à molécula inicial pela liberação de formaldeído (Bundgaard, 1985). O tempo de meia-vida do NFOH foi determinado em pH 1,4 e 7,4, sendo, respectivamente, de 1,5 e 144 h. Em meio ácido, NFOH foi completamente decomposto a NF em apenas 16 horas (Chung, 2003). Por essa razão, a síntese do NFOH é realizada, preferencialmente, em meio básico (Chung, 1996).

2.5. POLÍMEROS

2.5.1. Conceito

O termo *polímero* é derivado do grego *poly*, que significa “muito”, e *meres*, que significa “partes” (Fried, 1995; Stevens, 1999). Polímeros, também denominados de *macromoléculas*, são sintetizados a partir de moléculas simples, denominadas *monômeros*, que significam “parte simples”, pelo processo de *polimerização* (Stevens, 1999). Sendo assim, polímeros podem ser definidos como moléculas de cadeia longa compostas por grande número de unidades de estrutura química idêntica, que se repetem. Certos polímeros, como proteínas, celulose, quitina e seda, são encontrados na natureza, enquanto que muitos outros, incluindo poliestireno, polietileno e Nylon®, são produzidos somente por rotas sintéticas (Fried, 1995).

A maioria dos polímeros sintéticos tem massa molecular que varia de mil a milhares de unidades de massa atômica, é, obviamente, impraticável representar estruturas poliméricas definitivas. Ao invés disso, para representar os polímeros, o respectivo monômero é encerrado em colchetes ou parênteses, em que *n* representa o número de monômeros que compõem a cadeia polimérica (Stevens, 1999), conforme exemplificado na Tabela II.1.

TABELA II.1. Estruturas dos monômeros de ácido acrílico (AA) e metacrilato de hidroxietila (HEMA) e seus respectivos polímeros

MONÔMERO	POLÍMERO
ácido acrílico (AA)	poli(ácido acrílico) (PAA)
metacrilato de hidroxietila (HEMA)	poli(metacrilato de hidroxietila) (PHEMA)

2.5.2. Classificação

Polímeros compostos pela repetição de um único monômero são denominados *homopolímeros*. Se dois ou mais polímeros são empregados na síntese, o polímero resultante é chamado *copolímero* (Mano, Mendes, 1999; Stevens, 1999). Entretanto, a sequência exata das unidades monoméricas ao longo da cadeia de um copolímero pode variar de acordo com a reatividade de cada monômero durante o processo de polimerização. Sendo assim, a distribuição dos monômeros pode ser totalmente *aleatória* ou perfeitamente *alternada* (Stevens, 1999), conforme ilustrado na Figura II.16 pelos monômeros hipotéticos *A* e *B*. Sob condições e técnicas especiais, é possível preparar os copolímeros *em bloco* e *enxertado* (Stevens, 1999). Os copolímeros do tipo *Dibloco-AB* contêm um longo bloco de monômeros *A* seguido pelo bloco de monômeros *B*. Os do tipo *Tribloco-ABA* têm um bloco central *B* ligado a dois blocos *A* terminais (Fried, 1995). Já os copolímeros *Multibloco* são compostos por muitos blocos de monômeros *A* e *B* intercalados ao longo de toda cadeia polimérica (Stevens, 1999). Os copolímeros *enxertados* podem ser preparados pela polimerização de monômeros *B* na presença de uma cadeia polimérica completamente formada de monômeros *A* (Rosen, 1993).

FIGURA II.16. Possíveis estruturas do homopolímero e dos copolímeros compostos pelos monômeros hipotéticos A e B.

Polímeros também podem ser classificados de acordo com a arquitetura das cadeias poliméricas em estruturas *linear*, *ramificada* ou *em forma de rede* (Rosen, 1993; Mano, Mendes, 1999; Stevens, 1999) (Figura II.17).

FIGURA II.17. Representação esquemática dos polímeros ou copolímeros (a) linear, (b) ramificado ou (c) em forma de rede (Mano, Mendes, 1999).

Polímeros lineares são aqueles cuja cadeia não possui ramificação lateral, a não ser aquela inerente à própria unidade monomérica (Stevens, 1999), como no caso do HEMA (Tabela II.1). *Polímeros ramificados* são aqueles que possuem inúmeras cadeias laterais ancoradas à cadeia principal (Mano, Mendes, 1999). Os copolímeros enxertados também são exemplos de estruturas ramificadas. Já os *polímeros em forma de rede* ocorrem quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas, compostas por monômeros multifuncionais, são unidas por formação de ligações covalentes pelo processo denominado *reticulação* (Stevens, 1999).

2.5.3. Reações de polimerização

As reações de polimerização classificam-se, fundamentalmente, de acordo com o mecanismo de polimerização envolvido, em: *reação em etapas* ou *condensação* e *reação em cadeia* ou *adição* (Mano, Mendes, 1999; Stevens, 1999).

2.5.3.1. Polimerização em cadeia ou adição

Na *polimerização em cadeia* ou *adição*, a cadeia polimérica aumenta pelas sucessivas ligações de monômeros, um a um, à porção terminal ativada da molécula em crescimento, como numa reação em cadeia (Figura II.18) (Fried, 1995).

FIGURA II.18. Polimerização em cadeia: (a) monômeros não-reagidos; (b) monômeros 50% reagidos; (c) monômeros 75% reagidos; (d) monômeros 100% reagidos. (linhas pontilhadas representam espécies em reação) (Stevens, 1999).

Os polímeros de adição, em geral, têm cadeia regularmente constituída por apenas átomos de carbono (Mano, Mendes, 1999), como, por exemplo, os materiais acrílicos e estirênicos, que são polímeros com dupla ligação, que permite a ligação covalente nos carbonos do grupo vinílico para a formação da cadeia polimérica (Machado, Covas, 2004).

As polimerizações por adição compreendem três etapas fundamentais (Fried, 1995), que são:

- *iniciação* ou ativação do monômero;
- *propagação* ou crescimento da cadeia pela adição sequencial de monômeros;
- *terminação* da cadeia ativa e formação completa do produto polimérico final.

A natureza da fonte de iniciação pode ser *física* ou *química*, conforme descreve a Tabela II.2.

TABELA II.2. Tipos de iniciação na polimerização por adição (Mano, Mendes, 1999)

INICIAÇÃO	INICIADOR	FONTE DE ENERGIA	ESPÉCIE ATIVA
Física	Radiações de baixa energia	Calor, raios ultravioleta, microondas	Radicais livres
	Radiações de alta energia	Raios- γ (cobalto-60), raios-X	Radicais livres
	Elétrons	Corrente elétrica	Radicais livres, íons, complexos
Química	Percompostos	Peróxidos, hidroperóxidos	Radicais livres
	Azoderivados	Azonitrilas	Radicais livres
	Ácidos de Lewis	Halogenetos de Al, Ti, Sn	Cátions
	Bases de Lewis	Metal-alkilas, reagentes de Grignard	Ânions
	Catalisadores de Ziegler-Natta	Halogenetos de metal de transição/organo-alumínios	Complexos catalíticos
	Catalisadores de Kaminsky	Metalocenos/alquil-aluminoxanos	Complexos catalíticos

Na *iniciação física*, o próprio monômero é a espécie ativada por fontes térmica (Figura II.19), radiante (Figura II.20) ou elétrica. Esses processos produzem polímeros bastante puros, isentos de reagentes iniciadores nas extremidades de sua constituição (vide Figura II.21b, na qual se observa que o agente iniciador pode se tornar parte constituinte nas porções terminais da cadeia polimérica), porém não têm emprego industrial generalizado (Mano, Mendes, 1999).

FIGURA II.19. Mecanismo de iniciação física pela decomposição térmica do monômero: colisões bimoleculares formam birradicais diméricos (Mano, Mendes, 1999). **FIGURA II.20.** Mecanismo de iniciação física pela radiação ultravioleta do monômero: formação de birradicais monoméricos (Mano, Mendes, 1999).

A *iniciação química* é o processo mais amplamente utilizado na produção de polímeros e copolímeros (Mano, Mendes, 1999). Neste caso, a iniciação do processo se dá pela presença de uma espécie química, que é ativada por decomposição térmica, reações iônicas ou de oxirredução, entre outras. Esta espécie, por sua vez, ataca a porção vinílica da unidade monomérica, desencadeando o processo de polimerização (Fried, 1999). Essas espécies que reagem têm centros ativos, que podem ser *radicais livres*, *íons* ou sítios de formação de *complexos de coordenação* (Mano, Mendes, 1999).

2.5.3.1.1. Polimerização por radicais livres

A etapa de *iniciação* com formação de radicais livres, por sua vez, se subdivide em dois eventos (Stevens, 1999):

- *dissociação* do iniciador para formar duas espécies radicalares:

- *associação* entre o monômero livre e o radical para formação do monômero iniciado ou ativado:

Os iniciadores químicos geradores de radicais livres podem ser qualquer composto orgânico que contenha qualquer grupo lábil na estrutura, como, por exemplo, os grupos azo ($-\text{N}=\text{N}-$), dissulfeto ($-\text{S}-\text{S}-$) ou peróxido ($-\text{O}-\text{O}-$) (Fried, 1995). A ligação lábil da molécula do iniciador pode sofrer cisão homolítica por decomposição térmica (Figura II.21), irradiação (raios- γ ou ultravioleta) (Fried, 1995, Mano Mendes, 1999) ou por reações de oxirredução pela adição de agentes redutores (Figura II.22), sendo os sais ferrosos ou tiosulfato de potássio os mais empregados (Mano, Mendes, 1999).

FIGURA II.21. Mecanismo de iniciação pela decomposição térmica (a) do peróxido de benzoíla, (b) da α,α' -azo-bis-isobutironitrila e (c) persulfato de potássio, seguido pelo mecanismo de ativação do monômero vinílico (Mano, Mendes, 1999).

FIGURA II.22. Mecanismo de iniciação por oxidorredução do persulfato com tiosulfato como agente redutor (Stevens, 1999).

Na etapa seguinte, denominada *propagação*, outras unidades monoméricas são acrescentadas sucessivamente à espécie iniciada (Fried, 1995), como representado na Equação II.3.

A propagação da cadeia acontece sequencialmente até que ocorra algum dos três processos de *terminação* (Mano, Mendes, 1999). Quando as extremidades radiculares de duas cadeias distintas, com graus de polimerização x e y , se encontram, a terminação se dá por *combinação* e gera cadeia única, com grau de polimerização $x + y$, terminada pela formação da ligação covalente pela combinação dos dois radicais (Fried, 1995), conforme a Equação II.4.

Terminação também pode ocorrer pela reação de *desproporcionamento* (Equação II.5), que forma duas cadeias distintas: uma com o monômero terminal saturado e outra com o monômero terminal insaturado (Fried, 1995).

Quando o crescimento da cadeia é interrompido porque o centro ativo abstraiu hidrogênio de molécula inativa, que pode ser de monômero, polímero, iniciador, solvente ou impureza, os quais passam a radical livre (Equação II.6), o processo de terminação recebe o nome de *transferência de cadeia* (Mano, Mendes, 1999).

Em todos os casos de terminação com radicais livres, uma ou ambas as extremidades (Equações II.5 e II.6 e Equação II.4, respectivamente) contém a molécula do iniciador. Essa é a grande diferença entre os iniciadores químicos verdadeiros, que se tornam incorporados às porções terminais das cadeias, e os catalisadores de polimerização, que promovem a reação entre os monômeros, mas são completamente recuperados no final da produção, como observado nas polimerizações por iniciação *catiônica* ou por *sistemas catalíticos de coordenação* (Fried, 1995).

2.5.3.1.2. Polimerização por compostos iônicos

Quando o processo de iniciação gera carbânions ou carbocátions como espécies iniciantes, a polimerização se dá pelo processo *iônico*, no qual a cisão da ligação covalente do iniciador é heterolítica (Mano, Mendes, 1999). A polimerização de monômeros vinílicos com grupos retiradores de elétrons ocorre pela via aniônica, enquanto que monômeros vinílicos com grupos doadores de elétrons podem se polimerizar pelo mecanismo catiônico (Fried, 1995).

a). Polimerização aniônica

Os iniciadores aniônicos podem ser qualquer nucleófilo forte (Fried, 1995), sendo os mais usuais: compostos organometálicos, como butil-lítio e trifenil-metil-sódio; sistema complexo sódio/naftaleno, em meio de tetraidrofurano; metais alcalinos, como sódio, potássio e lítio, dissolvidos em amônia líquida; reagentes de Grignard, como brometo de metil-magnésio em solução etérea, entre outros (Mano, Mendes, 1999).

Na etapa de iniciação, o monômero vinílico é ativado pela adição nucleofílica do iniciador e serão mais suscetíveis à polimerização aniônica os monômeros que possuírem substituintes capazes de estabilizar, por efeito de ressonância ou indutivo, o carbânion formado (Stevens, 1999)

De acordo com a Figura II.23, a adição do ânion butil ao monômero gera o carbânion, associado com o contraíon lítio carregado positivamente. A propagação da cadeia ocorre pelas sucessivas inserções de novos monômeros entre o carbânion e seu respectivo contraíon (Fried, 1995). A terminação ocorre somente pelo método de transferência de cadeia pela abstração de hidrogênio (Mano, Mendes, 1999), primariamente, com o solvente (Stevens, 1999).

FIGURA II.23. Mecanismo de iniciação aniônica provocada pelo butil-lítio (Mano, Mendes, 1999).

b). Polimerização catiônica

Ao contrário das polimerizações por iniciadores aniônicos e radicais livres, a iniciação catiônica emprega os chamados catalisadores verdadeiros, que são recuperados no fim da produção e não são incorporados à cadeia polimérica (Fried, 1995).

Consiste em iniciador catiônico qualquer ácido de Lewis forte (Fried, 1995), como, por exemplo, os catalisadores do tipo Friedel-Crafts, ou seja, halogenetos de Al, Fe, B, Ti, Sn, entre outros (Mano, Mendes, 1999). Entretanto, raramente, os ácidos de Lewis são efetivos sozinhos e requerem pequenas quantidades de água, ou qualquer outra fonte de hidrogênios, para que, após reação com o ácido de Lewis, dêem origem

às espécies eletrofílicas que ativam os monômeros e dão início à polimerização (Stevens, 1999), conforme esquematizado na Figura II.24.

FIGURA II.24. Mecanismo de iniciação catiônica provocada pelo tetracloreto de titânio (Mano, Mendes, 1999).

A propagação é favorecida pelo aumento da estabilidade do carbocátion (Stevens, 1999), daí a maior facilidade que os monômeros vinílicos com grupos doadores de elétrons têm para se polimerizarem pelo mecanismo catiônico (Fried, 1995).

Ao contrário das polimerizações por radicais livres, a terminação pela combinação de duas cadeias poliméricas ativadas (Equação II.4) não acontece na polimerização catiônica. Mais freqüentemente, a terminação catiônica se dá pelo método da transferência de cadeia entre o polímero e molécula de monômero, solvente, contraíon ou outro polímero (Fried, 1995).

2.5.3.1.3. Polimerização por complexos de coordenação

Os sistemas catalíticos de coordenação, que, basicamente, resultam da combinação de um agente doador com outro receptor de elétrons, são: Ziegler-Natta e, mais recentemente, Kaminsky (Mano, Mendes, 1999).

O sistema catalítico de coordenação Ziegler-Natta foi o primeiro a ser desenvolvido, na década de 1950 (Mano, Mendes, 1999). Os exemplos de compostos e combinações de compostos que compreendem essa categoria de catalisadores são muito numerosos para serem completamente descritos (Stevens, 1999), mas podem ser definidos como a combinação de: (1) um complexo organometálico de elemento que

compõe os grupos de I a III da tabela periódica, como trietilalumínio, $\text{Al}(\text{C}_2\text{H}_5)_3$, e (2) um composto com metal de transição proveniente dos grupos de IV a VIII da tabela periódica, como o tetracloreto de titânio (TiCl_4) (Fried, 1995). O composto metálico de transição funciona como catalisador e o composto organometálico, como co-catalisador (Stevens, 1999).

O sistema catalítico de Kaminsky consiste em: (1) um catalisador, representado por um metalloceno, geralmente de zirconoceno (Zr), e (2) um co-catalisador, usualmente o metil-aluminoxano (Mano, Mendes, 1999).

Apesar do exato mecanismo da polimerização por complexos de coordenação não estar completamente elucidado, acredita-se que o componente organometálico ativa o complexo pela alquilação do metal de transição, que, por sua vez, é capaz de ativar os monômeros (Figura II.25) (Fried, 1995; Stevens, 1999).

FIGURA II.25. Mecanismo de iniciação provocada pelo sistema catalítico de Ziegler-Natta (Mano, Mendes, 1999).

O processo de terminação, nas polimerizações por complexos de coordenação, pode ocorrer de várias formas, como: transferência com monômero, gerando tanto terminações de cadeias insaturadas quanto saturadas (Figuras II.26a e II.26b, respectivamente), eliminação de hidreto (Figura II.26c), transferência com co-catalisador (Figura II.26d) ou transferência com hidrogênio (Figura II.26e) (Mano, Mendes, 1999; Stevens, 1999).

FIGURA II.26. Mecanismo de terminação em polimerização iniciada pelo sistema catalítico de Ziegler-Natta (Stevens, 1999).

2.5.3.2. Polimerização em etapas ou condensação

As polimerizações por condensação são aquelas que ocorrem em etapas. Primeiramente, ocorre a formação de dímeros, trímeros e oligômeros pela ligação aleatória entre os monômeros e o polímero de alta massa molecular só é alcançado quando esses oligômeros se ligam entre si (Figura II.27) (Fried, 1995). Os polímeros de condensação apresentam em sua cadeia principal não apenas átomos de carbono, mas também átomos de outros elementos, como oxigênio, nitrogênio, enxofre, fósforo, entre outros (Mano, Mendes, 1999). Via de regra, as condensações geram micromoléculas, tais como, H_2O , HCl , NH_3 , entre outros, como subprodutos de reação (Rosen, 1993). Sendo assim, a remoção desses subprodutos desloca o equilíbrio da reação no sentido

de favorecer o crescimento da cadeia polimérica. Entretanto, à medida que os segmentos moleculares vão sendo incorporados, o meio reacional se torna cada vez mais viscoso, o que dificulta ou mesmo impede a remoção desses subprodutos. Por essa razão, o crescimento da cadeia polimérica é vagaroso e a massa molecular dos polímeros resultantes é, comumente, da ordem de 10^4 (Mano, Mendes, 1999).

FIGURA II.27. Polimerização em etapas: (a) monômeros não-reagidos; (b) monômeros 50% reagidos; (c) monômeros 75% reagidos; (d) monômeros 100% reagidos. (linhas pontilhadas representam espécies em reação) (Stevens, 1999).

A maioria das polimerizações em etapa envolve reações de condensação clássicas (Tabela II.3), como esterificação, interesterificação ou amidação (Figura II.28) (Fried, 1995).

TABELA II.3. Classificação genérica de alguns polímeros obtidos por reações de condensação (Fried, 1995)

CLASSIFICAÇÃO	MONÓMERO 1	MONÓMERO 2
poliamida	ácido dicarboxílico	diamina
poli carbonato	bisfenol	fosgênio
poliéster	ácido dicarboxílico	diol ou poliol
poliimida	ácido tetracarboxílico	diamina
polissulfona	bisfenol	diclorofenilsulfona

FIGURA II.28. Exemplos de importantes reações de policondensação por mecanismo de polimerização em etapas: (a) poliesterificação; (b) interesterificação; (c) poliamidação e (d) auto-condensação de um monômero A-B (Fried, 1995).

De acordo com a Figura II.28, há duas rotas diferentes para a preparação do poliéster aromático, poli(tereftalato de etileno) (PET): (a) poliesterificação do ácido tereftálico e etilenoglicol e (b) interesterificação envolvendo dimetiltereftalato e etilenoglicol. Essas polimerizações e a preparação da poliamida alifática, nylon[®] 6,6 (Figura II.28c), são exemplos de *policondensação A-A/B-B*. Essa classificação vem da idéia de que os monômeros envolvidos são bifuncionais e têm a mesma funcionalidade nas porções terminais, ou seja, um dos monômeros envolvidos na condensação tem funções *A* nas extremidades (monômero *A-A*), enquanto o outro tem funções *B* (monômero *B-B*). A *policondensação A-B* está exemplificada pela Figura II.28d, que esquematiza a formação da caprolactona, um poliéster alifático, a partir do ácido ω -hidroxicapróico. Desde que a unidade monomérica possui dois grupos funcionais terminais diferentes, este é denominado monômero *A-B* e a reação também pode ser

chamada de *auto-condensação*, já que o polímero obtido é resultado da polimerização de um monômero bifuncional (Fried, 1995).

A Tabela II.4 sumariza as principais diferenças entre os mecanismos de condensação e adição na obtenção de polímeros.

TABELA II.4. Comparação entre as polimerizações de condensação e adição (adaptado de Mano, Mendes, 1999; Stevens, 1999)

CONDENSAÇÃO	ADIÇÃO
Crescimento do polímero ocorre em etapas pela reação entre dímeros, trímeros e oligômeros	Crescimento do polímero ocorre em cadeia pela adição sucessiva de monômeros
Iniciador não é necessário e o mecanismo de ação é sempre o mesmo	Os mecanismos de iniciação e propagação diferem de acordo com o iniciador empregado
Não há etapa de terminação e os grupos terminais permanecem reativos ao fim do processo	Etapa de terminação está geralmente envolvida
Velocidade de reação lenta, sem formação imediata do polímero	Velocidade de reação rápida, com formação imediata de polímeros
Monômeros são consumidos rápida-mente enquanto a massa molecular aumenta lentamente	Monômeros são consumidos progres-sivamente, mas a massa molecular aumenta rapidamente
Há formação de subprodutos micro-moleculares	Não há formação de subprodutos
Grau de polimerização médio, da ordem de 10^4	Grau de polimerização alto, da ordem de 10^5

A maioria das polimerizações em etapa corresponde a processos de condensação, assim como a maioria das polimerizações em cadeia compreende processos de adição. Entretanto, há exceções. (Stevens, 1999). A Figura II.29a ilustra a polimerização em etapa de uma poliuretana, cujo processo se dá por reações de adição (Fried, 1995). Por outro lado, a polimerização do diazometano catalisada por trifluoreto de boro é um exemplo de polimerização em cadeia por condensação (Figura II.29b) (Stevens, 1999).

FIGURA II.29. (a) polimerização em etapa de poliuretano por processo de adição e (b) polimerização em cadeia do diazometano por condensação.

Em 1994, a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), propôs a divisão dos processos de polimerização em quatro novas classificações (IUPAC, 1994):

- *policondensação*: o mesmo conceito de polimerização em etapa, com formação simultânea de subprodutos de baixa massa molecular;
- *poliadição*: o mesmo conceito de polimerização em etapa, sem formação de subprodutos;
- *polimerização em cadeia*: o mesmo conceito de polimerização em cadeia, sem a formação de subprodutos;
- *polimerização condensativa em cadeia*: o mesmo conceito de polimerização em cadeia, com formação de subprodutos de baixa massa molecular.

Entretanto, essa denominação ainda não está sendo amplamente empregada e a maioria dos autores continua utilizando a terminologia polimerizações em etapa (ou condensação) e em cadeia (ou adição).

2.6. QUITOSANA

Embora a quitosana, por sua natureza polimérica, devesse estar relacionada no tópico que aborda os polímeros (item 2.5), optou-se por descrevê-la num tópico à parte, pois esta macromolécula é, neste trabalho, o transportador eleito para os estudos de latenciação.

2.6.1. Conceito

Atualmente, devido à grande necessidade do desenvolvimento de materiais farmacêuticos biocompatíveis, os polímeros naturais têm-se tornado muito importantes por seu emprego bastante diversificado, além do baixo custo de obtenção. Assim, número significativo de polímeros com propriedades superabsorventes tem sido estudado (Pariser, Lombardi, 1989).

A quitina, segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, é homopolímero linear composto de unidades *N*-acetilglicosamina com ligações $\beta(1,4)$ e configuração tridimensional α -helicoidal estabilizada por ligações de hidrogênio intramolecular. A desacetilação parcial da quitina resulta na quitosana, polissacarídeo compreendido por copolímeros de glicosamina e *N*-acetilglicosamina (Figura II.30), que pode também ser encontrado naturalmente em alguns microrganismos e fungos (Singla, Chawla, 2001), como *A. oryzae*, *M. mucedo*, *P. blakesleeanus* (Koide, 1998). O percentual entre os monômeros de glicosamina e *N*-acetilglicosamina, que constituem a cadeia polimérica da quitosana, é chamado de grau de desacetilação (Ravi Kumar, 2000). O termo quitosana é empregado para descrever série de cadeias poliméricas com diferentes viscosidades, graus de desacetilação e massas moleculares (50 kDa a 2000 kDa) (Illum, 1998; Singla, Chawla, 2001). Denominam-se quitina aquelas cadeias poliméricas em que a unidade acetilada prevalece (grau de acetilação superior a 0,90). Quitosana é o derivado completa ou parcialmente *N*-desacetilado da quitina com grau de acetilação menor que 0,35 (Ravi Kumar, 2000).

FIGURA II.30. Estruturas parciais da quitina e quitosana.

2.6.2. Processo de obtenção

A quitosana é comercialmente produzida em larga escala no Japão, Polônia, Noruega, Índia, Itália, Rússia e Austrália (Ravi Kumar, 2000; Singla, Chawla, 2001) a partir da desacetilação da quitina. Comercialmente, quitina e quitosana variam em qualidade de fornecedor para fornecedor (Hirano, 1988). A quitina pode ser extraída de insetos, fungos e, principalmente, do exoesqueleto de crustáceos, como caranguejo, camarão e lagosta. O procedimento básico para extração da quitina e produção da quitosana (Figura II.31) envolve inicialmente o tratamento das carapaças de crustáceos, previamente lavadas e trituradas com base e ácido para a remoção de proteínas e minerais (carbonato e fosfato de cálcio), respectivamente. A quitina obtida é secada e submetida ao processo de desacetilação, que consiste no emprego de solução concentrada de hidróxido de sódio à temperatura elevada (Singla, Chawla, 2001).

As indústrias Katakurachikkarin Inc. e Kyoma Reizo Inc. isolaram quitina das cascas de caranguejo e forneceram à Kyoma Yushi Inc., onde a quitosana foi produzida industrialmente pela primeira vez, em 1971, no Japão (Hirano, 1988).

FIGURA II.31. Processo de obtenção da quitosana (Singla, Chawla, 2001).

2.6.3. Propriedades físico-químicas

A maioria dos polissacarídeos de origem natural, como celulose, dextrano, pectina, ágar e agarose, tem características neutras ou ácidas, enquanto que quitina ou quitosana são exemplos de polissacarídeos altamente básicos (Hench, 1998). Além disso, quitosana é a única goma catiônica de origem natural, que se torna viscosa quando em meio ácido (Ravi Kumar, 2000). Possui alta densidade de cargas, capazes de se aderirem a superfícies carregadas negativamente e quelar metais iônicos, além da capacidade de formar filmes (Singla, Chawla, 2001).

A quitina é altamente hidrofóbica e insolúvel na água e na maioria dos solventes orgânicos, solubilizando-se apenas em hexafluorisopropanol, hexafluoracetona e cloroálcoois, em conjugação com soluções aquosas de ácidos minerais e em dimetilacetamida contendo 5% de cloreto de lítio (Ravi Kumar, 2000). A quitosana, em geral, é solúvel nos ácidos acético, adípico, cítrico, fórmico, láctico, málico, malônico, oxálico e tartárico (Singla, Chawla, 2001). Isso porque, em pH ácido, os grupos amínicos livres (NH_2) tornam-se protonados sob a forma de grupos catiônicos (NH_3^+) (Sandford, 1988).

Fica claro, então, que o GD, que nada mais é do que a determinação, em percentual, do conteúdo de grupos amínicos livres no polissacarídeo (Rinaudo, Domard 1988), é uma das principais características físico-químicas da quitosana, pois o conteúdo em amina livre interfere e explica série de outras características, como solubilidade, massa molecular e viscosidade, além de muitas das aplicações biológicas (Li *et al.*, 1997).

A viscosimetria constitui-se em método simples e rápido de determinação da massa molecular, que gira em torno de $1,03 \cdot 10^6$ a $2,5 \cdot 10^6$ para a quitina e $1 \cdot 10^5$ a $5 \cdot 10^5$ para a quitosana, devido à *N*-desacetilação (Li *et al.*, 1997). Quitina e quitosana degradam antes de se fundirem, propriedade típica de polissacarídeos com ligação de hidrogênio (Ravi Kumar, 2000).

2.6.4. Propriedades biológicas

Dentre as inúmeras características que distinguem quitina e quitosana dos demais polissacarídeos, destaca-se a atividade antimicrobiana. Esses polímeros provocam a inibição do crescimento de microrganismos, como *E. coli*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Helminthosporium* (Ravi Kumar, 2000), *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. faecalis* (Olsen *et al.*, 1988), *Shigella dysenteriae*, *Aeromonas hydrophila*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus cereus*, *Coliforms*, *Vibrio* (Singla, Chawla, 2001), *Agrobacterium tumefaciens*, *Corinebacterium michiganense*, *Erwinia* sp., *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas Fluorescens*, *Xanthomonas campestris*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Drechslera sorokiniana*, *Micronectriella nivalis*, *Procularia oryzae*, *Rhizoctonia solani*, *Tricophyton equinum* (Seo, Mitsuhashi, Tanibe, 1991) e *Candida* (Koide, 1998). Alguns pesquisadores explicam a atividade antimicrobiana da quitosana por seus grupos amínicos que, uma vez em contato com os fluidos fisiológicos, provavelmente se protonizam e se ligam a grupos aniônicos desses microrganismos, resultando na aglutinação das células microbianas e inibição do crescimento (Olsen *et al.*, 1988; Ravi Kumar, 2000). Entretanto, estudos mais recentes revelam que o mecanismo da atividade antimicrobiana da quitosana está intimamente relacionado com as propriedades físico-químicas do polímero e com as características da membrana do microrganismo. Micrografias eletrônicas realizadas por Jiang e colaboradores (1997) (*apud* Zheng, Zhu, 2003) de *S. aureus* (bactéria gram-positiva) e *E. coli* (bactéria gram-negativa) na presença de quitosana mostram que a membrana do *S. aureus* foi enfraquecida ou até mesmo fragmentada, enquanto o citoplasma da *E. coli* foi concentrado e o interstício da célula, ampliado. Zheng e Zhu (2003) demonstraram que a atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas aumenta quanto maior a massa molecular do polímero, enquanto que, para bactérias gram-negativas, quanto menor a massa molecular da quitosana, maior a atividade antimicrobiana. Esses resultados sugerem que os efeitos da quitosana são distintos nos dois tipos de bactérias: no caso das gram-positivas, a hipótese é que quitosana de alta massa molecular forma películas ao redor da célula que acabam por inibir a absorção de

nutrientes, enquanto que quitosana de baixa massa molecular penetra mais facilmente em bactérias gram-negativas, causando distúrbios no metabolismo desses microrganismos (Zheng, Zhu, 2003).

Quitina e quitosana desempenham, ainda, importante papel na hemostase (Olsen *et al.*, 1988; Singla, Chawla, 2001), porém de maneira independente ao sistema clássico da cascata de coagulação (Rao, Sharma, 1997). Estudos realizados por Okamoto e colaboradores (2003) mostram que esses polímeros reduzem o tempo de coagulação sanguínea de forma dose-dependente, sendo a quitosana (tempo de coagulação sanguínea de 3,7 minutos) mais efetiva que a quitina (tempo de coagulação sanguínea de 4,7 minutos) na coagulação sanguínea sob a mesma concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ (tempo de coagulação sanguínea de 12 minutos para o controle), embora a quitina tenha maior capacidade em agregar plaquetas (61,2%) que a quitosana (27,9%). O fato de a quitosana ser mais eficaz na coagulação sanguínea, mesmo quando a quitina tem maior poder de agregação plaquetária, se atribui à sua capacidade em agregar também os eritrócitos (Rao, Sharma, 1997; Okamoto *et al.*, 2003) devido à interação das cargas positivas dos grupos amínicos livres da quitosana com as cargas negativas de receptores dos eritrócitos contendo resíduos de ácido neuramínico (Singla, Chawla, 2001) e murâmico (Rao, Sharma, 1997). A ação da quitina e quitosana sobre as plaquetas produz mais um efeito benéfico, que é a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas-AB (PDGF-AB) e fator de transformação do crescimento- β_1 (TGF- β_1), provavelmente pelo dano causado às membranas plaquetárias pela forte agregação induzida, principalmente, pela quitosana (Okamoto *et al.*, 2003). PDGF-AB e TGF- β_1 são citocinas liberadas pelas plaquetas, que desempenham importante papel no processo de cicatrização.

Potente ação analgésica tópica também é atribuída à quitina e quitosana. Estudos realizados por Okamoto e colaboradores (2002) sugerem que o principal efeito analgésico da quitosana é decorrente da captura de hidrogênios ácidos liberados no local da inflamação pela ionização do grupo amínico à NH_3^+ . A bradicinina, mediador químico liberado pelo cininogênio plasmático e outras citocinas, como Fator de Necrose

Tumoral α (FNT α) e as Interleucinas 1 (IL-1) e 8 (IL-8), parece ser particularmente importante para a produção da dor no local inflamado (Insel, 1996). A quitosana teria, ainda, a propriedade de absorver a bradicinina liberada no sítio da inflamação e a quitina, capacidade de absorção quase 3 vezes maior que esta.

A propriedade imunomoduladora da quitosana é devida à sua capacidade de ativar quase que exclusivamente o macrófago (Olsen *et al.*, 1988). Os macrófagos, ativados pelos oligômeros de quitina e quitosana de baixa massa molecular, liberam interleucina-1 (Figura II.32), que estimula a proliferação de fibroblastos e influencia a estrutura do colágeno. Liberam, também, *N*-acetilglicosaminidase, que hidrolisa a quitosana a monômeros de *N*-acetilglicosamina e glicosamina, unidades de açúcares necessários à biossíntese do ácido hialurônico e outros componentes da matriz extracelular (Muzzarelli, 1991). Promovem a migração de neutrófilos, facilitando a resolução da resposta inflamatória (Koide, 1998). As atividades bactericidas e bacteriostáticas sugerem que estes polímeros podem prevenir infecções, se aplicados diretamente no local da lesão (Koide, 1998). A quitosana é excelente umectante e adere melhor que ácido hialurônico, além de ser economicamente mais viável (Sandford, 1988).

Em culturas de células tratadas com quitina e seus derivados, verificou-se o aumento da atividade da lisozima extracelular, o que estimula a formação de tecido conjuntivo (Ravi Kumar, 2000). *N*-acetilglicosamina é o maior componente do epitélio e sua presença é essencial na reparação tecidual das feridas. Quitina e quitosana são facilmente despolimerizadas pela lisozima, presente naturalmente no fluido da lesão, e funcionam como fontes de liberação retardada de monômeros *N*-acetilglicosamina no processo de cicatrização (Olsen *et al.*, 1988; Kifune, 1991; Ravi Kumar, 2000). Além disso, feridas tratadas com quitosana mostraram menor grau de fibroplasia (Sandford, 1988; Singla, Chawla, 2001), favorecendo a reepitelização com formação de cicatriz lisa (Kifune, 1991). O fato de serem despolimerizadas pela lisozima também pode ser aproveitado para o desenvolvimento de sistemas bioerosíveis para a liberação de fármacos (Sandford, 1988).

FIGURA II.32. Lisozima, normalmente produzida por macrófagos, hidrolisa quitosana a oligômeros que ativam macrófagos a produzir interferona, fator de necrose tumoral e interleucina-1. Macrófagos ativados também produzem *N*-acetil- β -D-glicosaminidase (NAGase), que catalisa a produção dos monômeros D-glicosamina, *N*-acetilglicosamina e glicosamina substituída a partir dos oligômeros. Esses aminoaçúcares ficam disponíveis aos fibroblastos, que proliferam sob ação da interleucina-1, para incorporação no hialuronato e glicosaminoglicanos, que guiam a deposição ordenada do colágeno, também influenciada pelos oligômeros (adaptado de Muzzarelli, 1991, 1997).

Estas propriedades estão sendo exploradas no desenvolvimento de materiais comerciáveis para o tratamento de feridas (Ravi Kumar, 2000). No Japão, já se encontra disponível pele artificial de quitina, a Besquitin W[®], que pode ser aplicada em casos de queimaduras superficiais, profundas e de terceiro grau, além de lesões traumáticas e abrasivas, promovendo hemostasia, analgesia e aceleração da epitelização (Kifune, 1991).

O uso interno da quitosana, por via oral, promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal dessas gorduras. A administração concomitante com ácido ascórbico aumenta a formação de gel (Koide, 1998), favorecida em pH ácido (Ravi Kumar, 2000), e as cargas positivas dos grupos amínicos protonizados interagem com as cargas negativas dos grupos carboxílicos das gorduras. Quando no intestino, o pH elevado provoca a precipitação da quitosana, aprisionando

as gorduras no gel solidificado e eliminando-as no bolo fecal. A ação hipolipidêmica da quitosana pode ser atribuída, também, à interrupção da circulação entero-hepática dos ácidos biliares, porém a biossíntese endógena de colesterol permanece intacta. Atua formando gel no trato gastrointestinal, que captura lipídeos e outros nutrientes, incluindo vitaminas lipossolúveis e minerais como o cálcio, indisponibilizando-os para absorção (Koide, 1998; Singla, Chawla, 2001).

2.6.5. Toxicidade

Landes e Bough (1976) classificaram a quitosana como polímero inerte devido à sua baixa toxicidade. Estudos de hemocompatibilidade comprovam que a quitosana não produz toxicidade sistêmica aguda significativa, além de não induzir hemólise nem liberação de pirogênios (Radhakrishnan *et al.*, 1991; Rao, Sharma, 1997). Biomateriais extraídos de substâncias naturais podem estar contaminados por bactérias (Nakagawa *et al.*, 2003). Apesar dos métodos de esterilização, como autoclavagem, irradiação e emprego de óxido de etileno, serem capazes de exterminar os microrganismos, endotoxina, o mais potente pirogênio liberado pela ruptura da membrana externa de bactérias Gram-negativas, não pode ser inativado e mínimas doses em humanos ($4,1 \text{ UI.kg}^{-1}$ ou maior) são suficientes para provocar febres elevadas (Hochstein *et al.*, 1994). Nakagawa e colaboradores (2003) estudaram o potencial pirogênico de bandagens e outros tipos de curativos para feridas, comercializadas no Japão e fabricadas com biomateriais, e confirmaram que a quitina não apresentou pirogênios, ao contrário de outros materiais compostos por alginatos, cujas três amostras analisadas liberaram níveis bastante elevados de endotoxina.

A toxicidade, DL_{50} de 16 g.kg^{-1} em ratos (Hirano, 1988), é evidenciada apenas quando estas são empregadas como suplemento alimentar por longos períodos e está relacionada com o bloqueio da absorção de cálcio e vitaminas lipossolúveis, podendo acarretar disfunções ósseas, deficiência vitamínica e retardo do crescimento (Koide, 1998).

2.6.6. Emprego nos processos farmacêuticos

Quitina, quitosana e seus derivados têm sido testados para o uso farmacêutico e cosmético, sendo que gotas, pós, comprimidos, filmes e membranas estão sendo preparados através desses polissacarídeos (Hirano *et al.*, 1991).

Quando neutralizada com ácido, a quitosana se torna viscosa, o que permite seu emprego em cremes, loções e géis (Ravi Kumar, 2000). A capacidade de a quitosana intumescer e assumir consistência semelhante à dos tecidos corporais realça sua biocompatibilidade, tornando-a excelente matriz para fármacos hidrofílicos, que permeiam pobremente em matrizes de silicone, atualmente utilizadas na liberação de fármacos (Ravi Kumar, Kumar, 2001). Na produção de comprimidos, pode ser empregada como diluente e agente desintegrante, devido à sua grande habilidade em absorver água (Ravi Kumar, 2000), agregante, material de revestimento, mucoadesivo e veículo para a liberação prolongada ou cólon específica (Singla, Chawla, 2001).

Sistemas de liberação controlada eficazes já foram desenvolvidos, porém o novo desafio é a incorporação de materiais biodegradáveis, como a quitosana. Para administração por via oral, suas atividades antiúlcera e antiácida previnem a irritação da parede estomacal pelo contato direto do fármaco. Além disso, a matriz de quitosana intumescer em meio ácido e flutua no estômago, prolongando o período de permanência no corpo (Ravi Kumar, 2000). Exibe, ainda, alta adesividade em fluidos intestinais e funciona como promotor de absorção de fármacos hidrofílicos através das mucosas nasal e intestinal (Singla, Chawla, 2001). Todas essas propriedades fazem deste polímero candidato ideal para formulações orais de liberação controlada (Ravi Kumar, 2000).

A quitosana é excelente biomaterial e pode ser aplicada como curativo em ferimentos, queimaduras, úlceras de pele e escaras, sistemas de liberação de fármacos, membranas artificiais de rins e lentes de contato (Muzzarelli, 1986; Brine *et al.*, 1992). Alguns sistemas transdérmicos utilizando membranas de quitosana estão

sendo estudados na liberação de fármacos lipo e hidrofílicos (Ravi Kumar, Kumar, 2001).

Face ao exposto, a quitosana e seus derivados têm emprego potencial não somente como adjuvantes farmacêuticos em sistemas convencionais ou novas formas de liberação controlada, mas também como compostos biologicamente ativos (Singla, Chawla, 2001).

2.6.7. Derivados da quitosana

A modificação química dos polímeros em geral consiste em importante tópico para a síntese de materiais bifuncionais (Harish Prashanth, Tharanathan, 2003). Nesse contexto, a quitosana desperta especial atenção por possuir grupos amina e hidroxila quimicamente modificáveis (Hirano, 1988). Sofre reações típicas de amina nos grupos amínicos alifáticos primários dos monômeros desacetilados, sendo a *N*-acilação e reação de Schiff as mais importantes. Reação com cetoácidos seguida de redução com boroidreto ou cianoboroidreto de sódio produz grupos amínicos não-protéicos (Ravi Kumar, 2000). *N*-carboximetilquitosana (CMQ) e *N*-carboxibutilquitosana (CBQ) são obtidas com os ácidos glioxílico e levulínico, respectivamente. Muitos são os estudos para a otimização da síntese do derivado *N*-carboximetílico hidrossolúvel da quitosana a partir da reação com ácido glioxílico (Muzzarelli *et al.*, 1982; Rinaudo *et al.*, 1992; Le Dung *et al.*, 1994; Muzzarelli, Ilari, Petrarulo, 1994; Baumann, Faust, 2001; Colo *et al.*, 2004), embora também possa ser sintetizada pela reação com ácido monocloroacético (Guan *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001; Kittur *et al.*, 2002; Chen, Tian, Du, 2004).

A administração de *N,O*-CMQ em gel ou solução após procedimento cirúrgico reduz o tamanho e o número de adesões pós-cirúrgicas em modelo animal experimental. Mostrou-se mais efetiva que ácido hialurônico (Hirano, 1988; Koide, 1998; Zhou, Elson, Lee, 2004). Biomateriais, em geral, contendo grupos ionizáveis, principalmente carboxílicos, estão sendo empregados com essa finalidade por serem capazes de se aderirem às mucosas sem a necessidade de suturas ou adesivos,

provavelmente pela formação de ligações de hidrogênio entre o grupo carboxílico do biomaterial e o resíduo amínico ou hidroxílico tecidual. Contudo, experimentos mostram que a força de ligação é baixa e se torna menor quando o polímero é intumescido em água (Ravi Kumar, Kumar, 2001). Entretanto, a carboximetilação da quitosana prejudica a hidrossolubilidade do derivado, sendo a O-CMQ a forma de melhor solubilidade em pH de 3 a 11 (Li *et al.*, 1997).

O processo de cicatrização espontânea nem sempre conduz à normalidade morfo e fisiológica das áreas afetadas, resultando na formação de tecido conjuntivo anômalo, fibrótico, com reduzida resistência mecânica e tendência à retração. O gel de N-CBQ favoreceu a formação de tecido conjuntivo frouxo antes do arranjo das fibras de colágeno numa arquitetura histológica organizada, facilitando a difusão de substâncias e a proliferação celular (Biagini *et al.*, 1991). O gel desse derivado não se altera fisicamente em contato com fluidos da lesão e gera gradiente de difusão de substâncias solúveis liberadas pelas células durante o processo de cicatrização (Muzzarelli, 1991). O derivado cíclico da CBQ, 5-metilpirrolidinonaquitosana (5-MPQ), também é bastante efetivo na cicatrização de feridas (Muzzarelli, 1997).

Recentemente, o enxerto de monômeros vinílicos na quitosana vem despertando grande interesse, uma vez que a combinação química entre polímeros sintéticos e naturais rendem novos materiais que podem somar propriedades desejáveis, como biodegradabilidade (Singh, Ray, 1998). A quitosana possui dois tipos de grupos reativos que podem ser enxertados por outros polímeros: primeiro, os grupos amínicos das unidades monoméricas desacetiladas e, segundo, as hidroxilas das posições C₃ e C₆, tanto das unidades acetiladas quanto das desacetiladas (Hirano, 1988; Berger *et al.*, 2004). O enxerto da quitosana com monômeros funcionalizantes é uma excelente via para melhorar propriedades da quitosana, como aumento da solubilidade em meio aquoso ou orgânico, mucoadesividade, biocompatibilidade, além de tornar possível o desenvolvimento de matrizes de intumescimento pH-sensíveis para liberação de fármacos e outros biomateriais para o tratamento de feridas (Berger *et al.*, 2004).

2.7. LATENCIAÇÃO

2.7.1. Conceitos

No que se refere à introdução de novos fármacos, os processos de modificação molecular são os mais promissores (Korolkovas, 1988; Wermuth, 2003). Entre eles, merece realce a latenciação (Bundgaard, 1985; Wermuth, 2003; Chung, Ferreira, 1999), que consiste na transformação do fármaco em forma de transporte inativo, que, *in vivo*, mediante reação química ou enzimática, libera a porção ativa no local de ação ou próximo dele. Uma das formas latentes obtidas mediante este processo denomina-se pró-fármaco (Wermuth, 1984).

Alguns pró-fármacos já são conhecidos há muito tempo: a codeína, derivado da morfina isolado no século XIX, é um pró-fármaco que, no organismo, se converte em morfina para então promover seus efeitos narcóticos (Hiller, 1991). A triacetina, pró-fármaco do ácido acético, de ação antifúngica, e a metenamina, forma latente do formaldeído, de ação anti-séptica urinária, são outros exemplos (Korolkovas, 1988).

A latenciação tem sido bastante utilizada nos últimos anos, tornando-se uma das principais ferramentas na arte do planejamento de quimioterápicos específicos, recebendo atenção na sua aplicação em um dos maiores desafios da Ciência: o combate à AIDS e ao câncer (Chung, Ferreira, 1999; Testa, Caldwell, 1996).

Segundo Friis e Bundgaard (1996), alguns critérios devem ser considerados durante o planejamento do pró-fármaco:

- existência de grupos funcionais na molécula matriz capazes de sofrer derivatização;
- existência de mecanismos e/ou sistemas no organismo capazes de bioativar o pró-fármaco;
- facilidade e simplicidade da síntese e purificação do pró-fármaco;
- estabilidade química do pró-fármaco;

- regeneração, *in vivo*, da molécula matriz, em quantidades ideais;
- toxicidade do transportador e do pró-fármaco *per se*.

Dessa forma, a latenciação permite, mediante a escolha de transportadores adequados, via de regra desprovidos de atividade biológica, o melhoramento das propriedades indesejáveis do fármaco (Chung, Ferreira, 1999).

Entre os diversos métodos de preparação de pró-fármacos, a esterificação é a mais empregada, seguido da formação de amidas, imidas e carbamatos (Korolkovas, 1988; Bundgaard, 1985, 1991; Friis, Bundgaard, 1996).

Estudos demonstraram que a utilização de agente espaçante, grupo químico que estabelece a ligação entre fármaco e transportador, permite acesso maior e melhor da enzima (Korolkovas, 1988; Bundgaard, 1991; Friis, Bundgaard, 1996). Dessa forma, a liberação da porção ativa, que consiste no fator preponderante na manifestação da atividade biológica, é facilitada (Chung, Ferreira, 1999).

De acordo com Wermuth (1984), os pró-fármacos podem ser classificados em:

- pró-fármacos clássicos;
- bioprecusores;
- pró-fármacos mistos e
- fármacos dirigidos.

Os *pró-fármacos clássicos* consistem na ligação do fármaco a um transportador adequado, geralmente de caráter lipofílico, visando à resolução de problemas farmacocinéticos, como melhoria da atividade terapêutica por aumento de biodisponibilidade, diminuição da toxicidade, prolongamento da ação e aumento da seletividade (Chung, Ferreira, 1999; Wermuth, 2003).

Bioprecursores, diferentemente dos pró-fármacos clássicos, não apresentam transportador. Constituem-se em moléculas resultantes de modificação molecular com a formação de um novo composto que deve sofrer biotransformação pelo sistema redox celular para transformar-se em metabólito ativo (Wermuth, 2003).

Pró-fármacos mistos são compostos que possuem, ao mesmo tempo, características de pró-fármacos clássicos e de bioprecursores (Chung, 1996). Constituem-se em moléculas biologicamente inertes, que requerem várias etapas para a sua conversão à forma ativa, aumentando a liberação do fármaco em um sítio ou órgão específico (Brewster, Bodor, 1994).

Fármacos dirigidos compreendem formas de transporte de fármaco em que o transportador, normalmente macromoléculas como proteínas, hormônios, anticorpos, têm alta seletividade por receptores celulares e a biotransformação é mediada por enzimas, em geral, hidrolíticas (Schacht *et al.*, 2003). O objetivo principal do fármaco dirigido é minimizar as reações adversas provocadas pela ação inespecífica do fármaco em outros alvos (Zorc *et al.*, 1995), diminuindo, pois, a toxicidade.

Formas latentes mais seletivas, como o ADEPT (Antibody Directed Enzyme-Prodrug Therapy) e o GDEPT (Gene Directed Enzyme-Prodrug Therapy) representam grande avanço na latenciação como processo para se atingir alta seletividade de ação (Ettmayer *et al.*, 2004).

2.7.2. Polímeros na latenciação

Entre os transportadores empregados para prolongamento da ação de fármacos estão os polímeros, que conferem, em decorrência da ação prolongada, melhor biodisponibilidade dos fármacos com toxicidade diminuída. Outra vantagem consiste na possibilidade de se ligar diversos compostos à matriz polimérica com o intuito de obter sinergismo de ação (Meijer *et al.*, 1990).

A ligação de fármacos a matrizes poliméricas visa, via de regra, à obtenção de formas de ação prolongada e toxicidade diminuída. No entanto, dependendo do tipo de polímero e da ligação com o composto desejado, pode-se conferir seletividade de ação. Empregando fármacos dirigidos poliméricos, é possível acumular o fármaco no local de ação, minimizando sua toxicidade nos tecidos normais. Uma vez que a liberação do fármaco é prolongada, a dose requerida na formulação é diminuída (Kopeček, Duncan, 1987; Zorc *et al.*, 1995; Lovrek *et al.*, 2000).

Os polímeros, para serem empregados como agentes transportadores de substâncias farmacologicamente ativas, devem possuir determinadas características, como inocuidade, ausência de imunogenicidade, ser preferencialmente, biodegradáveis e apresentar estabilidade suficiente da ligação entre o fármaco e a matriz polimérica até a liberação do composto ativo no compartimento adequado (O'Mullane, Daw, 1991).

Muitos são os trabalhos encontrados na literatura que buscam melhorar a biodisponibilidade de fármacos pelo emprego de polímeros. Nesse sentido, a maioria destes se limita a conjugar o fármaco à matriz polimérica por interações iônicas ou inclusão. No entanto, há vários trabalhos que relatam a latenciação do fármaco à matriz polimérica. Duncan e colaboradores (2001) reúnem vários exemplos de pró-fármacos poliméricos de doxorrubicina, paclitaxel, camptotecina e platinato, utilizando poli-(hidroxipropilmetacrilato) (PHPMA), poli-(etilenoglicol) (PEG), poli-(ácido glutâmico) e galactosamina como transportadores, a serem empregados na terapia antitumoral, segundo os novos conceitos de PDEPT (Polymer-Directed Enzyme Prodrug Therapy) e PELT (Polymer-Enzyme Liposome Therapy), que promove a liberação maciça do fármaco dentro do interstício tumoral. O diflunisal, agente antiinflamatório, foi latenciado, via esterificação, ao poli-(*N*-hidroxietil-DL-aspartamida) (PHEA), e gerou respectivo pró-fármaco hidrossolúvel para administração oral ou parenteral (Giammona *et al.*, 1994). Zorc e colaboradores (1995,2000,2001) têm sintetizado pró-fármacos poliméricos de broxuridina com PHEA e poli- $[\alpha,\beta-(N\text{-}2\text{-aminoetil-DL-aspartamida})]$ -poli- $[\alpha,\beta-(N\text{-}2\text{-hidroxietil-DL-aspartamida})]$ (PAHA), de gemfibrozila e de fenoprofeno com PHEA e poli- $[\alpha,\beta-(N\text{-}3\text{-hidroxipropil-DL-aspartamida})]$ (PHPA), obtendo, em todos os casos, pró-

fármacos promissores que diferem no perfil de liberação de acordo com a matriz polimérica e do espaçante envolvido.

Kato e colaboradores (2000, 2004) descrevem a síntese do pró-fármaco de mitomicina C, empregando a succinilquitosana (SCQ) como transportador, obtendo derivados hidrossolúveis e insolúveis, sendo estes últimos consequência da reticulação da matriz polimérica pelo emprego de carbodiimida como agente acoplante. O estudo revela que *N*-SCQ apresentou excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade e tem longo período de retenção no organismo, o que faz desse polímero um promissor transportador polimérico (Kato, Onishi, Machida, 2004). A 6-*O*-carboximetil-quitina também foi explorada como transportador polimérico na síntese de pró-fármacos hidrossolúveis, de administração endovenosa, da 5-fluoruracila. O estudo comprova a liberação lenta e direcionada do fármaco para as células tumorais, o que reduz, consideravelmente, seus efeitos tóxicos (Ohya, Inosaka, Ouchi, 1992).

Fica claro, então, que o emprego de transportadores poliméricos na latenciação de fármacos já vem sendo explorado com sucesso, porém o número de trabalhos realizados ainda é relativamente pequeno frente às vantagens que este tipo de planejamento oferece. Isso porque a síntese e caracterização de polímeros não é procedimento simples e de fácil aquisição.

2.7.3. Uso tópico de pró-fármacos

A pele, maior órgão do corpo, funciona como interface entre o organismo e o ambiente externo e, por essa razão, está direta e continuamente exposta a vasto número de agentes estranhos (Mukhtar, Agarwal, 1993), que podem causar patologias específicas, que requeiram tratamento por aplicação tópica de medicamentos (Pannatier, Testa, Etter, 1981).

Entretanto, como a pele é membrana heterogênea, que consiste do estrato córneo lipofílico, epiderme e derme, ambas hidrofílicas (Figura II.33), a permeação da

pele pelo fármaco depende da hidrofiliicidade ou lipofiliicidade do composto (Tojo, Lee, 1987).

FIGURA II.33. Esquema da pele em corte transversal (http://www.kappamedical.com/skin_models.htm).

O aumento da penetração do fármaco pode ser realizado por alteração das propriedades de barreira do estrato córneo por meio do uso de substâncias químicas, que fornecem força adicional dirigida para tal transporte (por exemplo, iontoforese), ou por modificação química através da formação de pró-fármacos (Hadgraft, 1985; Anderson, 1993).

Segundo Hadgraft (1985), o desenvolvimento de pró-fármacos permite aumentar a atividade do fármaco administrado topicamente, uma vez que a modificação das interações fármaco-pele aumenta a taxa de penetração. Além disso, a pele contém

muitas enzimas não-específicas capazes de biotransformar pró-fármacos, liberando o fármaco de seu transportador e tornando-o disponível bem próximo ao seu sítio de ação. A Figura II.34 mostra a importância da difusão de pró-fármacos com biotransformação simultânea.

FIGURA II.34. Representação esquemática do uso de pró-fármacos na terapia tópica (Hadgraft, 1985).

Segundo Boehnlein e colaboradores (1994), que estudou o metabolismo do palmitato de retinil a retinol (vitamina A) por ação da esterase cutânea, a taxa de permeação através da pele desses compostos parece ser determinada pela difusão através do estrato córneo e o metabolismo primário parece ocorrer na epiderme. O metabolismo pode afetar a permeação da pele, quando a epiderme contribuir para a função de barreira.

No caso de pró-fármacos sintetizados por esterificação, a presença de esterase na pele é fundamental para que a liberação do fármaco ocorra *in situ*.

Trabalho realizado por Yu *et al.* (1980) revelou que o estrato córneo, a epiderme e parte da derme contêm mais esterase que o restante da pele, sendo que a atividade esterásica foi 4 a 9 vezes mais elevada na epiderme que na derme.

Pannatier, Testa e Etter (1981) observaram que a esterase cutânea envolvida na biotransformação de ésteres de *para*-nitrobenzoato se encontra solubilizada no citosol, pois é estável quando submetida ao calor acima de 50 °C. Além disso, verificaram que a taxa de hidrólise cutânea desses compostos aumenta com o aumento da lipofilicidade e diminui com a ramificação do C_α, ou seja, a reação enzimática de hidrólise é altamente sensível a impedimento estérico nas proximidades da ligação éster.

Esses resultados podem ser usados para prever o possível efeito terapêutico do pró-fármaco, quando este for aplicado topicamente.

OBJETIVO E JUSTIFICATIVAS

III. OBJETIVO E JUSTIFICATIVAS

O objetivo principal deste trabalho é o planejamento e síntese de pró-fármacos poliméricos potencialmente ativos contra leishmaniose e doença de Chagas, uma vez que estas endemias tropicais acometem grande parte do território brasileiro (WHO, 2003).

O tratamento dessas parasitoses é bastante precário por três principais razões: (1) escasso arsenal terapêutico; (2) elevada toxicidade dos fármacos disponíveis no mercado e (3) desinteresse das indústrias farmacêuticas multinacionais em desenvolver moléculas mais eficazes para o tratamento de endemias que prevalecem nos países pouco desenvolvidos ou em desenvolvimento – as chamadas doenças negligenciadas (Trouiller *et al.*, 2002).

O NFOH, que consiste na base de Mannich do NF, foi sintetizado neste laboratório por Chung (1996) e manifestou atividade promissora *in vitro* contra todas as formas do *T. cruzi*, especialmente em amastigotas e tripomastigotas, além de ser 300 a 400% menos tóxico que o fármaco de partida (Guido *et al.*, 2001).

Por ser um nitrocomposto, espera-se que o NFOH também exerça atividade antiparasitária na leishmaniose, uma vez que o nifurtimox, nitrocomposto ativo contra formas sangüíneas do *T. cruzi* e também, provavelmente menos, sobre as teciduais (Dias, 1999), tem se mostrado eficaz em casos de leishmaniose muco-cutânea na Colômbia e no Brasil (Carvalho, Arribas, Ferreira, 2000). Sendo assim, pretende-se confirmar, ainda neste trabalho, a atividade leishmanicida do NFOH para assegurar a aplicação dos pró-fármacos planejados na leishmaniose.

Quitina e quitosana são a maior causa de poluição em áreas de costas marítimas, onde as cascas de crustáceos não são aproveitadas, como México, Noruega

e Chile. O aproveitamento desses materiais constitui-se em fator positivo não somente do ponto de vista ambiental, mas também econômico, pelo baixo custo de processamento (Ravi Kumar, 2000).

A produção industrial de quitosana, pioneira no Japão, vem crescendo desde 1970. Suas aplicações estão concentradas nas áreas de processamento de alimentos, tratamento de águas e quelação de íons metálicos. Entretanto, o interesse por novas aplicações industriais, que agreguem valor aos produtos, como cosméticos, transportadores de fármacos, aditivos de alimentos, membranas semi-permeáveis, entre outros derivados, é crescente a cada ano (Li *et al.*, 1997).

Propriedades, como atividades antibacteriana e antifúngica e papel na cicatrização de feridas, sugerem que estes polímeros, quando aplicados diretamente no local da lesão, podem prevenir infecções, ao mesmo tempo em que aceleram o processo de reepitelização (Koide, 1998). Têm, ainda, a capacidade de ativar macrófagos, que estimulam a proliferação de fibroblastos. Estes, por sua vez, acarretam melhor arranjo das fibras de colágeno, facilitando a difusão de substâncias e a proliferação celular no processo de cicatrização (Muzzarelli, 1991).

Essas características, somadas à biocompatibilidade, fazem do uso tópico da quitosana não somente um simples veículo, mas a ação sinérgica da atividade do fármaco e do polímero (Singla, Chawla, 2000). Em outras palavras, o espectro de ação antimicrobiano é ampliado, ao mesmo tempo em que a cicatrização é potencializada pelo polímero.

Por outro lado, a propriedade da quitosana em ativar macrófagos (Olsen *et al.*, 1988; Muzzarelli, 1991) pode ser aproveitada no planejamento de pró-fármacos antichagásicos e leishmanicidas, uma vez que as formas replicantes dos parasitas são intracelulares e infectam, mais comumente, células do sistema fagocitário mononuclear (Dias, 1999; Marzochi, Marzochi, Schubach, 1999).

Por todas as razões citadas anteriormente, elegeu-se a quitosana como o transportador polimérico a ser empregado na síntese dos pró-fármacos de NFOH.

Para garantir a atividade terapêutica do NFOH, é necessário que a ligação fármaco-polímero seja cindida por via química ou enzimática. Sendo a esterase uma enzima amplamente distribuída nos tecidos e compartimentos corporais, como a pele (Yu *et al.*, 1980; Pannatier, Testa, Etter, 1981; Boehnlein *et al.*, 1994) e plasma sanguíneo, os pró-fármacos foram idealizados por meio da ligação do tipo éster. Para tanto, ou o fármaco, ou o polímero, devem ser derivatizados com espaçante que contenha grupo carboxílico. Como o NFOH é um composto fotossensível, termossensível e tem baixa estabilidade em meio ácido (Chung *et al.*, 2003), a quitosana foi escolhida como alvo para inserção do grupo espaçante carboxílico, conforme representado na Figura III.1

A síntese dos pró-fármacos não pode perder de vista que os produtos obtidos devem manter características físico-químicas, tais como hidrossolubilidade e propriedade filmogênica, para garantir a sua aplicação sob as formas injetável, gel ou membrana.

Na doença de Chagas, cuja infecção do parasita é sanguínea e macrofágica (De Lana, Tafuri, 1991; Dias, 1999), é pré-requisito que o pró-fármaco obtido seja hidrossolúvel para que a administração se dê pela via parenteral. No caso da leishmaniose, que se manifesta sob as formas visceral, cutânea e muco-cutânea, são planejados os pró-fármacos hidrossolúveis, para administração parenteral em leishmaniose visceral e muco-cutânea, no caso de mucosas inacessíveis, além do pró-fármaco sob a forma de filme ou gel a ser aplicado topicamente sob as lesões cutâneas e muco-cutâneas acessíveis.

Como, do primeiro planejamento, obtiveram-se os pró-fármacos propostos sem nenhuma solubilidade, partiu-se, então, para uma nova abordagem (Figura III.2): em vez de sintetizar os pró-fármacos para subsequente solubilização e formação dos

filmes, sintetizar-se-iam, primeiramente, os filmes. Por meio de enxerto com AA e HEMA, para posterior etapa de latenciação do NFOH na membrana já formada, desde que a matriz possuísse grupos carboxílicos, sem, necessariamente, ser solúvel em meio aquoso.

Entretanto, como a segunda metodologia não aborda a obtenção dos derivados hidrossolúveis para administração endovenosa, planejou-se, então, a despeito da instabilidade do fármaco, a síntese do hemissuccinato de hidroximetilnitrofural (SCNFOH) para subsequente ligação de sua carboxila com os grupos amina e/ou hidroxilas da quitosana *N*-metilfosfônica (MFQ), derivado hidrossolúvel da quitosana (Figura III.3). A síntese do SCNFOH também torna possível a sua ligação direta à quitosana, que, após solubilização, pode dar origem ao gel ou membrana desse pró-fármaco.

FIGURA III.1. Representação esquemática do objetivo inicial de derivatização da quitosana com os espaçantes succinóico, carboximetílico e carboxibutílico para posterior latênciação do NFOH.

FIGURA III.2. Representação esquemática da síntese do pró-fármaco de NFOH sob filme de quitosana previamente formado pelo enxerto de AA e HEMA.

FIGURA III.3. Representação esquemática da derivatização do NFOH com espaçante succinílico para posterior latência na quitosana.

MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAL

4.1.1. Reagentes, solventes e diversos

- nitrofural (NF) (sintetizado pelo Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares, FCF/USP);
- formaldeído (CH_2O) (Synth);
- carbonato de potássio (K_2CO_3) (Ecibra e Merck);
- água desionizada;
- clorofórmio (CHCl_3) (Merck);
- metanol (MeOH) (Merck);
- ácido acético (AcOH) (Merck);
- anidrido succínico (Vetec);
- tetraidrofurano (THF) (Merck);
- ácido sulfúrico (H_2SO_4) (Merck);
- quitosana de alta massa molecular (AMM) (Sigma);
- quitosana de média massa molecular (MMM) (Sigma);
- quitosana de baixa massa molecular (BMM) (Sigma);
- quitosana PADETEC (PADETEC, CE);
- hidróxido de sódio (NaOH) (Merck);
- etanol (EtOH) (Merck);
- *N,N*-dimetilformamida (DMF) (Nuclear);
- piridina (Merck);
- ácido levulínico (Fluka);
- boroidreto de sódio (NaBH_4) (Acrós);
- ácido glioilico monoidratado (Sigma-Aldrich);
- ácido fosforoso (Sigma-Aldrich);
- nitrato de cério e amônio ($(\text{NH}_4)\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$) (Sigma-Aldrich);
- metacrilato de hidroxietila (HEMA) (Sigma-Aldrich);

- ácido acrílico (AA) (Hopkin & Williams GPR e Sigma-Aldrich);
- *N,N*-dícicloexilcarbodiimida (DCC) (Merck);
- Herquat[®] (2-HT);
- dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich);
- cloreto de tionila (Sigma-Aldrich);
- protease Proleather[®];
- *N,N*-dimetilaminopiridina (DMAP) (Sigma-Aldrich);
- 1,1'-carbonildiimidazol (DCI) (Acrós);
- membrana para diálise de acetato de celulose seletiva para moléculas de 12.400 daltons, com 49,0 mm de diâmetro (Sigma-Aldrich);
- membranas de acetato de celulose Millipore[®] com poros de 3,0 , 0,8 e 0,45 µm de diâmetro;
- sílica gel azul 4-8 mm(Ecibra);
- celite (Nuclear);
- peneira molecular;
- água deuterada (D₂O) (Sigma-Aldrich);
- ácido clorídrico (HCl) (Nuclear);
- dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆) (CIL);
- meio de cultura RPMI 1640 (Gibco);
- soro fetal bovino (SFB) (Gibco);
- solução salina tamponada (PBS) (Gibco);
- tripsina (Gibco);
- corante supravital tetrazólio (MTS) (Promega);
- metossulfato de fenazina (PMS) (Promega);
- citrato ácido de dextrose (ACD) (Merck);
- cloreto de cálcio (Merck);
- meio de cultura M199 com sais de Hanks (Gibco);
- formalina (Merck);
- corante vital Trypan Blue[®] (Merck).

4.1.2. Equipamentos e acessórios

- balança analítica (Precisa Mod. XT 220A);
- agitador magnético (Fisotom Mod. 752A);
- estufa (FABBE Mod. 119);
- liofilizador (Christ Mod. Alpha 1-2);
- rotaevaporador (Büchi Mod. R-114);
- banho termostático (Büchi Mod. B-480);
- agitador tipo *shaker* (Tecnal Mod. TE-420);
- estufa incubadora de B.O.D. (ELETROlab);
- centrífuga (Fanen);
- autoclave (Fanen);
- pHmetro;
- condutivímetro;
- placas de Teflon®;
- garrafa de cultura (Corning);
- tubos de polipropileno (Corning);
- microplaca de cultura celular com 24 e 96 poços (Corning);
- micropipetas (Eppendorff);
- vidraria em geral.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Síntese do hidroximetilnitrofural (Chung, 1996)

Reagem-se 5 mmol de NF com 18 mL de CH_2O , em presença de 5 mmol de K_2CO_3 e 10 mL de H_2O . A reação permanece à temperatura ambiente, sob agitação, durante 48 h, sendo acompanhada por cromatografia em camada delgada (CCD) (fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}$, 85:10:5, v/v/v). Após completada a reação, o produto deve ser filtrado e lavado várias vezes com MeOH para remoção do excesso de CH_2O .

ESQUEMA IV.1. Síntese do NFOH.

4.2.2. Síntese do hemissuccinato de hidroximetilnitrofural (adaptado de Chung, 1996)

Reagem-se 2 mmol de NFOH com 2 mmol anidrido succínico em meio composto por 10 mL de THF e 2 gotas de solução aquosa de H_2SO_4 a 20%. A reação permanece à temperatura ambiente, sob agitação, durante 3 h, sendo acompanhada por CCD (fase móvel $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}:\text{AcOH}$, 85:10:5, v/v/v). Em seguida, o solvente é rotaevaporado à pressão reduzida, a 40 °C. O produto obtido deve ser, então, lavado várias vezes com H_2O a 0 °C para remoção do excesso de ácido succínico.

ESQUEMA IV.2. Síntese do SCNFOH.

4.2.3. Tratamento da quitosana

4.2.3.1. Purificação (Canella, Garcia, 2001)

As amostras de quitosana são dissolvidas em ácido acético 0,05 mol.L⁻¹, sob agitação constante por uma noite. As soluções devem ser filtradas em funil de vidro sinterizado n. 3 e em membranas de acetato de celulose Millipore®, de tamanhos de poros 3; 0,8 e 0,45 µm e, em seguida, neutralizadas com solução de NaOH 10% até pH ≈ 8,5. O polímero precipitado é lavado exaustivamente com água destilada até se

obter condutividade ≈ 20 mS. Em seguida, são feitas lavagens com misturas de água-etanol nas proporções 30/70, 20/80, 10/90 e 0/100 v/v. Colocam-se as amostras em vidro de relógio e a secagem é executada sob pressão reduzida.

4.2.3.2. Preparação de filmes (adaptado de Canella, Garcia, 2001)

A quitosana é dissolvida de 0,25 a 1,00% em solução aquosa de ácido acético de 1 a 2%. A solução do polímero é filtrada e transferida para placa de Petri. A evaporação do solvente é feita em câmara termostatzada a 45 °C, durante aproximadamente 20 h. Para neutralização, os filmes são imersos em solução aquosa de NaOH de 1 a 5%, por 16 h. O excesso de NaOH é removido por sucessivas lavagens com água desionizada.

4.2.4. Síntese dos derivados de quitosana

4.2.4.1. Succinilquitosana

Em balão contendo o polímero (1 mol) suspenso em DMF, a 90 °C, adiciona-se, sob agitação, 1 mol de piridina seguido de 1 mol de anidrido succínico. A agitação e o aquecimento são mantidos em refluxo por 30 h. A mistura reacional é transferida para a membrana de acetato de celulose e dialisada contra água desionizada. A diálise é mantida até que o pH do solvente de diálise se torne constante, após sucessivas trocas do mesmo. Ao término da diálise, o produto é submetido à liofilização até completa secagem.

ESQUEMA IV.3. Síntese da SCQ.

4.2.4.2. Carboxibutilquitosana (adaptado de Rinaudo et al., 2001)

A quitosana (1 mol, com base no monômero) é dissolvida em água na presença de ácido levulínico (1,5 a 2 mol). Numa primeira etapa, o sistema é mantido por 12 h, sob agitação constante à temperatura ambiente, e, em seguida, submetido a 80 °C, sob refluxo, por 2 h. Finda a segunda etapa, adiciona-se boroidreto de sódio (0,5 a 3,5 mol), previamente dissolvido em pequena quantidade de água, e mantém-se o sistema sob agitação à temperatura ambiente, por 30 minutos. Na última etapa eleva-se a temperatura da reação a 80 °C, sob refluxo e agitação constante, por 1 h. A mistura reacional é transferida para membrana de acetato de celulose e dializada por 72 h contra água desionizada, com sucessivas trocas do meio de diálise, e liofilizada para isolamento do polímero.

ESQUEMA IV.4. Síntese da CBQ.

4.2.4.3. Imina da carboxibutilquitosana (adaptado de Rinaudo et al., 2001)

A quitosana (1 mol com base no monômero) é dissolvida em água na presença de ácido levulínico (2 mol). O sistema é mantido por 12 h, sob agitação constante à temperatura ambiente, e, em seguida, submetido a 80 °C, sob refluxo, por 2 h. A mistura reacional é transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise. A secagem do polímero é feita por liofilização.

ESQUEMA IV.5. Síntese da imina da CBQ.

4.2.4.4. Carboximetilquitosana (adaptado de Muzzarelli, Ilari, Petrarulo, 1994)

A quitosana (6,0 mmol com base no monômero) é dissolvida em 70 mL de solução aquosa de ácido acético a 1%. Em seguida, adiciona-se ácido glioxílico (4,5 mmol) e ajusta-se o pH do meio para valor entre 4 e 5, mantendo o sistema sob agitação constante e temperatura ambiente por 30 minutos. Numa segunda etapa, adiciona-se boroidreto de sódio (6,0 mmol), previamente dissolvido em pequena quantidade de água, por gotejamento (o pH do meio, após completa adição do agente redutor, não deve ultrapassar pH 5), e mantém-se o sistema sob agitação e temperatura ambiente por mais 30 minutos. A mistura reacional é transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise, e liofilizada para obtenção do polímero seco.

ESQUEMA IV.6. Síntese da CMQ.

4.2.4.5. Quitosana N-metilfosfônica (adaptado de Heras et al., 2001; Ramos et al., 2003a; Ramos et al., 2003b)

Numa solução de ácido acético a 1%, solubiliza-se a quitosana a 2% e transferem-se 25 mL dessa solução, que equivalem a 500 mg de quitosana (1 parte, em peso), para um balão de fundo redondo de duas bocas. Em seguida, adicionam-se, sob temperatura ambiente e agitação constante, 500 mg de ácido fosforoso (1 parte, em peso), previamente dissolvido em qs de água desionizada, sob gotejamento por cerca de 1 h. Em seguida, eleva-se a temperatura a 70 °C, sob refluxo, e, com o auxílio de um funil de adição, acrescenta-se, sob gotejamento por cerca de 1 h, 500 mg de formaldeído a 36,5 % (1 parte, em peso) diluído, ainda, em cerca de 25 mL de água desionizada. Mantém-se o sistema sob refluxo a 70 °C e agitação constante por mais 6 h. A mistura reacional é transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise. O isolamento do polímero é feito por liofilização.

ESQUEMA IV.7. Síntese da MFQ.

4.2.4.6. Quitosana copolimerizada com ácido acrílico e metacrilato de hidroxietila

4.2.4.6.1. Reação seguida de isolamento e ressolubilização

Numa solução de ácido acético a 1% solubiliza-se a quitosana, também a 1%, e tomam-se 30 mL dessa solução-mãe para a preparação de cada amostra. Em seguida, adicionam-se de 50 a 100 mg de nitrato de cério e amônio, agita-se até a solubilização completa do sal e acrescentam-se os monômeros de HEMA e AA, um após a total

homogeneização do outro, em diferentes proporções (1:1, 3:1 e 1:3). Após agitação, o sistema é transferido para placa de Petri e submetido à estufa termostatzada entre 50 a 60 °C, por aproximadamente 24 h. Os filmes obtidos devem ser neutralizados com solução de hidróxido de sódio a 1% por algumas horas e, em seguida, lavados exaustivamente com água destilada. As membranas são transferidas para placas de Teflon® e secadas ao ambiente, sendo que, para a Análise Térmica Dinâmica e Mecânica (DMTA), os filmes devem ser submetidos a 50 °C, em estufa, para a máxima remoção de água.

4.2.4.6.2. Reação in situ

Numa solução de ácido acético a 1% solubiliza-se a quitosana, também a 1%, e tomam-se 30 mL dessa solução-mãe para a preparação de cada amostra. Em seguida, adicionam-se de 50 a 100 mg de nitrato de cério e amônio, agita-se até a solubilização completa do sal e acrescentam-se os monômeros de HEMA e AA, um após a total homogeneização do outro, em diferentes proporções (1:1, 3:1 e 1:3). Após agitação, o sistema é transferido para placa de Petri e submetido à estufa termostatzada entre 50 a 60 °C, por aproximadamente 24 h. Os filmes obtidos devem ser neutralizados com solução de hidróxido de sódio a 1% por algumas horas e, em seguida, lavados exaustivamente com água destilada. As membranas são transferidas para placas de Teflon® e secadas ao ambiente, sendo que para a Análise Térmica Dinâmica e Mecânica (DMTA), os filmes devem ser submetidos a 50 °C, em estufa, para a máxima remoção de água.

ESQUEMA IV.8. Síntese dos copolímeros de enxerto da quitosana com AA e HEMA.

4.2.5. Síntese dos pró-fármacos

4.2.5.1. A partir do hidroximetilnitrofural

4.2.5.1.1. Empregando carboxibutilquitosana como transportador

a). Reação com carbodiimida

Numa primeira etapa, deve-se determinar a quantidade de grupos carboxílicos livres que estão disponíveis para esterificação com o fármaco, conforme descrito no item 4.2.6.8. Dissolvem-se 500 mg do polímero funcionalizado em água e, em seguida, adicionam-se, lentamente com conta-gotas, 1030 mg de DCC, previamente solubilizados em THF. Mantém-se o sistema sob agitação constante e temperatura ambiente por 30 minutos. Numa segunda etapa, adiciona-se a massa de NFOH, previamente solubilizada em THF, estequiometricamente equivalente ao mol de carboxilas livres do polímero, acrescida de 30% de excesso. Mantém-se à temperatura ambiente e sob agitação constante por 24 h. A suspensão é filtrada em celite e, então, transferida para membrana de acetato de celulose e dializada por 72 h contra água desionizada, com sucessivas trocas do meio de diálise. Por fim, procede-se à liofilização para isolamento do produto.

b). Reação por catálise de transferência de fase

Num frasco-ampola, transfere-se a CBQ (10 mmol), previamente solvatada em quantidade mínima de DMF, e, em seguida, adiciona-se NFOH (10 mmol), K_2CO_3 (10 mmol) e Herquat® (0,2 mmol). Com o auxílio de um bastão de vidro, misturam-se bem os reagentes e o sistema é submetido ao ultrassom por 6 h, sob proteção da luz. A mistura reacional deve ser transferida para membrana de acetato de celulose e dialisada por 72 h contra água desionizada, com sucessivas trocas do meio de diálise, e liofilizada para obtenção do polímero seco.

c). Reação por meio de cloreto de ácido

Num balão de fundo redondo, 1 mol da CBQ é suspenso em cerca de 30 mL de DMSO. Em seguida, adiciona-se 0,25 mol de cloreto de tionila e mantém-se o sistema sob refluxo a 80 °C e agitação constante por 6 h, sob proteção da luz e com tubo secante acoplado ao sistema. Subseqüentemente, deve ser realizada a destilação do meio reacional para remover o excesso de cloreto de tionila. Numa segunda etapa, o NFOH é acrescido ao sistema previamente solubilizado em 30 mL de DMSO e a reação deve ser mantida sob agitação constante e proteção da luz em banho termostatzado a 35 °C, por cerca de 1 h. Ao fim desse período, o produto deve ser filtrado sob pressão reduzida, com sucessivas lavagens com MeOH.

d). Reação por catálise enzimática

Num balão de fundo redondo, 300 mg da CBQ são suspensas em cerca de 30 mL de DMSO. Em seguida, adicionam-se 200 mg da protease Proleather[®], seguida da adição de 150 mg de NFOH, previamente solubilizado em cerca de 10 mL de DMSO. Mantém-se o sistema sob proteção da luz em banho termostatzado a 50 °C e agitação constante por 4 dias, com alguma peneira molecular na reação e tubo secante acoplado ao sistema. O produto deve ser precipitado com MeOH e filtrado à pressão reduzida.

ESQUEMA IV.9. Síntese do pró-fármaco com a CBQ como transportador.

4.2.5.1.2. Empregando 5-metilpirrolidinonaquitosana como transportador

Dissolvem-se 300 mg da 5-MPQ e 250 mg de NFOH em meio de água e THF (1:1,3). Mantém-se à temperatura ambiente e sob agitação constante por 1 semana. A suspensão é, então, transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise. A secagem do produto é feita por liofilização.

ESQUEMA IV.10. Síntese da 5-MPQ com NFOH.

4.2.5.1.3. Empregando a imina da carboxibutilquitosana como transportador

Dissolvem-se 500 mg da CBQ em água e, em seguida, adicionam-se, lentamente, com o auxílio de um conta-gotas, 1030 mg de DCC, previamente solubilizada em THF. Mantém-se o sistema sob agitação constante à temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, adiciona-se a massa de NFOH, previamente solubilizada em THF, estequiometricamente equivalente ao número de mol de carboxilas livres do polímero, acrescida de 30% de excesso. Mantém-se à temperatura ambiente e sob agitação constante por 24 h. A mistura reacional é filtrada em celite, transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise. O produto é isolado por liofilização.

ESQUEMA IV.11. Síntese da imina da CBQ com NFOH.

4.2.5.1.4. *Empregando membrana de quitosana copolimerizada com ácido acrílico como transportador*

Suspendem-se 6 mmol de NFOH em cerca de 20 mL de água desionizada, submetendo o sistema ao ultrassom por 10 minutos para reduzir o tamanho das partículas. Em outros 20 mL de água desionizada, solubilizam-se 6 mmol de DMAP e 6 mmol de DCI. Adiciona-se o agente condensante ao meio contendo o NFOH e, após completa homogeneização, adicionam-se 300 mg de membrana de quitosana copolimerizada com 12 mmol de AA. O sistema é submetido à agitação a 25 rpm em *shaker* com cúpula âmbar e termostatizado a 37,5 °C, por 24 h. Após esse período, a membrana é recuperada do meio e dializada contra água desionizada por 24 h, com sucessivas trocas do meio de diálise. A membrana é secada ao ambiente sob placa de Teflon®.

ESQUEMA IV.12. Síntese da membrana de quitosana copolimerizada com AA com NFOH.

4.2.5.2. A partir do hemissuccinato de hidroximetilnitrofural

4.2.5.2.1. Empregando a quitosana como transportador

Numa solução de ácido acético a 1%, solubiliza-se a quitosana a 2% e transferem-se 15 mL dessa solução, que equivalem a 1,86 mmol de quitosana, para um balão de fundo redondo. Adicionam-se, então, 0,31 mmol de SCNFOH, seguidos de 2 gotas de solução aquosa de H_2SO_4 a 20%. O sistema é protegido da luz e mantido sob temperatura ambiente e agitação constante por 48 h. A mistura reacional é transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise, e liofilizada para obtenção do polímero seco.

ESQUEMA IV.13. Síntese da quitosana com SCNFOH.

4.2.5.2.2. Empregando a quitosana *N*-metilfosfônica como transportador

Num balão de fundo redondo, dissolvem-se 300 mg da MFQ em 30 mL de água desionizada e, em seguida, adicionam-se 100 mg de SCNFOH. Após a adição de 2 gotas de solução aquosa de H_2SO_4 a 20%, o sistema é protegido da luz e mantido sob temperatura ambiente e agitação constante. A mistura reacional deve, então, ser transferida para membrana de acetato de celulose e dializada contra água desionizada por 72 h, com sucessivas trocas do meio de diálise, e liofilizada para obtenção do polímero seco.

ESQUEMA IV.14. Síntese da MFQ com SCNFOH.

4.2.6. Análises

4.2.6.1. Espectroscopia no infravermelho

As análises espectrofotométricas foram efetuadas em pastilhas de brometo de potássio de grau espectrofotométrico, para compostos sólidos, ou em filmes formados entre pastilhas de cloreto de sódio, para compostos líquidos, em espectrofotômetro FTIR Bomem, junto à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP e em espectrômetro 750 Magma – IRTM, da Nicolet Instrument Corp., equipado com Golden Gate Single Reflection Diamond ATR, junto ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

4.2.6.2. Espectrometria de ressonância magnética nuclear de ¹H e de ¹³C (RMN ¹H e RMN ¹³C)

As análises de RMN ¹H e RMN ¹³C foram realizadas em espectrômetro Bruker ADPX 300 MHz, junto à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

4.2.6.3. Análises térmicas

4.2.6.3.1. Termogravimetria (TG)

As análises termogravimétricas foram realizadas no Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito (LATIG), junto ao Instituto de Química – USP. As curvas TG/DTG foram obtidas na faixa de temperatura entre 25 e 900 °C, utilizando-se termobalança TGA-50 Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL.min⁻¹), razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, utilizando-se cadinho de platina contendo massa de amostra em torno de 5 mg. Antes dos ensaios, verificou-se a calibração do instrumento empregando-se amostra de oxalato de cálcio monoidratado, conforme norma ASTM 1582-93.

4.2.6.3.2. Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

As análises por DSC foram realizadas no Laboratório de Análise Térmica Prof. Dr. Ivo Giolito (LATIG), junto ao Instituto de Química – USP. As curvas de DSC foram obtidas na faixa de temperatura de 25 a 550 °C, utilizando-se célula calorimétrica DSC-50 Shimadzu, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min⁻¹), em cápsula de alumínio parcialmente fechada contendo aproximadamente 2 mg da amostra. A célula DSC foi calibrada antes dos ensaios, no eixo da temperatura, utilizando padrões de índio ($T_{\text{fusão}} = 156,6 \text{ °C}$) e zinco ($T_{\text{fusão}} = 419,5 \text{ °C}$) metálicos, com pureza de 99,99%. Para a calibração do fluxo de calor, empregou-se o $\Delta H_{\text{fusão}}$ do índio metálico (28,7 J.g⁻¹).

4.2.6.3.3. Análise Térmica Dinâmico-mecânica (DMTA)

A determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) e demais eventos térmicos de compostos poliméricos foi realizada no equipamento Tritec 200 DMA, da Triton Technology, junto ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra. As amostras foram analisadas em células metálicas espessas (15,20 x 7,45 x 1,10 mm) sob “single cantilever bending

mode”, na faixa de – 100 a 400 °C, com velocidade de aquecimento de 10 °C.min⁻¹, frequência de 1 Hz e elongamentos de 0,005. Os eventos térmicos são determinados como $\tan \delta$, conforme a equação que segue:

$$\tan \delta = \frac{E''}{E'}$$

onde: $\tan \delta$ = tangente de perda (de energia, normalmente sob a forma de calor), amortecimento ou atrito interno;

E'' = componente elástica ou módulo de armazenamento;

E' = componente plástica ou módulo de perda.

4.2.6.4. Faixa de fusão

As faixas de fusão experimentais, não corrigidas, foram determinadas em aparelho Büchi e Quimis, segundo metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV, junto à Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP.

4.2.6.5. Cromatografia em camada delgada

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em placas de alumínio cobertas com uma camada de 0,5 mm de sílica-gel, fornecidas pela Merck Ind. Quím. S.A.

4.2.6.6. Determinação do grau de acetilação

4.2.6.6.1. Por IV (Moore, Roberts, 1980)

O grau de grupos *N*-acetila pode ser determinado por IV. Este método envolve o uso da banda de amida I, a 1655 cm⁻¹, e da banda de amina, a 3450 cm⁻¹. A

porcentagem dos grupos aminoacetilados (% *N*-acetil) foi determinada pela equação seguinte:

$$\% \text{ N-acetila} = (A_{1655}/A_{3450}) \cdot 100/1,33$$

onde: % **N-acetila** = percentual do grau de acetilação do polímero;

A_{1655} = absorvância da banda a 1655 cm^{-1} ;

A_{3450} = absorvância da banda a 3450 cm^{-1} .

4.2.6.6.2. Por RMN ^1H

O grau de acetilação na quitosana foi calculado com base nas integrais obtidas nos espectros de RMN ^1H , a partir da relação entre a integral de um hidrogênio representativo da cadeia polimérica global (H_p) e a do CH_3 do grupo acetila (H_a), conforme descrito na equação que segue:

$$GA = \frac{I_a}{I_p} \cdot \frac{H_p}{H_a} \cdot 100$$

onde: **GA** = percentual do grau de acetilação do polímero;

I_p = valor numérico da integral do hidrogênio H_1 do polímero;

I_a = valor numérico da integral do hidrogênio H_8 do grupo acetila;

H_p = número de hidrogênios H_1 do polímero;

H_a = número de hidrogênios H_8 do grupo acetila.

4.2.6.7. Determinação da massa molar viscosimétrica média

A massa molar viscosimétrica média das amostras de quitosana foram realizadas junto ao Departamento de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Para determinação da viscosidade intrínseca $[\eta]$, foi utilizado o sistema AVS-350, acoplado a um módulo diluidor automático AVS-50, ambos da Schott-Geräte. As medidas foram

realizadas em capilar de vidro ($\phi = 0,46$ mm) termostatizado em $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,01\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as soluções devem ser seqüencialmente diluídas no próprio capilar por meio da adição programada de volumes previamente determinados do solvente adequado. Os valores de tempo de escoamento, empregados para a determinação da $[\eta]$, corresponderam à média de pelos menos quatro determinações independentes, que não apresentaram variação maior que 0,09%. As amostras de quitosanas foram analisadas preparando-se soluções a 1 g do polímero por litro da solução aquosa de CH_3COOH $0,3\text{ mol.L}^{-1}$ / CH_3COONa $0,2\text{ mol.L}^{-1}$ (Rinaudo, Milas, Dung, 1993). O solvente e as soluções empregados devem ser filtrados através de membranas Millipore de acetato de celulose de diâmetro igual $0,45\text{ }\mu\text{m}$, antes das determinações de viscosidade.

A viscosidade intrínseca, $[\eta]$, é obtida por extrapolação à diluição infinita, definida por Huggins (1942):

$$\eta_{sp}/c = [\eta] + k'[\eta]^2C$$

onde: η_{sp} = viscosidade específica;

c = concentração do polímero (g.mL^{-1});

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

k' = constante de Huggins.

4.2.6.8. Determinação quantitativa das carboxilas livres nos polímeros funcionalizados (adaptado de Kwon et al., 1997)

A análise quantitativa dos grupos carboxila presentes nos polímeros funcionalizados foi realizada pela titulação de 25 mL de solução aquosa do polímero (2 mg.mL^{-1}) com solução $0,01\text{ M}$ de hidróxido de sódio, utilizando fenolftaleína como indicador.

4.2.6.9. Determinação do grau de substituição dos polímeros funcionalizados (adaptado de Rinaudo et al., 1992)

O grau de substituição dos grupos espaçantes no polímero foi calculado com base nas integrais obtidas nos espectros de RMN ^1H , a partir da relação entre a integral de um hidrogênio do polímero (H_p) e de um hidrogênio do grupo espaçante (H_s), conforme descrito na equação que segue:

$$GS = \frac{I_s}{I_p} \cdot \frac{H_p}{H_s} \cdot 100$$

onde: GS = percentual do grau de substituição do espaçante no polímero;

I_p = valor numérico da integral do hidrogênio H_1 do polímero;

I_s = valor numérico da integral do hidrogênio H_{10} do espaçante;

H_p = número de hidrogênios H_1 do polímero;

H_s = número de hidrogênios H_{10} do espaçante.

4.2.6.10. Determinação da capacidade de intumescimento das membranas em água

Amostras das membranas foram secadas em estufa a vácuo por 24 h e pesadas antes de serem imersas em água destilada por 48 h. Em seguida, as amostras intumescidas foram retiradas da solução, rapidamente secadas com papel de filtro para a remoção do excesso de umidade presente na superfície dos filmes e pesadas. A capacidade de intumescimento das membranas foi calculada segundo a expressão:

$$Q = \frac{(W_s - W_d)}{W_d} \cdot 100$$

onde: Q = percentual do grau de intumescimento;

W_s = peso das membranas intumescidas;

W_d = peso das membranas secas.

4.2.7. Ensaio de citotoxicidade (ISO 10.993-5, 1992)

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), segundo metodologia recomendada pela ISO (International Standard Organization).

4.2.7.1. Preparação dos extratos

Amostras de 4 cm² das membranas foram esterilizadas em autoclave a 120 °C, durante 20 min. Em seguida, foram incubadas por 2 dias a 37 °C em meio composto por 4 mL de RPMI 1640 e 10% de FBS. O extrato isolado, a 100%, foi sucessivamente diluído a 50, 25, 12,5 e 6,25% para a execução do ensaio de citotoxicidade.

4.2.7.2. Teste de citotoxicidade

Cultura de células de ovário de Hamster Chinês (CHO) foi obtida da incubação, a 37 °C, em meio de RPMI 1640 com 10% de FBS. Após propagação celular em monocamada, o meio de cultura foi removido e as células, lavadas com PBS. Para o destacamento das células da garrafa de cultura, foi adicionada solução de tripsina a 0,25%. As células foram, então, ressuspensas em meio de cultura e a concentração de células, ajustada para 60.000 células.mL⁻¹. A microplaca de cultura celular com 96 poços para o teste de citotoxicidade foi preparada da seguinte forma, para cada amostra a ser analisada: a primeira coluna é preenchida apenas com meio (branco); a segunda recebe meio e suspensão celular, que é pré-calculada na proporção de ~3.000 células a cada 50 µL (viabilidade celular = 100%); as demais colunas recebem, além do meio e da suspensão celular, 50 µL de diluições crescentes do extrato do biomaterial a 6,25; 12,5; 25; 50 e 100%. Posteriormente, a microplaca é incubada, a 37 °C, sob atmosfera úmida de CO₂ por 72 h. Passado o período de incubação, é feita a adição de 20 µL do corante, que consiste de solução de MTS a 0,2% em PBS e da solução de PMS a 0,09% em PBS, na relação de 20:1 de cada solução, respectivamente. Após mais duas horas de incubação, a incorporação do corante é medida pelo leitor de ELISA Dynatech MR 4000, adaptado para microplacas, a 490 nm contra o branco. A

citotoxicidade (IC_{50}) é estimada pela curva de interpolação, como a concentração do extrato do biomaterial resultante da inibição de 50% da incorporação do MTS, correlacionando o percentual médio de células viáveis em relação à concentração dos extratos a partir do gráfico.

4.2.8. Ensaios de hemocompatibilidade (ISO 10.993-4, 1999)

Os ensaios de hemocompatibilidade foram realizados no Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, segundo metodologia recomendada pela ISO.

4.2.8.1. Trombogenicidade

A avaliação do potencial coagulante das superfícies poliméricas foi conduzida por método gravimétrico (Imai, Nose, 1972). As membranas foram incubadas a 37 °C com PBS, que, após 48 h, foi removido para ligeira secagem do material. Amostras frescas de sangue de coelho foram coletadas em tubos de polipropileno e acrescidas de solução anticoagulante de ACD (U.S. Pharmacopeia, 1995), na relação de 9:1 e empregadas no ensaio imediatamente após a coleta. Gotas do sangue com ACD foram distribuídas sob pequena superfície da membrana, assim como sob placa de Petri vazia, que representa o controle positivo do ensaio. A atividade de coagulação foi iniciada pela adição de 20 μ L de solução de cloreto de cálcio a 10 M e interrompida, após 45 min, pela adição de 5 mL de água destilada. Os trombos formados sob as superfícies foram fixados com 5 mL de solução aquosa de formaldeído a 36%, secados sob papel de filtro em dessecador e, finalmente, pesados.

4.2.8.2. Potencial hemolítico

O teste do potencial hemolítico foi realizado como descrito na norma ASTM F 756-00, tanto para o biomaterial (contato direto) quanto para a solução de extração (contato indireto). Amostras com 21 cm² foram incubadas a 37 °C em tubos de polipropileno contendo 7 mL de PBS. Após 72 h, as soluções de extração foram

transferidas para novos tubos de polipropileno. Acrescentaram-se 9 mg.mL⁻¹ de sangue de coelho com ACD em cada membrana e sua respectiva solução de extração, mantendo as amostras a 37 °C. A cada 30 min, os tubos eram invertidos por 2 vezes para manter o contato do sangue com o material. Após 3 h, a fração fluida dos tubos foi centrifugada a 2000 rpm, durante 15 min. Controles positivo e negativo foram preparados pela adição da mesma quantidade de sangue com ACD a 7 mL de água e de PBS, respectivamente. A densidade óptica (DO) dos sobrenadantes foi medida a 540 nm e a percentagem de hemólise foi calculada, segundo a equação que segue:

$$\%Hemólise = \left[\frac{(DO_{am} - DO_{cn})}{(DO_{cp} - DO_{cn})} \right] \cdot 100$$

onde: DO_{am} = densidade óptica da amostra;

DO_{cn} = densidade óptica do controle negativo;

DO_{cp} = densidade óptica da controle positivo.

4.2.9. Ensaios de atividade biológica dos fármacos contra *Leishmania* spp.

Ensaios de atividade biológica contra as espécies *L. chagasi* (MHOM/BR/72/M6445), *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) e *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903) foram realizados no Laboratório de Soroepidemiologia e Imunologia Celular e Molecular do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – USP.

4.2.9.1. Atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania* spp.

4.2.9.2.1. Cultura das formas promastigotas

Todas as espécies foram cultivadas em meio M199 com sais de Hanks, suplementado com urina humana (Armstrong, Patterson, 1994), e incubadas em estufa incubadora para B.O.D. a 26°C, até atingirem o início da fase estacionária (cerca de 3

dias) (Kapler, Coburn, Beverley, 1990), quando, então, foram repicadas através de passagem em meio novo, na diluição de 1:100.

4.2.9.2.2. Avaliação da atividade biológica dos fármacos

A avaliação da atividade antiparasitária do NFOH e SCNFOH foi realizada através da determinação do número de parasitos viáveis, em que cerca de 1.10^6 parasitos foram mantidos em cultura, conforme já descrito anteriormente, e incubados separadamente em placas de 24 poços em presença de concentrações crescentes do fármaco. NF foi ensaiado como fármaco de referência. Após o período de incubação, retirou-se uma alíquota da cultura, que foi diluída a 1:10 em solução salina tamponada com fosfato de formalina 4%, para contagem dos parasitos viáveis em câmara de Neubauer.

Os valores de IC_{50} foram determinados a partir do gráfico de inibição de crescimento obtido em cada cultura realizada, pela correlação entre a concentração de fármaco eficaz para inibir o crescimento da metade da população inicial do parasito.

4.2.9.2. Atividade contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*

4.2.9.2.1. Formas amastigotas intracelulares

a). Purificação das formas amastigotas

Camundongos BALB/c (mantidos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical em gaiolas com meio absorvente esterilizado, com água e alimento *ad libitum*), infectados com as formas amastigotas de *L. amazonensis* (2×10^7 parasitos.mL⁻¹), apresentaram lesões após 30 dias da inoculação dos parasitos na pata esquerda. Para a purificação das formas amastigotas, os camundongos infectados foram sacrificados, segundo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa, para a retirada da pata com lesão. A pele foi removida e o tecido remanescente colocado em meio de cultura RPMI 1640 para maceração. O material obtido foi filtrado em gaze estéril e passado em agulha fina para

romper as células e liberar as formas amastigotas purificadas. Após várias centrifugações para a eliminação de restos celulares, o sedimento foi suspenso em meio RPMI 1640 e contado em câmara de Neubauer.

b). Cultura de macrófagos

Camundongos BALB/c foram sacrificados, segundo as normas do Comitê de Ética em Pesquisa, para a retirada da pele da região do peritônio. Cerca de 5 mL de meio RPMI 1640 gelado foi injetado no peritônio e, em seguida, aspirado. A viabilidade celular foi avaliada com o corante vital Trypan Blue, na diluição 1:2. Cerca de 5×10^5 macrófagos foram incubados em lâminulas estéreis de 13 mm de diâmetro, acondicionadas no interior de placas de 24 poços e incubados a 37 °C, com 5% de CO₂, por 24 h.

c). Infecção dos macrófagos com as formas amastigotas

Após a retirada das células não aderentes, a cultura de macrófagos foi infectada com formas promastigotas de *L. amazonensis*, na concentração de 5 parasitos para cada macrófago (Berman, 1984). A avaliação da infecção macrofágica foi realizada por contagem celular (macrófagos e amastigotas) em 200 células infectadas e coradas com Giemsa. Para a determinação da infectividade nas culturas, foram determinados alguns índices de avaliação descritos por Rosa e colaboradores (2003), definidos como: (1) porcentagem de macrófagos infectados, que foi calculado pela relação do número de macrófagos infectados pelo número total de macrófagos na cultura ($\times 100$); (2) índice de infecção, determinado pela relação do número de parasitos no interior dos macrófagos pelo número total de macrófagos infectados e (3) índice de associação, que foi determinado multiplicando-se o valor da porcentagem de macrófagos infectados pelo índice de infecção ($\times 100$). O índice de associação pode ser definido como um índice que representa o grau de infectividade dos macrófagos infectados, ou seja, quanto maior o índice de associação, maior o número de parasitas no interior de cada macrófago infectado.

d). Avaliação da atividade biológica do hidroximetilnitrofurais

Após 24 h de incubação e confirmação da infecção, foram feitos os ensaios com concentrações crescentes do NFOH (32 e 64 μM). A avaliação do crescimento dos parasitos no interior do macrófago foi realizada por contagem celular (macrófagos e amastigotas) em 200 células infectadas e coradas com Giemsa.

4.2.9.2.2. Transformação das formas amastigotas em promastigotas

A avaliação da atividade antiparasitária do NFOH, somente sobre as formas amastigotas do parasita, foi realizada seguindo a mesma metodologia usada para as formas promastigotas, ou seja, através da determinação do número de células viáveis em culturas com meio líquido (4.2.9.1). Cerca de 1×10^6 parasitos foram colocados em placas de 24 poços com concentrações crescentes do fármaco. Após cerca de 72 h de incubação em estufa para B.O.D. a 26 °C, uma alíquota da cultura foi retirada e diluída em solução de formalina para contagem celular em câmara de Neubauer.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

5.1. HIDROXIMETILNITROFURAL

ESPECTRO V.1. Espectro de IV do NFOH.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr, cm^{-1})	Atribuição
3450-3300	$\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação hidrogênio intermolecular
3335	$\nu_{\text{N-H}}$ assimétrica de amida primária
3163	$\nu_{\text{N-H}}$ simétrica de amida primária
2980	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifático
2961	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifático
1674	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida secundária
1592	$\delta_{\text{N-H}}$ de amida
1522	ν assimétrica de NO_2 aromático
1422	δ_{CH_2} (levemente deslocado por estar entre N e O)
1388	$\nu_{\text{C-N}}$ de amida
1360	ν simétrica de NO_2 aromático
1250	$\nu_{\text{C-N}}$ de amida secundária
1124	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

ESPECTRO V.2. Espectro de RMN ¹H do NFOH.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (DMSO-d₆) δ (ppm): 2,50 (DMSO); 3,33 (H₂O); 4,61 (t, 2H₈, J = 6,6 Hz); 5,51 (t, 1H_{OH}, J = 6,6 Hz); 7,25 (d, 1H₃, J = 3,9 Hz); 7,64 (t, 1H_{CO-NH}, J = 6,6 Hz); 7,80 (d, 1H₄, J = 3,9 Hz); 7,82 (s, 1H₆); 11,02 (s, 1H_{N-NH});

ESPECTRO V.3. Espectro de RMN ^{13}C do NFOH.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz (DMSO- d_6) δ (ppm): 39,39 (DMSO); 63,07 (C₈); 112,63 (C₃); 115,11 (C₄); 127,82 (C₆); 151,25 (C₂); 152,72 (C₅); 154,47 (C₇).

GRÁFICO V.1. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ do NFOH.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG		DSC			atribuição
T _{pico} (°C)	Δm (%)	T _{pico} (°C)	Evento térmico	ΔH (J.g ⁻¹)	
147	2,64	146	endotérmico	41,28	primeira decomposição
205	43,9	189	endotérmico	165,7	segunda decomposição
		199	exotérmico	1300	
		217	exotérmico		

CURVA DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE *L. chagasi*

GRÁFICO V.2. Curvas de inibição do crescimento de *L. chagasi* pelo NF, NFOH e SCNFOH.

CURVA DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO DE *L. braziliensis*

GRÁFICO V.3. Curvas de inibição do crescimento de *L. braziliensis* pelo NF, NFOH e SCNFOH.

GRÁFICO V.4. Curvas de inibição do crescimento de *L. amazonensis* pelo NF, NFOH e SCNFOH.

TABELA V.1. Comparação dos valores de IC₅₀ dos compostos frente às diferentes espécies de *Leishmania*

Composto	IC ₅₀			
	<i>L. chagasi</i> promastigota ^a	<i>L. brasiliensis</i> promastigota ^a	<i>L. amazonensis</i>	
NF	0,70 ± 0,43	0,78 ± 0,11	promastigota ^a	Amastigota ^b
NFOH	1,95 ± 8,24	2,54 ± 0,87	2,77 ± 0,45	2,65
SCNFOH	1,95 ± 3,39	7,00 ± 1,41	5,42 ± 2,08	4,36

^an = 3; ^bEnsaio preliminar, sem replicatas.

FIGURA V.1. Fotografia de cultura de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* 4 dias após a administração de NFOH a 32 μ M.

FIGURA V.2. Fotografia de cultura de macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* 4 dias após a administração de NFOH a 64 μ M.

5.2. HEMI-SUCCINATO DE HIDROXIMETILNITROFURAL

ESPECTRO V.4. Espectro de IV do SCNFOH.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr, cm^{-1})	Atribuição
3406	$\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação hidrogênio intermolecular
3330	$\nu_{\text{N-H}}$ assimétrica de amida primária
3156	$\nu_{\text{N-H}}$ simétrica de amida primária
2959	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifático
1678	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida secundária
1593	$\delta_{\text{N-H}}$ de amida
1516	ν assimétrica de NO_2 aromático
1420	δ_{CH_2} (levemente deslocado por estar entre N e O)
1383	$\nu_{\text{C-N}}$ de amida
1359	ν simétrica de NO_2 aromático
1254	$\nu_{\text{C-N}}$ de amida secundária
1124	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

ESPECTRO V.5. Espectro de RMN ¹H do SCNFOH.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (DMSO-d₆) δ (ppm): 2,42 (s, 2H₁₀, 2H₁₁); 2,51 (DMSO); 3,36 (H₂O); 4,62 (d, 2H₈, J = 6,4 Hz); 7,26 (d, 1H₃, J = 3,9 Hz); 7,66 (t, 1H_{CO-NH}, J = 6,4 Hz); 7,81 (d, 1H₄, J = 3,9 Hz); 7,82 (s, 1H₆); 11,03 (s, 1H_{N-NH}); 12,16 (s, 1H_{COOH}).

ESPECTRO V.6. Espectro de RMN ^{13}C do SCNFOH.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz (DMSO- d_6) δ (ppm): 28,64 (C_{10} , C_{11}); 39,38 (DMSO); 63,07 (C_8); 112,62 (C_3); 115,13 (C_4); 127,79 (C_6); 151,23 (C_2); 152,72 (C_5); 154,46 (C_7); 173,52 (C_9).

GRÁFICO V.5. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do SCNFOH.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG		DSC			atribuição
$T_{\text{pico}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta m\text{ (%)}$	$T_{\text{pico}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	Evento térmico	$\Delta H\text{ (J}\cdot\text{g}^{-1}\text{)}$	
35	1,05	—	—	—	perda de água
147	6,28	140	endotérmico	154,3	primeira decomposição
202	43,8	213	exotérmico	1060	segunda decomposição
211					
220					

5.3. QUITOSANA

FIGURA V.3. Fotografia das amostras de quitosana (a) PADETEC, (b) Sigma AMM, (c) Sigma MMM e (d) Sigma BMM solubilizadas em meio aquoso levemente ácido.

TABELA V.2. Massa molar das amostras de quitosana determinada por viscosimetria

Amostra	Rendimento purificação (%)	Viscosidade intrínseca $[\eta]$ (mL.g ⁻¹)	Massa molar viscosimétrica média (Mv)
PADETEC	49,80	148,4	$2,14 \cdot 10^4$
Sigma AMM	77,65	1109,3	$3,01 \cdot 10^5$
Sigma MMM	63,08	637,5	$1,45 \cdot 10^5$
Sigma BMM	75,29	469,9	$9,73 \cdot 10^4$

PADETEC – Parque de desenvolvimento tecnológico da Universidade Federal do Ceará; UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte; Sigma AMM – Alta Massa Molecular; Sigma MMM – Média Massa Molecular; Sigma BMM – Baixa Massa Molecular; n.d. – não determinado

ESPECTRO V.7. Espectros alinhados de IV de filmes das amostras de quitosana.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3370	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2906 2890	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1648	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1589	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina
1379	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1255	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1151	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1084	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

TABELA V.3. Grau de desacetilação determinado pela análise em IV de filmes de quitosana a 0,25%

Amostra	Absorvância		%N-acetil	GD (%)	GD médio (%)
	A_{3450}	A_{1655}			
PADETEC	1,678	0,595	25,64	74,36	76,16
	1,237	0,398	24,19	75,81	
	1,745	0,561	24,17	75,83	
Sigma AMM	0,511	0,191	28,10	71,90	72,23
	0,747	0,282	28,38	71,62	
	0,496	0,171	26,83	73,17	
Sigma MMM	2,155	0,733	25,57	74,43	73,33
	0,854	0,299	26,32	73,68	
	0,444	0,166	28,11	71,89	
Sigma BMM	2,046	0,680	24,99	75,01	76,16
	0,544	0,166	22,94	77,06	
	0,599	0,188	23,60	76,40	

PADETEC – Parque de desenvolvimento tecnológico da Universidade Federal do Ceará; Sigma AMM – Alta Massa Molecular; Sigma MMM – Média Massa Molecular; Sigma BMM – Baixa Massa Molecular.

ESPECTRO V.8. Espectro de RMN ¹H da quitosana Sigma MMM a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 2,55 (s, 3H₈); 3,60 – 3,85 (m, 1H_{2b}); 3,90 – 4,70 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,66 (H₂O); 5,00 (d, 1H₁, J = 6,9 Hz).

ESPECTRO V.9. Espectro de RMN ^{13}C da quitosana Sigma MMM a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 22,46 (C_8); 56,15 (C_2); 60,35 (C_6); 70,37 (C_3); 75,11 (C_5); 76,64 (C_4); 97,82 (C_1); 175,10 (C_7).

TABELA V.4. Grau de desacetilação determinado por RMN ^1H

Amostra	Integral		%N-acetil	GD (%)	GD médio (%)
	H ₁	H ₈			
PADETEC	1,0000	0,3426	11,42	88,58	89,33
	1,0000	0,3129	10,43	89,57	
	1,0000	0,3050	10,17	89,83	
Sigma AMM	1,0000	0,6721	22,40	77,60	71,15
	1,0000	1,0591	35,30	34,70	
	1,0000	0,8059	26,86	71,14	
Sigma MMM	1,0000	0,3965	13,22	86,78	86,35
	1,0000	0,4254	14,18	85,82	
	1,0000	0,4068	13,56	86,44	
Sigma BMM	1,0000	0,4282	14,27	85,73	83,45
	1,0000	0,5351	17,84	82,16	
	1,0000	0,5261	17,54	82,46	

PADETEC – Parque de desenvolvimento tecnológico da Universidade Federal do Ceará; Sigma AMM – Alta Massa Molecular; Sigma MMM – Média Massa Molecular; Sigma BMM – Baixa Massa Molecular.

GRÁFICO V.6. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ de filme de quitosana Sigma MMM.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG		DSC			atribuição
$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta m (\%)$	$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$	Evento térmico	$\Delta H (\text{J}.\text{g}^{-1})$	
30-214	6,00	122	endotérmico	147,0	perda de água
296	42,86	292	exotérmico	308,1	decomposição

GRÁFICO V.7. Sobreposição das curvas obtidas na análise de DMTA para filmes de quitosana secados em estufa a vácuo por 24 horas (♦), com 15% (◆), 38% (◆) e 150% de umidade (◆).

DADOS TERMOANALÍTICOS:

Temperatura (°C)	Evento térmico
0	movimentos das cadeias poliméricas induzidos pela água
72	água relacionada às interações intra e intermoleculares
100	água livre
131	transição vítrea
201	transição líquido-líquido
292	decomposição

5.4. SUCCINILQUITOSANA

ESPECTRO V.10. Espectro de IV da SCQ.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr, cm^{-1})	Atribuição
3419	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação hidrogênio intermolecular
3092	$\nu_{\text{O-H}}$ de hidroxila de ácido carboxílico
2941	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1729	$\nu_{\text{C=O}}$ de éster e $\nu_{\text{C=O}}$ de ácido carboxílico
1658	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1553	$\delta_{\text{N-H}}$ de amida
1397	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1168	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1067	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool secundário
1026	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool primário

5.5. CARBOXIBUTILQUITOSANA

ESPECTRO V.11. Espectro de IV da CBQ.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} \text{ (cm}^{-1}\text{)}$	Atribuição
3278	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2924 2874	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1710	$\nu_{\text{C=O}}$ de ácido carboxílico
1650	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1561	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina e $\nu_{\text{C=O}}$ assimétrico de carboxilato
1406	$\nu_{\text{C=O}}$ simétrico de carboxilato
1383	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1260	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1157	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1068	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

ESPECTRO V.12. Espectro de RMN ^1H da CBQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O) δ (ppm): 0,89 (d, $3\text{H}_{13'}$, $J = 6,1$ Hz); 1,78 (s, 3H_8); 1,87 – 2,00 (m, 3H_{13}); 2,14 (t, 2H_{11} , $J = 6,8$ Hz); 2,48 (t, 2H_{10} , $J = 6,8$ Hz); 2,55 – 2,70 (m, 1H_{2b}); 3,20 – 3,72 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,01 (H_2O); 4,23 – 4,47 (m, 1H_1).

ESPECTRO V.13. Espectro de RMN ^{13}C da CBQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz (D_2O) δ (ppm): 21,98 (C_8); 29,52 (C_{13}); 31,57 (C_{11}); 39,81 (C_{10}); 56,50 (C_2); 60,34 (C_6); 72,33 (C_3); 75,16 (C_5); 77,41 (C_4); 100,31 (C_1); 181,88 (C_9).

TABELA V.5. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da CBQ

Fonte de variação	SQ	v	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	418,5124	2	209,2562	3,9019	4,10
Resíduos	536,2918	10	53,6292		
Falta de ajuste	444,2333	6	74,0389	3,2170	6,16
Erro puro	92,0585	4	23,0146		
Total	954,8042	12			

% de variação explicada: 43,83

% máximo de variação explicável: 90,36

CBQ Modelo linear

GRÁFICO V.8. Superfície de resposta para o grau de substituição da CBQ no polímero descrita pela equação linear $\hat{y} = 20,27 (\pm 1,35) - 5,82 (\pm 1,84) x_2$, no nível de 95% de confiança.

TABELA V.6. Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da CBQ

Fonte de variação	SQ	v	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	764,0223	5	152,8045	5,6066	3,97
Resíduos	190,7819	7	27,2546		
Falta de ajuste	98,7234	3	32,9078	1,4299	6,59
Erro puro	92,0585	4	23,0146		
Total	954,8042	12			

% de variação explicada: 80,02

% máximo de variação explicável: 90,36

GRÁFICO V.9. Superfície de resposta para o grau de substituição da CBQ no polímero descrita pela equação quadrática $\hat{y} = 24,66 (\pm 2,18) + 5,55 (\pm 1,87) x_1 - 6,93 (\pm 1,87) x_2 - 6,92 (\pm 2,90) x_1^2 - 0,75 (\pm 2,90) x_2^2 + 5,63 (\pm 2,23) x_1 x_2$, no nível de 95% de confiança.

TABELA V.7. Análise da variância para o ajuste do modelo linear aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da 5-MPQ

Fonte de variação	SQ	v	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	43,1940	2	21,5970	4,4028	4,10
Resíduos	49,0532	10	4,9053		
Falta de ajuste	41,8377	6	6,9730	3,8655	6,16
Erro puro	7,2155	4	1,8039		
Total	92,2472	12			

% de variação explicada: 46,82

% máximo de variação explicável: 92,18

5-MPQ Modelo linear

GRÁFICO V.10. Superfície de resposta para o grau de substituição da 5-MPQ no polímero descrita pela equação linear $\hat{y} = 6,44 (\pm 0,38) - 1,86 (\pm 0,52) x_1 + 1,44 (\pm 0,52) x_2$, no nível de 95% de confiança.

TABELA V.8. Análise da variância para o ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela A.1, referentes ao GS da 5-MPQ

Fonte de variação	SQ	v	MQ	F calculado	F tabelado
Regressão	56,6118	5	11,3224	2,2241	3,97
Resíduos	35,6353	7	5,0908		
Falta de ajuste	28,4198	3	9,4733	5,2516	6,59
Erro puro	7,2155	4	1,8039		
Total	92,2472	12			

% de variação explicada: 61,37

% máximo de variação explicável: 92,18

5-MPQ Modelo quadrático

GRÁFICO V.11. Superfície de resposta para o grau de substituição da 5-MPQ no polímero descrita pela equação quadrática $\hat{y} = 6,54 (\pm 0,61) - 1,67 (\pm 0,52) x_1$, no nível de 95% de confiança.

5.6. IMINA DA CARBOXIBUTILQUITOSANA

ESPECTRO V.14. Espectro de RMN ^1H da imina da CBQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O) δ (ppm): 1,90 (s; 3H₈); 1,98 – 2,10 (m, 3H₁₃); 2,25 (t, 2H₁₁, J = 6,7 Hz); 2,62 (t, 2H₁₀, J = 6,7 Hz); 2,70 – 2,93 (m, 1H_{2b}); 3,25 – 4,00 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,73 (H₂O).

ESPECTRO V.15. Espectro de RMN ^{13}C da imina da CBQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz (D_2O) δ (ppm): 22,48 (C_8); 29,57 (C_{13}); 31,60 (C_{11}); 39,84 (C_{10}); 56,48 (C_2); 60,40 (C_6); 72,03 (C_3); 75,18 (C_5); 77,32 (C_4); 99,93 (C_1); 175,00 (C_7); 181,90 (C_9).

5.7. CARBOXIMETILQUITOSANA

ESPECTRO V.16. Espectro de IV da CMQ.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3254	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2900	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1700-1500	$\nu_{\text{C=O}}$ assimétrico de carboxilato, $\nu_{\text{C=O}}$ de amida e $\delta_{\text{N-H}}$ de amina
1378	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1250	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1150	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1080	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

ESPECTRO V.17. Espectro de RMN ¹H da CMQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 1,72 (s, 3H₈); 2,74 – 2,89 (m, 1H_{2b}); 2,92 – 3,10 (m, 1H_{2c}); 3,15 – 3,73 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 3,90 (s, 2H₁₀); 4,30 – 5,00 (m, H₂O, 1H₁).

ESPECTRO V.18. Espectro de RMN ^{13}C da CMQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 22,43 (C_8); 47,64 (C_{10}); 56,18 (C_2); 60,34 (C_6); 70,27 (C_3); 75,03 (C_5); 76,61 (C_4); 97,71 (C_1); 169,06 (C_9).

5.8. QUITOSANA N-METILFOSFÔNICA

ESPECTRO V.19. Espectro de RMN ^1H da MFQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 2,52 (s, 3H₈); 3,20 (s, 2H₉); 3,23 – 3,45 (m, 1H_{2b}); 3,80 (s, 2H₉); 3,88 – 4,50 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,75 (H₂O); 4,95 – 5,20 (m, 1H₁); 6,25 (s, 1H_{Ob}); 8,35 (s, 1H_{Oa}).

ESPECTRO V.20. Espectro de RMN ¹³C da MFQ a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹³C 75 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 21,96 (C₈); 41,47 (C₉); 56,18 (C₂); 60,19 (C₆); 72,52 (C₃); 74,67 (C₅); 77,72 (C₄); 100,61 (C₁); 174,20 (C₇).

GRÁFICO V.12. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ da MFQ.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG		DSC			atribuição
$T_{\text{pico}} (^\circ\text{C})$	$\Delta m (\%)$	$T_{\text{pico}} (^\circ\text{C})$	Evento térmico	$\Delta H (\text{J}.\text{g}^{-1})$	
66	9,67	63	endotérmico	347,2	perda de água
260	40,3	256	exotérmico	234,5	decomposição
		308	exotérmico		

TABELA V.9. Solubilidade e teor de carboxila livre dos derivados poliméricos

Polímero funcionalizado	Solubilidade em água	Solubilidade em ácido	Teor de carboxila livre (mmol.g⁻¹ polímero)
SCQ	- - -	- - -	— ^a
CBQ	+ +	+ + +	2,73
imina da CBQ	+ +	+ + +	2,46
CMQ	+	+ + +	— ^a
MFQ	+ +	+ + +	— ^b

Legenda: + levemente solúvel; ++ solúvel; +++ muito solúvel; - - -insolúvel.

^a não determinado pela falta de hidrossolubilidade.

^b não determinado pela ausência de carboxila.

5.9. QUITOSANA COPOLIMERIZADA COM ENXERTO DE ÁCIDO ACRÍLICO E METACRILATO DE HIDROXIETILA

5.9.1. Reação seguida de isolamento e ressolubilização (3ª. Série)

ESPECTRO V.21. Espectros alinhados de IV das membranas obtidas na execução da terceira série experimental.

M 2 **M 3** **M 4 a 6** **ESPECTROGRAMA:**

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3269	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2930	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1715	$\nu_{\text{C=O}}$ de éster
1650	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1549	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina e $\nu_{\text{C=O}}$ assimétrico de carboxilato
1405	$\nu_{\text{C=O}}$ simétrico de carboxilato e $\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1250	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1153	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1080	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

5.9.2. Reação *in situ* (6ª. Série)

ESPECTRO V.22. Espectros alinhados de IV das membranas obtidas na execução da sexta série experimental.

M 2 **M 3** **M 4 a 6** **ESPECTROGRAMA:**

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3363 3297	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2924 2877	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1720	$\nu_{\text{C=O}}$ de éster
1642	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1557	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina e $\nu_{\text{C=O}}$ assimétrico de carboxilato
1405	$\nu_{\text{C=O}}$ simétrico de carboxilato e $\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1250	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1153	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1064	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

GRÁFICO V.13. Sobreposição das curvas obtidas na análise de DMTA das membranas (♦) M1, com 15% de umidade, (♦) M2, (♦) M3, (♦) M4, (♦) M5 e (♦) M6, obtidas na execução da sexta série experimental.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DSC	T _{pico} (°C)		
	perda de água	T _g	decomposição
M1	75	150	293
M2	76	133	320
M3	96	184	292
M4	70	156	353
M5	94	173	290
M6	98	119	323

M 3

GRÁFICO V.14. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ da M3.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG		DSC			atribuição
$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$	$\Delta m (\%)$	$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$	Evento térmico	$\Delta H (\text{J}.\text{g}^{-1})$	
21-228	8,90	62	endotérmico	514,6	perda de água
287	29,8	278	exotérmico	258,1	primeira decomposição
465	11,7	435	exotérmico	45,78	segunda decomposição

M 3

ESPECTRO V.23. Espectro de RMN ¹H a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 2,45 (s, 3H₈); 3,23 – 3,35 (m, 2H₁₁); 3,46 – 3,61 (m, 1H_{2b}); 3,77 – 4,60 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,70 (H₂O); 5,27 (d, 1H_{1b}, J = 7,7 Hz); 5,42 (d, 1H_{1a}, J = 7,3 Hz);

M 3

ESPECTRO V.24. Espectro de RMN ¹³C a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹³C 75 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 23,13 (C₈); 30,74 (C₁₁); 42,42 (C₁₀); 44,10 (C_{11'}); 56,88 (C₂); 61,28 (C₆); 61,76 (C_{11'}); 70,97 (C₃); 75,70 (C₅); 77,95 (C₄); 98,40 (C₁); 175,07 (C₇); 175,43 (C₉); 177 (C_{9'}); 179 (C_{9'}).

M 3

ESPECTRO V.25. Espectro de HETCOR a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.

M 3

ESPECTRO V.26. Espectro de DEPT a 70 °C da membrana M3, sintetizada na sexta série experimental.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹³C 75 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 23,14 (C₈); 30,75 (C₁₁); 42,43 (C₁₀); 44,10 (C_{11'}); 56,88 (C₂); 61,28 (C₆); 61,76 (C_{11'}); 70,97 (C₃); 75,71 (C₅); 77,96 (C₄); 98,40 (C₁).

FIGURA V.4. Fotografia das membranas de quitosana (M1), quitosana com enxerto de HEMA (M2), quitosana com enxerto de AA (M3) e quitosana com enxerto de HEMA e AA na proporção de 3:1 (M4), 1:3 (M5) e 1:1 (M6), obtidas na sexta série experimental, logo após secagem em estufa.

FIGURA V.5. Fotografia das membranas de quitosana (M1), quitosana com enxerto de HEMA (M2), quitosana com enxerto de AA (M3) e quitosana com enxerto de HEMA e AA na proporção de 3:1 (M4), 1:3 (M5) e 1:1 (M6), obtidas na sexta série experimental, após etapa de neutralização.

GRÁFICO V.15. Capacidade de intumescimento (Q) das membranas obtidas, em triplicatas, na sexta série experimental.

GRÁFICO V.16. Citotoxicidade (IC) das membranas obtidas, em triplicatas, na sexta série experimental, sem lavagem em aparelho de soxhlet.

GRÁFICO V.17. Citotoxicidade (IC) das membranas, após lavagem em aparelho de soxhlet.

GRÁFICO V.18. Índice hemolítico das membranas obtidas, em triplicatas, na sexta série experimental e das soluções salinas tamponadas (PBS) utilizadas para lavagem das membranas.

GRÁFICO V.19. Capacidade trombogênica das membranas obtidas, em triplicatas, na sexta série experimental.

5.10. PRÓ-FÁRMACOS

5.10.1. Hidroximetilnitrofurural com carboxibutilquitosana

ESPECTRO V.27. Espectro de IV da tentativa de obtenção do pró-fármaco com CBQ por CTF com Herquat®.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3296	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2920	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1633	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1530	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina
1377	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1252	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1151	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1066	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

ESPECTRO V.28. Espectro de IV da tentativa de obtenção do pró-fármaco com CBQ por catálise enzimática com a protease Proleather®.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3312	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2900	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1638	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1557	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina
1378	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1262	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1157	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1060	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

ESPECTRO V.29. Espectro de IV da tentativa de obtenção do pró-fármaco com CBQ por formação de cloreto de ácido.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3311	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2941 2896	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1635	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1535	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina
1380	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1257	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1154	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1073	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

5.10.2. Hidroximetilnitrofural com membrana de quitosana enxertada com ácido acrílico

GRÁFICO V.20. Sobreposição das curvas de DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ do NFOH, M3 e respectivo pró-fármaco.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DSC	perda de água	$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$ primeira decomposição	segunda decomposição
NFOH	—	146	189; 199; 217
M3-NFOH	60	292	482
M3	62	278	435

GRÁFICO V.21. Sobreposição das curvas de TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ do NFOH, M3 e respectivo pró-fármaco.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG	perda de água	$T_{\text{pico}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$ primeira decomposição	segunda decomposição
NFOH	—	147	205
M3-NFOH	21-210	300	505
M3	21-228	287	465

5.10.3. Hemissuccinato de hidroximetilnitrofural com quitosana

ESPECTRO V.30. Espectro de RMN ^1H a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando quitosana como transportador.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 2,53 (s, 3H₈); 3,14 (s, 2H₁₀, 2H₁₁); 3,59 – 3,78 (m, 1H_{2b}); 3,94 – 4,70 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,95 (H₂O); 5,39 (d, 1H₁, J = 8,0 Hz);

ESPECTRO V.31. Espectro de RMN ¹³C a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando quitosana como transportador.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹³C 75 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 22,84 (C₈); 29,46 (C₁₀, C₁₁); 56,55 (C₂); 60,88 (C₆); 63,27 (C₈); 70,70 (C₃); 75,44 (C₅); 77,40 (C₄); 98,13 (C₁); 175,23 (C₇).

GRÁFICO V.22. Sobreposição das curvas de DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ do SCNFOH, quitosana e respectivo pró-fármaco.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DSC	perda de água	$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$ primeira decomposição	segunda decomposição
SCNFOH	—	140	213
Q-SCNFOH	66	246;299	—
Q	122	292	—

5.10.4. Hemissuccinato de hidroximetilnitrofural com quitosana *N*-metil-fosfônica

ESPECTRO V.32. Espectro de RMN ¹H a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando MFQ como transportador.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 2,25 (s, 3H₈); 2,84 (s, 2H₁₀, 2H₁₁); 3,05 (s, 2H₉); 3,24 (s, 2H₉); 3,30 – 3,50 (m, 1H_{2b}); 3,60 – 4,45 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,84 (H₂O); 5,08 (d, 1H₁, J = 7,7 Hz);.

ESPECTRO V.33. Espectro de RMN ^{13}C a 50 °C do pró-fármaco do NFOH, partindo do SCNFOH e empregando MFQ como transportador.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^{13}C 75 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 22,81 (C₈); 42,69 (C₉); 56,52 (C₂); 60,87 (C₆); 70,66 (C₃); 75,40 (C₅); 77,36 (C₄); 98,08 (C₁); 175,23 (C₇).

GRÁFICO V.24. Sobreposição das curvas de DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ do SCNFOH, MFQ e respectivo pró-fármaco.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DSC	perda de água	$T_{\text{pico}} (^{\circ}\text{C})$ primeira decomposição	segunda decomposição
SCNFOH	—	140	213
MFQ-SCNFOH	65	249;290	—
MFQ	63	256;308	—

GRÁFICO V.25. Sobreposição das curvas de TG/DTG obtidas sob atmosfera dinâmica de N₂ e razão de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ do SCNFOH, MFQ e respectivo pró-fármaco.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG	perda de água	T _{pico} (°C) primeira decomposição	segunda decomposição
SCNFOH	35	147	202; 211; 220
MFQ-SCNFOH	57	254; 320	—
MFQ	66	260	—

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1. SÍNTESE DO HIDROXIMETILNITROFURAL

A grande dificuldade na obtenção do NFOH está no seu isolamento. A reação de síntese parece transcorrer com alto rendimento, porém, na etapa de purificação, parte do produto é perdido na lavagem com MeOH para remoção dos materiais de partida (CH_2O e NF). Após a lavagem, NFOH, de aspecto amarelo claro e ponto de fusão a 152 - 156 °C, é obtido com 48% de rendimento.

O espectro de IV (Espectro V.1) indica a introdução do grupo hidroximetil: a banda a 1424 cm^{-1} refere-se ao CH_2 e os sinais em 3450 – 3300 cm^{-1} (largo) e 1124 cm^{-1} , à hidroxila, sinais estes que não são evidenciados no espectro de IV do NF (Espectro A.1).

O espectro de RMN ^1H (Espectro V.2) confirma o isolamento do NFOH, pois os tripletos a 5,51 e 4,61 ppm referem-se, respectivamente, aos hidrogênios da hidroxila e do grupo metilênico, que não estão presentes no espectro de RMN ^1H do NF (Espectro A.2). O carbono do CH_2 é evidenciado a 63,07 ppm no espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.3).

O Gráfico V.1 mostra a sobreposição das curvas de DSC e TG/DTG obtidas para o NFOH. As curvas TG/DTG evidenciam que NFOH é termicamente estável até ~120 °C, decompondo-se em duas etapas: a primeira, entre 120 e 170 °C, com pequena perda de massa ($\Delta m = 2,64\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 147$ °C) e a segunda, de 170 a 310 °C, com acentuada perda de massa ($\Delta m = 43,9\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 205$ °C). A partir de 310 °C, a perda de massa ocorre lenta e gradativamente até 500 °C, devido à eliminação de material carbonáceo formado na etapa anterior. A curva de DSC revela a ocorrência de um evento exotérmico entre 120 e 157 °C ($\Delta H = 41,28 \text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 146$ °C), que coincide com a primeira decomposição. A segunda decomposição coincide com três eventos térmicos, entre 170 e 310 °C: o primeiro,

endotérmico ($\Delta H = 165,7 \text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 189 \text{ }^{\circ}\text{C}$), seguido de dois eventos exotérmicos ($\Delta H = 1300 \text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 199 \text{ e } 217 \text{ }^{\circ}\text{C}$). A decomposição do NFOH teve comportamento distinto do seu protótipo, NF (Gráfico A.1), que se decompõe em etapa exotérmica única ($\Delta H = 730 \text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 245 \text{ }^{\circ}\text{C}$) com acentuada perda de massa ($\Delta m = 52,1\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 245 \text{ }^{\circ}\text{C}$). Além disso, verifica-se que a hidroximetilação do NF acarretou a diminuição da estabilidade térmica do novo derivado, de 200 para 120 $^{\circ}\text{C}$.

Os Gráficos V.2, V.3 e V.4 mostram, respectivamente, a atividade do NFOH contra formas promastigotas de *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, em relação ao seu protótipo, o NF. Foi observado que a hidroximetilação do NF, para a formação do NFOH, provocou diminuição da atividade leishmanicida contra as três espécies ensaiadas. Mesmo assim, pode-se considerar que NFOH preserva boa atividade, considerando-se os IC_{50} obtidos (Tabela V.1). Além disso, NFOH é 4 vezes menos mutagênico que o protótipo (Guido *et al.*, 2001). Dessa forma, NFOH é considerado derivado do NF com perfil terapêutico melhorado, mesmo a despeito da redução da atividade.

A detecção da atividade leishmanicida do NFOH sobre as formas promastigotas do parasito estimulou a pesquisa contra as formas amastigotas intracelulares. As Figuras V.1 e V.2 são fotografias do ensaio de atividade do NFOH, a 32 e 64 μM , respectivamente, contra formas amastigotas de *L. amazonensis*, residentes no interior de macrófagos. Observa-se que NFOH, em ambas as concentrações, não apresentou atividade contra as formas intracelulares, que atingiram população bem próxima ao controle (dado não mostrado). Entretanto, o resultado preliminar da atividade do NFOH em cultura das formas amastigotas fora de macrófagos, no ensaio denominado de transformação das formas amastigotas em promastigotas, mostrou que o derivado é tão ativo para amastigotas quanto para promastigotas (Tabela V.1). Tais resultados indicam a dificuldade do NFOH em penetrar o macrófago, mas não de atuar sobre o parasito intracelular. Esse resultado confirma o principal problema da quimioterapia das parasitoses causadas por protozoários, que conta com fármacos eficazes contra as formas sangüíneas, mas com baixo alcance sobre as formas intracelulares. Daí a

grande importância do planejamento dos pró-fármacos poliméricos, que podem aumentar a captação intracelular do NFOH, uma vez que a quitosana possui propriedade imunomoduladora em macrófagos.

A análise da Tabela V.1 permite observar, ainda, que alguns ensaios apresentaram valores muito elevados para o desvio padrão do IC₅₀ calculado, especialmente com *L. chagasi*. Esses resultados podem ser estatisticamente melhorados com a realização de maior número de replicatas, porém refletem a grande variabilidade encontrada em cultura de parasitos e pouco discutida na literatura. Mesmo assim, acredita-se que o comportamento das curvas de inibição de crescimento deva ser o mesmo, sem apresentar grandes alterações com a melhora estatística dos resultados.

6.2. SÍNTESE DO HEMI-SUCCINATO DE HIDROXIMETILNITROFURAL

À semelhança do que acontece com o NFOH, a síntese do SCNFOH também encontra na etapa de isolamento o seu ponto crítico. Tem sido obtido, até então, com rendimento de 66% e teve o ponto de fusão determinado em 126 - 129 °C.

Do espectro de IV do SCNFOH (Espectro V.4), pouco se pode concluir, uma vez que o padrão dos sinais é muito semelhante ao espectro do NFOH (Espectro V.1). O sutil alargamento do sinal, cujo ápice é lido em 1678 cm⁻¹, pode indicar a formação do éster. Entretanto, a permanência dos sinais, embora em menor intensidade, referentes à hidroxila do NFOH em 3406 e 1124 cm⁻¹, indicam a presença de alguma quantidade do material de partida.

A síntese do SCNFOH é confirmada pelos espectros de RMN ¹H e ¹³C. A presença dos novos sinais a 12,16 e 2,42 ppm, no Espectro V.5, referem-se, respectivamente, aos hidrogênios da carboxila e das metilas do espaçante succínico. A inserção desse espaçante na molécula do fármaco é comprovada pelo comportamento do hidrogênio do carbono 8, que passou de um tripleto no espectro do NFOH (Espectro

V.2) para um dubleto. A permanência do sinal a 5,52 ppm pode ser atribuída ao hidrogênio da hidroxila do NFOH de partida, o que indica que o método de isolamento do SCNFOH deve ser otimizado. O espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.6) também confirma a obtenção do SCNFOH pelo aparecimento do sinal do carbono 9, envolvido na formação do éster, a 173 ppm, além das metilas 10 e 11 do espaçante succínico a 28 ppm.

O Gráfico V.5 mostra a sobreposição das curvas de DSC e TG/DTG obtidas para o SCNFOH. A primeira perda de massa ($\Delta m = 1,05\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) corresponde à eliminação da umidade da amostra, decorrente do processo de lavagem com água para o isolamento do produto. A decomposição do SCNFOH, assim como para o NFOH, ocorre em duas etapas: a primeira, entre 95 e 160 $^{\circ}\text{C}$, com pequena perda de massa ($\Delta m = 6,28\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 147\text{ }^{\circ}\text{C}$) e a segunda, de 160 a 295 $^{\circ}\text{C}$, composta pela sobreposição de três eventos e com acentuada perda de massa ($\Delta m = 43,8\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 202, 211 \text{ e } 220\text{ }^{\circ}\text{C}$). A curva de DSC revela dois eventos: o primeiro, endotérmico, entre 90 e 165 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 154,3\text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 140\text{ }^{\circ}\text{C}$) e o segundo, exotérmico, de 165 a 300 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 1060\text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 213\text{ }^{\circ}\text{C}$), que coincidem, respectivamente, com a primeira e segunda decomposições. Verifica-se, também, que a introdução do espaçante succinoílico no NFOH acarretou a diminuição da estabilidade térmica do pró-fármaco, de 120 para 90 $^{\circ}\text{C}$.

A atividade leishmanicida do SCNFOH também foi pesquisada contra as formas promastigotas de *L. chagasi* (Gráfico V.2), *L. braziliensis* (Gráfico V.3) e *L. amazonensis* (Gráfico V.4). Observa-se que, em todas as espécies ensaiadas, SCNFOH foi o composto que apresentou maiores valores para IC_{50} (Tabela V.1). Entretanto, não se pode afirmar que SCNFOH foi menos ativo que NFOH. Como SCNFOH foi obtido pela introdução de espaçante succinoílico na molécula de NFOH e os ensaios de ambos os derivados são realizados no mesmo período de tempo, acredita-se que a diferença de atividade entre os dois compostos seja decorrente da liberação prolongada do NFOH a partir do SCNFOH. Por esses resultados, o SCNFOH poderia ser classificado como pró-fármaco do NFOH.

6.3. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA

A quitosana é solúvel em solução ácida, porém pequena fração ou parte das cadeias do polímero pode ser insolúvel em tais condições, prejudicando a solubilização no meio reacional e análise posterior de seus derivados por RMN (Canella, Garcia, 2001). A purificação consiste na separação das cadeias de quitosana nas frações insolúvel e solúvel em meio ácido, que aparecem quando esse polissacarídeo é obtido por desacetilação heterogênea (Vårum *et al.*, 1991). O processo de purificação foi experimentado com amostra de quitosana Sigma MMM, que se apresenta sob a forma de flocos densos e rígidos, não fragmentáveis e de coloração amarelo pardo. Findo o processo, obteve-se material quase que totalmente pulverizado com tonalidade bege. O rendimento foi de apenas 53%, uma vez que são 6 etapas de filtração e partiu-se de apenas 1 g de quitosana bruta. Porém, observou-se que a filtração das amostras à pressão reduzida em filtro de papel simples, antes da realização de qualquer procedimento, é eficaz na remoção da fração do polímero insolúvel em meio aquoso levemente ácido e também facilita as análises. Dessa forma, qualquer amostra de quitosana pode ser empregada na realização dos trabalhos, desde que previamente filtrada.

A Figura V.3 mostra a discrepância física entre as amostras de quitosana, quando em solução levemente ácida. As amostras de quitosana do PADETEC (a) e Sigma de AMM (b) e MMM (c) apresentam-se límpidas, embora a amostra do PADETEC possua coloração mais intensa. Já a amostra Sigma de BMM (d) proporciona turbidez à solução, apesar da coloração amarelada menos intensa. A variação das características físico-químicas da quitosana é explicada pela diferença da massa molecular e dos valores do GD das cadeias poliméricas (Li *et al.*, 1997). A quitosana Sigma AMM mostrou-se a mais viscosa, devido à elevada massa molecular (Tabela V.2). No outro extremo, a quitosana PADETEC é a amostra que se solubiliza mais rapidamente e em maiores concentrações, coincidindo com a massa molecular mais baixa.

Não houve dificuldades para a formação de filmes a partir da quitosana, mesmo quando esta não se encontrava purificada. Os filmes foram produzidos conforme método sugerido por Canella e Garcia (2001), como o descrito no item 4.2.3.2. Entretanto, o espectro no IV do filme de quitosana a 1% mostra bandas que ultrapassam o limite inferior de transmitância devido à formação de membrana espessa e, conseqüentemente, bastante concentrada. A fim de otimizar a concentração ideal do polímero, foram preparados filmes a 0,75, 0,50 e 0,25% e verificou-se que membranas a 0,25%, bastante delgadas, geravam excelentes espectros. Entretanto, durante o estágio no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra, onde novos filmes de quitosana foram sintetizados por copolimerização de enxerto da quitosana por AA e HEMA, verificou-se que filmes confeccionados a 1% eram perfeitamente lidos pelo espectrômetro 750 Magma - IRTM equipado com ATR.

Nota-se que a quitosana, pelo alinhamento dos espectros de IV obtidos com todas as amostras (Espectro V.7), apresenta padrão de absorção bastante característico. Os sinais próximos a 1650 e a 1590 cm^{-1} correspondem, respectivamente, à banda de amida I e do monômero acetilado e à banda de amina, do monômero desacetilado. O cálculo da proporção da intensidade desses sinais torna possível a determinação do GA, segundo método proposto por Moore e Roberts (1980) e descrito no item 4.2.6.6.2. A Tabela V.3 mostra os dados calculados do GD, pela análise de filmes, confeccionados em triplicata, de todas as amostras de quitosana. Observa-se que, segundo o método, GD pouco varia entre as amostras, ficando na média de 74% de desacetilação.

O Espectro A.3 refere-se à análise de RMN ^1H da quitosana PADETEC, amostra inicialmente eleita para a síntese dos derivados. Aparecem sinais do hidrogênio do monômero acetilado (H_{2a}) e do monômero desacetilado (H_{2b}), respectivamente, a 3,59 (junto com demais hidrogênios do resíduo glicosamínico) e 2,93 ppm. Como o hidrogênio H_1 foi encoberto pelo sinal da água, analisou-se a mesma amostra a 70 °C (Espectro A.4) para provocar o deslocamento dos sinais para campo mais baixo, o que permitiu a visualização do hidrogênio H_1 a 5,41 ppm. Vale ressaltar que os espectros

foram realizados com água deuterada sem TMS e a referência foi, assim, calibrada no sinal da água a 4,75 ppm (Silverstein, Webster, 2000).

O espectro de RMN ^1H a 70 °C da amostra de quitosana Sigma MMM (Espectro V.8), empregada na realização da maior parte dos trabalhos, revela o mesmo padrão observado para a amostra do PADETEC, exceto pela intensidade dos sinais. O Espectro de RMN ^{13}C da quitosana (Espectro V.9) não sofre grande influência da temperatura no deslocamento dos sinais, podendo-se observar a presença de pequena quantidade de acetilação pelos sinais a 175 e 22 ppm, que correspondem, respectivamente, aos carbonos C_7 e C_8 do grupo acetila.

A relação entre os sinais do hidrogênio da metila do grupo acetila (H_8) e de outro hidrogênio representativo da cadeia polimérica global (H_1) nos espectros de RMN ^1H das diferentes amostras de quitosana permite a realização do cálculo do GD (Tabela V.4). Nota-se que os valores diferem daqueles medidos pelos espectros de IV (Tabela V.3). Os GD calculados, pelos dois métodos, para a amostra Sigma AMM resultaram em valores bastante aproximados, em torno de 71 a 72%. Em contrapartida, a diferença entre as demais amostras foi superior a 10%. Já é sabido que GD varia de acordo com a técnica empregada (Shigemasa *et al.*, 1996; Tan *et al.*, 1998; Lavertu *et al.*, 2003), apesar de não haver relatos sobre a identificação do método mais adequado para a realização dessa análise. Durante os experimentos para a síntese de membranas de quitosana enxertadas com HEMA e AA, foi constatada a influência da etapa de neutralização no padrão dos espectros gerados em IV. O excesso de ácido acético, empregado como solvente na confecção dos filmes e não neutralizado pela solução de hidróxido de sódio, pode ser detectado nos espectros e amplificar a leitura de alguns sinais (dado discutido mais adiante, no item 6.4.6). Por essa razão, acredita-se que a análise em RMN ^1H se constitua em método mais confiável para o cálculo do GD.

O Gráfico V.6 mostra a sobreposição das curvas de DSC e TG/DTG obtidas para a quitosana Sigma MMM. Nas curvas TG/DTG, a primeira perda de massa ($\Delta m = 6,00\%$), que ocorre entre 27 e 214 °C, corresponderia à eliminação da umidade da amostra. Já o segundo e maior evento de perda de massa ($\Delta m = 42,86\%$,

$T_{\text{picoDTG}} = 296\text{ }^{\circ}\text{C}$), de 214 a 393 $^{\circ}\text{C}$, é atribuído à decomposição das cadeias poliméricas. A curva de DSC revela a ocorrência de um primeiro evento endotérmico, entre 30 e 210 $^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 147\text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 122\text{ }^{\circ}\text{C}$), que está relacionado, dentre outras causas, à perda de umidade da amostra. O segundo evento, que ocorre na faixa de 230 a 375 $^{\circ}\text{C}$, é exotérmico ($\Delta H = 308,1\text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 292\text{ }^{\circ}\text{C}$) e coincide com a degradação do polímero, identificada nas curvas TG/DTG.

Os eventos térmicos detectados pelo DMTA, na quitosana, são de difícil interpretação (Hasegawa *et al.*, 1992; Ikeda *et al.*, 1997; Hatakeyama *et al.*, 1998; Czihak *et al.*, 1999). As cadeias poliméricas desse polissacarídeo têm a capacidade de interagir com moléculas de água por ligações de hidrogênio (Mucha *et al.*, 2004), que acabam por interferir nas propriedades térmicas e mecânicas da quitosana e causam redução substancial da *temperatura de transição vítrea* (T_g) (Lazaridou *et al.*, 2002). Isso explica porque a mesma propriedade pode estar descrita na literatura sob valores de temperatura que variam em até 50 $^{\circ}\text{C}$. Além disso, o conteúdo em água está intimamente relacionado com o GD da amostra (Mucha *et al.*, 1999). Por esse motivo, as amostras de quitosana foram analisadas em DMTA sob diferentes graus de umidade (Gráfico V.7). A amostra com 150% de umidade representa o filme de quitosana analisado após 24 h de imersão em água. Por outro lado, aquela submetida à rápida hidratação momentos antes da análise apresentou 38% de umidade, enquanto que o filme exposto à umidade do ar por 24 h revelou 15% de conteúdo em água. Todos os valores de umidade nas amostras de quitosana foram calculados pela diferença entre amostra intumescida e amostra seca, conforme descrito no item 4.2.6.10. A análise do comportamento térmico das diferentes amostras de quitosana, especialmente aquela a 15% de umidade, permite identificar quatro eventos importantes, encontrados a $\sim 72\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\sim 131\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\sim 201\text{ }^{\circ}\text{C}$ e, finalmente, $\sim 292\text{ }^{\circ}\text{C}$.

O pico a $\sim 72\text{ }^{\circ}\text{C}$ pode ser atribuído a alguma relaxação induzida pela água devida à referida higroscopicidade da quitosana. Essa transição também é detectada por DSC em amostras com 5 a 25% de umidade, devido à associação entálpica entre moléculas de água e carboidrato (Livings, 2002). A segunda transição a $\sim 131\text{ }^{\circ}\text{C}$ é,

normalmente, descrita pela Tg (Mucha, Piekielna, Wieczorek, 2004; Wu *et al.*, 2004). O pico a $\sim 201^\circ\text{C}$ é difícil de ser reconhecido como consequência de qualquer movimento molecular. Alguns autores têm reportado que a Tg da quitosana é detectada por volta de 200°C , temperatura que está muito próxima do início da degradação. Realmente, pela análise da amostra seca de quitosana, a Tg está bem próxima de 200°C , o que comprova que a presença de água no polímero diminui a região de ocorrência da Tg para temperaturas mais baixas, uma vez que a água atua como plastificante por aumentar os movimentos entre as cadeias poliméricas. Se a Tg é detectada a 131°C , uma possível explicação para a ocorrência do pico a 200°C é alguma transição líquido-líquido, que corresponde ao movimento de longos segmentos de cadeia ou até da cadeia inteira (Dong *et al.*, 2004). O último pico, a 300°C , é descrito como temperatura de decomposição (Jiang *et al.*, 1996; Xiao *et al.*, 2003). Geralmente, se inicia em torno de 230°C e coincide, também, com dados termogravimétricos obtidos (Gráfico V.6) e publicados (Liu *et al.*, 2003). O início da temperatura de decomposição também pode ser descrito por valores levemente diferentes devido à dependência do GD e grau de polimerização na estabilidade térmica. Um pequeno pico também é detectado a 350°C e, provavelmente, pode ser decorrência de quebra das cadeias principais do polímero.

A temperatura de transição que ocorre em torno de 15°C é descrita, na literatura, como a transição β da quitosana. Normalmente, essa transição é atribuída à rotação de grupos hidroximetílicos hidratados (Bradley, Carr, 1976; Wu *et al.*, 2004) ou movimentos localizados de segmentos de cadeia em regiões desorganizadas da cadeia polimérica (Bradley, Carr, 1976). Entretanto, essa região não foi evidenciada na amostra seca de quitosana, assim como a Tg foi detectada em temperatura mais elevada, comprovando que a secagem em estufa por 24 h é eficiente na remoção do excesso de hidratação das amostras.

A hidratação presente na quitosana pode ser classificada em dois tipos diferentes: moléculas de água livres, denominadas de *congeláveis*, e moléculas de água *não-congeláveis*, que são de difícil remoção a temperaturas brandas, mesmo quando vácuo é aplicado (Mucha, Pawlak, 2004). No caso da água livre, não há

interação com o polímero, o que explica por que é tão fácil removê-la, enquanto que a outra estabelece ligações de hidrogênio com a matriz polimérica. Essa diferença pode ser observada quando, mesmo após a secagem da quitosana, os picos associados à água *não-congelável* não desaparecem.

De acordo com as curvas das amostras de quitosana hidratadas no Gráfico V.7, o primeiro pico, por volta de 0 °C, é atribuído à rotação dos grupos hidroximetílicos hidratados ou a movimentos localizados de segmentos de cadeia em regiões desorganizadas. A água detectada no segundo pico, a 72 °C, pode ser atribuída às moléculas desta que são necessárias para as interações intra e intermoleculares das cadeias poliméricas da quitosana, quando amorfas (Ogawa, Yui, Okuyama, 2004). Por outro lado, o pico a 100 °C é associado com a presença de água livre na quitosana. Considerando a curva obtida para a amostra seca, é possível confirmar que, após a secagem do filme, o pico associado à água livre desaparece. É interessante observar que, quando o conteúdo em água é extremamente elevado (amostra com 150% de umidade), a maior parte dessa água está ligada à quitosana por ligações de hidrogênio (pico a 0 °C), ao invés de estar na forma livre (pico a 100 °C). Com relação ao início do evento de degradação, como esperado, a temperatura não mudou com os diferentes conteúdos em água das amostras porque esta é liberada antes de ser atingida temperatura tão elevada. Liu e colaboradores (2003) provaram, com dados termogravimétricos, que a perda de massa causada pela presença de água em materiais poliméricos ocorre em temperaturas de até 135 °C.

6.4. SÍNTESE DOS DERIVADOS DE QUITOSANA

6.4.1. Succinilquitosana

A SCQ foi obtida conforme método descrito no item 4.2.4.1. O Espectro V.10 mostra o comportamento desse derivado no IV e o surgimento das bandas a 3091 e 1729 cm^{-1} confirmam a esterificação das hidroxilas da quitosana pelo grupo succinoíla. Além disso, o desaparecimento da banda de amina, a 1598 cm^{-1} , presente no espectro

da quitosana (Espectro V.7), e o surgimento do sinal em 1553 cm^{-1} (Espectro V.10), de amida, dá indicativos de que o grupo succinoíla também tenha substituído a amina na formação da amida desses compostos, conforme esboçado no Esquema IV.3.

Tentou-se a análise por RMN ^1H , como realizado para quitosana, porém o derivado succinoílico não se mostrou solúvel em meio aquoso levemente ácido. A baixa hidrossolubilidade do produto poderia ter sido consequência da alta substituição, principalmente das aminas e, também, das hidroxilas, provocada pelo excesso de anidrido succínico (Tabela VI.1).

TABELA VI.1. Condições para a síntese da SCQ

quitosana PADETEC	razão molar		solvente	produto
	anidrido succínico	piridina		
1,0	3,0	3,0	DMF	insolúveis em meio aquoso levemente ácido
1,0	1,0	1,0	DMF	

Sendo assim, com o intuito de diminuir o grau de substituição da quitosana pelos grupos succinoíla, reduziu-se a proporção molar dos reagentes em 1:1:1. Ainda assim, o derivado obtido não foi solúvel em meio ácido, condição fundamental para a confecção de filmes.

Rinaudo e colaboradores (2001) explicam que a solubilização da quitosana em meio ácido se dá pela protonização do grupo amínico livre das porções desacetiladas. Isso explica porque a quitina, 100% acetilada, é insolúvel em condições ácidas.

A SCQ, conforme mostra o Espectro V.10, tem os grupos amínicos substituídos, de forma que o nitrogênio se envolve numa ligação do tipo amida, não protonizável em meio ácido, como acontece com a quitina (Figura VI.1).

FIGURA VI.1. Representação química das moléculas de quitina, quitosana e SCQ.

Entretanto, como a SCQ possui grupo carboxílico terminal na porção substituída, foi proposto o inverso do método para a formação de membrana: solubilização do derivado em solução aquosa de hidróxido de sódio a 5%, por meio da formação de sal sódico do grupo carboxílico, com posterior neutralização do excesso de soda com solução aquosa de ácido acético a 2%. Porém, houve pouca solubilização e o sal formado não tem capacidade filmogênica, pois, quando submetido à estufa para evaporação do solvente, não ocorreu formação de filme, mas, sim, de emaranhado em rede de feixes e filamentos esbranquiçados. Devido, então, à incapacidade de formação de filmes observada na SCQ, fundamental para o propósito deste trabalho, esse derivado teve interesse diminuído.

6.4.2. Carboxibutilquitosana

Inicialmente, a síntese desse derivado seguiu a técnica descrita por Rinaudo e colaboradores (2001). Estes autores estabeleceram que, para cada mol de quitosana, deveriam ser adicionados 1,5 mol de ácido levulínico e 3,5 mol de boroidreto de sódio. Entretanto, nessas condições, observou-se que o pH do meio se tornara bastante

alcalino (8,5), provocando a precipitação do polímero ainda em reação. Após análise em RMN ^1H (dado não mostrado), verificou-se a formação do derivado cíclico, a 5-MPQ, com pouca substituição.

Segundo Muzzarelli e colaboradores (1993), a obtenção do derivado 5-MPQ é favorecida pelas seguintes condições: pH alcalino durante a etapa de redução com boroidreto de sódio, alta concentração de agente redutor e velocidade de adição lenta de boroidreto de sódio.

Então, com o intuito de melhorar a substituição do grupo aminico para a formação da imina, aumentou-se a concentração do ácido levulínico de 1,5 mol para 2 mol e, a fim de evitar o excesso de agente redutor com conseqüente alcalinização do meio reacional, reduziu-se a concentração do boroidreto de sódio de 3,5 mol para 1 mol por mol de quitosana e, posteriormente, para 0,5 mol por mol de quitosana, conforme descrito na Tabela VI.2. Outra medida foi solubilizar previamente o agente redutor em água, pois, segundo Smith (1994), boroidreto de sódio reage com água para formar intermediários alcoxiboroidreto, que também funcionam como agentes redutores mais fracos.

TABELA VI.2. Condições para a síntese da CBQ

quitosana PADETEC	razão molar		pH final	isolamento	produto
	ácido levulínico	NaBH ₄			
1,0	1,5	3,5	8,5	diálise	derivado cíclico
1,0	2,0	1,0*	4,5	precipitação EtOH filtração – diálise	CBQ e derivado cíclico
1,0	2,0	0,5*	4,0	diálise	CBQ

* adicionado previamente solubilizado em qs de água desionizada.

Na etapa de precipitação, foi necessária a adição abundante de etanol comercial para elevar o pH a 5,0 e o polímero precipitou sob forma gelatinosa. O precipitado foi submetido à diálise por aproximadamente 72 h com conseqüente liofilização. Verificou-se que a diálise direta do meio reacional foi eficaz para o isolamento do polímero,

sendo, então, preferida por ser mais simples que a precipitação prévia do polímero, além de minimizar a perda do produto. O polímero obtido, de coloração branca, assumiu aspecto de algodão.

O produto foi titulado segundo método descrito no item 4.2.6.8 para determinação da quantidade de carboxilas livres correspondentes àquelas do grupo carboxibutil introduzido no polímero. Determinou-se que, para cada grama de CBQ, havia 2,73 mmol de carboxilas livres (Tabela V.9). Esse dado foi tomado como base para o cálculo estequiométrico da massa de NFOH necessária para se esterificar ao grupo espaçante.

Na tentativa de preparar filmes da CBQ, foi possível solubilizá-la em meio ácido e evaporar o solvente em estufa termostatzada. A formação do filme foi visualmente evidenciada. Entretanto, por se tratar de derivados anfotéricos, solúveis em condições ácidas, neutras e básicas, ao passo que a quitosana mostra-se solúvel somente em condições ácidas (Rinaudo *et al.*, 2001), o filme enfraqueceu na etapa de neutralização com hidróxido de sódio e se fragmentou na lavagem com água. Mesmo assim, os pequenos fragmentos recuperados do processo foram analisados em IV (Espectro V.11) e o aparecimento do sinal a 1710 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico, indica a substituição do polímero pelo espaçante carboxílico.

No espectro de RMN ^1H (Espectro V.12), os tripletos em 2,48 e 2,14 ppm correspondem, respectivamente, aos hidrogênios dos C_{10} e C_{11} e o sinal por volta de 1,93 ppm, ao C_{13} da metila do grupo espaçante introduzido. O C_9 da carboxila é visualizado no espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.13) a 182 ppm. Os C_7 e C_9 , não aparecem no espectro, provavelmente, devido ao baixo grau de acetilação e substituição da 5-MPQ, respectivamente, e curto período de análise. O C_{12} não foi evidenciado em nenhum dos espectros, o que dificulta a distinção entre a CBQ e sua respectiva imina.

Entretanto, a reação, embora já tivesse formado a CBQ satisfatoriamente sob as novas condições, ainda produzia a forma cíclica. A ciclização da CBQ em 5-MPQ parecia estar sendo catalisada pela quantidade de boroidreto de sódio excedente à necessária para reduzir a imina intermediária à amina da CBQ. Além disso, a formação do derivado cíclico é desfavorável porque a 5-MPQ não possui grupos carboxílicos que permitam a latenciação do fármaco pela formação do éster.

Sendo assim, a reação necessitava de otimização com o objetivo de gerar polímero substituído com teor máximo de CBQ e mínimo de 5-MPQ. Para tanto, partiu-se da melhor condição reacional obtida até então, 2,0 mol de ácido levulínico e 0,5 mol de boroidreto de sódio por mol de quitosana, para a montagem de um planejamento fatorial 3^2 com ponto central que margeasse essa condição.

É chamado de planejamento fatorial 3^2 porque são variados 2 fatores, x_1 e x_2 , em 3 níveis, -1, 0 (zero) e +1 (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 2002). Os fatores são a razão molar do ácido levulínico e do boroidreto de sódio em relação ao polímero. Os níveis, -1 e +1, são, respectivamente, o menor e o maior valor escolhido para a razão molar de cada reagente. O 0 (zero) é representado pelo ponto central e numericamente corresponde à média entre os níveis -1 e +1 (Tabela VI.3). Em outras palavras, a razão molar do ácido levulínico escolhida para os níveis -1, 0 e +1 corresponde, respectivamente, a 1,0, 2,0 e 3,0 mol, sendo que, para o boroidreto de sódio, corresponde a 0,50, 0,75 e 1,00 mol, respectivamente. A Figura VI.2 é uma representação esquemática dos ensaios realizados neste planejamento.

TABELA VI.3. Planejamento fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central

ENSAIO	FATORES		RAZÃO MOLAR	
	X1	X2	ác. levulínico	NaBH ₄
1	- 1	- 1	1,00	0,50
3	+1	- 1	3,00	0,50
3r	+1	- 1	3,00	0,50
5	- 1	+1	1,00	1,00
7	+1	+1	3,00	1,00
8	- 1	0	1,00	0,75
12	+1	0	3,00	0,75
11	0	- 1	2,00	0,50
9	0	+1	2,00	1,00
2	0	0	2,00	0,75
4	0	0	2,00	0,75
6	0	0	2,00	0,75
10	0	0	2,00	0,75

FIGURA VI.2. Diagrama do planejamento fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central (a) esquematizado de forma genérica e (b) representando as reais condições do planejamento nas ordenadas e os ensaios indicados com os respectivos números nos pontos correspondentes.

Os ensaios para maximizar a síntese da CBQ e minimizar a ocorrência da 5-MPQ foram realizados segundo metodologia descrita no item 4.2.4.2, variando-se a proporção do ácido levulínico e boroidreto de sódio, conforme arrolado na Tabela VI.3. Inicialmente, foram realizados os ensaios de 1 a 7, em ordem aleatória, que

correspondem ao planejamento fatorial 3^2 com triplicata no ponto central. Entretanto, o tratamento estatístico desses dados revelou a necessidade da realização de outros pontos para se obter um modelo matemático adequado que representasse o sistema. Assim, introduziram-se os pontos representados pelos ensaios **8**, **9**, **11** e **12** e mais um ponto central, ensaio **10**, transformando o planejamento num fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central, conforme esquematizado na Figura VI.2. O ensaio **3** foi repetido com o nome de **3r** porque, como o produto apresentou características diferentes dos demais, tais como hidrossolubilidade, viscosidade e aspecto físico, uma replicata foi realizada para efeito de confirmação do resultado.

O GS do polímero pelos espaçantes foi determinado utilizando as integrais obtidas nos espectros de RMN ^1H (Espectros A.6 a A.17), conforme a equação descrita no item 4.2.6.9. É calculado a partir da relação entre a integral de um hidrogênio do polímero, H_1 (Figura VI.3), e de um hidrogênio do grupo espaçante. Para a determinação do GS da CBQ e 5-MPQ, os sinais-sonda escolhidos para o cálculo são, respectivamente, H_{10} e $\text{H}_{13'}$.

FIGURA VI.3. Representação química da molécula de quitosana funcionalizada, que esquematiza, da esquerda para a direita, monômeros acetilado, desacetilado, substituído pela carboxibutílica e substituído pela 5-metilpirrolidinona.

É importante, ainda, para o cálculo, o número de hidrogênios presentes na molécula que os sinais do RMN ^1H representam. Em outras palavras, há 2 hidrogênios H_{10} e 3 hidrogênios $\text{H}_{13'}$, que são considerados nos cálculos. Como a delimitação da

área do sinal do espectro de RMN ^1H para o cálculo da integral é feita manualmente, os cálculos foram realizados com os valores médios de três medidas das integrais de cada espectro (Tabela A.1). O hidrogênio H_1 foi utilizado como referência para calibração das integrais em todos os espectros e, por essa razão, seu valor é sempre 1.

A Figura VI.4b mostra, em azul, o GS do polímero pela CBQ e, em vermelho, o GS do polímero pela 5-MPQ. De acordo com este diagrama, pode-se observar que o ensaio 1 (1,00 de ácido levulínico: 0,50 de boroidreto de sódio) formou derivado polimérico com maior teor da CBQ (27,47%) , porém a quantidade do derivado cíclico, 5-MPQ, ainda é razoável (9,07%), se comparado com os demais ensaios. Esse resultado se opõe ao que era esperado.

FIGURA VI.4. (a) Diagrama genérico do planejamento fatorial 3^2 com quadruplicata no ponto central com os ensaios indicados nos pontos correspondentes e (b) diagrama com as respostas do GS (%) da CBQ e 5-MPQ indicadas, respectivamente, em azul e vermelho, nos pontos equivalentes aos ensaios que correspondem.

Traçando-se uma reta entre os ensaios 1, 11 e 3, observa-se que a fração molar do boroidreto de sódio é sempre a mesma (0,5), mas a fração molar do ácido levulínico aumenta de 1,0 a 3,0. Ora, se o teor de agente redutor é o mesmo para as três situações, esperava-se que o ensaio 3, por ter maior concentração de ácido levulínico, produzisse derivado com maior substituição em CBQ, mas o que se nota é a formação

da CBQ em sentido decrescente ao aumento da fração molar do ácido levulínico. Todavia, observou-se, também, que a formação da 5-MPQ diminuiu com o aumento do ácido levulínico, de acordo com o esperado, já que, quanto maior a quantidade do ácido levulínico, menor a probabilidade de o borodreto de sódio agir por excesso e provocar a ciclização do espaçante.

Uma vez observado esse aspecto, os dados foram, então, representados de outra forma. Calculou-se o GS total do polímero pela somatória do percentual de substituição das formas linear e cíclica (Tabela VI.4) e, desse total, determinou-se, em percentual, quanto da substituição total correspondia à CBQ e 5-MPQ. Os resultados estão representados na Figura VI.5.

TABELA VI.4. Percentual do GS da CBQ e 5-MPQ e percentual relativo de CBQ e 5-MPQ ao GS total (CBQ + 5-MPQ)

Ensaio	X ₁	X ₂	GS (%)		GS total (%) ^a	Percentual na substituição ^b	
			CBQ	5-MPQ		CBQ	5-MPQ
1	- 1	- 1	27,47	9,07	36,54	75,18	24,82
3	+1	- 1	26,55	1,79	28,34	93,68	6,32
3r	+1	- 1	21,86	2,82	24,68	88,57	11,43
5	- 1	+1	1,70	5,94	7,64	22,25	77,75
7	+1	+1	21,31	5,43	26,74	79,69	20,31
8	- 1	0	5,90	8,98	14,88	39,65	60,35
12	+1	0	22,51	5,53	28,04	80,28	19,72
11	0	- 1	26,66	4,78	31,44	84,80	15,20
9	0	+1	14,09	12,17	26,26	53,66	46,34
2	0	0	22,12	4,09	26,21	84,40	15,60
4	0	0	33,43	6,69	40,12	83,33	16,67
6	0	0	22,86	5,28	28,14	81,24	18,76
10	0	0	27,29	7,45	34,74	78,55	21,45

^a grau de substituição total, obtido da somatória das porcentagens de CBQ e 5-MPQ, e, para efeito de cálculo, considerado como 100% de substituição; ^b valores percentuais obtidos com base na consideração efetuada em ^a

FIGURA VI.5. (a) Diagrama genérico do planejamento fatorial 3² com quadruplicata no ponto central com os ensaios indicados nos pontos correspondentes e (b) diagrama de respostas do percentual relativo de CBQ (azul) e 5-MPQ (vermelho) ao GS total (CBQ + 5-MPQ).

Observa-se que, de acordo com os novos valores, o ponto com melhor rendimento em CBQ é o ensaio 3 (91%), como esperado. Além disso, o ensaio 3 é, também, o ponto com menor teor de 5-MPQ (9%). Nota-se, ainda, que, se retas paralelas ao eixo x_1 fossem traçadas de forma a passar pelos pontos 1, 11 e 3, outra por 8, ponto central e 12 e mais uma por 5, 9 e 7, a tendência de aumentar a formação da CBQ e diminuir a da 5-MPQ se mantém com o aumento da fração molar de ácido levulínico. Da mesma forma, se retas paralelas ao eixo x_2 fossem traçadas entre os pontos 1, 8 e 5, outra por 11, ponto central e 9, e uma última por 3, 12 e 7, fica fácil observar que a CBQ diminui e a 5-MPQ aumenta à medida que aumenta a fração molar do boroidreto de sódio. Entretanto, essa relação tem um intervalo muito estreito entre os pontos 3, 12 e 7, nos quais o rendimento da CBQ varia de 91 a 80. Essa observação deixa claro que trabalhar com 3,0 mol de ácido levulínico por mol de quitosana favorece a formação da CBQ, ainda mais se se utiliza 0,5 mol de boroidreto de sódio por mol de quitosana (estequiometria equivalente ao ensaio 3).

Os dados arrolados na Tabela A.1 foram lançados no programa STATISTICS, licenciado para o Prof. Dr. Roy Edward Bruns. As Tabelas V.5 a V.8 fazem a análise da

variância dos modelos linear e quadrático para o GS da CBQ e 5-MPQ. Fundamentalmente, para verificar a validade do modelo, deve ser realizado o chamado Teste F para a *regressão* e *falta de ajuste*. O modelo é considerado estatisticamente significativo quando $F_{\text{calculado}}$ para a *regressão* é maior que o F_{tabelado} para os graus de liberdade (ν) em questão. E, de forma oposta, se o $F_{\text{calculado}}$ para *falta de ajuste* é menor que o F_{tabelado} , significa que o modelo não apresenta falta de ajuste (Barros Neto, Scarminio, Bruns, 2002).

O Gráfico V.8 mostra a superfície de resposta obtida do modelo linear para o GS da CBQ. Neste modelo, a fração molar do ácido levulínico (x_1) não foi, por muito pouco, significativa no nível de 95% de confiança ($x_1 = 4,43 \pm 1,84$). Se o modelo for reconstruído no nível de 90% de confiança, x_1 passa a ser significativo. Sendo assim, o modelo quadrático para o GS da CBQ (Gráfico V.9) foi testado e todos os fatores foram significativos no nível de 95% de confiança. De acordo com a representação quadrática, o rendimento de CBQ cresce com o aumento do ácido levulínico e diminuição de boroidreto de sódio, sendo a região média do eixo x_1 apontada como a zona de máximo rendimento da CBQ.

Em relação ao GS da 5-MPQ, a superfície de resposta do modelo linear (Gráfico V.10) mostra que a formação do derivado cíclico é maximizada quanto maior for a quantidade de boroidreto de sódio e menor for a fração molar de ácido levulínico. Esse resultado é extremamente favorável, pois os rendimentos da CBQ e 5-MPQ são maiores em regiões opostas do gráfico, de acordo com o desejado. Na Figura VI.5b, o contraste dos rendimentos da CBQ e 5-MPQ entre os pontos 5 e 3 deixam claro a validade dos modelos. No modelo linear para o GS da 5-MPQ, todos os fatores foram significativos no nível de 95% de confiança. Também foi construído o modelo quadrático para o GS da 5-MPQ (Gráfico V.11). Entretanto, como a fração molar de boroidreto de sódio (x_2) não foi significativa no nível de 65% de confiança ($x_2 = 1,24 \pm 0,52$), embora o seja no nível de 90% de confiança, o modelo linear foi preferido para descrever o comportamento desse sistema.

Se os Gráficos V.9 e V.10, que foram eleitos os melhores modelos para explicar, respectivamente, os GS da CBQ e 5-MPQ, fossem sobrepostos, observar-se-ia que, na região média do eixo x_1 , em que o rendimento da CBQ foi máximo (30%) (Gráfico V.9), o percentual de ocorrência da forma cíclica não é das mais baixas (6 a 5%) (Gráfico V.10). A substituição da 5-MPQ na quitosana é mínima (4 a 3%) no ponto de maior concentração em ácido levulínico. Todavia, embora o modelo quadrático acuse melhor rendimento da CBQ na região média do eixo x_1 , a região de maior concentração de ácido levulínico ainda apresenta bom rendimento para a CBQ (em torno de 24%) e mínimo para o derivado cíclico.

Assim, destacam-se como melhores condições de reação os pontos representados pelos ensaios **3** e **11** (Figura VI.5), confirmados pela tendência representada nos modelos estatísticos (Santos *et al.*, 2005).

6.4.3. Imina da carboxibutilquitosana

A síntese da imina da CBQ seguiu a técnica otimizada para a CBQ, porém sem a etapa de redução.

Não houve dificuldades na síntese, que gerou produto de cor bege e aspecto de algodão. Porém, seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C (Espectros V.14 e V.15) não apresentam diferenças quando comparados aos espectros da CBQ (Espectros V.12 e V.13). O DEPT desse derivado foi realizado (dado não mostrado) na tentativa de identificar o C_{12} , porém este não apareceu em nenhum dos espectros obtidos, tanto da CBQ quanto da sua imina.

A titulação do produto mostrou que há 2,46 mmol de carboxilas livres do grupo espaçante para cada grama do polímero (Tabela V.9).

6.4.4. Carboximetilquitosana

Inicialmente, empregou-se a metodologia descrita por Muzzarelli (1982) para a síntese da CMQ. O método, descrito no item 4.2.4.4, consiste na reação de quantidades equimolares de quitosana, ácido glicoxílico e boroidreto de sódio, dividida em duas etapas: formação da imina no grupo amínico da quitosana pela adição do ácido glicoxílico, seguida de redução pela adição de boroidreto de sódio. Entretanto, a adição do agente redutor é precedida pela alcalinização do meio a pH 12 pela adição, gota a gota, de solução de hidróxido de sódio a 2 N. Entretanto, na etapa de alcalinização, houve precipitação do polímero no meio reacional, o que deve ter prejudicado a obtenção do produto (Tabela VI.5). Sendo assim, procedeu-se novo experimento, sob as mesmas condições, exceto pela ausência da etapa de alcalinização. Entretanto, ainda assim, houve a precipitação do polímero quando da adição do boroidreto de sódio.

TABELA VI.5. Condições para a síntese da CMQ

Fração molar			Amostra de quitosana	Etapa de alcalinização	Observações
quitosana	ácido glicoxílico	NaBH ₄			
1,0	1,0	1,0	PADETEC	pH = 12	Precipitação do polímero na alcalinização
1,0	1,0	1,0	PADETEC	Não realizada	Precipitação do polímero na adição do NaBH ₄
1,0	1,0	1,0	Aldrich	Não realizada	Precipitação do polímero na adição do NaBH ₄
1,0*	0,7	1,0	PADETEC	pH ~ 4 - 5	Não houve precipitação

* previamente solubilizada em solução aquosa de ácido acético.

Estudo realizado por Muzzarelli, Ilari e Petrarulo (1994) prevê que a *N*-carboximetilação de amostras de quitosana obtidas de camarão e caranguejo rende, quase sempre, CMQ insolúvel, sendo que a maioria dos polissacarídeos modificados precipita durante a etapa de hidrogenação.

Considerando que as características físico-químicas das amostras de quitosana, tais como massa molecular e grau de desacetilação, afetam, fortemente, o desempenho

das modificações químicas da quitosana, em especial, a *N*-carboximetilação (Muzzarelli, Ilari, Petrarulo, 1994), realizou-se novo experimento empregando a quitosana de média massa molecular fornecida pela Aldrich. Ainda assim, houve a precipitação do polímero na etapa de redução.

À vista desses resultados, nova estequiometria de reação devia ser explorada, de forma que a quantidade de ácido glicoxílico não fosse muito elevada, pois, quando em excesso, o ácido glicoxílico favorece a formação da forma insolúvel da CMQ (Muzzarelli, Ilari, Petrarulo, 1994). A novidade na nova metodologia foi partir da quitosana previamente solubilizada em solução aquosa de ácido acético e, após a adição do ácido glicoxílico, o pH da solução foi ajustado entre 4 e 5, pois, segundo Muzzarelli (1982), essa é a faixa de pH que favorece a formação da imina. Neste caso, a adição do boroidreto de sódio não provocou precipitação do polímero no meio reacional, embora durante a etapa de diálise, parte do produto tenha precipitado no interior da membrana de diálise. Fica comprovada, então, a despeito do que foi observado para a CBQ, a grande dificuldade de síntese da CMQ com graus satisfatórios de hidrossolubilidade e substituição.

A CMQ, que se apresenta sob a forma de algodão esbranquiçado após liofilização, mostrou-se levemente solúvel em meio aquoso, porém solúvel quando em meio ligeiramente ácido. Essa propriedade impossibilitou a determinação quantitativa das carboxilas substituídas no polímero, uma vez que a acidificação do meio para a solubilização da amostra acarreta maior consumo de base para a neutralização dos grupos ácidos, falseando o resultado. O problema da solubilidade também limitou a tentativa de preparação de filme, que enfrentou o mesmo problema descrito para a CBQ. Foi possível visualizar a formação do filme, entretanto, não foi possível recuperá-lo após as etapas de neutralização e lavagem com água, pois acabava por se fragmentar. Mesmo assim, pequenos fragmentos foram recuperados, o que possibilitou a análise em IV (Espectro V.16). Quando comparado com o espectro de IV da quitosana (Espectro V.7), observa-se, no espectro da CMQ, o alargamento e junção dos sinais referentes ao estiramento C=O de amida, em torno de 1650 cm^{-1} , e a

deformação da ligação N-H de amina, por volta de 1580 cm^{-1} , talvez pelo surgimento e sobreposição do sinal referente ao estiramento da ligação C=O de ácido carboxílico, que, na forma de carboxilato, ocorre em torno de 1550 cm^{-1} (Silverstein, Webster, 2000).

No espectro de RMN ^1H (Espectro V.17), o sinal que aparece a 3,06 ppm é atribuído aos hidrogênios do C₁₀, entretanto a síntese da CMQ só foi comprovada no espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.18), no qual o C₉ da carboxila é evidenciado a 169 ppm e o C₁₀, a 48 ppm.

Não foi possível determinar a quantidade de carboxilas livres, que correspondem aos grupos carboximetil introduzidos no polímero, pois, ao contrário do observado para CBQ e sua respectiva imina, o produto não foi solúvel em meio aquoso livre de ácido (Tabela V.9). Como a determinação é feita por titulação ácido-base, a acidificação do meio, para promover a solubilização do polímero, interferiria no resultado.

6.4.5. Quitosana N-metilfosfônica

A síntese da MFQ compreende a reação, em uma única etapa, do polímero com ácido fosforoso e formaldeído, sem qualquer prejuízo às características da quitosana, como a propriedade filmogênica (Heras *et al.*, 2001). Ramos e colaboradores (2003a) observaram que o grau de substituição não é dependente da origem da quitosana, nem das propriedades físico-químicas do polímero, como massa molecular e grau de desacetilação, mas, sim, dependente do tempo de reação, em que períodos superiores a 7 h favorecem a síntese do derivado dissustituído.

A síntese da MFQ foi comprovada nos Espectros V.19 e V.20. Observam-se dois singletos, a 8,35 e 6,25 ppm, referentes aos hidrogênios das hidroxilas do grupo fosfônico. Em campo mais alto, puderam ser evidenciados dois sinais, também de baixa intensidade, a 3,80 e 3,20 ppm, que correspondem, respectivamente, aos hidrogênios do grupo metilênico mono (H₉) e dissustituídos (H_{9'}) na quitosana (Heras *et al.*, 2001).

(Espectro V.19). No entanto, pelo espectro de ^{13}C (Espectro V.20), verifica-se apenas a presença de sinal correspondente à diss substituição, a 41 ppm, atribuído ao C_9 . A fraca intensidade dos sinais correspondentes aos grupos metilfosfônicos indica o baixo grau de substituição, porém este foi suficiente para tornar o polímero obtido mais solúvel em água que a CMQ, por exemplo.

O Gráfico V.12 mostra a sobreposição das curvas de DSC e TG/DTG obtidas para a MFQ. Nas curvas TG/DTG, a primeira perda de massa, que ocorre entre 24 e 128 °C ($\Delta m = 9,67\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 66$ °C), corresponde à eliminação da umidade da amostra. Comparando-se a perda de umidade da MFQ com a quitosana (Gráfico V.6), comprova-se o aumento da higroscopicidade do novo derivado, já que a umidade desprendida foi quase 4% maior na MFQ que na quitosana. No intervalo de 187 a 375 °C, ocorre a segunda perda de massa ($\Delta m = 40,3\%$, $T_{\text{picoDTG}} = 260$ °C), atribuída à decomposição do polímero. A curva de DSC revela um primeiro evento endotérmico, entre 24 e 130 °C ($\Delta H = 347 \text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 63$ °C), relacionado à perda de umidade da amostra. A decomposição da MFQ, na curva de DSC, é marcada por dois eventos exotérmicos: o primeiro, entre 210 e 275 °C, e o segundo, entre 275 e 375 °C ($\Delta H = 234,5 \text{ J.g}^{-1}$, $T_{\text{picoDSC}} = 256$ e 308 °C), que, se somados, coincidem com a degradação do polímero identificada nas curvas TG/DTG.

6.4.6. Membranas de quitosana copolimerizadas com enxerto de ácido acrílico e metacrilato de hidroxietila

Devido à grande dificuldade encontrada na síntese do pró-fármaco de NFOH com o transportador CBQ, principalmente com relação à solubilidade dos produtos até então sintetizados, a nova perspectiva de trabalho se concentrou na idéia de tentar latenciar o fármaco no filme já constituído, evitando, assim, a necessidade de solubilização do pró-fármaco obtido para a posterior preparação da membrana. Entretanto, a CBQ e, em menor proporção, a CMQ, por serem hidrossolúveis graças à introdução de grupos carboxílicos, não favorecem a execução dessa nova metodologia, pois os filmes formados pela secagem em estufa são, posteriormente, ressolubilizados nas etapas de neutralização e lavagem com água. Por outro lado, a presença dos

grupos carboxílicos na matriz polimérica é fundamental para a formação do éster pela ligação com a hidroxila do NFOH. Sendo assim, esse planejamento visa à obtenção de nova membrana que apresente grande quantidade de grupos carboxílicos livres para a latenciação do fármaco, mas que, ao mesmo tempo, não colabore para a hidrossolubilidade do filme.

Com base nesses parâmetros, o AA foi escolhido por ser um polímero vinílico sintético, que possui um grupo ácido para cada unidade monomérica. Entretanto, a fim de contrabalançar o efeito hidrofílico do AA, a idéia foi incorporá-lo à quitosana com outro monômero vinílico sintético com caráter mais hidrofóbico, como o HEMA. Para tanto, foi empregada a metodologia de copolimerização de enxerto, em que as cadeias poliméricas principais, representadas pela quitosana, são ativadas pelo iniciador químico da reação, nitrato de cério e amônio, que gera radicais livres provavelmente nos grupos aminos da posição C₂ e hidroxilas das posições C₃ e C₆ (Lloyd *et al.*, 1998; Berger *et al.*, 2004). Esses radicais livres da cadeia de quitosana vão, por sua vez, atacar a porção vinílica dos monômeros, o que provoca a ligação de AA e HEMA à quitosana pela cisão da dupla ligação. A incorporação de AA e HEMA ao polímero principal ocorre de forma aleatória e em cadeia, enquanto houver monômeros dispersos no sistema (Figura VI.6).

Para melhor compreensão do efeito de cada monômero no comportamento do polímero final, a experimentação foi realizada de forma a sintetizar várias membranas com diferentes proporções dos monômeros a serem enxertados na quitosana, conforme descrito na Tabela VI.6.

FIGURA VI.6. Representação da formação de radicais livres do nitrato de cério e amônio na amina e nas carboxilas C₃ e C₆ da quitosana.

TABELA VI.6. Planejamento inicial de síntese dos copolímeros de enxerto

MEMBRANA	QUITOSANA (g)	AA (mL)	HEMA (mL)	$(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (g)
1	0,3	—	—	—
2	0,3	—	0,8	0,1
3	0,3	0,8	—	0,1
4	0,3	0,2	0,8	0,1
5	0,3	0,8	0,2	0,1
6	0,3	0,5	0,5	0,1

Para cada série de experimentação dos filmes, a quitosana era previamente solubilizada, a 1%, em solução aquosa de ácido acético a 1% e filtrada à pressão reduzida para a remoção da fração do polímero insolúvel em meio ácido. Para a preparação dos filmes, 30 mL da solução-mãe de quitosana eram acrescidos do iniciador químico, seguido pelos monômeros de HEMA e AA em diferentes proporções, conforme a Tabela VI.6. A membrana **1** representa o padrão do filme de quitosana para cada série experimental. As amostras **2** e **3** foram acrescidas com os monômeros HEMA e AA, respectivamente. Já as membranas **4**, **5** e **6** receberam os dois monômeros nas razões volumétricas de AA:HEMA, respectivamente, 1:4, 4:1 e 1:1.

Numa primeira tentativa, a reação foi realizada *in situ* pela prévia homogeneização de todos os reagentes em placas de Petri, que foram submetidas à estufa por 24 h a 50 °C. Com as etapas de neutralização e lavagem, foi observado que as membranas com maior teor em AA tendiam a absorver grande volume de água e a se rasgar com facilidade, enquanto que as amostras com maior proporção de HEMA enrolavam das bordas para o centro do filme. A análise dos espectros de IV (dado não mostrado) revelou que havia muito material de partida sem reagir, principalmente HEMA, nas amostras **2** e **4**. Esse resultado indicou que, provavelmente, as membranas precisavam de maior tempo de reação para incorporação de percentual maior dos monômeros. Outra questão é que, talvez, na etapa de neutralização com hidróxido de sódio, a provável formação de sal sódico das carboxilas do AA possa ter corroborado para o aumento da hidrofília e conseqüente fragilidade da membrana em meio aquoso.

Assim sendo, na segunda tentativa, a reação foi realizada em banho termostatizado a 50 °C por cerca de 4 h, sob agitação constante e, em seguida, as amostras foram transferidas diretamente para placas de Petri e submetidas à secagem em estufa igualmente a 50 °C por mais 24 h. A etapa de neutralização não foi realizada, mas, na lavagem, os filmes fragmentaram-se espontaneamente com grande intensidade. As análises de IV (dado não mostrado) indicam a substituição da quitosana, porém a falta de resistência dos filmes é, provavelmente, conseqüência da degradação da quitosana pelo prolongado tempo de reação: 4 h de agitação associado

a 24 h para secagem, ambos a 50 °C. Entretanto, como não se efetuou a neutralização dessas membranas, parece que não há interferência dessa etapa com a fragilidade dos filmes.

A terceira série experimental foi a reação em banho termostatizado a 50 °C por cerca de 3 h, sob agitação constante, porém com conseqüente precipitação do polímero pela adição de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5% (4.2.4.6.1). Com a precipitação, o iniciador químico, nitrato de cério e amônio, por ser um sal, solubiliza-se no meio aquoso e é removido, interrompendo a reação. Com isso, espera-se que a reação tenha ocorrido nesse tempo e que, sem o iniciador, o polímero pode ser ressolubilizado em meio ácido e submetido à secagem em estufa sem risco de degradação. Mais uma vez, a neutralização não foi efetuada e, com a lavagem, as membranas mostraram-se um pouco mais íntegras, mas ainda com certo grau de fragilidade, principalmente a amostra **M6**. Análises de IV (Espectro V.21) dos filmes comprovam a substituição por HEMA pelo aparecimento das bandas por volta de 1720 e 1150 cm^{-1} , que são atribuídas, respectivamente, ao estiramento das ligações C=O e C-O do éster. A substituição por AA é visualizada pelo surgimento de banda a 1555 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento assimétrico da ligação C=O do ânion carboxilato e que é reconfirmado pela banda a 1405 cm^{-1} , atribuída ao estiramento simétrico da ligação C=O do ânion carboxilato (Hu *et al.*, 2002; Mahdavina *et al.*, 2004). Esses sinais, que são bastante claros nas amostras **M3**, **M5** e **M6**, comprovam a substituição da quitosana pelo AA.

Como a terceira série experimental mostrou resultados promissores, tentou-se a reprodução do método. Entretanto, constatou-se a dificuldade de reprodutibilidade do método, o que é bastante comum em se tratando de síntese de derivados de polímeros, especialmente por copolimerização de enxerto (Harish Prashanth, Tharanathan, 2003). Por outro lado, confirmou-se que o AA tem maior tendência a ser enxertado na matriz de quitosana que o HEMA, pois, como mencionado anteriormente, quando os monômeros são incorporados na relação volumétrica de 1:1 (**M6**), o sinal do éster do HEMA por volta de 1700 cm^{-1} é bastante discreto, enquanto que os sinais referentes ao

ácido carboxílico do AA são bem evidentes (Espectro V.21). Entretanto, duas observações podem explicar essa tendência. Primeiro, as duas bandas por volta de 1550 e 1400 cm^{-1} , que comprovam a ocorrência de grupo carboxílico ionizado, são evidenciadas em todos os espectros dessa série, inclusive na membrana padrão de quitosana, que não foi acrescida de AA. A explicação é que o ácido acético, necessário à solubilização da quitosana para a confecção dos filmes e presente em todas as amostras, poderia estar sendo detectado no IV. Sendo assim, esse mesmo filme de quitosana foi submetido à neutralização por 18 h e lavagem exaustiva com água destilada. Submetido ao IV (Espectro A.5), não se visualizam as bandas da carbonila em questão com a mesma intensidade. Dessa forma, o grupo carboxílico do ácido acético também é visualizado na mesma região que AA, intensificando o sinal e dificultando a leitura do grau de substituição do enxerto de AA. Por isso, a fim de garantir a análise correta da substituição da quitosana por AA no IV, a etapa de neutralização não pode ser descartada. Como consequência, essa possível superposição de bandas pode levar à incorreta interpretação de ter havido maior substituição da quitosana por AA, além de promover cálculo do GD maior que o real. Em segundo lugar, como os monômeros eram acrescidos à reação por uma relação volumétrica (Tabela VI.6) e a massa molecular do HEMA ($130,10 \text{ g.mol}^{-1}$) é superior à do AA ($72,06 \text{ g.mol}^{-1}$), o cálculo estequiométrico dessas condições revelou que este ácido era adicionado quase que em dobro. Daí surgiu a necessidade de realizar os próximos experimentos com adição dos monômeros estimados em mmol, conforme descrito na Tabela VI.7.

TABELA VI.7. Planejamento estequiométrico para a síntese dos copolímeros de enxerto

MEMBRANA	QUITOSANA		AA		HEMA		$(\text{NH}_4)_2\text{Ce}(\text{NO}_3)_6$ (g)
	mmol	g	mmol	mL	mmol	mL	
1	1,86	0,3	—	—	—	—	—
2	1,86	0,3	0	0	12	2,92	0,1
3	1,86	0,3	12	1,64	0	0	0,1
4	1,86	0,3	3	0,42	9	2,18	0,1
5	1,86	0,3	9	1,24	3	0,74	0,1
6	1,86	0,3	6	0,82	6	1,46	0,1

Ainda com o intuito de melhorar a resistência mecânica dos filmes, a quarta tentativa foi realizada da mesma forma que a terceira, porém a reação foi interrompida pela precipitação após 1 h ao invés de 3 h. Os polímeros precipitados foram, da mesma forma, ressolubilizados em meio aquoso levemente ácido e as soluções obtidas foram transferidas para placas de Petri para secagem em estufa por 24 h, aproximadamente. Os filmes foram neutralizados com solução de hidróxido de sódio a 5% por cerca de 1 h e lavados exaustivamente com água destilada. Essas membranas obtidas mostraram-se altamente resistentes à manipulação e não intumesceram vertiginosamente em contato com água. Entretanto, as análises de IV (dado não mostrado) revelaram que não houve sinais de substituição, nem de AA, nem de HEMA, em qualquer das amostras, mesmo com o emprego da nova estequiometria. Assim sendo, fica evidente que 1 h é tempo insuficiente para que a reação ocorra.

Uma vez comprovado que 1 h de reação é ineficaz e 4 h pode ser muito, parece que 3 h de reação resulta em membranas com grau de substituição satisfatório, porém com baixa resistência mecânica. A fim de resolver esse problema, duas medidas foram tomadas no planejamento da quinta série de experimentos: primeiro, a quantidade do iniciador químico foi reduzida à metade, ou seja, 0,05 mg, pois o excedente de nitrato de cério e amônio, se houvesse, poderia estar causando degradação da quitosana e colaborando para a fragilidade dos filmes; e segundo, as membranas seriam confeccionadas com o dobro da espessura com que eram feitas até então. Com esse objetivo, para a mesma área da placa de Petri, o dobro da solução polimérica foi submetido à secagem. A metodologia seguiu o protocolo estabelecido na terceira tentativa, porém as membranas foram neutralizadas com solução de hidróxido de sódio a 5%. Os espectros de IV obtidos (dado não mostrado) indicam pouca substituição por ambos os monômeros. Tal fato sugeriu que, talvez, para a metade do iniciador químico, três h de reação fosse tempo demasiado curto.

Sendo assim, a sexta tentativa foi realizada com o emprego de metade do nitrato de cério e amônio, ou seja, 0,05 mg, os cálculos foram realizados para formar filmes com o dobro da espessura, porém, a reação foi realizada *in situ*, submetendo as

amostras à estufa a 50 °C por cerca de 24 h. Uma vez formados, os filmes foram neutralizados por, aproximadamente, 16 h e lavados exaustivamente com água destilada. As membranas obtidas mostraram-se as mais resistentes à manipulação, se comparadas com as amostras de todas as séries realizadas até então.

Espectros de IV bem resolvidos foram obtidos (Espectro V.22) e a análise revelou que houve boa substituição em todas as amostras por ambos os monômeros. A substituição por HEMA é comprovada pelo aparecimento das bandas por volta de 1720 e 1150 cm^{-1} , que são atribuídas, respectivamente, ao estiramento das ligações C=O e C-O do éster. A substituição por AA é visualizada pelo surgimento de banda a 1555 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento assimétrico da ligação C=O do ânion carboxilato e que é reconfirmado pela banda a 1405 cm^{-1} , atribuída ao estiramento simétrico da ligação C=O do ânion carboxilato (Hu *et al.*, 2002; Mahdavi *et al.*, 2004).

DMTA é uma técnica potente para determinar a miscibilidade de diferentes compostos, principalmente em se tratando de copolímeros de enxerto. É normal assumir que a detecção de um único pico em $\tan \delta$ é suficiente para indicar a miscibilidade quando os compostos não têm valores de Tg muito próximos (Canevarolo, 2004). Considerando os resultados apresentados sobre a influência da umidade nas propriedades térmicas da quitosana, todas as amostras das membranas foram secadas em estufa antes da realização das análises, nas mesmas condições, a fim de evitar possíveis erros de leitura induzidos pela presença de água.

O Gráfico V.13 representa a sobreposição das curvas térmicas de todos os filmes sintetizados na sexta série experimental. A membrana **M2** apresenta pico simples e estreito na região da transição α , que indica a perfeita miscibilidade entre PHEMA e quitosana e o sucesso da reação de enxerto. Além disso, o pico que corresponde à degradação da quitosana (**M1**) foi deslocado para temperaturas mais elevadas, indicando o aumento da termoestabilidade desse novo material frente à quitosana. Outra característica importante da **M2** é a baixa intensidade dos picos relacionados aos movimentos de indução da água (0 e 72 °C), o que sugere que esse derivado

polimérico tem menor capacidade de retenção de água que a quitosana não modificada.

Análise comparativa da curva obtida para a membrana **M3** com a curva da quitosana revela que o copolímero expressou maior valor de T_g . Isso pode estar relacionado, mais provavelmente, pela interação entre os grupos amínicos da quitosana com os grupos carboxílicos do PAA, que resulta na formação de um material mais rígido. O início da temperatura de degradação também foi deslocado para temperatura mais elevada, o que indica o melhoramento das propriedades térmicas da **M3**, embora o pico da degradação coincida com o observado para a quitosana. Além disso, observa-se um segundo pico de degradação acima dos 300 °C. As curvas TG/DTG obtidas para a **M3** (Gráfico V.14) também detecta a degradação da membrana em duas etapas: a primeira, que vai de 240 a 375 °C ($\Delta m = 29,8\%$, $T_{picoDTG} = 287$ °C), está relacionada com a degradação da cadeia da quitosana e a segunda, entre 395 a 500 °C ($\Delta m = 11,7\%$, $T_{picoDTG} = 465$ °C), pode ser decorrência da descarboxilação das cadeias de PAA enxertadas. Ainda nas curvas TG/DTG, a primeira perda de massa ($\Delta m = 8,90\%$), que ocorre entre 21 e 228 °C, corresponde à eliminação da umidade da amostra, que é 3% maior que a observada na quitosana (Gráfico V.6). Já curva de DSC da **M3** (Gráfico V.14) revela a ocorrência de um primeiro evento endotérmico, entre 21 e 228 °C ($\Delta H = 514,6$ J.g⁻¹, $T_{picoDSC} = 62$ °C), relacionado à referida perda de umidade da amostra, seguido de dois eventos exotérmicos entre 235 a 373 °C ($\Delta H = 258,1$ J.g⁻¹, $T_{picoDSC} = 278$ °C) e 410 a 500 °C ($\Delta H = 45,8$ J.g⁻¹, $T_{picoDSC} = 435$ °C), em consequência da decomposição da membrana.

O comportamento da curva da membrana **M4** (Gráfico V.13) mostra nítida separação de fase, indicando que, quando grandes quantidades de HEMA estão em presença de AA, o material é incapaz de manter propriedades de homogeneidade, mesmo que este último esteja em quantidades reduzidas. Na membrana **M5**, a curva de degradação revela a presença de dois picos distintos. Estes sugerem a existência de cadeias de quitosana livres de enxerto, que começam a degradar em temperaturas mais baixas que as cadeias enxertadas. Na curva de **M6**, a relaxação α do copolímero

de enxerto da quitosana com HEMA e AA é deslocada para temperaturas superiores, em comparação aos valores para PAA e PHEMA, e para temperaturas inferiores, comparativamente ao valor para a quitosana. Essa observação indica que realmente há alguma interação entre todos os componentes poliméricos. Entretanto, também foi detectado um pequeno sinal exatamente a 100 °C, que é atribuído à presença de certa umidade.

A membrana **M3**, composta exclusivamente por AA, pôde ser solubilizada em meio aquoso levemente ácido e foi caracterizada, ainda, por RMN ^1H (Espectro V.23) e ^{13}C (Espectro V.24). Verifica-se, comparando o espectro de RMN ^1H padrão da quitosana (Espectro V.8) com o obtido para **M3**, que há fortes indícios de ter ocorrido substituição devido ao aparecimento de grande número de novos sinais, maiores ainda que se se considerasse a mistura física entre os dois polímeros, cujo PAA somaria apenas dois novos sinais correspondentes aos hidrogênios H_{10} e H_{11} . Por esse motivo, realizou-se análise por HETCOR (Espectro V.25) a fim de facilitar a atribuição dos sinais. Infelizmente, não houve correlação entre todos os sinais e o espectro não pôde ser melhorado, uma vez que essa análise, por ser executada a 70 °C e não ser cumulativa, como a varredura do ^{13}C , não poderia se manter sem controle durante a noite. O único hidrogênio que pôde ser atribuído com segurança foi o H_{11} , que ocorre a 3,28 ppm e corresponde ao CH_2 da cadeia de PAA enxertada. Por outro lado, o Espectro de RMN ^{13}C (Espectro V.24), somado às informações do DEPT (Espectro V.26), tornou possível a confirmação de que o enxerto ocorre nas três posições passíveis de formação de radicais livres pelo íon cério, que são as duas hidroxilas das posições 3 e 6 do anel glicosamínico e acetilglicosamínico, além do grupamento amínico do anel glicosamínico (Figura VI.6). Observa-se, no DEPT, a presença de quatro grupos CH_2 , sendo que a quitosana possui apenas um CH_2 , o do C_6 , que ocorre em 61,28 ppm. O PAA também forneceria apenas mais um grupo CH_2 , o C_{11} , a 30,74 ppm. Entretanto, mais dois CH_2 foram identificados no DEPT e foram atribuídos aos CH_2 correspondentes aos primeiros monômeros introduzidos nas hidroxilas das posições 3 e 6 e na amina da posição 2, denominados, respectivamente, de C_{11} .

(61,76 ppm) e C₁₁ (44,10 ppm). Foi visualizado, ainda, o grupo CH da cadeia de PAA enxertada a 42,42 ppm.

As Figuras V.4 e V.5 mostram as características físicas das membranas antes e depois da etapa de neutralização, respectivamente, onde as propriedades de intumescimento, especialmente das membranas com grande conteúdo em AA, são visualmente comprovadas. O Gráfico V.15 mostra os resultados obtidos para a capacidade de intumescimento dos diferentes filmes. A membrana **M3**, mais rica em AA, apresentou o maior grau de intumescimento ($Q = 2860\%$) da série, sendo cerca de 13 vezes mais absorvente que a quitosana ($Q = 223\%$). Em contrapartida, a amostra **M2**, com maior conteúdo em HEMA, foi a amostra com menor capacidade de absorção de água ($Q = 220\%$), quase que equiparando-se à quitosana. As outras amostras comprovam a tendência de que, quanto maior o conteúdo em AA e menor em HEMA, maior a capacidade de absorção de água pela membrana. Os desvios medidos em cada triplicata, que chegou a 763 para **M3**, revelam a heterogeneidade e aleatoriedade da inserção do enxerto ao longo da cadeia da quitosana, o que explica o fato das medidas serem tão díspares dependendo da porção da membrana que se toma para realizar as análises. Essa heterogeneidade das amostras foi observada, também, na tentativa de analisar o comportamento hidrofílico da superfície das diferentes membranas por medida do ângulo de contato pelo método da gota de água pendente (dado não mostrado). À medida que se percorria o filme, os resultados do ângulo de contato diferiam drasticamente de um ponto da membrana a outro, tornando muito difícil o cálculo da média, com desvio padrão pequeno, que melhor representasse a amostra.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado conforme descrito no item 4.2.7 e baseia-se no procedimento originalmente desenvolvido por Borefreund e Puerner (1984) para a triagem de agentes citotóxicos em monocamada de células. O método consiste na avaliação quantitativa de células viáveis, após a exposição ao agente tóxico, pela incubação com o corante supravital, MTS, e um agente acoplador de elétrons, PMS. Sendo assim, a viabilidade celular é medida como a persistência da capacidade das células em biorreduzir MTS à formazana. De acordo com o Gráfico V.16, quanto maior

a permanência da viabilidade celular, menor é a toxicidade do material frente às células. Desse modo, comprova-se que, realmente, a quitosana se constitui em excelente biomaterial, pois teve comportamento equiparado ao PEAD, material com comprovada segurança e que, por essa razão, foi ensaiado neste estudo como o controle negativo. A viabilidade celular mantida pela quitosana foi de 72%, enquanto que a do PEAD foi de 74%. Dentre as membranas enxertadas, a que apresentou melhor comportamento foi a membrana **M2**, com 65% de viabilidade celular, composta por quitosana e HEMA. A amostra **M3**, que é composta pelo maior conteúdo em AA e, exatamente por essa razão, seria a melhor membrana para permitir a latenciação do NFOH aos grupos carboxílicos livres, foi a amostra com pior desempenho na viabilidade celular (38%), a exceção do controle positivo (1%), representado por fenol a 0,3%. Entretanto, à medida em que se mistura HEMA à membrana de AA, a citotoxicidade tende a diminuir, e quando a relação entre HEMA e AA é de 1:1 (**M6**) a viabilidade celular se mantém em 61%, um pouco abaixo da observada para a membrana **M2** e com metade do conteúdo de AA presente na **M3**. Esse comportamento citotóxico das membranas, principalmente quando compostas por AA, provavelmente sejam consequência da deficiência da etapa de lavagem na remoção dos monômeros que não foram enxertados e tem elevada toxicidade em contato com os tecidos orgânicos. Essa hipótese é plausível, pois, no Espectro V.23, pode-se observar os sinais do monômero de AA na região entre 6 e 7 ppm, ainda que em pequena intensidade. Soma-se a esse o fato de que as membranas que continham HEMA puderam ser lavadas mais cuidadosamente por não terem propriedades de intumescimento tão pronunciadas quanto as que continham AA, que acabam por comprometer a integridade física da matriz polimérica.

Os ensaios de citotoxicidade foram repetidos com novas amostras, desta vez, lavadas em aparelho de Soxhlet, por 24 h. Isto porque as membranas não podem ser lavadas manualmente à exaustão, uma vez que o intumescimento as torna mais suscetíveis à fragmentação. Os resultados obtidos estão apresentados no Gráfico V.17. Pode-se observar nítida melhora no comportamento das membranas que foram lavadas, uma vez que a maioria das curvas agrupou-se acima de 70% de viabilidade celular, mesmo quando a concentração dos extratos era de 100%, ao contrário do

ensaio anterior, sem lavagem (Gráfico V.16). Esses dados comprovam que a lavagem é etapa fundamental para a remoção dos monômeros que não reagem e que, provavelmente, estes constituem-se na principal causa da toxicidade revelada pelo ensaio. A exceção é a membrana **M4**, que, com o extrato concentrado, permitiu a viabilidade celular de apenas 40% das células. Se a principal causa da citotoxicidade é a fração dos monômeros que não reagem, pode-se inferir que o percentual de enxerto nessa amostra não foi satisfatório. Isso pode ser comprovado pelo DMTA (Gráfico V.13), em que a curva obtida para **M4** mostra a imiscibilidade entre os componentes poliméricos.

O Gráfico V.18 representa os resultados obtidos para o potencial hemolítico das membranas e das respectivas soluções de extração (PBS) empregadas na lavagem do material. De acordo com ASFM F756-00 (2000), os materiais podem ser classificados em três categorias diferentes, conforme arrolado na Tabela VI.8.

TABELA VI.8. Classificação do potencial hemolítico dos materiais, de acordo com o percentual de hemólise (ASFM F756-00, 2000)

Percentual de hemólise em relação ao controle negativo	Categoria hemolítica
0 – 2	não-hemolítico
2 – 5	levemente hemolítico
> 5	hemolítico

Enquanto as membranas **M2**, **M4** e **M6** podem ser consideradas como *não-hemolíticas*, **M3** e **M5** apresentam caráter *hemolítico*. Verifica-se, então, que a propriedade hemolítica está relacionada a elevados conteúdos em AA. Curiosamente, **M1**, que corresponde à membrana de quitosana sem enxerto, revelou-se *levemente hemolítica*, resultado que pode ser consequência do ácido acético residual, empregado na confecção do filme.

Considerando as soluções de extração, todas as amostras passam a apresentar caráter *hemolítico*, com índices superiores a 50% para **M4**, **M5** e **M6**. Esses resultados confirmam que a toxicidade é causada por produtos que podem ser removidos dos

materiais pela lavagem, como monômeros que não reagem ou solvente empregado para a produção das membranas. Além disso, se a hemólise realmente é causada por monômeros que não reagem, verifica-se, mais uma vez, que a eficiência de enxerto é maior nas membranas pela introdução dos monômeros isolados (**M2** e **M3**) do que quando associados (**M4**, **M5** e **M6**). Isso porque o teor de material tóxico extraído das primeiras foi 5 vezes menor do que o observado para as últimas.

O ensaio de hemólise é considerado teste significativo para a quantificação de pequenas quantidades de hemoglobina plasmática que não podem ser medidas sob condições *in vivo*. Por essa razão, não é possível definir níveis universais de aceitação para hemólise (ISO 10990-4). Apesar da definição de que materiais hemocompatíveis devem ser *não-hemolíticos*, a verdade é que, na prática, muitos instrumentos médicos causam hemólise. Isso significa dizer que, quando o efeito hemolítico ocorre, é importante se assegurar que os benefícios clínicos se sobrepõem aos riscos, representados por valores de hemólise dentro de limites práticos não claramente estabelecidos.

As membranas também foram avaliadas quanto ao potencial trombogênico. O peso dos trombos formados após 45 minutos de ensaio encontra-se representado no Gráfico V.19. Observa-se que a formação de trombo foi menor que no controle e, por essa razão, as membranas são classificadas como não-trombogênicas. Essa característica está diretamente relacionada à hidrofiliabilidade do material. Quando colocado em contato com superfícies hidrofóbicas, as proteínas são adsorvidas de forma forte e irreversível, enquanto que superfícies hidrofílicas interagem com as proteínas de forma fraca e reversível. Uma vez que a adesão das proteínas se constitui em etapa inicial da cascata de coagulação e que todas as membranas, nos estudos de intumescimento, mostraram propriedades de hidrogéis, era previsível que as membranas apresentassem pouca propriedade trombogênica. Essa relação entre hidrofiliabilidade e trombose é confirmada pelo baixo peso do trombo formado quando o sangue foi posto em contato com a amostra **M3**, a mais hidrofílica de todas (Gráfico V.15).

6.5. SÍNTESE DOS PRÓ-FÁRMACOS

6.5.1. Carboxibutilquitosana com hidroximetilnitrofural

Vários são os fatores que dificultam a síntese dos pró-fármacos. Primeiro, o NFOH não pode ser submetido a condições drásticas de reação, pois tem pouca estabilidade química, na medida em que se reverte facilmente ao NF em meio ácido, além de ser fotossensível (Chung, 1996; Güido *et al.*, 2001; Chung *et al.*, 2003). Outro fator complicador é que as reações foram sempre processadas em meio heterogêneo devido às diferentes solubilidades dos reagentes envolvidos.

Sendo assim, com o intuito de obter o pró-fármaco do NFOH utilizando, como transportador, a CBQ, várias metodologias foram experimentadas, como emprego de: (1) carbodiimida; (2) catálise de transferência de fase sólido-sólido com o sal de amônio quaternário Herquat[®]; (3) a partir de cloreto de ácido e (4) catálise enzimática com a protease Proleather[®]. Entretanto, nenhuma apresentou resultados satisfatórios.

Na reação com carbodiimida, a adição de DCC e NFOH, que necessitavam de solubilização prévia em THF, provocou a precipitação do polímero, antes solubilizado em água, transcorrendo a reação em meio heterogêneo. A análise do produto obtido por RMN ¹H (dado não mostrado) revelou que não houve substituição do espaçante com NFOH. Além disso, os dois tripletos correspondentes aos CH₂ do grupo carboxibutil, que ocorrem em 2,7 e 2,3 ppm, aproximadamente, desapareceram, ficando o espectro com características bastante semelhantes ao do derivado cíclico, 5-MPQ. O problema enfrentado com as carbodiimidas foi que o DCC, por ser empregada na síntese de peptídeos para formação da ligação peptídica, acabava por facilitar o ataque intramolecular da carboxila ativada ao grupo amínico secundário, conforme ilustrado na Figura VI.7. Nesta situação, o emprego dos agentes condensantes não é recomendado.

FIGURA VI.7. Ciclização do espaçante carboxibutil provocada pelas carbodiimidas.

Já os produtos obtidos com a metodologia da catálise de transferência de fase, catálise enzimática e a partir de cloreto de ácido e foram analisados no IV e geraram os Espectros V.27, V.28 e V.29, respectivamente. Pode-se observar que, no espectro de IV da CBQ (Espectro V.11), aparece a banda da carbonila de ácido, a 1710 cm^{-1} , que é pequena, mas está de acordo com cerca de 25% de substituição do grupo carboxibutil no polímero todo. Uma das evidências da substituição do grupo carboxílico pelo NFOH é o desaparecimento dessa banda em todos os espectros de tentativa de síntese dos pró-fármacos, o que também pode indicar a substituição total dos grupos carboxílicos. Porém, não há sinal intenso o bastante para caracterizar o NFOH. Uma análise cuidadosa dos sinais do Espectro V.27 revelou a presença de novas bandas muito discretas: uma a 1530 cm^{-1} , de maior intensidade e deslocada para a direita, e corresponde ao estiramento assimétrico de NO_2 de aromático e outra a 1355 cm^{-1} , que corresponde ao estiramento simétrico de NO_2 de aromático. Essa última banda realmente não existe no espectro da CBQ (Espectro V.11). Entretanto, o espectro do NFOH (Espectro V.1) apresenta bandas bastante intensas e finas. Era de se esperar que aparecessem satisfatoriamente no espectro do pró-fármaco. Por outro lado, as bandas mais intensas do espectro do NFOH são exatamente as absorções do grupo nitro. Então, realmente, as demais bandas não seriam mesmo visualizadas, já que são menos intensas que a do grupo nitro. O Espectro A.18 representa a mistura física da

CBQ com NFOH numa quantidade que provavelmente não ultrapassa a proporção passível de ser incorporada ao polímero. Não foram visualizadas bandas que possam ser atribuídas ao NFOH. Além disso, o sinal da carbonila de ácido, a 1708 cm^{-1} , também não desapareceu. Sendo assim, o desaparecimento desse sinal nos Espectros V.27, V.28 e V.29 pode, provavelmente, indicar substituição da carboxila. O Espectro A.19 foi obtido pela mistura física da mesma amostra da CBQ utilizada para a realização do Espectro A.18, porém com o dobro da quantidade de NFOH. Nota-se que, realmente, os sinais a 1523 e 1563 cm^{-1} tendem a se intensificar pelo aumento da concentração de NFOH. Entretanto, as análises de IV mostram-se insuficientes e não permitem chegar a conclusões definitivas. São, no entanto, necessárias como análise preliminar dos produtos obtidos.

Foi realizada, então, tentativa de análise desses produtos por RMN ^1H , porém todos os derivados apresentaram problemas de solubilidade, tanto em meio aquoso quanto em meio orgânico. Assim sendo, os produtos foram encaminhados para análise de RMN ^1H de sólidos. Porém, ainda assim, não foi possível realizar as análises, pois as amostras devem estar sob a forma de pós e esses derivados, assim como a quitosana, assumem aspecto de algodão que se compactam em qualquer tentativa de pulverizá-los. A questão da insolubilidade do produto final em meio aquoso se constitui num problema ainda mais grave na medida em que o pró-fármaco obtido deve ser solubilizado em meio aquoso levemente ácido para a preparação das membranas.

Assim sendo, a pesquisa pelos pró-fármacos devia seguir novas metodologias.

6.5.2. 5-Metilpirrolidinonaquitosana com hidroximetilnitrofural

Uma alternativa para a formação do pró-fármaco foi a tentativa de sintetizá-lo a partir da 5-MPQ, pelo ataque nucleofílico da hidroxila do NFOH na amida cíclica, sem adição de catalisadores. Como parte de anel de cinco membros, instável, o grupo carbonílico estaria mais reativo, não sendo necessário o uso de agente condensante. A

reação foi mantida por 1 semana, porém análise em ultravioleta (dado não mostrado) não comprovou substituição.

6.5.3. Imina da carboxibutilquitosana com hidroximetilnitrofural

Outra alternativa foi experimentar a mesma condição reacional com emprego do agente condensante, porém partindo da imina da CBQ. Com isso, esperava-se que o DCC não fosse capaz de ativar a amina, terciária, deste derivado. Análise em ultravioleta do produto obtido (dado não mostrado) também não indicou a substituição do polímero pelo fármaco.

6.5.4. Membrana de quitosana enxertada por ácido acrílico com hidroximetilnitrofural

Frente a todos os problemas observados na execução do método de síntese do pró-fármaco com posterior formação do filme, a nova proposta foi tentar latenciar o fármaco na matriz polimérica já constituída. Com esse objetivo, foram sintetizadas as membranas enxertadas com os polímeros vinílicos.

A membrana **M3**, que é composta pelo maior conteúdo em AA, foi escolhida para a latenciação do NFOH, justamente por ser, dentre as membranas da série estudada, a matriz mais rica em grupos carboxílicos.

A reação foi realizada conforme descrito no item 4.2.5.1.4. O Gráfico V.20 representa a sobreposição, para efeitos comparativos, dos resultados obtidos em DSC para NFOH, **M3** e o produto da reação entre ambos, M3-NFOH. Não há evidências de que M3-NFOH seja fruto da mistura física entre NFOH e **M3**, pois a curva do produto obtido da reação não mostra sinais que ocorram às mesmas temperaturas dos eventos visualizados para o NFOH. Em contrapartida, as curvas de **M3** e do produto da reação são bastante semelhantes, exceto pela etapas de decomposição que, no caso de M3-NFOH, foram deslocadas para temperaturas mais elevadas. Esse comportamento é

mais bem evidenciado no Gráfico V.21, que sobrepõe as curvas de TG/DTG das espécies envolvidas e indica que M3-NFOH é uma espécie diferente de **M3** e termicamente mais estável. Entretanto, o que pode ter ocorrido é a reticulação da matriz polimérica entre os grupos carboxílicos do AA enxertado e as aminas livres da quitosana, catalisada pelo DCI e, não necessariamente, a formação do pró-fármaco.

6.5.5. Quitosana com hemissuccinato de hidroximetilnitrofurál

Há fortes indícios, segundo os Espectros V.30 e V.31, de que a síntese do pró-fármaco do NFOH, tendo a quitosana como transportador, ocorreu. Antes, há que se considerar que, como a quitosana deve, necessariamente, ser analisada, quando por RMN, sob condições ácidas e a 50 °C, no mínimo, tanto a solubilização quanto a execução da análise foram executadas o mais rápido quanto possível. Nota-se, no Espectro V.30, o aparecimento de um novo singlete a 3,14 ppm, que pode ser atribuído, a despeito do deslocamento de todos os sinais em quase 1 ppm para campo mais baixo, aos grupos metilênicos do espaçante succinoílico do SCNFOH, que têm sido observadas a 2,42 ppm (Espectro V.5). No Espectro V.31, realizado a 50 °C por cerca de 18 h, nota-se a presença de dois novos sinais, a 63 e 23 ppm, que são atribuídos, respectivamente, aos C₈ e C_{10/11} do SCNFOH.

O Gráfico V.22 mostra a sobreposição das curvas de DSC do SCNFOH, quitosana e o produto da reação entre ambos, Q-SCNFOH. A ausência de eventos térmicos característicos do SCNFOH na curva do Q-SCNFOH descarta a possibilidade da nova espécie se tratar da mistura física dos reagentes. Além disso, o padrão das curvas de DSC revela que todas as amostras são espécies diferentes entre si. O Gráfico V.23 mostra que Q-SCNFOH possui mais umidade do que a amostra polimérica de partida. Isso porque o produto da reação foi liofilizado para seu isolamento, enquanto que a amostra de quitosana foi analisada sob a forma de filme, submetido a secagem em estufa. Outra consideração importante é que Q-SCNFOH é termicamente menos estável que a quitosana, além de se decompor em dois eventos exotérmicos, ao

passo que o polímero de partida se decompõe, aparentemente, em etapa única e em temperatura mais elevada. De fato, as modificações térmicas detectadas na Q-SCNFOH reforçam a conclusão de que se obteve o pró-fármaco desejado.

É difícil considerar que o fármaco tenha permanecido adsorvido à quitosana após 4 dias de diálise e uma etapa de filtração. Por essa razão, provavelmente, o produto dessa reação seja o pró-fármaco do NFOH, ligado à quitosana por meio de espaçante succinílico. Este derivado é capaz de formar filme pela mesma metodologia que é empregada para a quitosana.

6.5.6. Quitosana *N*-metilfosfônica com hemissuccinato de hidroximetilnitrofural

A importância da formação do pró-fármaco, utilizando a MFQ como transportador, está na busca pelo pró-fármaco polimérico que mantenha características de hidrossolubilidade que permitam sua administração endovenosa para o combate da doença de Chagas e da leishmaniose visceral. A reação para latenciação do SCNFOH na MFQ foi realizada sob as mesmas condições que foram estipuladas quando a quitosana era empregada como transportador polimérico.

Da observação do Espectro V.32, pode-se concluir que o surgimento do sinal a 2,84 ppm se refere aos hidrogênios dos grupos metilênicos do espaçante succinílico do SCNFOH. Os sinais a 3,24 e 3,05 ppm foram atribuídos aos hidrogênios do CH₂ dos grupos fosfônicos mono e dissustituídos, respectivamente (Heras *et al.*, 2001). Entretanto, o Espectro V.33, que corresponde à análise em RMN ¹³C, não detectou sinais de substituição da MFQ pelo SCNFOH. Tais resultados sugerem que se houve a formação do pró-fármaco hidrossolúvel, o grau de substituição de SCNFOH obtido foi inferior ao observado quando a quitosana não-fosfônica foi empregada como transportador.

Analogamente ao que foi evidenciado para os demais derivados poliméricos, pela comparação das curvas sobrepostas do DSC de SCNFOH, MFQ e o produto da

reação entre ambos, MFQ-SCNFOH (Gráfico V.24), a ausência de eventos térmicos característicos do SCNFOH na curva da MFQ-SCNFOH descarta a possibilidade de mistura física entre os reagentes. A comparação entre as curvas de TG/DTG da MFQ e da MFQ-SCNFOH, sobrepostas no Gráfico V.25, mostra que a reação deu origem a uma nova espécie que, embora possua o pico da primeira decomposição muito próximo ao pico de decomposição da quitosana, se desdobra num segundo evento, muito mais intenso do que é visualizado para a MFQ. Entretanto, não há segurança para se afirmar a obtenção desse derivado, uma vez que não houve alteração nas temperaturas de decomposição.

CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

- NFOH e SCNFOH foram sintetizados e caracterizados por técnicas espectrométricas – IV e RMN – e de análise térmica;
- A avaliação da atividade biológica do NFOH contra formas promastigotas de *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* mostrou atividade preservada, porém reduzida em relação ao protótipo;
- NFOH apresentou atividade também contra as formas amastigotas de *L. amazonensis*, embora não tenha a capacidade de penetrar macrófagos infectados;
- SCNFOH tem atividade diminuída contra formas promastigotas de *L. chagasi*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, provavelmente, em decorrência da sua atuação como pró-fármaco do NFOH;
- A quitosana foi satisfatoriamente caracterizada por IV, RMN e análise térmica;
- O pró-fármaco do NFOH, ligado à quitosana por meio de espaçante succínico, com propriedades filmogênicas, foi sintetizado e caracterizado por meio de técnicas espectrométricas e por análise térmica;
- Os derivados SCQ e CMQ não foram obtidos satisfatoriamente e as sínteses devem ser otimizadas;
- A síntese da CBQ foi otimizada por meio do planejamento fatorial 3^2 , que apontou que o grau de substituição é máximo quando a fração molar ácido levulínico/quitosana e boroidreto de sódio/quitosana são, respectivamente, de 2,00 a 3,00 e 0,50;

- As tentativas de síntese dos pró-fármacos hidrossolúveis de NFOH utilizando a CBQ como transportador produziu derivados insolúveis;
- A MFQ foi sintetizada e caracterizada por meio de técnicas espectrométricas e por análise térmica;
- A análise do produto obtido da reação entre MFQ e SCNFOH não permite afirmar que o pró-fármaco hidrossolúvel foi sintetizado;
- Obtiveram-se membranas por copolimerização de enxerto da quitosana com AA e HEMA, que foram caracterizadas química e biologicamente quanto ao grau de intumescimento, citotoxicidade, potencial hemolítico e trombogenicidade;
- As membranas de quitosana copolimerizadas com maiores quantidades em HEMA mostraram-se menos citotóxicas e mais trombogênicas;
- As membranas de quitosana enxertadas com maiores teores em AA apresentaram maior capacidade de intumescimento e foram mais hemolíticas;
- A lavagem das membranas foi eficaz para o melhoramento da biocompatibilidade de todas as amostras, indicando que a toxicidade é decorrência de material de partida ou solvente envolvido no processo e não propriamente à composição do material;
- Tentativa de síntese do pró-fármaco entre NFOH e a membrana copolimerizada com AA indicou que as condições reacionais, provavelmente, provocaram a reticulação da matriz polimérica.

PERSPECTIVAS

VIII. PERSPECTIVAS

Considerando-se os resultados obtidos, propõem-se, para o futuro, as seguintes etapas experimentais com vistas à maior completude do trabalho e à resposta a algumas perguntas que surgiram ao longo do seu desenvolvimento:

- otimização da síntese das membranas obtidas por copolimerização com AA e HEMA pela diminuição do percentual de enxerto;
- aplicação de outras técnicas espectrométricas de RMN para a completa caracterização estrutural dos derivados obtidos;
- aprofundamento na avaliação da atividade do SCNFOH como pró-fármaco do NFOH;
- avaliação da atividade leishmanicida dos pró-fármacos poliméricos obtidos, com especial atenção para o aumento da penetração do composto em macrófagos parasitados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, B. D. Prodrugs and their topical use. In: SHAH, V. P., MAIBACH, H. I. Eds. **Topical drug bioavailability, bioequivalence, and penetration**. New York: Plenum Press, 1993. cap. 3, p. 69-89.
- ANDRADE, Z. A.; BRENER, Z. Ação da nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona) sobre as formas intracelulares do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 11, p. 222-228, 1969.
- ARMSTRONG, T. C.; PATTERSON, J. L. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 80, n. 6, p. 1030-1032, 1994.
- American society for testing and materials. **ASTM E1582-93**: Standard practice for calibration of temperature scale for thermogravimetry. Philadelphia, 2000.
- American society for testing and materials. **ASTM F756-00**: Standard practice for assessment of haemolytic properties of materials. Philadelphia, 2000.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos. Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2.ed. Campinas: Editora Unicamp, 2002.
- BAUMANN, H.; FAUST, V. Concepts for improved regioselective placement of O-sulfo, N-sulfo, N-acetyl and N-carboxymethyl groups in chitosan derivatives. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 331, p. 43-57, 2001.

- BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, Amsterdam, v. 57, p. 35-52, 2004.
- BERMAN, J. D.; LEE, L. S. Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 70, n. 2, p. 220-225, 1984.
- BIAGINI, G.; MUZZARELLI, R. A. A.; GIARDINO, R.; CASTALDINI, C. Biological materials for wound healing. In: BRINE, C.J., SANDFORD, P.A., ZIKAKIS, J.P., Eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p. 16-24.
- BOEHNLEIN, J.; SAKR, A.; LICHTIN, J. L.; BRONAUGH, R. L. Characterization of esterase and alcohol dehydrogenase activity in skin: metabolism of retinyl palmitate to retinol (vitamina A) during percutaneous absorption. **Pharm. Res.**, New York, v. 11, p. 1155-9, 1994.
- BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; De CAPRARIS, P.; BOUSQUET, E.; TIRENDI, S. 1-Alkylazacycloalkan-2-one esters as prodrugs of indomethacin for improved delivery through human skin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 77, p. 21-9, 1991.
- BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; GUERRERA, F. Naproxen 1-alkylazacycloalkan-2-one esters as dermal prodrugs: *in vitro* evaluation. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 100, p. 99-105, 1993.
- BONINA, F. P.; MONTENEGRO, L.; TRAPANI, G.; FRANCO, M.; LISO, G. *In vitro* evaluation of *N*-acyllactam esters of indomethacin as dermal prodrugs. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 124, p. 45-51, 1995.

- BOREFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). **J. Tissue Cult. Method**, Gaithersburg, v. 9, p. 7-9, 1984.
- BRADLEY, S. A.; CARR, S. H. Mechanical loss process in polysaccharides. **J. Polym. Sci., Part B**, New York, v. 14, n. 1, p. 111-124, 1976.
- BREWSTER, M. E.; BODOR, N. Improved brain delivery of antiviral agents through the use of redox targeting. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Shannon, v. 14, p. 177-97, 1994.
- BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P. **Advances in chitin and chitosan**. New York: Elsevier, 1992.
- BUNDGAARD, H. Ed. **Design of prodrugs**. Amsterdam: Elsevier, 1985.
- BUNDGAARD, H. Novel chemical approaches in prodrug design. **Drugs Future**, Barcelona, v. 16, p. 443-58, 1991.
- CAMANDAROBA, E. L. P.; PINHEIRO LIMA, C. M.; ANDRADE, S. G. Oral transmission of Chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biodevelopment in the intragastric experimental infection. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 44, n. 2, p. 97-103, 2002.
- CANELLA, K. M. N. de C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 13-17, 2001.
- CANEVAROLO, S. V. Análise térmica dinâmico-mecânica. In: _____. Técnicas de caracterização de polímeros. São Paulo: Artliber, 2004. p. 263-284.

- CARVALHO, P. B. **Leishmanicidas potenciais: síntese de fármacos dirigidos derivados de inibidores de diidrofolato redutase e pteridina redutase, de ação seletiva em macrófagos**. São Paulo, 2001. 276 p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- CARVALHO, P. B.; ARRIBAS, M. A. G.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, São Paulo, v. 36, p. 69-96, 2000.
- CHANG, K. P.; CHAUDURI, G.; FONG, D. Molecular determinants of *Leishmania* virulence. **Annu. Rev. Microbiol.**, Palo Alto, v. 44, p. 499-529, 1990.
- CHEN, L.; TIAN, Z.; DU, Y. Synthesis and pH sensitivity of carboxymethyl chitosan-based polyampholyte hydrogels for protein carrier matrices. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 25, p. 3725-3732, 2004.
- CHUNG, M. C. **Planejamento e síntese de pró-fármacos recíprocos de nitrofurais e primaquina potencialmente antichagásicos**. São Paulo, 1996. 196 p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo).
- CHUNG, M. C., FERREIRA, E.I. O processo de latência no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p.75-84, 1999.
- CHUNG, M. C.; GÜIDO, R. V. C.; MARTINELLI, T. F.; GONÇALVES, M. F.; POLLI, M. C.; BOTELHO, K. C. A.; VARANDA, E. A.; COLLI, W.; MIRANDA, M. T. M.; FERREIRA, E. I. Synthesis and in vitro evaluation of potential antichagasic hydroxymethylnitrofurazone (NFOH-121): a new nitrofurazone prodrug. **Bioorg. Med. Chem.**, New York, v. 11, p. 4779-4783, 2003.

- COLO, G. di; ZAMBITO, Y.; BURGALASSI, S.; NARDINI, I.; SAETTONE, M. F. Effect of chitosan and of *N*-carboxymethylchitosan on intraocular penetration of topically applied ofloxacin. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 273, p. 37-44, 2004.
- CRESCENTE, J. A.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C.; ARAÚJO, J. A. Ocorrência de 4 casos agudos de doença de Chagas na vila de Icoaraci-PA. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, São Paulo, v. 25, supl. 1, p. 29, 1992.
- CRUZ, M. L. **Preparação e análise estrutural de iminas derivadas de dextranos oxidados e antimaláricos**. São Paulo, 1995. 236 p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- CZIHAK, C.; MULLER, M.; SCHOBBER, H.; HEUX, L.; VOGL, G. Dynamics of water adsorbed to cellulose. **Phys. B**, Amsterdam, v. 266, n. 1-2, p. 87-91, 1999.
- DAVIDSON, R. N. Practical guide for the treatment of leishmaniasis. **Drugs**, Auckland, v. 56, p. 1009-18, 1998.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas. In: CIMERMAN, B., CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu. 1999. cap. 11, p. 81-111.
- DIAS, J. C. P. Doença de Chagas: epidemiologia e prevenção. **Arq. Bras. Cardiol.**, Rio de Janeiro, v. 63, p. 451-5, 1994.
- DONG, Y.; RUAN, Y.; WANG, H.; ZHAO, Y.; BI, D. Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. **J. Appl. Polym. Sci.**, Hoboken, v. 93, p. 1553-1558, 2004.

- DUNCAN, R.; GAC-BRETON, S.; KEANE, R.; MUSILA, R.; SAT, Y. N.; SATCHI, R.; SEARLE, F. Polymer-drug conjugates, PDEPT and PELT: basic principles for design and transfer from the laboratory to clinic. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v. 74, n. 1-3, p. 135-146, 2001.
- ETTMAYER, P.; AMIDON, G. L.; CLEMENT, B.; TESTA, B. Lessons learned from marketed and investigational prodrugs. **J. Med. Chem.**, Easton, v. 47, p. 2393-2404, 2004.
- FADEL, E.; CAVALCANTE, A.; INOUE, K. Açaí causa mal de Chagas no Amapá. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 31 mar. 2005. Vida&, p. A24.
- FRIED, J. R. **Polymer science and technology**. New Jersey: Prentice Hall PTR. 1995. 509 pp.
- FRIIS, G. J.; BUNDGAARD, H. Design and application of prodrugs. In: KROGSGAARD-LARSEN, P.; LILJEFORS, T.; MADSEN, U. Eds. **A textbook of drug design and development**. 2.ed. Amsterdam: Harwood Academic. 1996. cap. 13, p. 351-385.
- GADELHA, A. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana com a pentamidina. Esquema em dose única endovenosa. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 65, p. 198-200, 1990.
- GHERSI-EGEA, J. -F.; MAUPOIL, V.; RAY, D.; ROCHETTE, L. Eletronic spin resonance detection of superoxide and hydroxyl radicals during the reductive metabolism of drugs by rat brain preparations and isolated cerebral microvessels. **Free Radical Biol. Med.**, New York, v. 24, p.1074-81, 1998.
- GIAMMONA, G.; CAVALLARO, G.; PITARRESI, G.; VENTURA, C.; PALAZZO, S. Synthesis and therapeutic potential of a macromolecular prodrug of diflunisal. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 105, p. 57-63, 1994.

- GILLETTE, J. R.; MENARD, R. H.; STRIPP, B. Active products of fetal drug metabolism. **Clin. Pharmacol. Ther.**, London, v. 14, p. 680-92, 1973.
- GLEW, R. H.; SAHA, A. K.; DAS, A.; REMALEY, A. T. Biochemistry of the *Leishmania* species. **Microbiol. Rev.**, Washington, v.52, n. 4, p. 412-32, 1988.
- GRIMAUDI JR., G.; TESH, R. B. Leishmaniasis of the new world: current concepts and implications for future research. **Clin. Microbiol. Rev.**, Washington, v. 6, n. 3, p. 230-50, 1993.
- GUAN, Y.; LIU, X.; FU, Q.; LI, Z.; YAO, K. Effects of N,O-dicarboxymethyl chitosan on phase behavior and morphological structure of chitosan/viscose rayon blends. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 36, p. 61-66, 1998.
- GUIDO, R. V. C.; FERREIRA, E. I.; NASSUTE, J. C.; VARANDA, E. A.; CHUNG, M. C. Diminuição da atividade mutagênica do pró-fármaco NFOH-121 em relação ao nitrofural (nitrofurazona). **Rev. Cienc. Farm.**, Araraquara, v. 22, n. 2, p. 319-33, 2001.
- HADGRAFT, J. Prodrugs and skin absorption. In: BUNDGAARD, H. Ed. **Design of prodrugs**. Amsterdam: Elsevier, 1985. cap. 8, p. 271-89.
- HARISH PRASHANTH, K. V.; THARANATHAN, R. N. Studies on graft copolymerization of chitosan with synthetic monomers. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 54, p. 343-351, 2003.
- HASEGAWA, M.; ISOGAI, F.; ONABE, F.; USUDA, M.; ATALLA, R. H. Characterization of cellulose chitosan blend films. **J. Appl. Polym. Sci.**, Hoboken, v. 45, n. 11, p. 1873-1879, 1992.

- HATAKEYAMA, H., HATAKEYAMA, T. Interaction between water and hydrophilic polymers. **Thermochim. Acta**, Amsterdam, v. 308, n. 1-2, p. 3-22, 1998.
- HENCH, L. L. Biomaterials: a forecast for the future. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 19, n. 16, p. 1419-23, 1998.
- HENDERSON, G. B.; ULRICH, P.; FAIRLAMB, A. H.; ROSENBERG, I.; PEREIRA, M.; SELA, M.; CERAMI, A. "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 85, p. 5374-5378, 1988.
- HERAS, A.; RODRÍGUEZ, N. M.; RAMOS, V. M.; AGULLÓ, E. N-methylene phosphonic chitosan: a novel soluble derivative. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 44, p. 1-8, 2001.
- HILLER, S. A better way to make the medicine go down. **Science**, Washington, v. 253, p. 1095-6, 1991.
- HIRANO, S. Production and application of chitin and chitosan in Japan. In: SKJÅK-BRÆK, G., ANTHONSEN, T., SANDFORD, P, eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 37-43.
- HIRANO, S.; HIROCHI, K.; HAYASHI, K. -I.; MIKAMI, T.; TACHIBANA, H. Cosmetic and pharmaceutical uses of chitin and chitosan. In: GEBELEIN, C. G.; CHENG, T. C.; YANG, V. C. Eds. **Cosmetic and pharmaceutical applications of polymers**. New York: Plenum Press, 1991. p. 95-104.
- HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Development stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature**, London, v. 212, p. 1385-6, 1966.

- HU, Y.; JIANG, X.; DING, Y.; GE, H.; YUAN, Y.; YANG, C. Synthesis and characterization of chitosan-poly(acrylic acid) nanoparticles. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 23, p. 3139-3201, 2002.
- HOCHSTEIN, H. D.; FITSGERALD, E. A.; McMAHON, F. G.; VARGAS, R. Properties of US standard endotoxin (EC-5) in human male volunteers. **J. Endotoxin Res.**, Leeds, v. 1, p. 52-56, 1994.
- HUGGINS, M. L. The viscosity of dilute solutions of long-chain molecules. IV. Dependence on concentration. **J. Am. Chem. Soc.**, Easton, v. 64, p. 2716-2718, 1942.
- IKEDA, S.; KUMAGAI, H.; NAKAMURA, K. Dielectric analysis of food polysaccharides in aqueous solution. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 301, n. 1-2, p. 51-59, 1997.
- ILLUM, R. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient. **Pharm. Res.**, New York, v. 15, p. 1326-31, 1998.
- IMAI, Y.; NOSE, Y. J. New method for evaluation of antithrombogenicity of materials. **Biomed. Mater. Res.**, Hoboken, v. 6, p. 165-172, 1972.
- INOUE, K. 50 Mil podem ter sido expostos a mal de Chagas. **O Estado de São Paulo**, São Paulo, 24 mar. 2005. Vida&, p. A13.
- INSEL, P. A. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G., LIMBIRD, L. E., MOLINOFF, P. B., RUDDON, R. W., GILMAN, A. G., eds. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9. ed. Mexico: McGraw-Hill, 1996. p. 450-480.
- International standard organization. **ISO 10993-5**: Biological evaluation of medical devices – part 5 – tests for cytotoxicity: *in vitro* methods. Geneva, 1992.

International standard organization. **ISO 10993-4**: Biological evaluation of medical devices – part 4 – selection of tests for interaction with blood. Geneva, 1999.

IUPAC. Basic classification and definitions of polymerization reactions (IUPAC recommendations 1994). **Pure Appl. Chem.**, Research Triangle Park, v. 66, p. 2483-2486, 1994.

JIANG, H.; SU, W.; CARACCI, S.; BUNNING, T. J.; COOPER, T.; ADAMS, W. Optical waveguiding and morphology of chitosan thin films. **J. Appl. Polym. Sci.**, Hoboken, v. 61, n. 7, p. 1163-1171, 1996.

KAPLER, G. M; COBURN, C; BEVERLEY, S. Development of a stable Leishmania expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 87, p. 9736-40, 1990.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biological fate of highly-succinylated *N*-succinyl-chitosan and antitumor characteristics of its water-soluble conjugate with mitomycin C at i.v. and i.p. administration into tumor bearing mice. **Biol. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 23, n. 12, p. 1497-1503, 2000.

KATO, Y.; ONISHI, H.; MACHIDA, Y. *N*-succinyl-chitosan as a drug carrier: water-insoluble and water-soluble conjugates. **Biomaterials**, Amsterdam, v. 25, p. 907-915, 2004.

KIFUNE, K. Clinical application of chitin artificial skin (beschitin W) In: BRINE, C.J., SANDFORD, P.A., ZIKAKIS, J.P., eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p. 9-15.

- KIRMSE, P.; MAHIN, L.; LAHRECH, T. M. Canine leishmaniasis in Morocco with special reference to infantile kala-azar. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 81, n. 2, p. 212-3, 1987.
- KITTUR, F. S.; HARISH PRASHANTH, K. V.; UDAYA SANKAR, K.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 49, p. 185-193, 2002.
- KOIDE, S. S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutr. Res.**, Los Angeles, v. 18, n. 6, p. 1091-101, 1998.
- KOPEČEK, J.; DUNCAN, R. Targetable polymeric prodrugs. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v. 6, p. 315-327, 1987.
- KOROLKOVAS, A. **Dicionário terapêutico Guanabara, ed. 2002/2003**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.
- KOROLKOVAS, A. **Essentials of medicinal chemistry**. 2.ed. New York: Wiley-Interscience, 1988. 1204 p.
- KWON, K.; AUH, J. H.; KIM, J. -W.; PARK, K. H.; PARK, C. C.; KO, C. J. Physicochemical properties and functionality of high carboxymethylated starch. **Starch/Stärke**, Weinheim, v. 49, n. 12, p. 499-505, 1997.
- LAGUNA, F.; ADRADOS, M.; ALVAR, J. Visceral leishmaniasis in patients infected with the human immunodeficiency virus. **Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, Heidelberg, v. 16, p. 898-903, 1997.
- LANA, M. de; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi*. In: NEVES, D.P. **Parasitologia humana**. 8.ed. São Paulo: Atheneu. 1991. p. 73-104.

- LANDES, D. R.; BOUGH, W. A. Effects of chitosan – a coagulating agent for food processing wastes – in the diet of rats on growth and liver and blood composition. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, Secaucus, v. 15, p. 555-563, 1976.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, London, v. 273, p. 595-600, 1978.
- LAINSON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R., Eds. **The leishmaniasis in biology and medicine**. Vol. 1, London: Academic Press, 1987. P. 1-120.
- LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQI, 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. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, Oxford, v. 32, p. 1149-1158, 2003.
- LAZARIDOU, A.; BILIADERIS, C. G. Thermophysical properties of chitosan, chitosan-starch and chitosan-pellulan films near the glass transition. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 48, p. 179-190, 2002.
- Le DUNG, P.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J. Water soluble derivatives obtained by controlled chemical modifications of chitosan. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 24, p. 209-14, 1994.
- LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. A. Applications and properties of chitosan. In: GOOSEN, M. F. A., Ed. **Applications of chitin and chitosan**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1997, p. 3-29.
- LIU, Y.; LIU, Z.; ZHANG, Y.; DUNG, K. Graft copolymerization of methyl acrylate onto chitosan initiated by potassium diperodotocuprate (III). **J. Appl. Polym. Sci.**, Hoboken, v. 89, p. 2283-2289, 2003.

- LLOYD, L. L.; KENNEDY, J. F.; METHACANON, P.; PATERSON, M.; KNILL, C. J. Carbohydrate polymers as wound management aids. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 37, p. 315-322, 1998.
- LOVREK, M.; ZORC, B.; BONESCHANS, B.; BUTULA, I. Macromolecular prodrugs. VIII. Synthesis of polymer-gemfibrozil conjugates. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 200, p. 59-66, 2000.
- MACHADO, A. V.; COVAS, J. A. Síntese e processamento de polímeros. In: De MELO, J. S. S.; MORENO, M. J.; BURROWS, H. D.; GIL, M. H. Eds. **Química de polímeros**. Coimbra: Imprensa da Universidade. 2004. cap. II.4, p. 93-120.
- MAGILL, A. J. Epidemiology of the leishmaniasis. **Dermatol. Clin.**, Philadelphia, v. 13, p. 505-23, 1995.
- MAHDAVINIA, G. R.; POURJAVADI, A.; HOSSEINZADEH, H.; ZOHURIAAN, M. J. Modified chitosan 4. Superabsorbent hydrogels from poly(acrylic acid-co-acrylamide) grafted chitosan with salt- and pH-responsiveness properties. **Eur. Polym. J.**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 1399-1407, 2004.
- MANO, E. L.; MENDES, L. C. **Introdução à polímeros**. 2. ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher. 1999. 191 p.
- MARION-LANDAIS, G.; HEOTIS, J. P.; HERRETT, R. J.; DIAZ, J. R. Non-absorption of furazolidone from the vagina in women. **Curr. Ther. Res. Clin. Exp.**, New York, v. 18, p. 510-2, 1975.
- MARZOCHI, M. C. de A.; SCHUBACH, A. de O.; MARZOCHI, K. B. F. Leishmaniose tegumentar americana. In: CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**. São Paulo: Atheneu. 1999. cap. 9, p. 39-64.

MEIJER, D. K. F.; MOLEMA, G.; JANSEN, R. W.; MOOLENAAR, F. Design of cell-specific drug targeting preparations for the liver: where cell biology and medicinal chemistry meet. In: CLAASSEN, V. Ed. **Trends in drug research**. Amsterdam: Elsevier, 1990. v. 13, p. 303-32.

Merck index. 12.ed. Whitehouse Station, 1996. p.1134.

MOORE, G. K.; ROBERTS, G. A. F. Determination of the degree of *N*-acetylation of chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 2, p. 115-6, 1980.

MUCHA, M.; PAWLAK, A. Thermal analysis of chitosan and its blends. **Termochim. Acta**, Amsterdam, v. 427, n. 1-2, p. 69-76, 2005.

MUCHA, M.; PIEKIELNA, J.; WIECZOREK, A. Characterization and morphology of biodegradable chitosan/synthetic polymer blends. **Macromol. Symp.**, Weinheim, v. 144, p. 391-412, 1999.

MUKHTAR, H.; AGARWAL, R. Cytochrome P450-dependent metabolism of drugs and carcinogens in skin. In: WANG, R. G. M.; KNAAK, J. B.; MAIBACH, H. I., Eds. **Health risk assessment: dermal and inhalation exposure and absorption of toxicants**. Boca Raton: CRC Press, 1993. cap. 3, p. 47-61.

MUZZARELLI, R. A. A. **Chitin in nature and technology**. New York: Plenum Press, 1986.

MUZZARELLI, R. A. A. Role of lysozyme and *N*-acetyl- β -D-glicosaminidase in the resorption of wound dressings. In: BRINE, C.J., SANDFORD, P.A., ZIKAKIS, J.P., eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p. 25-33.

- MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cell. Mol. Life Sci.**, Basel, v. 53, p. 131-140, 1997.
- MUZZARELLI, R. A. A.; ILARI, P.; PETRARULO, M. Solubility and structure of N-carboxymethylchitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 16, n. 4, p. 177-80, 1994.
- MUZZARELLI, R. A. A.; ILARI, P.; TOMASETTI, M. Preparation and characteristic properties of 5-methyl pirrolidinona chitosan. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 20, p. 99-105, 1993.
- MUZZARELLI, R. A. A.; TANFANI, F.; EMANUELLI, M.; MARIOTTI, S. N-(carboxymethylidene)chitosans and N-(carboxymethyl)chitosans: novel chelating polyampholytes obtained from chitosan glyoxylate. **Carbohydr. Res.**, Amsterdam, v. 107, p. 199-214, 1982.
- NAKAGAWA, Y.; MURAI, T.; HASEGAWA, C.; HIRATA, M.; TSUCHIYA, T.; YAGAMI, T.; HAISHIMA, Y. Endotoxin contamination in wound dressings made of natural biomaterials. **J. Biomed. Mater. Res., Part B**, Hoboken, v. 66 B, n. 1, p. 347-355, 2003.
- NASCIMENTO, B. S. Z. do N. **Envolvimento da superfície celular do *T. cruzi* na interação parasito-célula hospedeira**. São Paulo, 1985. 113 p. (Tese de Livre-Docência – Instituto de Química – USP).
- NEVES DA SILVA, N.; CLAUSELL, D. T.; NÓLIBOS, H. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 10, p. 265-276, 1968.

NITROFURAZONE. Drug information fulltext [Online]. Available: <http://erl.sibi.usp.br:8590/> [january 15, 2001].

OGAWA, K.; YUI, T.; OKUYAMA, K. Three D structures of chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, London, v. 34, n. 1-2, p. 1-8, 2004.

OHYA, Y.; INOSAKA, K.; OUCHI, T. Synthesis and antitumor activity of 6-O-carboxymehtyl chitin fixing 5-fluorouracils through pentamethylene, monomethylene spacer groups *via* amida, ester bonds. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v. 40, n. 2, p. 559-561, 1992.

OKAMOTO, Y.; KAWAKAMI, K.; MIYATAKE, K.; MORIMOTO, M.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 49, p. 249-252, 2002.

OKAMOTO, Y.; SHIBAZAKI, K.; MINAMI, S.; MATSUHASHI, A.; TANIOKA, S.; SHIGEMASA, Y. Evaluation of chitin and chitosanon open wound healing in dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, Tokyo, v. 57, p. 851-854, 1995.

OKAMOTO, Y.; YANO, R.; MIYATAKE, K.; TOMOHIRO, I.; SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Effects of chitin and chitosan on blood coagulation. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 53, p. 337-342, 2003.

OLIVE, P. L. Correlation between metabolic reduction rates and eletron affinity of nitroheterocycles. **Cancer Res.**, Philadelphia, v. 39, p. 4512-5, 1979.

OLSEN, R.; SCHWARTZMILLER, D.; WEPPNER, W.; WINANDY, R. Biomedical applications of chitin and its derivatives. In: SKJÅK-BRÆK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P., Eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 813-28.

- O'MULLANE, J.; DAW, A. Macromolecular prodrugs: blood interactions and targeting. **J. Controlled Release**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 113-20, 1991.
- PANNATIER, A.; TESTA, B.; ETTER, J. -C. Enzymatic hydrolysis by mouse skin homogenates: structure-metabolism relationships of para-nitrobenzoate esters. **Int. J. Pharm.**, Amsterdam, v. 8, p. 167-74, 1981.
- PARISER, E. R.; LOMBARDI, D. P. **Chitin sourcebook: a guide to the research literature**. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- PRIESTLEY, G. C. An introduction to the skin and its diseases. In: _____, Ed. **Molecular aspects of dermatology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. cap. 1, p. 1-18.
- RADHAKRISHNAN, V. V.; VIJAYAN, M. S.; SAMBASIVAN, M.; JAMALUDDIN, M.; RAO, S. B. Haemostatic potential of chitosan. **Biomedicine**, Chennai, v. 2, p. 3-6, 1991.
- RAMOS, M. C. A. **Preparação de copolímeros de base sílica: sua aplicação na imobilização de enzimas**. Coimbra, 2002. 251 p. (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade de Coimbra).
- RAMOS, V. M.; RODRÍGUEZ, N. M.; DÍAZ, M. F.; RODRÍGUEZ, M. S.; HERAS, A.; AGULLÓ, E. N-methylene phosphonic chitosan. Effect of preparation methods on its properties. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 52, p. 39-46, 2003a.
- RAMOS, V. M.; RODRÍGUEZ, N. M.; RODRÍGUEZ, M. S.; HERAS, A.; AGULLÓ, E. Modified chitosan carrying phosphonic and alkyl groups. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 51, p. 425-429, 2003b.

- RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **J. Biomed. Mater. Res., Part A**, Hoboken, v. 34, p. 21-28, 1997.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **React. Funct. Polym.**, Amsterdam, v. 46, p. 1-27, 2000.
- RAVI KUMAR, M. N. V.; KUMAR, N. Polymeric controlled drug-delivery systems: perspective issues and opportunities. **Drug Dev. Ind. Pharm.**, New York, v. 27, n. 1, p. 1-30, 2001.
- REIS, T. SC quer limitar exames de mal de Chagas. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 23 mar. 2005. Cotidiano, p. C3. (a)
- REIS, T. Açaí infectou 26 com mal de Chagas no AP. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 31 mar. 2005. Cotidiano, p. C8. (b)
- RINAUDO, M.; DESBRIÈRES, J.; Le DUNG, P.; THUY BINH, P.; DONG, N. T. NMR investigation of chitosan derivatives formed by reaction of chitosan with levulinic acid. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 46, p. 339-48, 2001.
- RINAUDO, M.; DOMARD, A. Solution properties of chitosan. In: SKJÅK-BRÆK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P., Eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 71-86.
- RINAUDO, M.; Le DUNG, P.; GEY, C.; MILAS, M. Substituent distribution on O,N-carboxymethylchitosans by ^1H and ^{13}C n.m.r. **Int. J. Biol. Macromol.**, London, v. 14, n. 3, p. 122-28, 1992.

- RITTER, C. L.; MALEJKA-GIGANTI, D. Nitroreduction of nitrated and C-9 oxidized fluorenes in vitro. **Chem. Res. Toxicol.**, Washington, v.11, p.1361-7, 1998.
- ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; HAMPSHIRE, A.; LOPES, C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.
- ROSEN, S. L. **Fundamental principles of polymeric materials**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, 1993. 420 p.
- SANDFORD, P. A. Chitosan: commercial uses and potential applications. In: SKJÅK-BRÆK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P., Eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. London: Elsevier Applied Science, 1988. p. 51-69.
- SANTOS, K. S. C. R. dos; SILVA, H. S. R. C.; FERREIRA, E. I.; BRUNS, R. E. 3^2 Factorial design and response surface analysis optimization of *N*-carboxybutylchitosan synthesis. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 59, n. 1, p. 37-42, 2005.
- SCHACHT, E. H.; DE WINNE, K.; HOSTE, K.; VANSTEENKISTE, S. Macromolecular carries for drug targeting. In: WERMUTH, C.G., Ed. **The practice of medicinal chemistry**. 2. ed. London: Academic Press, 2003. p. 587-600.
- SCHLEIN, Y.; WARBURG, A.; SCHNUR, L. F.; LE BLANCQ, S. M.; GUNDERS, A. E. Leishmaniasis in Israel: reservoir hosts, sandfly vectors and leishmanial strains in the Negev, Central Arava and along the Dead Sea. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 78, p. 480-4, 1984.

- SEO, H.; MITSUHASHI, K.; TANIBE, H. Antibacterial and antifungal fiber blended by chitosan. In: BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P., Eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p. 34-40.
- SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **Int. J. Biol. Macromol.**, Amsterdam, v. 18, p. 237-42, 1996.
- SHIKANAI-YASUDA, M. A.; MARCONDES, C. B.; GUEDES, L. A. Possible oral transmittion of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, São Paulo, v. 33, p. 351-357, 1991.
- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrofotométrica de compostos orgânicos**. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2000. 460 p.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5. ed. Singapore: John Wiley & Sons. cap. 7, p. 289-315.
- SINGH, D. K.; RAY, A. R. Characterization of grafted chitosan films. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 36, p. 251-255, 1998.
- SINGLA, A. K.; CHAWLA, M. Chitosan: some pharmaceutical and biological aspects – an update. **J. Pharm. Pharmacol.**, Wallingford, v. 53, p. 1047-67, 2001.
- SMITH, M. B. **Organic synthesis**. Singapore: McGraw-Hill, 1994. cap. 4, p. 343-505.
- STEVENS, M. P. **Polymer chemistry: an introduction**. 3.ed. New York: Oxford University Press, 1999. 551 p.

- SZCZUKOWSKI, M. J.; DAYWITT, A. L.; ELRICK, H. Metastatic testicular tumor treated with nitrofurazone. Report of a case. **J. Am. Med. Assoc.**, Chicago, v. 167, p. 1066-8, 1958.
- TAN, S. C.; KHOR, E.; TAN, T. K.; WONG, S. M. The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, London, v. 45, p. 713-719, 1998.
- TESTA, B.; CALDWELL, J. Prodrugs revisited: the "ad hoc" approach as a complementary ligand design. **Med. Res. Rev.**, New York, v.16, p.233-241, 1996.
- TOJO, K.; LEE, A. -R. C. Bioconversion of a provitamin to vitamins C and E in skin. **J. Soc. Cosmet. Chem.**, New York, v. 38, p. 333-9, 1987.
- TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, London, v. 359, p. 2188-2194, 2002.
- United state pharmacopeia: USP 23, the national formulary: NF 18. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1994. p. 119.
- VÅRUM, K. M.; ANTHONSEN, M. W.; OTTØY, M. H.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Chemical composition and sequences in chitosans determined by high-field proton and carbon N.M.R. – spectroscopy – relation to solubility. In: BRINE, C. J.; SANDFORD, P. A.; ZIKAKIS, J. P., Eds. **Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, physical properties and applications**. New York: Elsevier Applied Science, 1991. p. 127-36.
- WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors. In: WOOLBRIDGE, K. R. H.; JOLLES, G. **Drug design: factor or fantasy?**. London: Academic Press, 1984. p. 47-72.

- WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors , In:_____, Ed. **The practice of Medicinal Chemistry**. 2. ed. London: Academic Press, 2003. p. 561-585.
- WORLD Health Organization. Nitrofural (nitrofurazone). **IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.** Lyon, v. 50, p. 195-209, 1990.
- WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. [Online]. Disponível em: <http://www.who.int/tdr/index.html> [23 de janeiro de 2003].
- WU, Y. –B.; YU, S. –H.; MI, F. –L.; WU, C. –W.; SHYU, S. –S.; PENG, C. –K.; CHAO, A. –C. Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosan/cellulose blends. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 57, p. 435-440, 2004.
- XIAO, C. B.; ZHANG, J. H.; ZHANG, Z. J.; ZHANG, L. N. Study of blend film from chitosan and hydroxypropyl quar gum. **J. Appl. Polym. Sci.**, Hoboken, v. 90, n. 7, p. 1991-1995, 2003
- YU, C. D.; GORDON, N. A.; FOX, J. L.; HIGUCHI, W. I.; HO, N. F. H. Physical model evaluation of topical prodrug delivery – simultaneous transport and bioconversion of vidarabine-5'-valerate V: Mechanistic analysis of influence of nonhomogeneous enzyme distribution in hairless mouse skin. **J. Pharm. Sci.** Washington, v. 69, n. 7, p. 775-80, 1980.
- ZANINI, A. C.; BASILE, A. C.; FOLLADOR, W.; OGA, S. **Guia de medicamentos: 1997/1998**. 2.ed. São Roque: Ipex, C1997. p. 946.
- ZHANG, L. M.; CHEN, D. Q. Grafting of 2-(dimethylamino)ethyl-methacrylate onto potato starch using potassium permanganate/sulfuric acid initiation system. **Staerke**, Weinheim, v. 53, p. 311-316, 2001.

- ZHAO, X.; KATO, K.; FUKUMOTO, Y.; NAKAMAE, K. Synthesis of bioadhesive hydrogels from chitin derivatives. **Int. J. Adhes. Adhes.**, Amsterdam, v. 21, p. 227-232, 2001.
- ZHENG, L. -Y.; ZHU, J. -F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. **Carbohydr. Polym.**, Amsterdam, v. 54, p. 527-530, 2003.
- ZHOU, J.; ELSON, C.; LEE, T. D. G. Reduction in postoperative adhesion formation and re-formation after an abdominal operation with the use of *N,O*-carboxymethyl chitosan. **Surgery**, St. Louis, v. 135, n. 3, p. 307-312, 2004.
- ZORC, B.; MAYSINGER, D.; KALČIĆ, I.; BUTULA, I. Macromolecular prodrugs V. Polymer-brocuridine conjugates. **Int. J. Pharm.**, London, v. 123, p. 65-70, 1995.
- ZOVKO, M.; ZORC, B.; LOVREK, M.; BONESCHANS, B. Macromolecular prodrugs. IX. Synthesis of polymer-fenoprofen conjugates. **Int. J. Pharm.**, London, v. 228, p. 129-138, 2001.

APÊNDICE A

APÊNDICE A

A.1 NITROFURAL

ESPECTRO A.1. Espectro de IV do NF.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}}$ (KBr, cm^{-1})	Atribuição
3461	$\nu_{\text{N-H}}$ assimétrica de amida
3154	$\nu_{\text{N-H}}$ simétrica de amida
2911	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifático
1717	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1584	$\delta_{\text{N-H}}$ de amida
1508	ν assimétrica de NO_2 aromático
1389	$\nu_{\text{C-N}}$ de amida
1349	ν simétrica de NO_2 aromático
1252	$\nu_{\text{C-N}}$ de amida secundária

ESPECTRO A.2. Espectro de RMN ^1H do NF.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (DMSO- d_6) δ (ppm): 2,51 (DMSO); 3,47 (H₂O); 6,64 (s, 2H_{CO-NH}); 7,25 (d, 1H₃); 7,84 – 7,75 (m, 1H₆, 1H₄); 10,81 (s, 1H_{N-NH}).

GRÁFICO A.1. Curvas de TG/DTG e DSC obtidas sob atmosfera dinâmica de N_2 e razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$ do NF.

DADOS TERMOANALÍTICOS:

DTG		DSC		
$T_{\text{pico}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	$\Delta m\text{ (%)}$	$T_{\text{pico}}\text{ (}^{\circ}\text{C)}$	Evento térmico	$\Delta H\text{ (J/g)}$
245	52,1	245	exotérmico	+ 730,2

A.2 QUITOSANA

ESPECTRO A.3. Espectro de RMN ¹H da quitosana PADETEC.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 1,81 (s, 3H₈); 2,80 – 2,90 (m, 1H_{2b}); 3,10 – 3,95 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,66 (H₂O).

ESPECTRO A.4. Espectro de RMN ¹H da quitosana PADETEC a 70 °C.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 2,53 (s, 3H₈); 3,58 – 3,79 (m, 1H_{2b}); 4,00 – 4,60 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,70 – 5,15 (H₂O); 5,25 – 5,60 (m, 1H₁).

ESPECTRO A.5. Espectro de IV da **M1** neutralizada e lavada obtida na execução da terceira série experimental.

ESPECTROGRAMA:

$\nu_{\text{máx}} (\text{cm}^{-1})$	Atribuição
3293	$\nu_{\text{N-H}}$ de amina, amida e $\nu_{\text{O-H}}$ de álcool com ligação de hidrogênio intermolecular
2875	$\nu_{\text{C-H}}$ de alifáticos
1650	$\nu_{\text{C=O}}$ de amida
1558	$\delta_{\text{N-H}}$ de amina
1377	$\delta_{\text{C-H}}$ simétrica de CH_3
1250	$\delta_{\text{C-N}} + \delta_{\text{N-H}}$ (banda 3 de amida)
1149	$\nu_{\text{C-O-C}}$ assimétrica de éter alifático
1080	$\nu_{\text{C-O}}$ de álcool

A.3 CARBOXIBUTILQUITOSANA

ESPECTRO A.6. RMN ¹H a 70 °C do produto do ensaio 1.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 0,87 (d, 3H₁₃, J = 6,23 Hz); 1,76 (s, 3H₈); 1,88 – 2,00 (m, 3H₁₃); 2,13 (t, 2H₁₁, J = 6,86 Hz); 2,47 (t, 2H₁₀, J = 6,86 Hz); 2,57 – 2,68 (m, 1H_{2b}); 3,20 – 3,73 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,00 (H₂O); 4,13 – 4,41 (m, 1H₁).

ESPECTRO A.7. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 2.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 0,89 (d, 3H_{13} , $J = 6,23$ Hz); 1,78 (s, 3H_8); 1,87 – 2,06 (m, 3H_{13}); 2,15 (t, 2H_{11} , $J = 6,91$ Hz); 2,48 (t, 2H_{10} , $J = 6,91$ Hz); 2,54 – 2,69 (m, 1H_{2b}); 3,20 – 3,75 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,01 (H_2O); 4,27 – 4,44 (m, 1H_1);.

ESPECTRO A.8. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 3.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 0,89 (d, 3H_{13} , $J = 5,65$ Hz); 1,78 (s, 3H_8); 1,87 – 2,03 (m, 3H_{13}); 2,05 – 2,20 (m, 2H_{11}); 2,48 (t, 2H_{10} , $J = 6,46$ Hz); 2,55 – 2,72 (m, 1H_{2b}); 3,19 – 3,75 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,02 (H_2O); 4,26 – 4,48 (m, 1H_1).

ESPECTRO A.9. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 4.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 0,89 (d, 3H_{13'}, J = 6,07 Hz); 1,78 (s, 3H₈); 1,87 – 2,00 (m, 3H₁₃); 2,14 (t, 2H₁₁, J = 6,76 Hz); 2,48 (t, 2H₁₀, J = 6,76 Hz); 2,55 – 2,70 (m, 1H_{2b}); 3,20 – 3,72 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,01 (H_{2O}); 4,23 – 4,47 (m, 1H₁).

ESPECTRO A.10. RMN ^1H (300 MHz) a 70 °C do produto do ensaio 5.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 1,10 (d, 3H_{13} , $J = 6,34$ Hz); 1,78 (s, 3H_8); 1,94 (s, 3H_{13}); 2,57 (t, 2H_{10} , $J = 6,70$ Hz); 2,94 (t, 1H_{2b} , $J = 8,23$ Hz); 3,18 – 3,80 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,11 (H_2O); 4,64 (d, 1H_1 , $J = 7,63$ Hz).

ESPECTRO A.11. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 6.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 0,89 (d, 3H_{13} , $J = 6,27$ Hz); 1,78 (s, 3H_8); 1,87 – 1,96 (m, 3H_{13}); 2,14 (t, 2H_{11} , $J = 6,93$ Hz); 2,48 (t, 2H_{10} , $J = 6,93$ Hz); 2,62 (t, 1H_{2b} , $J = 8,23$ Hz); 3,21 – 3,73 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,01 (H_2O); 4,35 (d, 1H_1 , $J = 7,56$ Hz).

ESPECTRO A.12. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 7.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 0,91 (d, $3\text{H}_{13'}$, $J = 6,24$ Hz); 1,80 (s, 3H_8); 1,88 – 1,99 (m, 3H_{13}); 2,17 (t, 2H_{11} , $J = 6,88$ Hz); 2,50 (t, 2H_{10} , $J = 6,88$ Hz); 2,55 – 2,73 (m, 1H_{2b}); 3,22 – 3,76 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,03 (H_2O); 4,27 – 4,45 (m, 1H_1).

ESPECTRO A.13. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 8.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz ($\text{D}_2\text{O} + \text{HCl}$) δ (ppm): 1,10 (d, 3H_{13'}, J = 6,26 Hz); 1,78 (s, 3H₈); 1,89 – 1,96 (m, 3H₁₃); 2,51 – 2,60 (m, 2H₁₀); 2,87 – 3,02 (m, 1H_{2b}); 3,76 – 3,25 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,19 (H_{2O}); 4,65 (d, 1H₁, J = 7,42 Hz).

ESPECTRO A.14. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 9.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 1,10 (d, 3H₁₃, J = 6,21 Hz); 1,78 (s, 3H₈); 1,89 – 1,96 (m, 3H₁₃); 2,57 (t, 2H₁₀, J = 6,63 Hz); 2,95 (t, 1H_{2b}, J = 8,71 Hz); 3,23 – 3,76 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,17 (H₂O); 4,65 (d, 1H₁, J = 7,88 Hz).

ESPECTRO A.15. RMN ^1H (a 70 °C do produto do ensaio 10.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 1,10 (d, 3H_{13} , $J = 6,15$ Hz); 1,78 (s, 3H_8); 1,91 – 1,99 (m, 3H_{13}); 2,33 (2H_{11} , t, $J = 5,64$ Hz); 2,57 (t, 2H_{10} , $J = 5,64$ Hz); 2,85 – 3,03 (m, 1H_{2b}); 3,23 – 3,77 (m, 1H_{2a} , 1H_3 , 1H_4 , 1H_5 , 2H_6); 4,07 (H_2O); 4,64 (d, 1H_1 , $J = 7,00$ Hz).

ESPECTRO A.16. RMN ¹H a 70 °C do produto do ensaio 11.

ESPECTROGRAMA:

RMN ¹H 300 MHz (D₂O + HCl) δ (ppm): 1,12 (d, 3H_{13'}, J = 6,16 Hz); 1,79 (s, 3H₈); 1,90 – 1,97 (m, 3H₁₃); 2,34 (t, 2H₁₁, J = 6,07 Hz); 2,58 (t, 2H₁₀, J = 6,07 Hz); 2,88 – 3,01 (m, 1H_{2b}); 3,24 – 3,77 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,09 (H₂O); 4,65 (d, 1H₁, J = 8,08 Hz).

ESPECTRO A.17. RMN ^1H a 70 °C do produto do ensaio 12.

ESPECTROGRAMA:

RMN ^1H 300 MHz (D_2O + HCl) δ (ppm): 1,10 (d, 3H₁₃, J = 6,20 Hz); 1,78 (s, 3H₈); 1,88 – 1,95 (m, 3H₁₃); 2,27 – 2,35 (m, 2H₁₁); 2,56 (t, 2H₁₀, J = 6,59 Hz); 2,95 (t, 1H_{2b}, J = 8,65 Hz); 3,26 – 3,74 (m, 1H_{2a}, 1H₃, 1H₄, 1H₅, 2H₆); 4,14 (H_{2O}); 4,64 (d, 1H₁, J = 7,80 Hz).

TABELA A.1. Integrales dos espectros de RMN ^1H dos ensaios para cálculo do GS da CBQ e 5-MPQ

Ensaio	X_1	X_2	Integral										GS	
			$\overline{H_1}^a$	H_{10}^b			H_{13}^b			H_{13}^c			CBQ	5-MPQ
1	-1	-1	1,0000	0,5546	0,5480	0,5457	0,5494	0,2702	0,2676	0,2785	0,2721	0,2721	27,47	9,07
3	+1	-1	1,0000	0,5266	0,5374	0,5291	0,5310	0,0533	0,0541	0,0535	0,0536	0,0536	26,55	1,79
3r	+1	-1	1,0000	0,4363	0,4377	0,4377	0,4372	0,0851	0,0851	0,0840	0,0847	0,0847	21,86	2,82
5	-1	+1	1,0000	0,0337	0,0338	0,0343	0,0339	0,1743	0,1791	0,1808	0,1781	0,1781	1,70	5,94
7	+1	+1	1,0000	0,4304	0,4266	0,4214	0,4261	0,1625	0,1628	0,1633	0,1629	0,1629	21,31	5,43
8	-1	0	1,0000	0,1182	0,1174	0,1183	0,1180	0,2685	0,2642	0,2757	0,2695	0,2695	5,90	8,98
12	+1	0	1,0000	0,4522	0,4522	0,4463	0,4502	0,1660	0,1660	0,1655	0,1658	0,1658	22,51	5,53
11	0	-1	1,0000	0,5333	0,5310	0,5352	0,5332	0,1459	0,1421	0,1418	0,1433	0,1433	26,66	4,78
9	0	+1	1,0000	0,2816	0,2840	0,2794	0,2817	0,3651	0,3697	0,3605	0,3651	0,3651	14,09	12,17
2	0	0	1,0000	0,4392	0,4465	0,4416	0,4424	0,1267	0,1211	0,1204	0,1227	0,1227	22,12	4,09
4	0	0	1,0000	0,6620	0,6686	0,6749	0,6685	0,1979	0,2015	0,2025	0,2006	0,2006	33,43	6,69
6	0	0	1,0000	0,4599	0,4547	0,4566	0,4571	0,1597	0,1577	0,1582	0,1585	0,1585	22,86	5,28
10	0	0	1,0000	0,5460	0,5512	0,5402	0,5458	0,2231	0,2258	0,2213	0,2234	0,2234	27,29	7,45

^a mostra-se somente a média porque H_1 é o hidrogênio de referência para o polímero em todos os espectros e foi sempre calibrado em 1;^b média da integral do hidrogênio sonda utilizado para o cálculo do GS da CBQ;^c média da integral do hidrogênio sonda utilizado para o cálculo do GS do 5-MPQ.

A.4. MISTURA FÍSICA ENTRE HIDROXIMETILNITROFURAL E CARBOXIBUTILQUITOSANA