



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

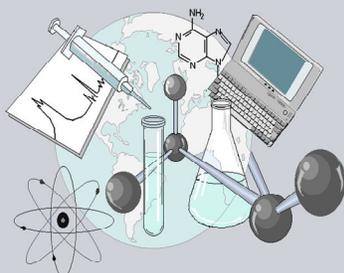
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Preparo, caracterização e estudos das propriedades físico-químicas de complexos polieletrólíticos de N,N,N-trimetilquitosana/heparina obtidos em diferentes pHs para uso em liberação controlada de heparina”

Dissertação apresentada por
Alessandro Francisco Martins ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de mestre
em Química



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, Fevereiro 2011

ALESSANDRO FRANCISCO MARTINS

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR., Brasil)

M386p Martins, Alessandro Francisco
Preparo, caracterização e estudos das propriedades físico-químicas de complexos polieletrólíticos de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina obtidos em diferentes pHs para uso em liberação controlada de heparina / Alessandro Francisco Martins. -- Maringá, 2011.
85 f. : il. col., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2011

1. Quitosana. 2. *N,N,N*-trimetilquitosana. 3. Heparina. 4. Complexo polieletrólíticos. 5. Liberação controlada. I. Muniz, Edvani Curti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed.:547.782045



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Alessandro Francisco Martins**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 17 de fevereiro de 2011.

COMISSÃO JULGADORA:

Prof. Dr. Edvani Curti Muniz
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Emani Abicht Basso
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Luiz Henrique Dall'Antonia
Membro - UEL

Preparo, caracterização e estudos das propriedades físico-químicas de complexos polieletrólíticos de N,N,N-trimetilquitosana/heparina obtidos em diferentes pHs para uso em liberação controlada de heparina.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a Obtenção do título de Mestre em Química.
Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz

MARINGÁ

2011

*Dedico este trabalho aos meus pais,
Geni e Nivaldo, à meu irmão Adriano
e à minha namorada Taimara, além
de todas as pessoas que de alguma
forma contribuíram para que eu
conseguisse chegar até aqui.*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, senhor de todas as coisas existentes neste mundo, sempre presente em minha vida. Obrigado meu DEUS, pela oportunidade de estudar e por me ajudar a concluir o mestrado. O senhor sempre é fiel com aquele que segue seu caminho, muito obrigado.

Aos meus pais, Geni Coneglian Martins e Nivaldo Francisco Martins, pela confiança, dedicação, carinho e amor. Aqui um agradecimento especial para a minha querida mãe (Geni Coneglian Martins) que já habita o reino dos céus. Minha mãe essa conquista é para a senhora e onde quer que você esteja quero que saiba que eu te amo muito. Mãe a senhora lutou muito para que eu chegasse até aqui, muito obrigado pelo amor e educação que a senhora me ofereceu durante a sua estadia aqui na terra.

À minha namorada, Taimara Camile Matias, que me apóia e me oferece muito amor e incentivo para eu continuar. Obrigado meu amor pela amizade, simplicidade, companheirismo e dedicação.

À meu irmão, Adriano Francisco Martins que não me faltou em momento algum de minha caminhada. Obrigado meu irmão.

Ao Prof. Dr. Edvani Curti Muniz pela atenção, dedicação, incentivo, orientação, amizade e apoio em todos os momentos.

Aos colegas do bloco 18 e 23: Adonilson, Adriana, Juliana, André, Guilherme, Heveline, Beto, Laís, Fernanda, Leticia, Vinícius, Helder, Ricardo, Daiane, Thiago e Gedalias pela amizade e apoio.

Ao Beto pela realização dos experimentos de MEV durante o transcorrer deste trabalho e pela paciência e amizade.

À Prof. Silvia pelas análises de DRX durante o transcorrer deste trabalho e pela paciência e amizade.

À Ivânia pela ajuda na interpretação dos gráficos de RMN.

À Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos e CNPQ pelo apoio financeiro.

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade e dedicação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HP - Heparina

GAG - Glicosaminoglicano

TIH – Trombocitopenia Induzida

QT - Quitosana

PECs - Complexos Polieletrólitos

TPF - Tripolifosfato de Sódio

GTMAC - Cloreto de Glicidiltrimetilamônio

TMC - *N,N,N*-trimetilquitosana

GQ - Grau de Quaternização

NMP - *N*-metil-2-pirrolidona

PEC2 - Complexos Polieletrólitos de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina

PEC2-5 - Complexo Polieletrólítico de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina obtido em pH 5

PEC2-8 - Complexo Polieletrólítico de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina obtido em pH 8

PEC2-10 - Complexo Polieletrólítico de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina obtido em pH 10

PEC2-12 - Complexo Polieletrólítico de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina obtido em pH 12

PEC1 - Complexo Polieletrólítico de quitosana/heparina

PEC1-5 - Complexo Polieletrólítico de quitosana/heparina obtido em pH 5

AM - Azul de Metileno

AM/HP - Complexo Metacromático de Azul de Metileno/Heparina

NT⁺ - Sítio *N*-trimetilado

ND - Sítio *N*-dimetilado

NM - Sítio *N*-monometilado

OM - Sítio *O*-metilado

GD - Grau de Dissubstituição

GM3 - Grau de Metilação em C3-OH

GM6 - Grau de Metilação em C6-OH

δ - Deslocamento Químico

SBPEC2-8 - Sobrenadante do PEC2-8

SBPEC2-12 - Sobrenadante do PEC2-12

PEC2-8* - Complexo Polieletrólítico de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina obtido em pH 8 submergido por 24 horas em uma solução de ácido clorídrico (pH 2).

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Unidades monossacarídicas repetitivas da Heparina. (pag. 15)
- Figura 2.** Unidades monossacarídicas repetitivas da Quitosana. (pag. 19)
- Figura 3.** Dependência do pH para a ocorrência de adsorção e dessorção de íons Cu(II) em matriz de quitosana reticulada com TPF. (pag. 21)
- Figura 4.** PEC de Quitosana e Heparina. (pag. 23)
- Figura 5.** Interação eletrostática entre o derivado de Quitosana e Heparina. (pag. 25)
- Figura 6.** Estrutura da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC). (pag. 27)
- Figura 7.** Esquema de reação: Síntese da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC). (pag. 31)
- Figura 8.** Espectros de FTIR da TMC (8a), PEC2-5 (8b), HP (8c), PEC1-5 (8d) e QT (8e). (pag. 37)
- Figura 9.** Espectros de FTIR da HP (9a), PEC2-12 (9b), PEC2-10 (9c), PEC2-8 (9d), PEC2-5 (9e) e TMC (9f). (pag. 38)
- Figura 10.** Espectros de RMN ¹H da QT (10a) e TMC (10b). (pag. 41)
- Figura 11.** Estruturas sacarídicas repetitivas da QT (11a) e TMC (11b) com os átomos de hidrogênio atribuídos e seus respectivos δ apresentados na figura 10. (pag. 41)
- Figura 12.** Espectros de CP-MAS RMN ¹³C da QT (12a) e da TMC (12b). (pag. 44)
- Figura 13.** Espectros de CP-MAS RMN ¹³C: TMC (13a), PEC2-5 (13b), (HP (13c), PEC1-5 (13d) e QT (13e). (pag. 47)
- Figura 14.** Espectros de CP-MAS RMN ¹³C de: HP (14a), PEC2-12 (14b), PEC2-10 (14c), PEC2-8 (14d) PEC2-5 (14e) e TMC (14f). (pag. 49)
- Figura 15.** Ilustração esquemática da estrutura física dos PEC2 obtidos em meio alcalino com razão $C2/C\omega > 0,69$. A maior razão entre os carbonos $C2/C\omega$ em pH básico proporciona elevada intensidade de regiões com interação efetiva envolvendo os sítios ⁺NT da TMC com os sítios aniônicos da HP, portanto maior aproximação entre os polímeros. Ao mesmo tempo existe mínima intensidade de regiões com repulsão eletrostática envolvendo os sítios ⁺NT em pH alcalino. (pag. 51)

Figura 16. Soluções de TMC (pH 8, pH 10 e pH 12) antes da adição de heparina (Fig. 16a), PEC2-5 (PEC em suspensão - esquerda), PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12 (direita) preparados em meio alcalino após 24 horas de obtenção (16b). **(pag. 52)**

Figura 16c. PEC2-8 após ser liofilizado por 48 horas a -55°C . **(pag. 52)**

Figura 17. Ilustração esquemática da estrutura física do PEC2-5 com razão $C2/C\omega < 0,69$. A menor razão entre os carbonos $C2/C\omega$ em pH 5 proporciona mínima intensidade de regiões com interação efetiva envolvendo os sítios NT^+ da TMC com os sítios aniônicos da HP, portanto menor a aproximação entre os polímeros. Ao mesmo tempo existe elevada intensidade de regiões com repulsão eletrostática envolvendo os sítios NT^+ e NM^+ em pH 5. **(pag. 53)**

Figura 18. Micrografias do PEC2-8 processadas após este ser congelado em nitrogênio líquido e liofilizado a -55°C por 48h. **(pag. 55)**

Figura 19. Curvas de TGA dos precursores QT, TMC e HP. **(pag. 57)**

Figura 20. Curvas de TGA (20a) e DSC (20b) dos PEC2 obtidos em ampla faixa de pH. **(pag. 60)**

Figura 21. Dependência linear de degradação térmica dos PEC2 com a variação do pH da solução de TMC obtida através das curvas de TGA (21a) e de DSC (21b). **(pag. 63)**

Figura 22. Difractogramas referentes aos PEC2 e precursores. **(pag. 65)**

Figura 23. Razão das áreas de P1 (23a), P2 (23b) e P3 (23c) PEC2/TMC. **(pag. 68)**

Figura 24. Complexo Metacromático de azul de metileno/heparina (AM/HP). **(pag. 69)**

Figura 25. Curva de calibração do complexo Metacromático AM/HP obtida em água destilada (pH ~ 6), utilizada para quantificar heparina ($R^2 = 0,9869$). **(pag. 70)**

Figura 26. Fração liberada (%) (26a) e concentração (mg.L^{-1}) (26b) de Heparina a partir do PEC2-8 e PEC2-12 em água destilada (pH ~ 6). **(pag. 71)**

Figura 27. Espectros de FTIR da TMC (27a), SBPEC2-8 (27b), PEC2-8 (27c), HP (27d). **(pag. 74)**

Figura 28. Espectros de FTIR do PEC2-8 (28a) e PEC2-8* (28b). **(pag. 76)**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Temperaturas dos eventos perda de água e degradação térmica, de cada PEC2, determinadas por meio de curvas de TGA. **(pag. 61)**

Tabela 2. Áreas dos Picos em $2\theta = 30.11^\circ$ (P1), 43.04° (P2) e 54.91° (P3) obtidos pelos difratogramas de raio-X, referentes a TMC e PEC2 (Fig. 23). **(pag. 67)**

Tabela 3. Análise do SPEC2-8 e SPEC2-12, valores de absorvância do complexo metacromático AM/HP, concentração e massa de heparina remanescente em solução referente a cada sobrenadante. **(pag. 73)**

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Heparina.....	14
1.1.1. Histórico.....	14
1.1.2. Propriedades físico-químicas.....	14
1.1.3. Fatores que contribuem para inibição da coagulação sanguínea.....	16
1.1.4. Efeitos colaterais.....	18
1.2. Complexos polieletrólíticos e hidrogéis a base de quitosana utilizados em remoção de íons metálicos em águas residuais.....	18
1.3. Complexos polieletrólíticos e hidrogéis a base de quitosana utilizados em liberação controlada de fármacos.....	21
1.4. Quitosana versus <i>N,N,N</i> -Trimetilquitosana (TMC) em liberação controlada.....	26
2. OBJETIVOS.....	28
3. EXPERIMENTAL	29
3.1. Materiais	29
3.2. Procedimentos	29
3.2.1. Modificação química da quitosana, síntese da <i>N,N,N</i> -trimetilquitosana (TMC).....	29
3.2.2. Formação dos complexos polieletrólíticos de quitosana/heparina (PEC1-5) e <i>N,N,N</i> -trimetilquitosana/heparina (PEC2).....	31
3.2.3. Ensaios <i>in vitro</i> de liberação controlada de heparina a partir da matriz do PEC2-8 e PEC2-12 utilizando azul de metileno.....	32
3.2.4. Estudo da estabilidade do PEC2-8 em pH 2.....	33
3.3. Caracterizações.....	33
3.3.1. Espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	33

3.3.2. Espectroscopia de RMN ¹ H e ¹³ C (CP-MAS).....	34
3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	34
3.3.4. Análise Térmica.....	35
3.3.4.1. Análise Termogravimétrica (TGA).....	35
3.3.4.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	35
3.3.5. Difração de Raios-X	35
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Caracterização dos precursores, PEC1-5 e PEC2 através da Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).....	36
4.2. Caracterização e cálculo do grau de quaternização (GQ) da TMC através de RMN ¹ H.....	39
4.3. Caracterização da QT e TMC através da técnica espectroscópica de CP-MAS RMN ¹³ C.....	43
4.4. Caracterização do PEC1-5 e do PEC2 através da técnica espectroscópica de CP-MAS RMN ¹³ C.....	46
4.4.1. Caracterização do PEC1-5 e PEC2-5.....	46
4.4.2. Caracterização dos PEC2.....	48
4.5. Análise morfológica do PEC2-8.....	54
4.6. Caracterização dos precursores e PEC2 por TGA e DSC.....	56
4.7. Análise dos precursores e PEC2 por difração de Raios-X.....	63
4.8. Estudos <i>in vitro</i> de liberação controlada de heparina utilizando azul de metileno a partir das matrizes do PEC2-8 e PEC2-12.....	69
4.9. Análise do sobrenadante do PEC2-8 e PEC2-12.....	72
4.10. Estabilidade do PEC2-8 em pH 2.....	75
5. CONCLUSÕES	77
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79

RESUMO

Quitosana (QT) e *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC) foram complexadas com heparina (HP) para a obtenção de complexos polieletrólíticos (PECs). O PEC formado por QT e HP (QT/HP) foi denominado como PEC1. Este foi o único PEC de QT/HP obtido neste trabalho e sua obtenção ocorreu em pH 5, por isso, foi rotulado como PEC1-5. Os PECs formados de TMC e HP (referidos como PEC2) foram preparados em pHs 5, 8, 10, e 12 (PEC2-5, PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12, respectivamente). A formação dos PEC2 em meio alcalino é possível devido à quaternização da QT e conseqüente manutenção da densidade de carga positiva sobre os átomos de nitrogênio na estrutura da TMC. QT, TMC, e todos os PECs obtidos (PEC1 e PEC2) foram caracterizados através das espectroscopias de FTIR e CP-MAS RMN ^{13}C . Foram observadas diferenças significantes nos espectros de CP-MAS RMN ^{13}C dos PECs em relação aos precursores (QT, TMC e HP). Para os PEC2, as diferenças foram atribuídas principalmente ao elevado grau de quaternização (GQ = 59%) da TMC. Os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C dos PEC2 também apresentaram alterações expressivas e dependentes do pH das soluções nas quais estes materiais foram preparados. Os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C referentes aos PEC2 obtidos em meio alcalino apresentaram maior similaridade ao espectro de CP-MAS RMN ^{13}C da HP. Este fato foi relacionado à maior efetividade de complexação entre TMC e HP em meio alcalino e ao conseqüente aumento na razão dos carbonos C2 e C ω (C2/C ω) na estrutura da TMC. C2 referem-se aos carbonos ligados covalentemente aos sítios *N*-monometilados (NM) e *N*-dimetilados (ND) na forma não carregada, enquanto que o carbono C ω é atribuído aos carbonos ligados covalentemente aos sítios *N*-trimetilados (^+NT) e *N*-monometilados (^+NM) carregados positivamente. Imagens de MEV confirmaram alta densidade de poros, de diferentes tamanhos e distribuídos heterogeneamente, na matriz do PEC2-8. A estabilidade térmica dos PEC2

foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA) e por calorimetria diferencial exploratória (DSC). A partir de ambas as técnicas foi constatado que a estabilidade térmica dos PEC2 aumenta linearmente com a elevação do pH da solução de TMC, utilizada no preparo dos materiais. Estes fatores também foram diretamente correlacionados com a razão $C2/C\omega$. Através da difração de raios-X pode-se verificar o maior ordenamento do PEC2-8 em relação aos outros PEC2 preparados em meio alcalino. Isto foi confirmado pelo cálculo das áreas de P1 ($2\theta = 30,11^\circ$), P2 ($2\theta = 43,04^\circ$) e P3 ($2\theta = 54,91^\circ$) dos PEC2 obtidos em pH 5, 8 10 e 12 em relação ao mesmos picos que aparecem no difratograma da TMC. Estes resultados ratificaram o pH 8 como sendo a melhor condição para a TMC e HP complexar. Estudos *in vitro* de liberação de HP confirmaram que o PEC2-8 pode apresentar potencial para a liberação específica de HP em ambientes com condições próximas a do intestino (pH 7,4), pois a partir deste PEC foi possível liberar em água destilada (pH \sim 6) aproximadamente $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ e/ou 420 UI Kg^{-1} de HP em 7 horas de estudo.

Palavras chave: Quitosna, *N,N,N*-trimetilquitosana, Heparina, Complexos polieletrólíticos, liberação controlada.

ABSTRACT

Chitosan (CT) and *N,N,N*-trimethyl chitosan (TMC) were complexed with heparin (HP) to obtain polyelectrolyte complexes (PECs). The PEC from CS/HP, labeled as PEC1, was obtained at pH 5 (PEC1-5). The PECs from TMC/HP, labeled as PEC2, were obtained at pHs 5, 8, 10 and 12 (PEC2-5, PEC2-8, PEC2-10 and PEC2-12, respectively). The formation of PEC2 in alkaline media became possible due to the quaternization of CT. The structures of PECs were characterized by FTIR and CP-MAS ^{13}C NMR spectroscopies. There were significant differences in the spectra of CP-MAS ^{13}C NMR of PECs in relation to the precursors (CT, TMC and HP). For PEC2, the differences were attributed mainly to the high degree of quaternization (DQ = 59%) of TMC. Through CP-MAS ^{13}C NMR the ratio of carbons bonded to not charged nitrogen atoms (C2) to the carbons bonded to positively charged atoms (C ω) at TMC were calculated for each of PEC2 ones. The spectra of CP-MAS ^{13}C NMR of PEC2 also showed significant changes that were dependent on pH in which the PECs were prepared. Furthermore, the CP-MAS ^{13}C NMR spectra of PEC2 obtained in alkaline medium showed greater similarity to the spectrum of CP-MAS ^{13}C NMR of HP. This fact was related to greater effectiveness of complexation between HP and TMC in alkaline medium and to the consequent increase in the ratio of carbons C2 and C ω (C2/C ω) in the structure of TMC. C2 refer to carbons covalently bonded to sites *N*-monomethyl (NM) and *N*-dimethyl (ND) in a non-charged, while the carbon C ω is assigned to carbons covalently bonded to sites *N*-trimethyl (NT $^+$) and *N*-monomethyl (NM $^+$) positively charged. SEM images confirm a high density of pores, of different sizes and heterogeneously distributed, in the matrix of PEC2-8. Thermal stability of PEC2 was analyzed by Thermogravimetry (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). Both techniques allowed finding that the thermal stability of PEC2 increase linearly with increasing pH of the solution of TMC used in the preparation of the materials. These factors were directly correlated with the ratio C2/C ω . Higher self-assembling of PEC2-8 in relation to the other PEC2 obtained in alkaline medium was observed through WAXS analysis. This was confirmed calculating the areas of P1 ($2\theta = 30,11^\circ$), P2 ($2\theta = 43,04^\circ$) and P3 ($2\theta = 54,91^\circ$) of PEC2 obtained at pH 5, 8, 10 and 12 compared to the same peaks that appear in the WAXS profile of the TMC. This ratified the pH 8 as the best condition for the strongest complexation between TMC and HP. *In vitro* studies of HP release confirmed that the PEC2-8 may have potential for specific delivering of HP on environments with pH conditions close to the intestinal one (pH 7,4), because it was possible to release from this PEC, in distilled water (pH \sim 6), approximately 4.2 mg L^{-1} and/or 420 UI kg^{-1} of HP in 7 hours of study.

Keywords: Chitosan, *N,N,N*-trimethyl chitosan, Heparin, Polyelectrolyte complexes, Controlled release.

1. INTRODUÇÃO.

1.1 Heparina.

1.1.1. Histórico.

Em 1916, um estudante de medicina chamado Jay McLean, realiza a descoberta de um agente anticoagulante presente em fígado de cães. Esta substância foi denominada mais tarde por Howell e Holt de heparina (HP) [1]. O termo heparina (*hepathos* = fígado) foi designado pelos seus próprios descobridores em 1918. Até 1928, pouco se conhecia sobre a estrutura da HP, até que o estudo químico desenvolvido por Howell em 1928 mostrou que se constituía de um carboidrato, mais especificamente um glicosaminoglicano (GAG). Embora tenha sido descoberta em 1916, seu uso clínico na prevenção de tromboembolismo venoso foi iniciado após algumas décadas, em 1940, devido a dificuldades na purificação e padronização terapêutica [2,3]. Atualmente ainda reservam-se alguns questionamentos com relação a sua atividade biológica e desde a sua descoberta, em 1916, muitos estudos têm sido feitos com relação à sua estrutura química e sua farmacologia.

1.1.2. Propriedades físico-químicas.

A heparina apresenta cadeia linear constituída por uma seqüência alternada de unidades sulfatadas de ácido urônico e D-glucosamina com ligações do tipo α e β (1 \rightarrow 4). O ácido urônico podendo ser o ácido L-Idurônico ou ainda o ácido D-glucurônico e as unidades de D-glucosamina apresentam-se *N*-sulfatadas ou *N*-

acetiladas. As moléculas de ácido L-Idurônico apresentam-se sulfatadas na posição C2 e as unidades de D-glucosamina apresentam-se N-sulfatadas e 6-O sulfatadas (Fig. 1) [4].

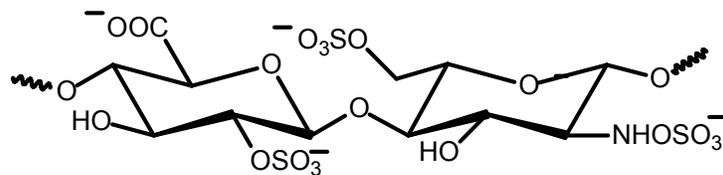


Figura 1. Unidades monossacarídicas repetitivas da Heparina.

O ácido L-Idurônico corresponde entre 70-80% do conteúdo de ácidos urônicos presentes na estrutura da HP e o ácido D-glucurônico corresponde entre 20 a 30% [5]. O alto grau de sulfatação faz da HP o GAG de maior acidez e, conseqüentemente o polieletrólito natural mais fortemente carregado. Tal característica química contribui para a relativa facilidade de localizar a HP em tecidos animais empregando-se corantes acidófilos como, por exemplo, o azul de metileno (AM) [6].

A HP é biosintetizada e armazenada exclusivamente em mastócitos. Tecidos animais ricos em mastócitos como os pulmões de bois e mucosa intestinal de porcos são utilizados como fonte de HP [7]. Com relação aos aspectos físico-químicos, a HP comporta-se como polieletrólito em soluções aquosas (principalmente em pH > 6) devido a sua elevada densidade de carga negativa. Na HP sódica, os prótons ácidos das unidades de sulfonatos são substituídos parcialmente por íons de sódio. A HP também pode apresentar-se na forma de sais de cálcio.

Atualmente, existem duas formas de heparinas (HPs) disponíveis para uso clínico: HPs com massa molar em torno de 3000 a 30000 Daltons, em geral 15000 Daltons, são denominadas de HPs não fracionadas e as moléculas com massas molares entre 2000 a 10000 Daltons, denominadas de HPs de baixa massa molar [8].

1.1.3. Fatores que contribuem para inibição da coagulação sanguínea.

Constata-se na literatura científica que a HP atua na liberação e ativação de lipoproteínas e lipases hepáticas, possui efeito diurético, antiinflamatório e antiviral e atua na promoção da fibrinólise [2]. A HP exerce sua função anticoagulante indiretamente, por atuar como cofator da antitrombina (proteína inibitória da coagulação) [9]. A HP aumenta em até 1000 vezes a atividade desta proteína, possibilitando a interferência no processo final de coagulação, que consiste na conversão da protrombina em trombina que, por sua vez, promove a conversão do fibrinogênio em fibrina, originando o coágulo [6].

A ligação da antitrombina à HP induz uma mudança conformacional na molécula de antitrombina, a qual acelera grandemente a inibição de vários fatores de coagulação, principalmente os fatores Xa e IIa (trombina) [10,11]. A inativação da trombina (fator IIa) pela HP é dependente do tamanho da cadeia sacarídica, ou seja, a HP retirada da mucosa intestinal não é eficaz na inibição da coagulação sanguínea quando comparada com a HP extraída dos pulmões, [12]. HPs com menos de 18 unidades monossacarídicas (massa molar menor que 5400 Daltons), não podem ligar-se à trombina e à antitrombina simultaneamente, sendo incapazes de inibir a trombina através da antitrombina [13]. A atividade anticoagulante da HP é atribuída principalmente aos substituintes sulfato e carboxil, os quais deixam este biopolímero com uma incomum alta densidade de carga negativa. Estudos com HPs modificadas e oligossacarídeos obtidos da mesma indicaram que cada uma dessas cargas negativas é significativa para assegurar uma alta atividade anticoagulante [14,15]. HPs supersulfatadas apresentam diminuição significativa de sua atividade anticoagulante quando comparadas com a HP padrão. Este efeito se deve à provável ocorrência de sulfatação em posições artificiais no polissacarídeo. Isto sugere que a atividade

anticoagulante da HP, via antitrombina, não dependa somente de seu conteúdo de grupos sulfato e carboxil, mas também da posição desses grupamentos na estrutura do polissacarídeo [16].

A HP não fracionada é utilizada na prevenção e tratamento de trombose venosa profunda e tromboembolismo pulmonar. É também um importante agente na prevenção de acidentes tromboembólicos, freqüentemente observados no período pós-operatório de alguns tipos de cirurgias, principalmente pélvicas e ortopédicas [17]. A administração da HP é realizada por via intravenosa ou subcutânea não existindo um mecanismo para a via oral. O efeito é imediato quando administrada por via intravenosa, em contraste, existe considerável variação na biodisponibilidade quando a administração é realizada pela via subcutânea. A biodisponibilidade da HP pela via subcutânea é baixa e dose-dependente. O início da ação da HP administrada por esta via ocorre entre 20 a 60 minutos [2].

Devido à alta quantidade de cargas negativas e à alta massa molar, a HP é geralmente ineficiente quando administrada através da via oral [18]. Entretanto vários estudos têm demonstrado que HPs não fracionadas e HPs de baixa massa molar, quando administradas através do tubo estomacal de camundongos, ratos, e coelhos possuem atividade antitrombótica em baixas doses [19-21]. Embora a administração de HP pela via oral demonstre atividade antitrombótica, pouco é conhecido sobre a farmacocinética. Sabe-se apenas, que quando a HP é administrada por via oral as moléculas são incorporadas em células endotélias. Também foi observado que uma quantidade muito pequena é encontrada no plasma [22].

1.1.4. Efeitos colaterais.

Os efeitos adversos mais comumente observados com o uso da HP são a trombocitopenia induzida (TIH), hemorragia e osteoporose. Entre os efeitos adversos conhecidos na terapia com HP, a TIH, é sem dúvida a mais freqüente e importante [23]. A TIH é definida quando ocorre a diminuição de 50% do número de plaquetas em relação à contagem de plaquetas antes do início da terapia com HP [24]. Pacientes que recebem altas doses de HP (15000 a 30000 UI Kg⁻¹ ao dia) por períodos superiores há seis meses podem desenvolver osteoporose, entretanto o mecanismo pelo qual a HP produz osteoporose é incerto [25]. Estudos sugerem que a HP liga-se a diferentes íons incluindo o cálcio, impedindo assim a calcificação [26].

1.2. Complexos polieletrólíticos e hidrogéis a base de quitosana utilizados em remoção de íons metálicos em águas residuais.

Cientistas têm dado muita atenção nos dias atuais para as novas descobertas que ajudam a diminuir a poluição na biosfera. Poluição esta que é causada principalmente por agentes orgânicos e inorgânicos. Neste contexto, os metais tem tido maior atenção, principalmente pela toxicidade de muitos deles, mesmo em baixas concentrações [27]. A remoção de íons metálicos de detritos e de águas industriais é um grande problema nos dias atuais. Processos de precipitação, troca iônica, entre outros, têm sido empregados no tratamento de efluentes com elevado teor de metais [28]. Destes, a precipitação é a mais comumente empregada. Devido à baixa seletividade do primeiro processo (precipitação) e do alto custo do segundo (troca iônica) inúmeros estudos têm objetivado a busca de novos materiais (hidrogéis superabsorventes) que possibilitem a remoção de íons metálicos em águas residuais por processos não convencionais [29]. Os

hidrogéis a base de polímeros naturais (quitina, quitosana, amido, celulose), principalmente a base de quitosana (QT) tem despertado grande interesse de pesquisadores, devido as suas excelentes propriedades [30].

A QT é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos. A quitina é o biopolímero orgânico mais abundante da natureza, após a celulose [31,30]. Enquanto a quitina é inerte e insolúvel, a QT é reativa e solúvel em ácidos orgânicos fracos ou diluídos como ácido acético 3% e ácido fórmico. A QT é insolúvel em água, podendo ser caracterizada como um polieletrólito catiônico. Sua estrutura é formada pela repetição de unidades $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amino-2-desoxi-D-glicose ou (D-glucosamina) apresentando uma cadeia polimérica similar à da celulose, exceto pela substituição dos grupos hidroxila na posição 2 por grupos acetamida (Fig. 2).

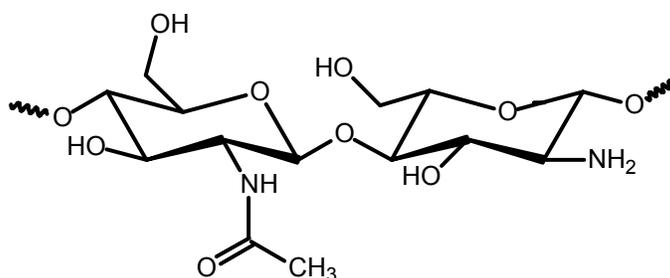


Figura 2. Unidades monossacarídicas repetitivas da Quitosana.

O pKa do grupo amino da QT situa-se entre 5,9 e 6,7 e depende da dimensão da cadeia polimérica [32]. Os grupos amino atuam como polieletrólitos catiônicos em $\text{pH} < 6,5$, portanto podem servir como sítios quelantes.

Há cerca de três décadas a QT está sendo usada em processos de purificação e tratamento de água para remoção de óleo. Dessa forma, modificações químicas na superfície deste biopolímero e conseqüente imobilização de agentes complexantes

melhoram a seletividade por íons específicos e podem caracterizar novos materiais adsorventes [33]. Este biopolímero tem sido amplamente utilizado na adsorção de metais pesados, principalmente mercúrio, cádmio, zinco, cobre e urânio [34]. A presença de um percentual elevado de grupos amino distribuídos na cadeia polimérica confere à QT características de uma polibase, capaz de neutralizar soluções ácidas e provocar a precipitação de vários íons de metais em soluções aquosas ácidas [35].

Por ser um polissacarídeo catiônico, a QT reage com substâncias macromoleculares similares de cargas opostas como, por exemplo, alginato, sulfato de condroitina, pectina e HP formando complexos polieletrólíticos (PECs).

A existência de uma espécie macromolecular aniônica na matriz polimérica favorece a interação com íons de cargas opostas. Microesferas de QT reticulada com epícloridrina e impregnadas com HP apresentaram resultados significantes quanto a adsorção de íons Cu(II) [36]. A adição de um agente de reticulação (epícloridrina) se faz necessária para proporcionar estabilidade ao material polimérico. A impregnação de HP na matriz polimérica possibilita o aumento de grupos funcionais favorecendo interações eletrostáticas com metais. Desta forma, promove-se melhor especificidade e seletividade ao material o que ajuda na adsorção de íons metálicos [36].

A QT possui uma capacidade de adsorção de cinco a seis vezes superior a da quitina [37]. A dissolução de tripolifosfato de sódio ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$) (TPF) em uma solução de QT induz reticulação iônica entre estas substâncias e propicia a obtenção de micropartículas [38]. A reticulação da QT com TPF possibilita maior estabilidade ao material obtido e introduz grupos fosfatos, os quais possuem sítios básicos que poderão interagir com íons H_3O^+ e íons metálicos em solução aquosa podendo aumentar sua capacidade de remediação de ambientes aquáticos contaminados pela mineração de

carvão. A reticulação iônica da QT com TPF mostrou-se eficaz também na adsorção de íons Cu(II) (Fig. 3) [39].

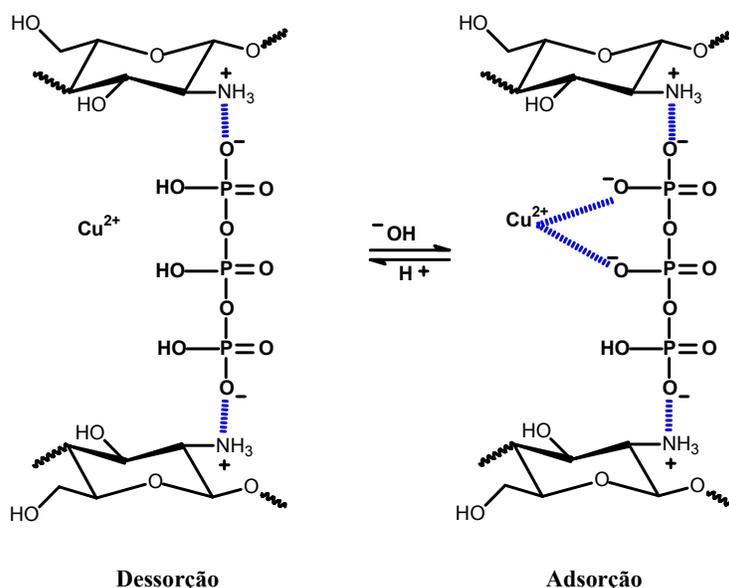


Figura 3. Dependência do pH para a ocorrência de adsorção e dessorção de íons Cu(II) em matriz de quitosana reticulada com TPF [39].

1.3. Complexos polieletrólíticos e hidrogéis a base de quitosana utilizados em liberação controlada de fármacos.

Nos últimos anos muitos grupos de pesquisas na área de materiais poliméricos têm dado muita atenção para sistemas de entrega específica. Estes sistemas oferecem grandes vantagens sobre os sistemas farmacêuticos convencionais [40], devido à liberação do fármaco diretamente no sítio de ação [41], proteção da substância ativa em condições ácidas, redução do número de doses e pequena variação na concentração do fármaco com o tempo, aumentando a ação terapêutica. O mecanismo de entrega controlada difere das formas farmacêuticas convencionais, que incluem principalmente complexos de sais, suspensões, emulsões e comprimidos. Para estes sistemas de

liberação controlada preferem-se a administração através da via oral, devido à fácil manipulação, maior conforto, menor risco e custo [40].

Entretanto, a administração por esta via apresenta limitações devido a vários fatores que afetam o modo de absorção de fármacos. No organismo humano as substâncias são absorvidas no intestino delgado e então levadas para todo o corpo através da corrente sanguínea. Muitas destas substâncias degradam quando estão em contato com o pH do estômago (pH ~ 2). Assim, estas substâncias ao atingirem a região gástrica se degradam e para que uma fração do fármaco passe por essa região sem se degradar são necessárias altas doses e isto pode ser nocivo ao paciente. Dessa forma, têm sido desenvolvidas medidas para se contornar esse problema. Uma dessas medidas seria a administração da substância via parenteral (injeção) o que inclui as vias subcutânea, intramuscular e endovenosa. Porém, essas vias podem causar dores no local da injeção, riscos de infecção ou reações alérgicas ao paciente e, portanto, algumas rejeições e contra-indicações podem existir.

Dessa forma, a administração através da via oral pode ser utilizada fazendo o uso de sistemas carreadores de fármacos. Estes sistemas podem ser obtidos através de PECs. Quando dois polímeros com cargas opostas são misturados em meio aquoso a atração eletrostática entre eles pode conduzir à formação de (PECs). Desta forma, PECs são estruturas formadas por interações físicas entre um polímero que possui grupos com cargas positivas e outro com cargas negativas em solução. Tais materiais podem ser obtidos a partir da QT (Fig. 2) e HP (Fig. 1) respectivamente [42]. A atração eletrostática entre os grupos catiônicos e grupos aniônicos de polieletrólitos são as principais interações na formação dos PECs. Elas são mais fortes do que quaisquer outras interações secundárias, tais como ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e interação de Van der Waals [43]. Se as interações entre os polieletrólitos de

cargas opostas forem muito intensas, os PECs podem precipitar [43]. Os PECs podem ser sensíveis às alterações de pH e força iônica de soluções aquosas. Dependendo do meio em que estão inseridos, podem exibir alta densidade de carga e diferentes comportamentos de intumescimento. Esta característica permite a difusão de moléculas de água e de solutos, tais como fármacos [44] e proteínas do interior da matriz dos PECs [45] para o meio de intumescimento.

O PEC formado entre HP (polímero aniônico) e QT (polímero catiônico) foi estudado por Kweon e colaboradores [46] (Fig. 4).

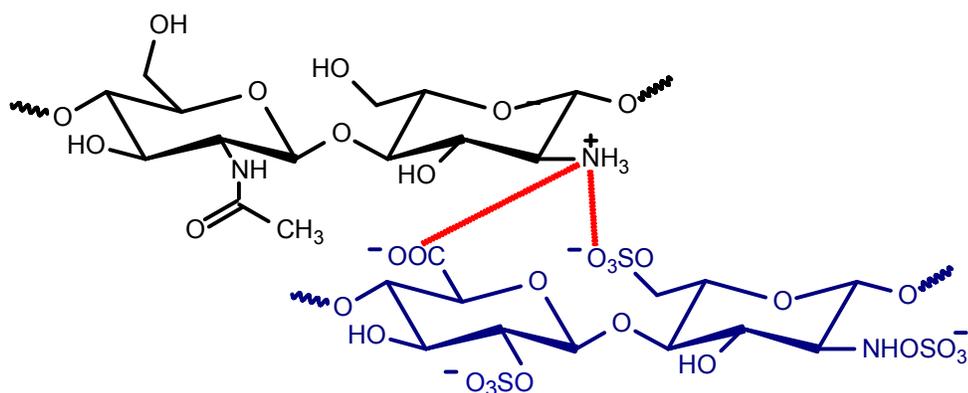


Figura 4. PEC de Quitosana e Heparina.

Sistemas assim constituídos podem apresentar interações eletrostáticas fortes e continuam a apresentar estabilidade relativa mesmo variando o pH [42]. Materiais com estas características apresentam grandes vantagens em relação aos hidrogéis irreversíveis (cadeias poliméricas hidrofílicas tridimensionais, reticuladas covalentemente) por apresentarem, frequentemente, constituintes tóxicos em sua matriz. Em se tratando de PEC de QT/HP, a QT apresenta importantes características para obter sistemas como o descrito acima, pois é um polímero obtido a partir da fonte natural quitina, é catiônico, portanto interage com a HP através de interações eletrostáticas, além de ser biodegradável o que facilita a sua eliminação pelo corpo humano.

Por se tratar de um polímero de fonte natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico a QT tem sido proposta como material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia e medicina [47]. A QT é biocompatível com tecidos vivos por não causar reações alérgicas e rejeições, degradada sob a ação de fermentos e é facilmente removível do organismo sem causar reações colaterais.

Sistemas de micropartículas cuja matriz é composta de QT foram estudados no sentido de tratar infecções gástricas, pois podem atingir uma área extensa da mucosa e liberar o fármaco instantaneamente [48]. O grupo amino protonado da QT permite o estabelecimento de diferentes tipos de interação com fármacos iônicos e não iônicos [49] e também fornece sistemas pH-sensíveis, que intumescem em pH gástrico permitindo uma liberação local-específica [50].

A vantagem dos PECs em relação aos hidrogéis irreversíveis se deve a não necessidade de acrescentar uma substância que atue na reticulação (formação do arranjo tridimensional), ou seja, um agente de reticulação que é imprescindível na síntese de hidrogéis irreversíveis. Na maioria das vezes os agentes de reticulação são substâncias danosas a saúde (substâncias tóxicas), e possa uma vez incorporado à matriz polimérica, diminuir sua possível biodegradabilidade e biocompatibilidade. A microencapsulação de fármacos é uma alternativa da qual se tem lançado mão para minimizar e até eliminar efeitos colaterais indesejáveis [51].

O genipin é uma substância natural atóxica extraída de plantas medicinais. Tem sido relatado em trabalhos recentes que esta substância liga-se covalentemente a QT, atuando como agente de reticulação. Estudos indicaram enorme vantagem deste agente comparado às substâncias sintéticas, pois o genipin apresenta em torno de 5000 a 10000 vezes menor toxicidade em relação ao glutaraldeído [52].

Um sistema alternativo que pode ser potencialmente útil na remoção de HP da circulação sanguínea foi desenvolvido por Kaminski e colaboradores [53]. Este sistema é baseado na aplicação de microesferas de QT utilizando genipin como agente de reticulação. A principal vantagem do dispositivo polimérico proposto acima é que todos os reagentes básicos utilizados para preparar as microesferas (QT, genipin, surfactantes) são de baixo custo e atóxicos. A taxa de remoção de HP pode ser ajustada alterando o valor de pH. Além disso, para permitir a remoção de HP em maiores valores de pH, fez-se a modificação da QT com cloreto de glicidiltrimetilamônio (GTMAC). A modificação torna o nitrogênio do grupamento amino da QT quaternário mantendo uma carga positiva nos átomos de nitrogênio mesmo em pH alcalino. Isto resultou em uma alta taxa de remoção de HP em pH típico do sangue (7,4). A carga positiva remanescente nos átomos de nitrogênio dos grupos amino da QT favorece a interação eletrostática com grupos sulfatos existente ao longo da cadeia polimérica da HP (Fig. 5). Portanto, verificou-se a remoção de HP mesmo o meio sendo alcalino.

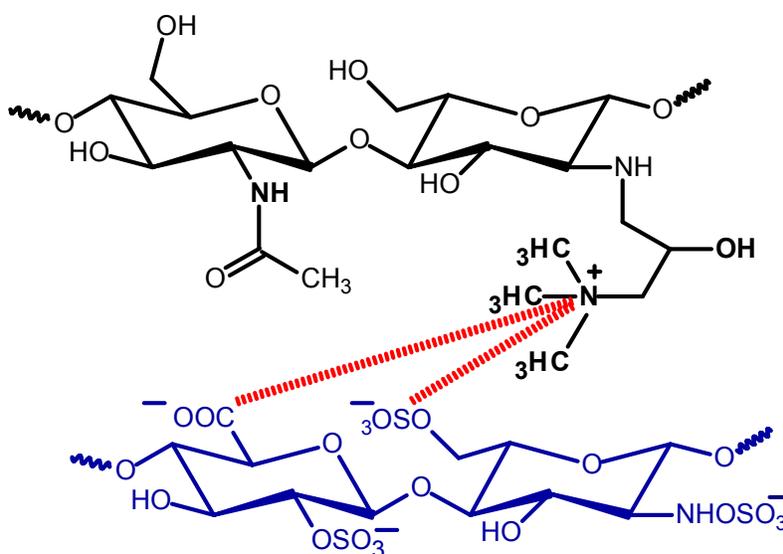


Figura 5. Interação eletrostática entre o derivado de Quitosana e Heparina [53].

1.4. Quitosana versus *N,N,N*-Trimetilquitosana (TMC) em liberação controlada.

A QT possui propriedades interessantes, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, atoxicidade, mucoadesividade e atividades antimicrobianas. Devido a isso, tem sido extensivamente estudada e aplicada em diversas áreas [54-58]. O grupo amino presente na estrutura sacarídica da QT atua como polieletrólito catiônico em pHs < 6,5; [59,60] mas é insolúvel em pH \geq 6,5. Essa insolubilidade restringe a aplicação biomédica da QT, principalmente em situações onde a entrega controlada de fármacos é necessária. Para superar essa limitação, pesquisadores têm sintetizado derivados que apresentam solubilidade em ampla faixa de pH, incluído o fisiológico (7,4) [61].

Neste sentido, vários grupos de pesquisadores obtiveram a *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC) (Fig. 6), que é solúvel em grande faixa de pH [62,63]. Assim, a TMC tem atraído a atenção de químicos de polímeros e outros, pois este pode manter, ou superar algumas propriedades da QT. Por exemplo, este derivado pode manter a biodegradabilidade, biocompatibilidade, mucoadesividade e atoxicidade, além de melhorar a ação antimicrobiana em relação à QT, assegurando assim, um futuro promissor em algumas aplicações biotecnológicas [64]. Na área de liberação controlada de fármacos a TMC permite maior solubilidade e permeabilidade em meios básicos e neutros [65-67]. Pesquisas têm mostrado que a TMC pode melhorar a permeação de peptídeos e algumas proteínas na região do trato gastrointestinal [68-70].

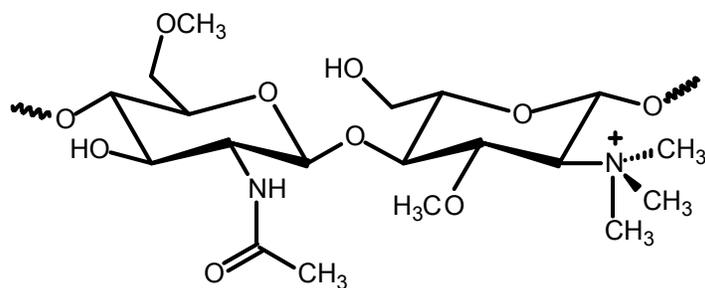


Figura 6. Estrutura da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC).

É bem conhecido que a absorção de medicamentos dirigida para a corrente sanguínea ocorre na região intestinal, onde o pH é ligeiramente alcalino (7,4). De tal forma, novos materiais poliméricos (hidrogéis) com base na TMC podem ser desenvolvidos visando à liberação controlada de fármacos (no trato gastrointestinal) e ainda pode vir a apresentar utilidade promissora em culturas de células, regeneração e reparação de tecidos [71].

A TMC possui um interesse particular devido a sua estrutura definida, melhor solubilidade e fácil preparo [62,63]. Le Dung e colaboradores [62] obtiveram a TMC com aproximadamente 35% de substituição. Sieval e colaboradores [63], com base nos resultados de Le Dung, buscaram desenvolver uma nova rota sintética que obtivessem TMC com diferentes e preferivelmente graus de quaternização (GQ) maiores. A intenção era investigar o efeito da metilação na QT em aplicações farmacêuticas. Sieval confirmou experimentalmente que Le Dung interpretou erroneamente seus resultados, segundo ele, Le Dung obteve TMC com apenas 15% de quaternização. Com a nova metodologia desenvolvida, em duas etapas de reação, Sieval pode obter TMC com GQ próximos e superiores a 60%.

A TMC pode apresentar solubilidade em concentração de até 5% (m/v), fato este de grande importância, pois reduz a limitação de baixa solubilidade da QT. Em um procedimento de três etapas foi possível obter TMC com maiores GQ (GQ > 85%).

Porém, esta via sintética resultou também na metilação completa do oxigênio do grupamento álcool presente na QT. Por isso, a solubilidade da TMC foi diminuída consideravelmente [63].

Dessa forma, com a TMC novos materiais poliméricos (hidrogéis) podem ser desenvolvidos para fins de liberação controlada de fármacos na região intestinal. Portanto, processando a metilação da QT obtém-se a produção da TMC, derivado hidrossolúvel que possui cargas positivas permanentes ao longo das cadeias, devido à quaternização dos grupos amino.

2. OBJETIVOS

- Sintetizar a *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC), derivado hidrossolúvel da Quitosana (QT).
- Caracterizar a QT e a TMC através das técnicas de RMN de polarização cruzada (CP-MAS RMN ^{13}C) e espectroscopia de infravermelho (FTIR) e ainda quantificar o grau de quaternização (GQ) da TMC por RMN ^1H .
- Preparar complexos polieletrólíticos de quitosana/heparina em pH 5 (PEC1-5) e *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina (PEC2), sendo este último em ampla faixa de pHs e caracterizar os PECs e precursores por meio de RMN de sólidos (CP-MAS RMN ^{13}C) e espectroscopia de infravermelho (FTIR).
- Caracterizar as propriedades físico-químicas dos complexos polieletrólíticos de *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina utilizando as técnicas de TGA, DSC e Difração de raio-X e correlacionar com suas estruturas.
- Analisar a morfologia do PEC2-8 através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

- Estudar, utilizando sistemas *in vitro*, a liberação controlada de heparina a partir dos PECs de TMC/HP (PEC2) obtidos em pH 8 e 12 (PEC2-8 e PEC2-12) e avaliar a estabilidade destes materiais em meio ácido, condição de pH próxima da encontrada na região gástrica.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Materiais

Quitosana (CAS 9012-76-4) com grau de desacetilação de 85% e massa molecular média de $87 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ foi adquirida através da Golden-Shell Biochemical (China); Iodeto de Metila (CAS 74-88-4), *N*-metil-2-pirrolidona (CAS 872-50-4) e Azul de Metileno (CAS 97130-83-1) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Heparina Sódica (CAS 9041-08-1) foi gentilmente fornecida pela Kin Master (Passo Fundo/RS, Brasil). Outros reagentes tais como, Hidróxido de Sódio, Iodeto de Sódio, Cloreto de Sódio, Ácido Clorídrico, Etanol e Éter Etílico, todos de grau analítico, foram também utilizados neste trabalho. Todos os reagentes foram empregados como recebidos, pois não houve necessidade de processos adicionais de purificação.

3.2. Procedimentos

3.2.1. Modificação química da quitosana, síntese da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC).

A metodologia empregada neste trabalho para a obtenção da TMC está apresentada na Figura 7 e foi adaptada do trabalho de Sieval e colaboradores [63].

A TMC foi sintetizada através de uma reação de metilação redutora da QT, utilizando Iodeto de Metila (CH_3I) na presença de base (NaOH) a $60\text{ }^\circ\text{C}$. A QT (2 g) e 4,8 g de Iodeto de Sódio (NaI) foram dissolvidos em 80 mL de *N*-metil-2-pirrolidona (NMP) em banho de água a $60\text{ }^\circ\text{C}$ com agitação magnética. Em seguida, foram adicionados ao meio reacional 11 mL de uma solução aquosa de NaOH (15% m/v) e 11,5 mL de CH_3I . A solução foi mantida em refluxo e agitada durante 1 h e depois disso o produto resultante foi precipitado em etanol. Assim, o material foi separado por centrifugação, lavado várias vezes com etanol e éter etílico e finalmente filtrado a vácuo e seco em estufa a $40\text{ }^\circ\text{C}$. Em uma segunda etapa o produto foi novamente dissolvido em 80 mL de NMP em banho de água a $60\text{ }^\circ\text{C}$ e agitação magnética juntamente com 4,8 g de NaI . Novamente, após a completa solubilização o sistema foi colocado em refluxo e, em seguida, foram adicionados ao meio reacional 11 mL de uma solução aquosa de NaOH (15% m/v) e 7 mL CH_3I . Após 30 minutos de reação foram adicionados 0,6 g de NaOH e 2,0 mL de CH_3I e a solução resultante foi mantida sob agitação por mais 1 h. Depois deste tempo, o produto foi coletado e seco. O produto obtido até esta etapa foi o Iodeto de *N,N,N*-trimetilquitosana. Em uma etapa final, o produto resultante foi solubilizado em 40 mL de uma solução aquosa de cloreto de sódio (10% m/v) para a troca e remoção do íon iodeto (I^-) pelo íon cloreto (Cl^-). Por fim, obteve-se um precipitado branco o cloreto de *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC).

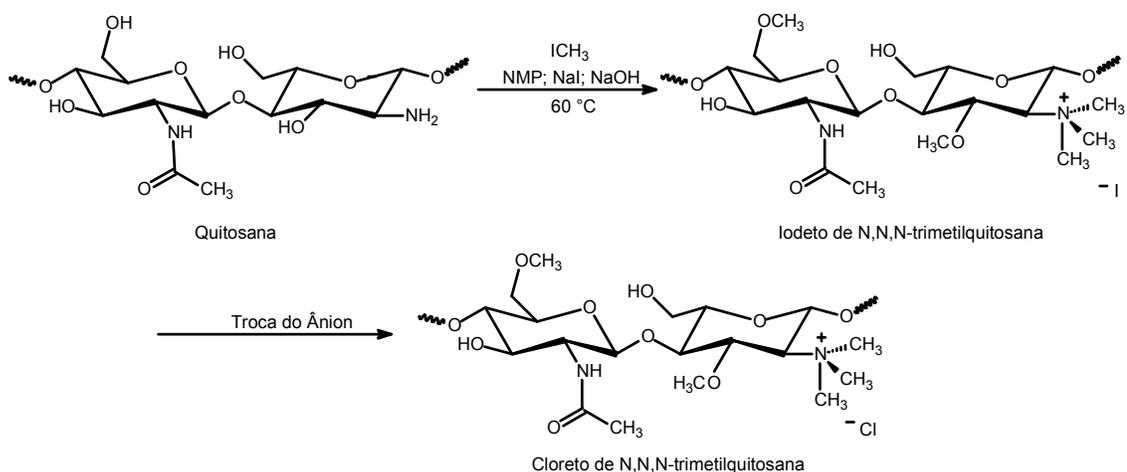


Figura 7. Esquema de reação: síntese da *N,N,N*-trimetilquitosana (TMC).

3.2.2. Formação dos complexos polieletrólíticos de quitosana/heparina (PEC1-5) e *N,N,N*-trimetilquitosana/heparina (PEC2).

Para a obtenção dos PECs de TMC/HP (PEC2), inicialmente foram preparadas soluções de TMC 1% m/v (10 mL) nos pHs 5, 8, 10 e 12. O pH para cada solução foi ajustado com auxílio de soluções aquosas de hidróxido de sódio e/ou ácido clorídrico, 1 mol L⁻¹ e 0,1 mol L⁻¹, respectivamente. Posteriormente, 3 mL de uma solução de HP 1% (m/v) foram adicionados às soluções de TMC já preparadas e com os pHs corrigidos. A adição de HP foi feita lentamente em temperatura ambiente sob agitação magnética. O procedimento acima foi repetido para o preparo do PEC de QT/HP em pH 5 (PEC1-5). Nesse caso, utilizou-se uma solução de QT 1% m/v em pH 5 ao invés da solução de TMC. Depois do preparo dos PECs, estes foram congelados em nitrogênio líquido, liofilizados a -55 °C por 48 h e foram obtidos, como produtos finais, sólidos de coloração branca.

Os PEC2, preparados em meio alcalino, adquiriram estabilidade. Por isso, foram obtidos na forma de precipitado. O sobrenadante foi removido para que o precipitado pudesse ser congelado antes de proceder à liofilização. O pH dos sobrenadantes

manteve-se próximo aos valores das soluções originais de TMC. Somente o PEC2-5 (PEC de TMC/HP preparado em pH 5) não adquiriu estabilidade suficiente para precipitar, por isso apresentou-se na forma de suspensão. Já o PEC1-5 apresentou uma fração solúvel em água. A fração solúvel deste PEC foi separada por filtração, em seguida congelada em nitrogênio líquido e liofilizada a -55°C por 24 h para posterior análise.

3.2.3. Ensaio *in vitro* de liberação controlada de heparina a partir da matriz do PEC2-8 e PEC2-12 utilizando azul de metileno.

Após serem liofilizados, o PEC2-8 e o PEC2-12 foram processados para formar pastilhas de aproximadamente 100 mg (diâmetro de 1 cm e espessura de 1 mm) e colocados em 15 mL de água destilada (pH \sim 6) a 37°C . Alíquotas de 100 μL foram coletadas do sobrenadante e a concentração de HP foi avaliada em função do tempo, como descrito a seguir. As alíquotas foram adicionadas diretamente a um volume de 4 mL (pH \sim 6) de uma solução aquosa de Azul de Metileno (AM) 5 mg L^{-1} . A quantificação de HP liberada a partir do PEC2-8 e PEC2-12 foi feita a partir de uma curva analítica que confirma a crescente absorvância do complexo metacromático de azul de metileno/heparina (AM/HP) com o aumento da concentração de HP [72-74]. A curva obtida é constituída de 8 pontos, variando a concentração das soluções de HP adicionadas à solução de AM. As soluções de HP que foram usadas para obter a curva foram preparadas com as concentrações de 0,2; 0,4; 0,8; 1,0; 3,0; 5,0; 6,0 e 7,0 mg L^{-1} . As medidas de absorvância do complexo AM/HP foram realizadas imediatamente após a mistura e homogeneização das amostras do complexo AM/HP usando um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV MINI 1240 de marca Shimadzu, no comprimento de onda de 567 nm.

Para a construção da curva analítica e quantificação da HP liberada em função do tempo, as medidas de absorvância foram repetidas duas vezes ($n = 2$). Então, a partir da curva de calibração pode-se quantificar a massa de HP em cada alíquota de 100 μL do estudo de liberação. Para a análise da quantidade em massa de HP incorporada na complexação do PEC2-8 e PEC2-12, 100 μL do sobrenadante foi coletado logo após a precipitação dos materiais e imediatamente adicionado a solução de AM (4 mL). As quantidades de HP complexada no PEC2-8 e no PEC2-12 foram determinadas efetuando-se a diferença entre a quantidade de HP adicionada inicialmente e a quantidade de HP existente no respectivo sobrenadante, após a obtenção do material que permaneceu sem reagir.

3.2.4. Estudo da estabilidade do PEC2-8 em pH 2.

Inicialmente 300 mg do PEC2-8 foram colocados em contato com uma solução aquosa de ácido clorídrico de pH 2 (50 mL). Esta solução foi mantida a temperatura ambiente e sob agitação por 24 horas. Após este tempo o PEC2-8 foi centrifugado e seco em estufa a 30 °C.

3.3. Caracterizações

3.3.1. Espectroscopia de infravermelho (FTIR).

Foram obtidos espectros FTIR dos precursores (QT, TMC e HP) e dos PECs, em pastilhas de KBr, a 3% m/m. Os espectros foram adquiridos no modo de transmitância com resolução típica de 2 cm^{-1} utilizando um espectrômetro de marca Bomem-MB 100. Para isso, foram acumuladas 64 varreduras para cada espectro.

3.3.2. Espectroscopia de RMN ^1H e ^{13}C (CP-MAS).

Os espectros de RMN ^1H da QT e da TMC foram adquiridos utilizando um espectrômetro de RMN Varian, Mercury Plus 300 BB, operando em 300,06 MHz para a frequência do ^1H . Para a aquisição dos espectros de RMN ^1H , foram utilizadas soluções de QT e de TMC (10 mg) dissolvidas, respectivamente, em 0,7 mL $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$ (100/1 v/v) e D_2O . Os espectros de RMN ^1H foram adquiridos em temperatura ambiente e os principais parâmetros para a aquisição foram os seguintes: um pulso de 45° ; tempo de relaxamento de 10 s e 128 acúmulos de sinais. Dados de domínio do tempo foram apodizados com função exponencial de 0,2 Hz (LB) para melhorar a relação sinal-ruído antes de aplicar a transformação de Fourier.

Os espectros de RMN ^{13}C de estado sólido dos PEC2, PEC1-5, HP, QT e TMC foram adquiridos utilizando a técnica de polarização cruzada CP-MAS. Os principais parâmetros para a aquisição foram: largura do pulso de $\pi/2$; tempo de contato 3 ms e tempo de espera 3 s. Todos os espectros foram apodizados por uma função de decaimento exponencial (LB) de 50 Hz. As amostras foram colocadas em Si_3N_4 , rotor de 7 mm de diâmetro, que foi rotacionada em 4 KHz durante as medições. Os deslocamentos químicos foram referenciados externamente, definindo a ressonância de carbonos metílicos com hexametilbenzeno (HMB) em 17,3 ppm. Para ajudar na atribuição dos deslocamentos químicos (δ) de ^1H e ^{13}C foram realizados experimentos em 2D (RMN ^1H 2D gHSQC e gCOSY).

3.3.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A morfologia do PEC2-8 foi avaliada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando um equipamento Shimadzu, modelo SS-550. Antes das

análises, foi depositada uma fina camada de ouro sobre a superfície da amostra para torná-la eletricamente condutora. As imagens foram obtidas aplicando uma tensão de aceleração de elétrons entre 10 a 12 kV. Para isso, imediatamente após a obtenção do PEC2-8, este foi congelado em nitrogênio líquido, liofilizado por 48 h a -55 °C e fraturado.

3.3.4. Análise Térmica

3.3.4.1. Análise Termogravimétrica (TGA)

Análises de TGA e DTG dos PEC2 e dos precursores HP, QT e TMC foram realizadas em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TG-50, operando com taxa de aquecimento 10 °C min^{-1} , em atmosfera de gás nitrogênio com fluxo de 50 mL min^{-1} , na faixa de temperatura entre 25 a 600 °C .

3.3.4.2. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Todos os PEC2 foram submetidos a análises calorimétricas por DSC. Os ensaios foram realizados em um equipamento Shimadzu, modelo DSC-50, operando com taxa de 10 °C min^{-1} , sob fluxo de nitrogênio gasoso de 50 mL min^{-1} , na faixa de temperatura de 25 a 400 °C .

3.3.5. Difração de Raios-X

Após serem liofilizados e triturados, os precursores (QT, TMC e HP) e os PEC2 foram caracterizados por meio de difração de raio-X de alto ângulo (WAXS). As medidas foram conduzidas em um difratômetro Shimadzu, modelo XRD-6000,

operando na região de 5° a 70° com resolução 0,02° e velocidade de $2\theta = 2^\circ \text{ min}^{-1}$. A radiação foi gerada em linha de Cu K_α a 40,0 kV e 30,0 mA ($\lambda = 0,15418 \text{ nm}$). Foi usado um sistema de fenda de 0,300 mm para coleta do feixe de luz difratada com ângulo de divergência de 1°.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos precursores, PEC1-5 e PEC2 através da Espectroscopia de Infravermelho (FTIR).

Os espectros de FTIR da TMC, QT, HP, PEC1-5 e PEC2-5 são apresentados na Figura 8 enquanto na Figura 9 são mostrados os espectros de FTIR da TMC, HP e PEC2 obtidos em pHs 5, 8, 10 e 12 (PEC2-5, PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12).

A banda em 1489 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular das ligações C-H do grupamento metílico, existentes em maior proporção na TMC (Figs. 8a e 9f) em relação à QT (Fig. 8e) [75-77]. Os sinais em 2939 e 2896 cm^{-1} que aparecem nos espectros da HP e TMC foram atribuídos aos estiramentos característicos das ligações C-H e permanecem nos espectros dos PEC2 (Fig. 8b, 9b, 9c, 9d e 9e) [75-77]. As bandas em 2931 e 2889 cm^{-1} presentes no espectro FTIR do PEC1-5 (Fig. 8d) foram atribuídas ao estiramento das ligações C-H que aparecem com menor intensidade no espectro de FTIR da QT (Fig. 8e) comparado com o espectro de FTIR da TMC (Fig. 8a). Ainda, as bandas em 1661 e 1601 cm^{-1} presentes no espectro da QT (Fig. 8e) são referentes às ligações C=O de amida secundária e às vibrações de amina primária respectivamente [78]. Nos espectros dos PECs, a banda em 1601 desloca-se para menor número de onda, de 1601 cm^{-1} (Fig. 8e) para 1555 cm^{-1} (Figs. 8b, 9b, 9c, 9d e 9e). Além disso, no espectro de FTIR do PEC1-5 esta banda desloca-se ainda mais e aparece em 1521 cm^{-1}

(Fig. 8d). Estes deslocamentos são atribuídos às vibrações das ligações ^+N-H ainda remanescentes na TMC e QT. Portanto, interações iônicas entre QT/HP e TMC/HP podem ser evidenciadas pela análise dos respectivos espectros de FTIR na região entre 1520-1560 cm^{-1} (Figs. 8 e 9).

A banda em 1079 cm^{-1} , atribuída ao estiramento das ligações C-O de alcoóis primários (Fig. 8e), apresenta diferença significativa entre os espectros FTIR do PEC1-5 (Fig. 8d) e PEC2 (Figs. 8b, 9b, 9c, 9d, e 9e) [78]. Esta diferença é atribuída principalmente à complexação da QT com a HP (Fig. 8d), e à existência dos grupamentos e/ou sítios *N*-trimetilados (NT^+), *N*-dimetilados (ND), *N*-monometilados (NM) e *O*-metilados (OM) na estrutura da TMC (Figs. 8b, 9b, 9c, 9d, e 9e). Estes fatores influenciam na intensidade das interações intermoleculares na estrutura da QT (em especial, as ligações hidrogênio) [79].

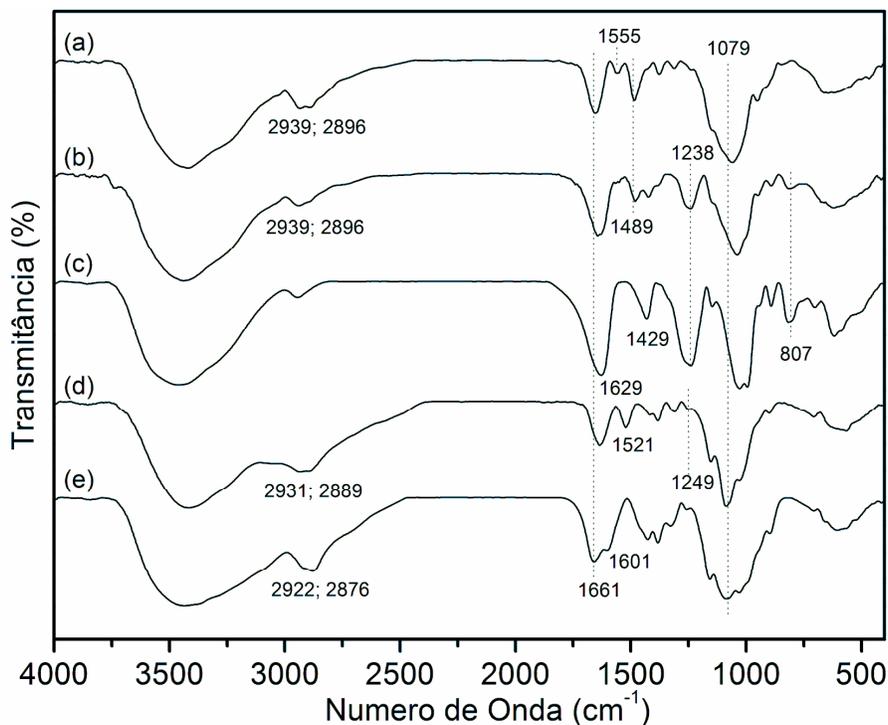


Figura 8. Espectros de FTIR da TMC (8a), PEC2-5 (8b), HP (8c), PEC1-5 (8d) e QT (8e).

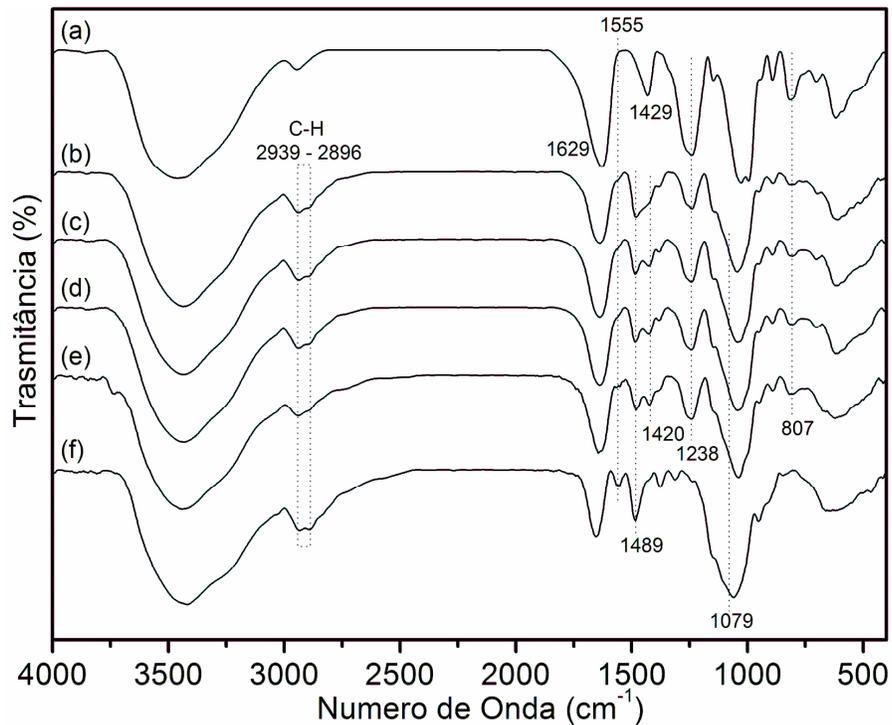


Figura 9. Espectros de FTIR da HP (9a), PEC2-12 (9b), PEC2-10 (9c), PEC2-8 (9d), PEC2-5 (9e) e TMC (9f).

As bandas que aparecem no espectro de FTIR da HP em 1626 cm^{-1} e 1429 cm^{-1} são atribuídas às deformações axiais, assimétrica e simétrica, respectivamente, do ânion carboxilato (Figs. 8c e 9a). Em relação aos PECs, estas bandas possuem mudanças significativas devido à complexação dos grupos COO^- da HP com os grupamentos catiônicos da QT e da TMC. Desta forma, pode ser observada diminuição na intensidade das bandas em 1626 e 1429 cm^{-1} (Figs. 8b, 8d, 9b, 9c, 9d e 9e) [46,80,81].

No espectro FTIR da HP as bandas em 1238 e 807 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica dos grupos S=O e à deformação axial das ligações C-O-S [80,82]. Estas bandas também apresentaram grandes diferenças em relação aos espectros dos PECs obtidos. Por exemplo, além da grande atenuação na banda em 1238 cm^{-1} no espectro do PEC2-5 (Fig. 8b), observa-se o deslocamento da

mesma no espectro do PEC1-5 para 1249 cm^{-1} (Fig. 8d). Isto foi atribuído à complexação dos grupos sulfonatos da HP com policátions ou com cátions simples [80]. Assim, foi sugerida que a existência de interações eletrostáticas entre grupos $^+\text{NH}_3$ da QT com grupos sulfonatos da HP contribuem para a formação do complexo polimérico aniônico-catiônico – PEC1-5 (Fig. 4) [80]. Já a banda em 807 cm^{-1} presente no espectro FTIR da HP desaparece por completo no espectro do PEC1-5 (Fig. 8d). Com relação aos PEC2, os sinais em 1238 e 807 cm^{-1} atribuídos aos estiramentos das ligações S=O e C-O-S se mantêm, porém apresentam menores intensidades quando comparadas ao espectro de FTIR da HP, indicando a complexação da HP com a TMC (Figs. 8b, 9b, 9c, 9d e 9e). Vale ressaltar que a intensidade da banda em 1238 cm^{-1} no espectro FTIR do PEC2-12 (Fig. 9b) é menor quando comparada aos espectros FTIR do PEC2-5, PEC2-8 e PEC2-10 (Figs. 9e, 9d e 9c). Isto é um indício de maior interação entre HP e TMC em pH 12.

4.2. Caracterização e cálculo do grau de quaternização (GQ) da TMC através de RMN ^1H .

As diferenças nos espectros de RMN ^1H apresentados na Figura 10 indicam que a TMC foi efetivamente obtida e permitem calcular o grau de quaternização (GQ) da mesma. O espectro da QT (Fig. 10a) apresenta sinais em 1,84 ppm, referentes aos átomos de hidrogênio metílicos do grupo acetamida; em 2,96 ppm (H2); 3,53-3,70 ppm (H3-H5); e H1 na faixa entre 4,37 a 4,67 ppm. Todos estes sinais são atribuídos aos átomos de hidrogênio presentes nas unidades sacarídicas repetitivas da QT, apresentadas na Figura 11a [75,83].

De acordo com Sieval [63] o sinal em 3,38 ppm (Fig. 10b) é atribuído aos átomos de hidrogênios metílicos dos sítios ^+NT [grupos $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$] (Fig. 10b) e o pico

em 2,54 ppm (Fig. 10b) é referente aos átomos de hidrogênio metílicos dos sítios ND [grupos $N(CH_3)_2$] (Fig. 11b). Sieval comprovou experimentalmente que o sinal em 2,54 ppm referente aos átomos de hidrogênio metílicos dos sítios ND desloca-se para a região entre 2,95 a 3,05 ppm pela adição de uma simples gota de ácido clorídrico deuterado na solução de TMC antes de proceder a análise de RMN 1H . Desta forma, obteve-se o espectro de RMN 1H da TMC com um pico em 2,54 ppm, sinal este atribuído aos átomos de hidrogênio metílicos dos sítios ND (Fig. 10b) [63]. Isto comprova que a TMC sintetizada possui, em solução aquosa, grupamentos ND na forma não carregada. Os sinais em 3,48 e 3,55 ppm (Fig. 10b) ocorrem devido à metilação em C3-OH (sítios OM) e C6-OH (sítios OM) nas unidades sacarídicas da QT (Fig. 11b) [63,75]. Os átomos de hidrogênio dos sítios NM [grupos $NHCH_3$] deve absorver na região de 2,54 ppm, assim como os átomos de hidrogênio dos sítios ND (Fig. 11b).

A região delimitada de 4,7 a 5,7 ppm (Fig. 10b) corresponde ao sinal dos átomos de hidrogênio H1 (Fig. 11b) ligados covalentemente ao carbonos anoméricos da estrutura sacarídica da TMC [75,76]. A área deste sinal pode ser utilizada como referência para o cálculo do GQ, do grau de diss substituição (GD), do grau de metilação em C3-OH (GM3) (Fig. 11b) e do grau de metilação em C6-OH (GM6) (Fig. 11b) [84-86].

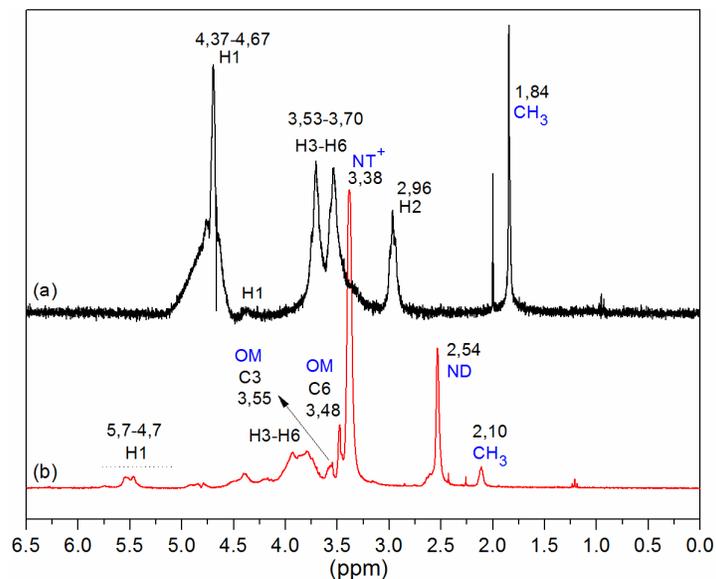


Figura 10. Espectros de RMN ^1H da QT (10a) e TMC (10b).

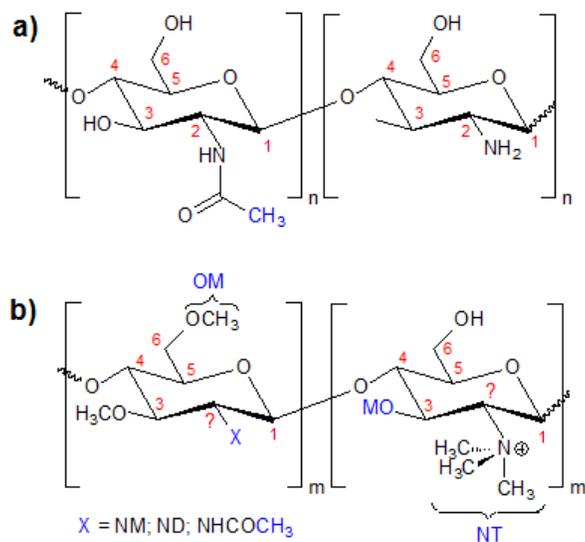


Figura 11. Estruturas sacarídicas repetitivas da QT (11a) e TMC (11b) com os átomos de hidrogênio atribuídos e seus respectivos δ apresentados na Figura 10.

O GQ para a TMC pode ser obtido através da equação

$$(\text{GQ} \%) = \frac{A[\text{NT}] * 100 \%}{A[\text{H1}] * 9} \quad (1)$$

onde o termo $A[NT]$ é atribuído à área dos átomos de hidrogênio dos sítios ^+NT (Fig. 11b) e o termo $A[H1]$ refere-se à área de H1, ligado aos carbonos anoméricos (Fig. 11b) utilizada como referência para calcular o GQ [84-86].

De acordo com a equação (1) o termo $[A(NT)]$ é proporcional a $1/9$ do termo $[A(H1)]$. Isto ocorre porque para cada carbono anomérico existe apenas um átomo de hidrogênio ligado covalentemente, enquanto que em cada grupamento ^+NT , existem nove átomos de hidrogênio ligados covalentemente. Assim, para calcular o GQ é necessário fazer a divisão por $1/9$ na equação (1). Portanto, através da equação (1) é possível calcular o GQ, além do GD, GM3 e GM6 [84-86]. Vale ressaltar que a análise de RMN 1H deveria ser realizada a $80\text{ }^\circ\text{C}$ para que a equação (1) pudesse ser empregada no cálculo do GQ, pois o sinal do solvente (D_2O) interfere na área de H1 (Fig. 10b) [76,87]. Além disso, esta metodologia para calcular o GQ conduz a erros consideráveis devido à baixa intensidade e heterogeneidade do sinal de H1 (Fig. 10b). Por isso, a metodologia descrita acima não foi utilizada para calcular o GQ da TMC no presente trabalho.

Todavia, pode-se calcular o GQ utilizando como referência o sinal dos átomos de hidrogênio do grupo metílico presente nos sítios acetamida $[(NHCOCH_3)]$ em 2,10 ppm (Fig. 10b), [87,88]. A QT utilizada para a obtenção da TMC apresenta-se 15% acetilada. Esta porcentagem não apresenta variação com o processo de metilação da QT [76,87,88], mesmo observando as diferenças nas intensidades dos sinais dos respectivos átomos de hidrogênio dos grupos acetamida, em 1,84 ppm (Fig. 10a) e 2,10 ppm (Fig. 11b).

Portanto, o GQ da TMC foi determinado através da relação entre as áreas dos sinais referentes aos átomos de hidrogênio dos grupos acetamida $[(NHCOCH_3)]$ com o sinal relativo aos átomos de hidrogênio dos grupamentos metílicos dos sítios ND

$[(CH_3)_2]$ e o sinal correspondente aos átomos de hidrogênio dos grupamentos metílicos dos sítios ^+NT $[(CH_3)_3]$ [87,88]. As equações (2) e (3) apresentadas abaixo foram utilizadas para calcular o GQ, com base nos dados obtidos a partir do espectro de RMN 1H da TMC, de acordo com Morya e Inamdar [87] e Curti e Campana Filho [88].

$$GQ (\%) = \left[\frac{[(CH_3)_3]}{9} \times \frac{1}{S} \right] \quad (2)$$

$$S = \frac{[(CH_3)_3]}{9} + \frac{[(CH_3)_2]}{6} + \frac{[(NHCOCH_3)]}{3} \quad (3)$$

onde o termo $[(CH_3)_3]$ é a integral dos hidrogênios metílicos do grupo amino trimetilado (sítios ^+NT) em 3,38 ppm, o termo $[(CH_3)_2]$ é a integral dos hidrogênios metílicos dos grupos amino dimetilados (sítios ND) em 2,54 ppm e o termo $[(NHCOCH_3)]$ é a integral dos hidrogênios metílicos dos grupos acetamida em 2,10 ppm (Fig. 10b). O GQ calculado foi de aproximadamente 59 %, sendo este dado obtido através das equações 2 e 3. O valor do GQ foi elevado o que viabiliza a potencialidade da TMC em complexar com poliânions para formar PECs. Entretanto, o GQ encontrado pode apresentar um erro, devido à incerteza no δ do H2 (Fig. 11b). Isto ocorre devido à possível sobreposição do sinal do H2 com o sinal dos átomos de hidrogênio metílicos dos sítios ^+NT [76,87].

4.3. Caracterização da QT e TMC através da técnica espectroscópica de CP-MAS RMN ^{13}C .

Na Figura 12 são mostrados os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C da QT (Fig. 12a) e da TMC (Fig. 12b).

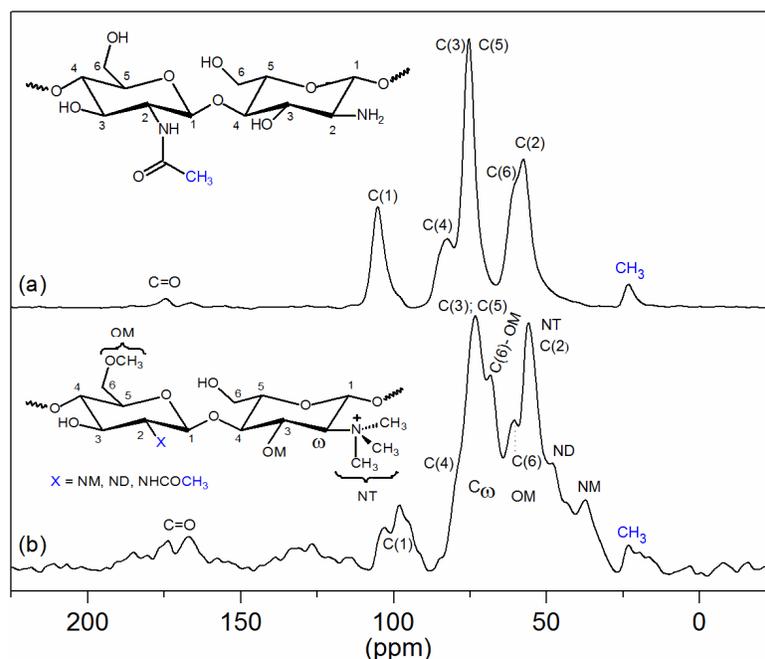


Figura 12. Espectros de CP-MAS RMN ^{13}C da QT (12a) e da TMC (12b).

Analisando os espectros da Figura 12 percebem-se diferenças que foram atribuídas à existência dos sítios ^+NT , ND e NM na estrutura da TMC (Fig. 12b). Os novos sinais em 37,4; 48,0 e 57,0 ppm foram atribuídos aos carbonos metílicos presentes, respectivamente, nos sítios NM, ND e ^+NT (Fig. 12b). O sinal em 57,7 ppm é referente aos carbonos C6 e se sobrepõe ao sinal dos carbonos C2 (Fig. 12a). No espectro da TMC os sinais dos carbonos C6, C2, carbonos metílicos dos sítios OM, e carbonos metílicos dos sítios ^+NT aparecem na região entre 50-62 ppm (Fig. 12b). O sinal em 68,4 ppm foi atribuído aos carbonos C6 ligados aos sítios OM (Fig. 12b). Enquanto o sinal dos carbonos C4 é facilmente localizado em 82,4 ppm no espectro da QT (Fig. 12a), este não é visualizado no espectro da TMC (Fig. 12b) devido à sobreposição com os sinais de C3 e C5. Os sinais que aparecem em 107,0 e 175,0 ppm

no espectro da QT referem-se aos carbonos C1 e C=O que também são visualizados no espectro da TMC [75,76,83].

Devido ao efeito proporcionado pelo alto GQ, os carbonos ligados diretamente aos sítios ^+NT carregados positivamente foram designados como $C\omega$ (Fig. 12b) e os carbonos ligados aos sítios NM, ND, $NHCOCH_3$ (Fig. 12b) e NH_2 (Fig. 12a) não carregados positivamente foram designados como C2 (Fig. 12). Portanto, na TMC pode-se calcular a razão $C2/C\omega$ e o valor dessa razão dependerá principalmente do GQ e do pH de obtenção da TMC. A TMC foi sintetizada em meio alcalino sendo que seu pH em solução aquosa foi inicialmente 8,0. Assim, pode-se dizer que a densidade de cargas positivas existentes ao longo da cadeia da TMC é proveniente, principalmente, dos sítios ^+NT . Vale ressaltar que a TMC sintetizada apresentou $GQ = 59\%$, sendo este dado obtido através do espectro de RMN^1H da TMC em estudo (Fig. 10b) [87,88].

Assim, pode-se calcular o valor da razão $C2/C\omega$ da TMC sendo este aproximadamente 0,69. A existência de uma elevada densidade de cargas positivas sobre os carbonos do tipo $C\omega$ faz com que estes absorvam na região entre 70-82 ppm (região confirmada pelos experimentos 2D, RMN^1H 2D gHSQC e gCOSY) juntamente com a absorção dos carbonos C3, C4 e C5; e diferentemente dos carbonos C2. Isto está relacionado à maior desblindagem nos carbonos $C\omega$ quando comparados aos carbonos C2 e também pela baixa razão entre $C2/C\omega$ da TMC em estudo. Portanto, a maior área na região dos sinais referentes aos carbonos C3, C4 e C5 no espectro CP-MAS $RMN^{13}C$ da TMC, quando comparada à área na mesma região do espectro CP-MAS $RMN^{13}C$ da QT, se deve à existência dos sinais adicionais dos carbonos C6 dos sítios OM e dos carbonos $C\omega$ que ocorrem na mesma região no espectro CP-MAS $RMN^{13}C$ da TMC (Fig. 12b).

4.4. Caracterização do PEC1-5 e do PEC2 através da técnica espectroscópica de CP-MAS RMN ^{13}C .

4.4.1. Caracterização do PEC1-5 e PEC2-5.

Na Figura 13 são mostrados os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C da QT, TMC, HP, PEC2-5 e do PEC1-5. Os sinais de absorção dos carbonos $^*\text{C}$, CA, C=O e CB, referentes aos resíduos de ácido urônico e D-glucosamina da HP, são equivalentes aos dados publicados na literatura (Fig. 13c) [89,90].

Existem duas regiões espectrais que chamam a atenção na Figura 13. A primeira região (50-62 ppm) é atribuída à absorção dos carbonos C2, C6, carbonos metílicos dos sítios ^+NT [75,76,83] e dos carbonos CB [89,90] (Figs. 13b e 13d). No espectro CP-MAS RMN ^{13}C do PEC2-5 (Fig. 13b) os sinais dos carbonos C6, C2 e CB possuem menores intensidades e apresentam-se mais separados quando comparados aos mesmos sinais que aparecem no espectro CP-MAS RMN ^{13}C do PEC1-5 (Fig. 13d). Os sinais dos carbonos C2 ligados aos grupamentos $^+\text{NH}_3$, ^+NM e, possivelmente, aos sítios ^+ND carregados positivamente também foram denominados de carbonos $\text{C}\omega$, assim como os carbonos ligados aos sítios ^+NT da TMC (Fig. 12b). As diferenças espectrais citadas acima estão diretamente ligadas à razão entre os carbonos C2/ $\text{C}\omega$ nas estruturas da QT e TMC.

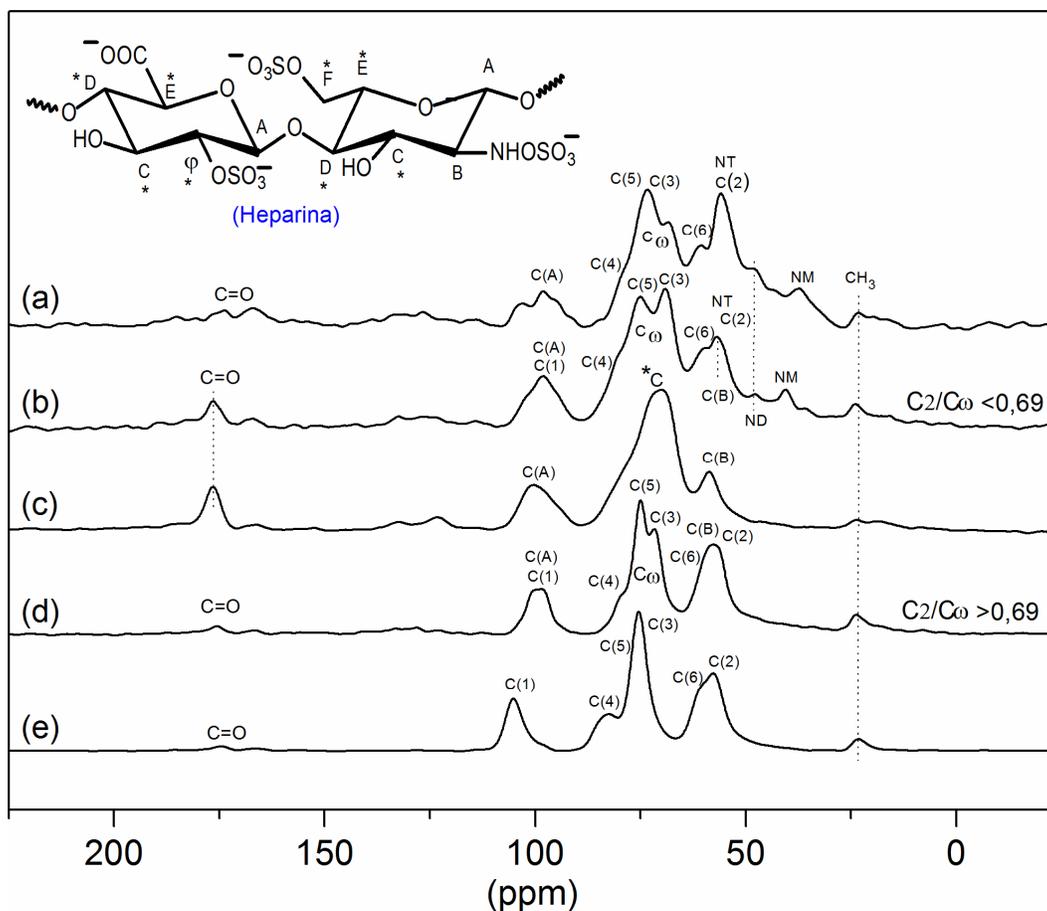


Figura 13. Espectros de CP-MAS RMN ^{13}C : TMC (13a), PEC2-5 (13b), (HP (13c), PEC1-5 (13d) e QT (13e).

A TMC (GQ = 59%) possui, em solução aquosa, cargas positivas permanentes [63]. Já a existência de cargas positivas nos grupamentos amino da QT depende do pH [59,60]. Como o pH de obtenção do PEC1-5 é próximo do pKa do grupo amino (pKa = 6,5) [59,60] pode-se inferir que a QT apresenta, no pH 5, menor densidade de carga em solução aquosa, em relação a TMC. Assim, o PEC2-5 pode possuir os sítios NM e ND nas formas protonadas, como ^+NM e ^+ND . A protonação ocorrerá preferencialmente nos sítios NM, devido à menor hidrofobicidade e/ou efeito estérico frente aos sítios ND. Este fato pode ser observado pelo aumento no deslocamento químico do sinal atribuído aos grupos metílicos ligados aos sítios NM, passando de 37,4 ppm (Fig. 13a) para 41,0 ppm (Fig. 13b). Este efeito contribui para o menor valor da razão $\text{C2}/\text{C}\omega$ no PEC2-5 em

relação ao PEC1-5, pois, além de parte dos sítios ^+NT estarem positivamente carregados ($GQ = 59\%$), existe a contribuição dos sítios ^+NM no fornecimento de carbonos do tipo $C\omega$ na estrutura da TMC. Assim, o PEC2-5 possui razão $C2/C\omega < 0,69$; enquanto o PEC1-5 apresenta razão $C2/C\omega > 0,69$ (Fig. 13). Desta forma, explica-se a menor intensidade e maior heterogeneidade dos sinais na região entre 50-62 ppm (Fig. 13b) em relação ao espectro do PEC1-5 (Fig. 13d).

A segunda diferença significativa nos espectros CP-MAS RMN ^{13}C dos PECs obtidos em meio ácido é relacionada à absorção dos carbonos C3, C4, C5 [75,76,83] e $C\omega$, região que aparece entre 70 a 82 ppm (Fig. 13b e 13d). A maior densidade de carbonos $C\omega$ na estrutura da TMC em relação à QT contribui para o maior alargamento do sinal nesta região no espectro CP-MAS RMN ^{13}C do PEC2-5 em relação ao PEC1-5. Novamente, este fato foi atribuído à maior densidade de cargas existentes na TMC, ou seja, menor valor da razão $C2/C\omega$ na estrutura da TMC em relação à estrutura da QT. Como esperado, a região de absorção dos carbonos C1, C3, C4, C5, CA, C=O e CH_3 não apresentaram mudanças significativas nos espectros CP-MAS RMN ^{13}C dos PECs obtidos em pH 5 (Fig. 13) [75,76,83].

4.4.2. Caracterização dos PEC2.

Os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C dos PEC2 preparados em ampla faixa de pH são mostrados na Figura 14. Novamente, observam-se diferenças entre os diversos espectros da Figura 14, principalmente na região de 50 a 62 ppm para os carbonos C2, C6, carbonos metílicos dos sítios ^+NT [75,76,83] e os carbonos CB [89,90]. No entanto, os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C dos PEC2 obtidos em meio alcalino (Figs. 14b, 14c e 14d) não apresentaram mudanças significativas entre si na região de 50 a 62 ppm.

Além disso, a região dos sinais atribuídos aos carbonos C3, C4, C5 e C ω apresentam maior semelhança com a região dos carbonos *C no espectro da HP (Fig. 14a) com o aumento do pH de obtenção dos PEC2 (Figs. 14b, 14c, e 14d).

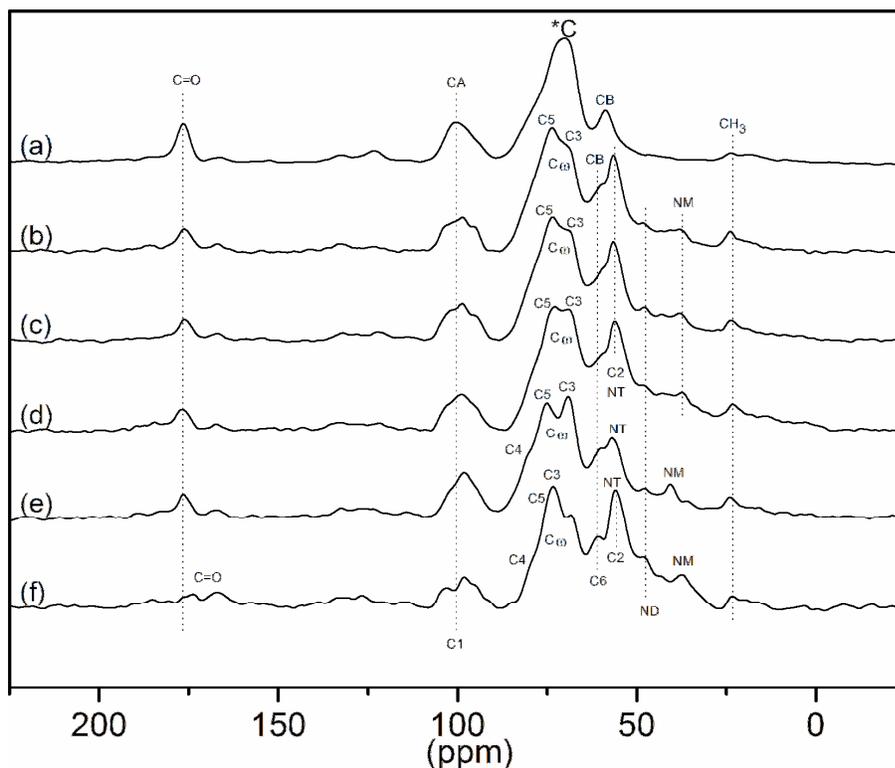


Figura 14. Espectros de CP-MAS RMN ^{13}C de: HP (14a), PEC2-12 (14b), PEC2-10 (14c), PEC2-8 (14d) PEC2-5 (14e) e TMC (14f).

O sinal referente aos sítios ND que aparece em 48,0 ppm (Fig. 14) não apresenta mudanças no deslocamento químico com a variação do pH de preparo dos PEC2. Isto sugere que em pH 5 não ocorre protonação efetiva nos sítios ND. Assim, a densidade de cargas positivas da TMC na obtenção do PEC2-5 decorre, provavelmente, dos sítios ^+NT e ^+NM .

Os espectros de CP-MAS RMN ^{13}C do PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12 não apresentam diferenças significativas entre si (Figs. 14b, 14c e 14d). Entretanto, os

espectros de CP-MAS RMN ^{13}C desses PEC2, que foram obtidos em meio básico, apresentam maior similaridade ao espectro de CP-MAS RMN ^{13}C da HP (Fig. 14a). Isto pode ser atribuído à maior efetividade de complexação entre HP e TMC em condições alcalinas. Possivelmente, neste meio a densidade de cargas positivas na TMC provém exclusivamente dos sítios ^+NT , enquanto a HP apresenta-se totalmente ionizada, sugerindo interação iônica mais efetiva entre TMC e HP em pH alcalino [91]. Com a elevação do pH a densidade de cargas positivas na TMC decresce, ao ponto de ser constante ($\text{DQ} = 59\%$ e $\text{C2/C}\omega > 0,69$) em valores elevados de pH, enquanto a densidade de cargas negativas na HP aumenta com a elevação do pH. Este fator está diretamente ligado à maior efetividade de complexação da HP com a TMC em meio básico. A completa ionização da HP e a não existência de sítios na forma ^+NM na TMC induz maior aproximação entre as cadeias da HP e TMC, proporcionando interação iônica altamente efetiva entre os polissacarídeos. Desta forma, a densidade de cargas negativas na HP é suficiente para neutralizar parte da densidade de cargas positivas na TMC. Os fatores físico-químicos citados acima, relacionados à obtenção dos PEC2 obtidos em meio básico, foram esquematizados na Figura 15.

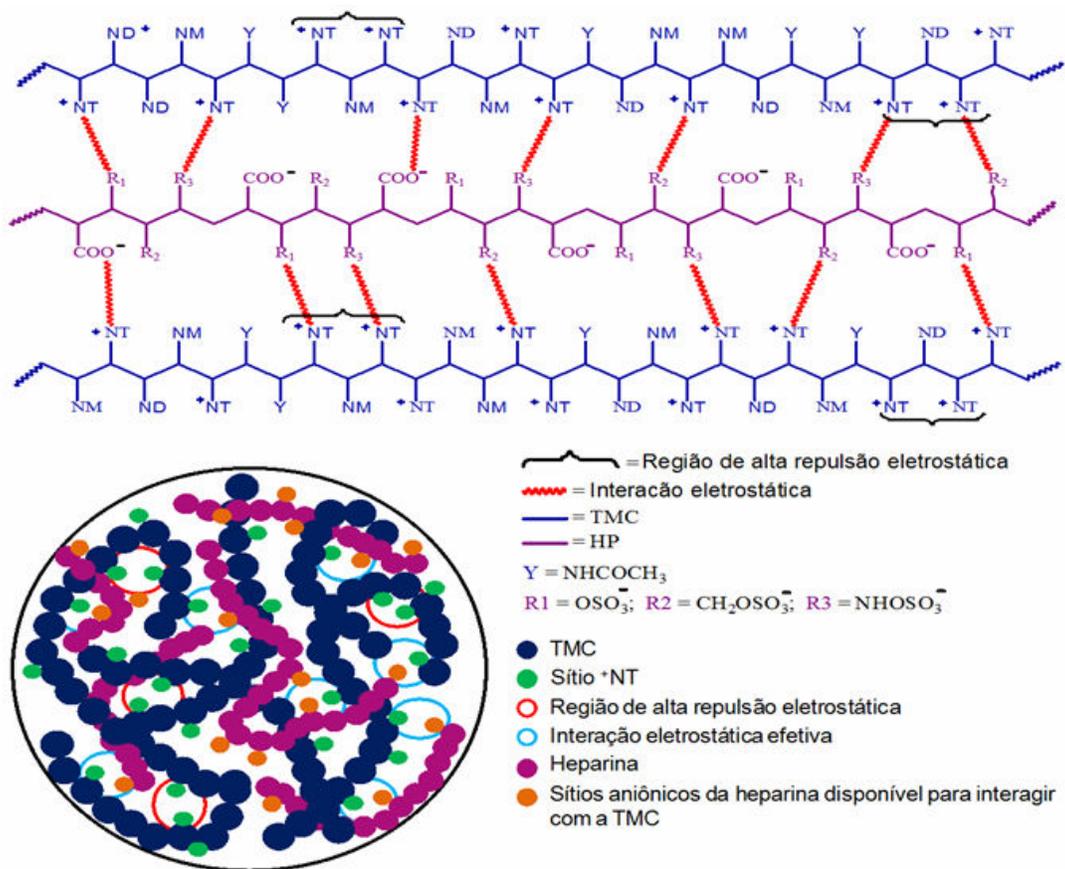


Figura 15. Ilustração esquemática da estrutura dos PEC2 obtidos em meio alcalino com razão $C2/C\omega > 0,69$. A maior razão entre os carbonos $C2/C\omega$ em meio básico proporciona elevada intensidade de regiões com interação efetiva envolvendo os sítios ⁺NT da TMC com os sítios aniônicos da HP, portanto maior aproximação entre os polímeros. Ao mesmo tempo existe mínima intensidade de regiões com repulsão eletrostática envolvendo os sítios ⁺NT em meio básico.

Em meio básico a TMC (solução de 1% m/v) apresentou-se solúvel em até pH 12 (16a). A interação entre HP e TMC foi efetiva o suficiente para que a formação dos PEC2 obtidos em meio básico ocorra na forma de precipitado (16b - direita) que, após ser liofilizado, o PEC2-8 produz um material altamente poroso (16c). As interações eletrostáticas entre os sítios ⁺NT e ⁺NM com os grupamentos aniônicos da HP ocorrem, em pH 5, com menor intensidade. Devido à proximidade do pH de preparo do PEC2-5 com o pKa do ânion carboxilato da HP (pKa = 4,57) [91], este biopolímero não estará totalmente ionizado nestas condições. Este fator, somado à alta densidade de cargas

positivas na TMC em meio ácido, propicia a obtenção do PEC2-5 na forma de suspensão (Fig. 15b - esquerda). Portanto, a parcial ionização da HP e o baixo valor da razão $C2/C\omega$ ($< 0,69$) que proporciona alta repulsão entre os grupos positivamente carregados na TMC, impede a efetiva complexação entre TMC e HP em pH 5. Além disso, a maior disponibilidade de densidade de cargas positivas como ^+NM frente aos sítios ^+NT induz, preferencialmente, interações de longo alcance destes sítios (^+NM) com os grupamentos aniônicos da HP, pois as cargas positivas dos átomos de nitrogênio dos sítios ^+NM estão mais disponíveis frente às cargas positivas dos átomos de nitrogênio dos sítios ^+NT .

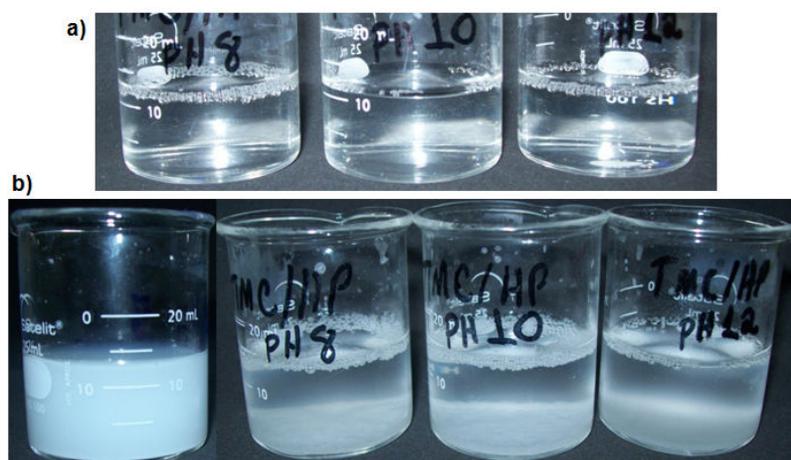


Figura 16. Soluções de TMC (pH 8, pH 10 e pH 12) antes da adição de heparina (16a), PEC2-5 (PEC em suspensão – esquerda obtido em pH 5), PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12 (direita) preparados em meio alcalino após 24 horas de obtenção (16b).



Figura 16c. PEC2-8 após ser liofilizado por 48 horas a $-55^{\circ} C$.

Os fatores físico-químicos acima citados, relacionados ao preparo do PEC2-5, foram esquematizados na Figura 17.

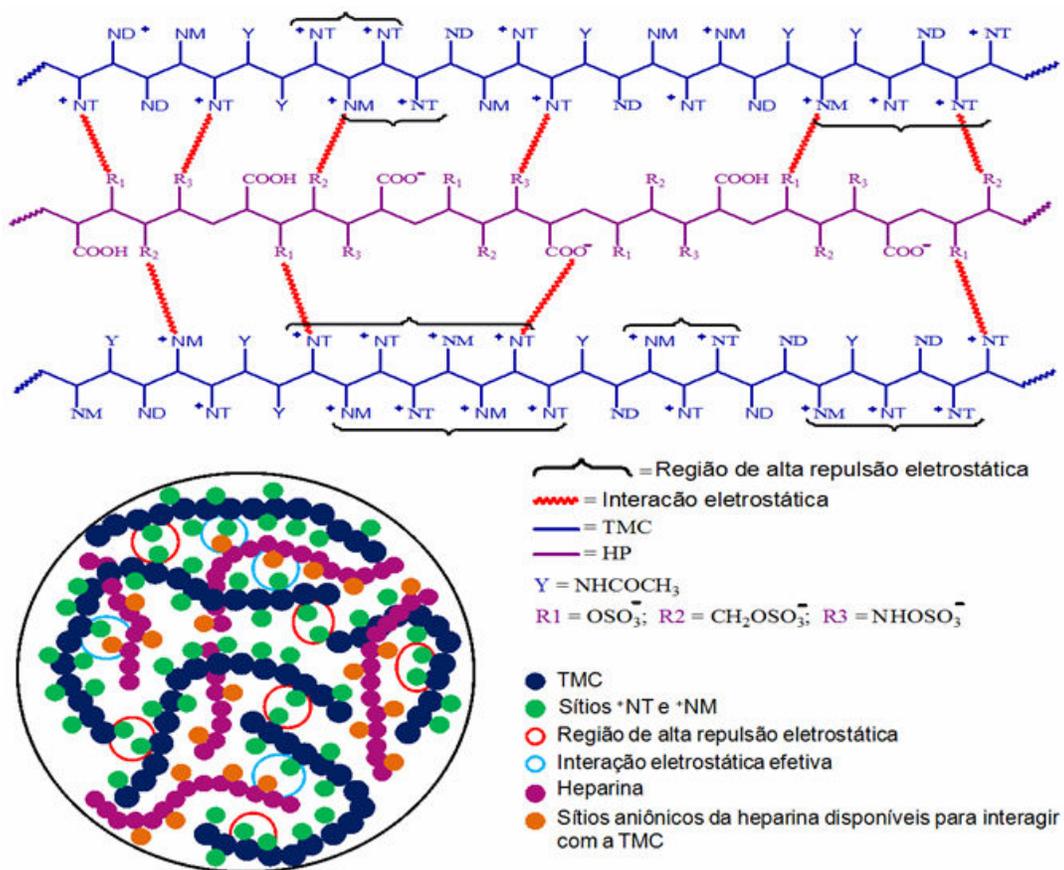


Figura 17. Ilustração esquemática da estrutura do PEC2-5 com razão $C2/C\omega < 0,69$. A menor razão entre os carbonos $C2/C\omega$ em pH 5 proporciona mínima intensidade de regiões com interação efetiva envolvendo os sítios ⁺NT da TMC com os sítios aniônicos da HP, portanto menor a aproximação entre os polímeros. Ao mesmo tempo, existe elevada intensidade de regiões com repulsão eletrostática envolvendo os sítios ⁺NT e ⁺NM em pH 5.

Desta forma, as diferenças espectrais (Fig.14) envolvendo as regiões em que absorvem os carbonos $C2$ e $C\omega$ estão diretamente ligadas à razão $C2/C\omega$. A grande semelhança nos sinais referentes aos carbonos $C3$, $C4$, $C5$ e $C\omega$ nos espectros dos PEC2 com o sinal dos carbonos *C no espectro da HP (Fig. 13c e 14a) [89,90] se deve à maior efetividade de complexação entre HP e TMC em meio básico. Outro indício de que a complexação da HP com a TMC em meio básico é mais forte está na convergência do

sinal referente aos carbonos C1 e CA (Fig. 13b) com o sinal referente ao carbono CA (Fig. 14a, 14b e 14c) [89,90]. Os sinais dos carbonos C=O e CH₃ (resíduos acetilados) que ocorrem em 176,3 e 23,2 ppm, [75,76,83,89,90] respectivamente, se mantêm inalterados em todos os espectros dos PEC2 estudados (Fig. 14).

4.5. Análise morfológica do PEC2-8.

Na figura 18 são apresentadas quatro micrografias do PEC2-8 com diferentes ampliações. As micrografias obtidas do PEC2-8 comprovam a elevada densidade de poros com diversos tamanhos e distribuídos heterogeneamente no interior da matriz do PEC2-8.

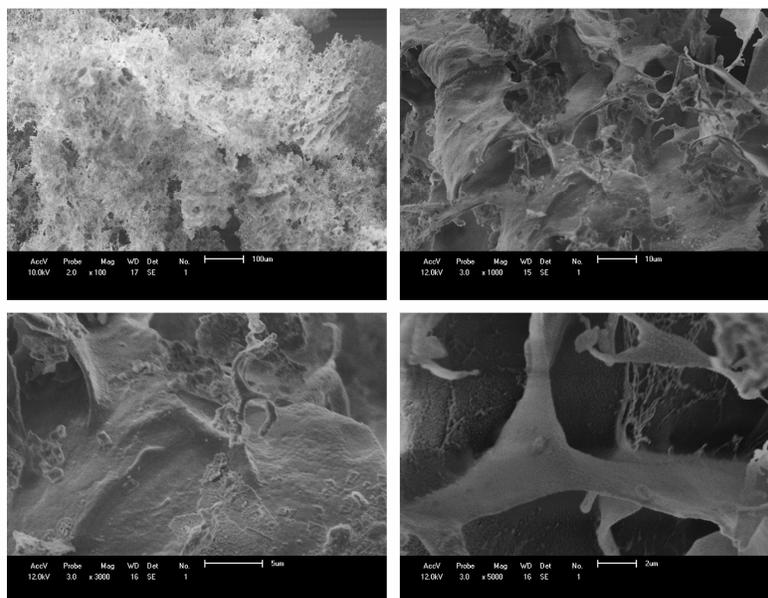


Figura 18. Micrografias do PEC2-8 processadas após este ser congelado em nitrogênio líquido e liofilizado a -55°C por 48h.

A alta porosidade do PEC2-8 obtido próximo a condição neutra de pH viabiliza uma provável aplicação deste material em culturas de células. A alta densidade de poros ocorre devido às características iniciais dos precursores TMC e HP. Em pH 8 ambos polímeros apresentam elevada densidade de carga. As unidades de ácido L-Idurônico na estrutura da HP apresentam-se sulfatadas na posição C-2 e as unidades de D-glucosamina apresentam-se *N*-sulfatadas e 6-O sulfatadas [6,92]. Este alto conteúdo de grupamentos aniônicos ionizados em solução (pH 8) interagem fortemente com a TMC devido ao elevado GQ (baixa razão $C2/C\omega$). Esta condição, somada à heterogeneidade estrutural da TMC, contribui para a formação de um material com elevada porosidade (Fig. 18).

4.6. Caracterização dos precursores e PEC2 por TGA e DSC.

Na Figura 19 são mostradas as curvas de TGA obtidas para HP, QT e TMC. Cada uma das curvas apresenta dois eventos de perda de massa. O primeiro deles foi atribuído à evaporação de água e compostos voláteis. Deve-se observar que as amostras dos precursores dos PECs apresentaram conteúdos diferentes de água adsorvida. A HP apresentou o maior teor de água adsorvida, enquanto a QT possui teor intermediário e a TMC o menor teor de água adsorvida dentre os três polímeros precursores (Fig. 19). O maior conteúdo de água na HP ocorre devido à alta densidade de cargas em sua estrutura, grupos como carboxilato ($-\text{COO}^-$) e sulfonato ($-\text{OSO}_3^-$) são altamente hidrofílicos e interagem fortemente com a água via interações tipo ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e íon-dipolo. Já a QT possui grupamentos hidroxila (OH) e amino ($-\text{NH}_2$) em sua estrutura sacarídica. Tais grupos podem fornecer sítios para interações tipo ligação hidrogênio e dipolo-dipolo com a água.

Quando comparada à QT, a TMC apresentou o menor teor de água devido ao seu elevado GQ. A densidade de cargas positivas nos átomos de nitrogênio na TMC deveria possibilitar maior interação com a água quando comparada a QT. Segundo Britto e Campana-Filho [79], as TMCs com baixo GQ (5%, 21% e 33%) mostraram-se levemente hidrofílicas, em relação à QT, fato este atribuído à quaternização dos átomos de nitrogênio [79]. Entretanto, a TMC utilizada neste trabalho para a obtenção dos PEC2 apresentou GQ = 59% e os resultados de TGA mostraram uma redução de hidrofílicidade no derivado, em relação à QT. No presente trabalho, a menor hidrofílicidade da TMC foi atribuída à metilação nos carbonos C3-OH, C6-OH e C2-NH₂ na estrutura glicosídica da QT. Isto também acontece devido ao baixo valor da

razão C2/C ω , que confere alta porcentagem de grupamentos CH₃ na estrutura da TMC. Estes fatores impedem interação mais intensa com a água e, por isso, foi encontrada menor porcentagem de água de hidratação na TMC em relação a QT. Os teores de água nas amostras, obtidos por TGA, estão descritos na Tabela 1.

O segundo evento de perda de massa foi atribuído à degradação dos polissacarídeos (Fig. 19). Verificou-se que a QT é termicamente mais estável em relação à TMC e HP (Fig. 19). A menor estabilidade térmica da TMC em relação à QT se deve ao elevado valor de GQ na TMC, ou seja, é devido à presença de grupos metílicos nos átomos de nitrogênio (sítios ⁺NT, ND e NM). A inclusão destes grupamentos volumosos (grupos metílicos) não favorece a ocorrência de interações intermoleculares de grande intensidade (em especial ligações de hidrogênio) na estrutura do derivado, diferentemente do que prevalece na QT [79].

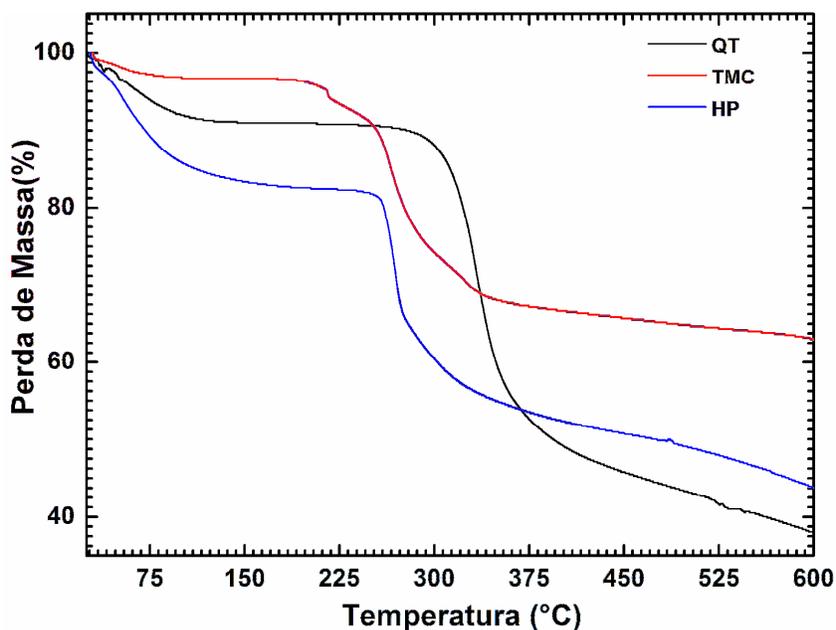


Figura 19. Curvas de TGA dos precursores QT, TMC e HP.

Na Figura 20a são mostradas as curvas de TGA referentes aos PEC2 formados em diferentes condições de pH. Observam-se, no gráfico, dois eventos de perda de massa para todos os PEC2 obtidos (Fig. 20a). Os valores de temperatura dos eventos térmicos são fornecidos na Tabela 1. O primeiro evento ocorre na faixa de 25 °C a 125 °C e, compreende a região onde as amostras apresentaram perda de massa variando de 8 a 14% (Tabela 1). Isto foi atribuído à perda de água adsorvida na estrutura dos PEC2, cujo conteúdo depende da hidrofiliabilidade dos polímeros precursores, TMC e HP.

A perda de massa, correspondente a evaporação de água para os PEC2, mostrou ser função do pH (Fig. 20a). Como já relatado anteriormente, em meio básico a densidade de cargas na HP é bastante elevada enquanto que em pH 5 parte dos grupos carboxílicos não estão totalmente ionizados, devido à proximidade do pKa deste grupamento com o pH de obtenção para o PEC2-5 [91]. Em meio ácido ($\text{pH} \leq 5$) a TMC apresenta alta densidade de cargas positivas devido ao elevado GQ e à protonação dos átomos de nitrogênio dos sítios NM e, possivelmente, dos sítios ND (razão $\text{C2/C}\omega < 0,69$). Em meio básico, a densidade de cargas positivas na TMC provém quase que exclusivamente dos sítios ^+NT e, como o valor de GQ é de 59%, pode-se afirmar que a densidade de cargas positivas da TMC em meio básico é também alta (razão $\text{C2/C}\omega > 0,69$). Desta forma, o PEC2-5 apresentou menor conteúdo de água adsorvida em relação aos outros PEC2, devido à condição de pH de sua obtenção favorecer menor densidade de cargas negativas na HP. Portanto, em pH 5 existe baixa efetividade de complexação envolvendo TMC e HP. Por isso, a curva de TGA do PEC2-5 é similar à curva de TGA da TMC no primeiro evento de perda de massa (Figs. 19 e 20a).

Os PEC2-8 e PEC2-10 apresentaram conteúdos de água adsorvida similares. Em meio básico a HP e a TMC apresentam alta densidade de carga. Assim, a complexação destes polímeros ocorre com maior efetividade quando comparada ao meio ácido. O

maior conteúdo de água adsorvida na estrutura do PEC2-8 e PEC2-10 comparado ao PEC2-5 e PEC2-12 são ratificados pela maior similaridade da curva de TGA no primeiro evento de perda de massa desses PECs com a curva de TGA da HP (Figs. 19 e 20a). Assim, a maior porcentagem de água no PEC2-8 e no PEC2-10 é uma indicação de acréscimo no conteúdo de HP na estrutura destes PECs, pois a HP possui características mais hidrofílicas que a TMC. A maior perda de massa no primeiro evento foi atribuída, também, à existência de interações intermoleculares envolvendo moléculas de água e átomos de nitrogênio dos sítios NM e ND que se encontram na forma neutra.

A densidade de cargas positivas, característica da TMC, se mantém alta e constante no PEC2-12, pois provém exclusivamente dos átomos de nitrogênio quaternários, enquanto a HP apresenta-se totalmente ionizada. Este fato promove alta efetividade na interação eletrostática entre estes polímeros na obtenção do PEC2-12. Tal efetividade faz com que a quantidade de água adsorvida no PEC2-12 seja menor em relação ao PEC2-8 e PEC2-10. Isto pode ser devido à maior aproximação das cadeias poliméricas de HP e TMC em pH 12. Tal aproximação faz com que grupos positivamente carregados da TMC prefiram interagir com grupos da HP ao invés de serem simplesmente solvatados pela água. Desta forma, explica-se a menor quantidade de água adsorvida e maior estabilidade térmica do PEC2-12 quando comparado ao PEC2-8 e PEC2-10. As quantidades de água perdida (em porcentagem) pelos precursores QT, TMC e HP; e pelos PEC2 são descritas na Tabela 1.

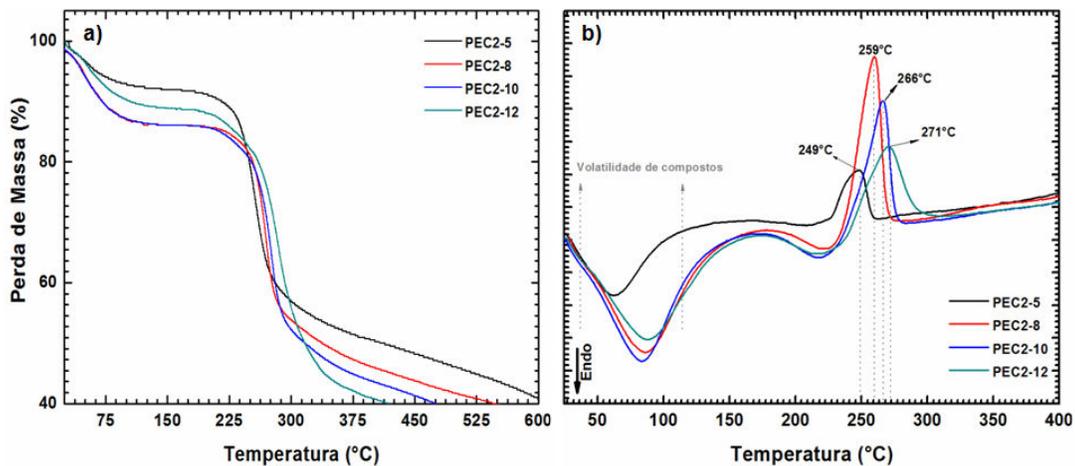


Figura 20. Curvas de TGA (20a) e DSC (20b) dos PEC2 obtidos em ampla faixa de pH.

O segundo evento de perda de massa se inicia na faixa de 200 a 375 °C e foi atribuído à degradação térmica das amostras. No entanto, a completa decomposição térmica acontece em temperaturas superiores a 450 °C.

As curvas de DSC dos PEC2 são apresentadas na Figura 20b. Os picos endotérmicos que aparecem na faixa de 25 a 125 °C foram atribuídos à vaporização de compostos voláteis, especialmente água adsorvida pelos PEC2. Os picos exotérmicos na faixa de 220 a 300 °C estão relacionados com a degradação térmica desses materiais. As curvas de DSC corroboram com as curvas de TGA, evidenciando a crescente estabilidade térmica dos PEC2 com o aumento do pH de obtenção do PEC. Portanto, foi observado por meio de duas técnicas independentes que o aumento do pH da solução de TMC usada para preparar os PEC2 contribuiu para formação de materiais com maior estabilidade térmica, principalmente devido à maior aproximação das cadeias poliméricas da TMC e HP. Comparando as curvas de DSC relativas aos PEC2 obtidos nos dois extremos de pH, verificou-se um aumento na estabilidade térmica em cerca de 22 °C no PEC2-12 em relação ao PEC2-5 (Fig. 20b).

Tabela 1: Temperaturas dos eventos, perda de água e degradação térmica, de cada PEC2, determinadas por meio de curvas de TGA.

	Temperatura (°C)		Perda de Massa (%)
	Faixa	Pico (DTG)	
Primeiro Evento			
HP	25-125	-	17,5
QT	25-125	-	9,2
TMC	25-125	-	3,9
PEC2-5	25-125	-	8,0
PEC2-8	25-125	-	14,3
PEC2-10	25-125	-	14,2
PEC2-12	25-125	-	12,3
Segundo Evento			
HP	200-269,0	269,0	47,5
QT	200-312,2	312,2	59,7
TMC	200-264,4	264,4	52,9
PEC2-5	200-258,3	258,3	42,2
PEC2-8	200-268,5	268,5	35,3
PEC2-10	200-276,6	276,6	34,0
PEC2-12	200-248,5	285,5	35,7

Na Figura 21 é mostrada a dependência da temperatura de degradação dos PEC2 em função do pH de preparo dos hidrogéis, obtida por meio de curvas de TGA (Fig. 21a) e de DSC (Fig. 21b). Vale mencionar que a estabilidade térmica dos PEC2 observadas por TGA e por DSC aumentam linearmente com o aumento do pH de obtenção do PEC (Fig. 21) e são representadas pelas equações

$$T_{D1} = 239,2 + 3,8 pH \quad (\text{obtida da curva de TGA, } R^2 = 0,997) \quad (4)$$

$$T_{D2} = 233,4 + 3,2 pH \quad (\text{obtida da curva de DSC, } R^2 = 0,994) \quad (5)$$

onde o T_{D1} é a temperatura de degradação obtida a partir da curva de TGA (esta temperatura foi obtida no ponto de inflexão do segundo evento que aparece nas curvas de DTG para todos os PECs de TMC/HP – Tabela 1) e T_{D2} refere-se às temperaturas máximas dos picos exotérmicos das curvas de DSC; e o termo pH é a condição de pH em que cada PEC de TMC/HP (PEC2) foram preparados.

Esse comportamento é entendido em termos de interação molecular e também pela capacidade de estabilização de cargas entre os polímeros TCM e HP, em solução, de acordo com o pH de preparo dos PEC2. Vale mencionar a proximidade dos coeficientes angulares obtidos nas equações 4 e 5 e coeficientes de determinação (R^2).

No PEC2-5, a TMC possui a maior densidade de cargas positivas, como já discutido. No entanto, em pH 5 a HP apresenta a sua menor densidade de cargas negativas entre os pHs estudados, pois neste pH os grupos carboxílicos estão apenas parcialmente ionizados. Assim, em pH 5 a HP não é capaz de estabilizar o excesso de densidade de cargas positivas da TMC, o que gera valor baixo para a razão $C2/C\omega$. Desta forma, na TMC coexistem, nestas condições, grandes quantidades de sítios (^+NT e ^+NM) resultando em alta repulsão eletrostática, o que gera um complexo menos estável em meio ácido. Na Tabela 1, mais precisamente através das temperaturas do ponto de inflexão obtidas da DTG, observa-se que o PEC2-5 é o único PEC de TMC/HP que apresenta menor estabilidade térmica em relação à TMC pura. Os valores de perda de massa, em porcentagem, da TMC, da HP e do PEC2 referentes ao segundo evento também são apresentados na Tabela 1.

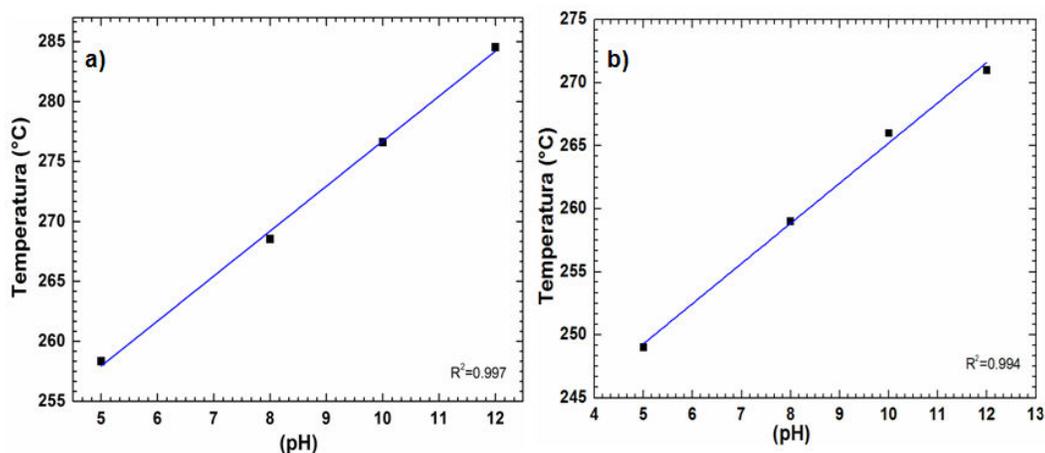


Figura 21. Dependência linear de degradação térmica dos PEC2 com a variação do pH da solução de TMC obtida através das curvas de TGA (a) e de DSC (b).

A densidade de cargas nas cadeias da TMC diminui com o aumento do pH do meio (pH 5 \rightarrow pH 8). Mesmo com a elevação do pH de obtenção dos PEC2 (pH 8 \rightarrow pH 12), a densidade de cargas, provenientes da quaternização dos átomos de nitrogênio na TMC, mantêm-se praticamente inalterada. No entanto, a densidade de cargas negativas nas cadeias da HP aumenta com o acréscimo do pH, favorecendo assim maior efetividade na interação entre TMC e HP nos PEC2 preparados em meio alcalino. Tal efeito possibilitou a obtenção de complexos mais estáveis.

4.7. Análise dos precursores e PEC2 por difração de Raios-X.

Na Figura 22 são apresentados os difratogramas dos polissacarídeos puros (QT, TMC e HP) e PEC2 obtidos em diferentes condições de pH. No difratograma da HP observa-se um sinal de intensidade fraca, porém alargado compreendendo a região de (2θ) de 15° a 30°, o qual foi atribuído à ausência de cristalinidade na HP. No difratograma da QT observa-se o surgimento dos picos de difração, em $2\theta = 9,26^\circ$ e $16,13^\circ$ que confirmam a existência de domínios cristalinos na estrutura da QT. Estes domínios cristalinos são regiões ordenadas devido à alta proporção de grupos NH_2 e OH

na QT, que favorecem a ocorrência de ligações de hidrogênio intra ou entre as cadeias de QT [91,93].

Comparando os difratogramas da QT e TMC, pode-se observar uma grande diferença entre os mesmos. No difratograma da TMC não são observados os picos de difração em $2\theta = 9,26^\circ$ e $16,13^\circ$, entretanto há o surgimento de novos sinais de difração, em $2\theta = 25,45^\circ$, $30,11^\circ$, $43,04^\circ$, $54,91^\circ$ e $65,28^\circ$. A grande quantidade de picos de difração no difratograma da TMC em relação à QT mostra o quanto a TMC é mais cristalina. A TMC não deveria apresentar maior cristalinidade que a QT, pois o processo de metilação diminui a intensidade das interações de ligações de hidrogênio antes existentes na QT [79]. Entretanto, os vários picos de difração presentes no difratograma da TMC são devido ao fato da obtenção deste derivado acontecer na forma de sais de cloreto (Fig. 7) [62,63]. Desta forma, explica-se a diferença entre os difratogramas da QT e TMC e, assim, a maior cristalinidade da TMC em relação à QT, pois os picos em $2\theta = 25,45^\circ$, $30,11^\circ$, $43,04^\circ$, $54,91^\circ$ são atribuídos a interações eletrostáticas entre íons cloreto e, principalmente, os átomos de nitrogênio dos sítios ^+NT carregados positivamente.

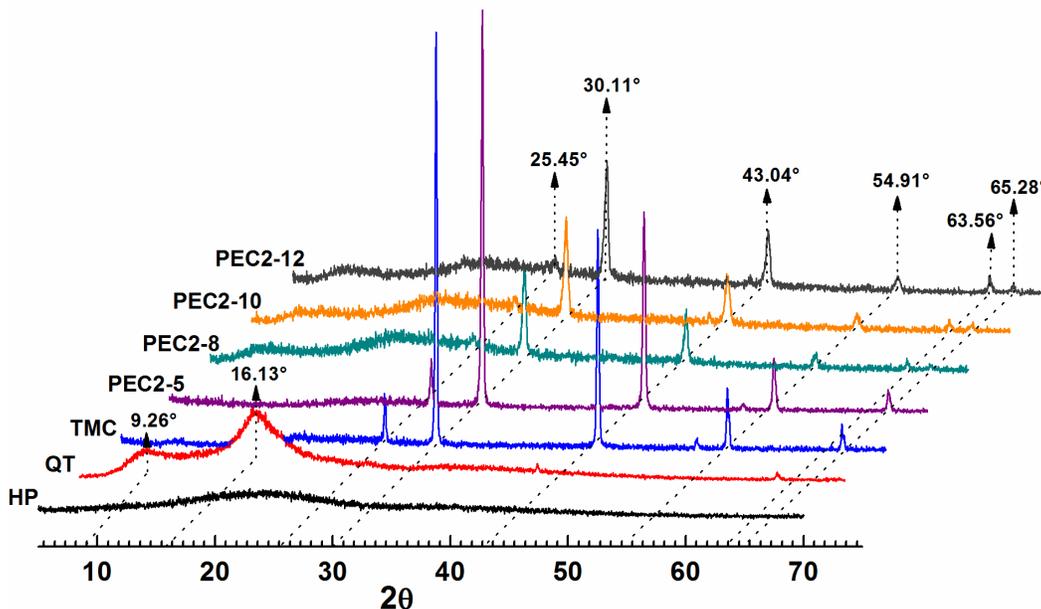


Figura 22. Difratomogramas referentes aos PEC2 e precursores.

Com relação aos difratogramas dos PEC2 podem-se observar grandes mudanças em relação ao difratograma da TMC pura. Como já discutido anteriormente, o PEC2-5 apresenta baixa efetividade de complexação e menor estabilidade térmica frente aos outros PEC2. Desta forma, os mesmos picos observados no difratograma do PEC2 ocorrem também no difratograma da TMC, com intensidades semelhantes em ambos difratogramas. Em pH 5, as interações entre íons cloreto e o átomos de nitrogênio quaternário (sítios ^+NT) se mantêm. Desta forma, é como se o PEC2-5 mantivesse a estrutura e ordenamento cristalino equivalentes da TMC. A ionização apenas parcial da HP em pH 5 e a alta densidade de carga da TMC ($C2/C\omega < 0,69$) favorecem a elevada cristalinidade do PEC2-5.

Quando comparados ao difratograma da TMC pura, os difratogramas do PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12 apresentam diferenças consideráveis de intensidades nos picos em $2\theta = 25,45^\circ$, $30,11^\circ$, $43,04^\circ$, $54,91^\circ$ e $65,28^\circ$. As interações eletrostáticas que passam a existir na formação dos PEC2 diminuem o perfil de cristalinidade do

componente TMC em relação ao perfil apresentado pela TMC pura. A efetiva interação entre os dois polissacarídeos (HP e TMC) perturba o ordenamento estrutural do sal de TMC por meio da desestabilização das ligações eletrostáticas envolvendo os ânions cloreto e os átomos de nitrogênio quaternário existentes nos segmentos das cadeias da TMC. Nos difratogramas dos PEC2 obtidos em meio básico observa-se o aparecimento de um pequeno pico de difração na região de $2\theta = 63,56^\circ$. Tal pico ocorre devido à maior aproximação das cadeias poliméricas de TMC e HP em meio básico. Este pico pode estar associado à maior estabilidade térmica do PEC2-12 frente aos outros PEC2, pois este pico é mais significativo no difratograma do PEC2-12.

Foi feito um estudo envolvendo as áreas dos picos em $2\theta = 30,11^\circ$ (P1), $43,04^\circ$ (P2) e $54,91^\circ$ (P3) nos difratogramas da TMC e PEC2 e os resultados estão descritos na Tabela 2. Tal análise revela alteração nas áreas de P1, P2 e P3 quando se tomam as respectivas áreas no difratograma da TMC pura. Para o PEC2-5 há pequeno aumento das áreas desses picos, em relação aos mesmos picos no difratograma da TMC. Por outro lado, os aumentos que ocorreram nas áreas de P1, P2 e P3 nos difratogramas dos demais PEC2 foram bem maiores e, dentre esses, o PEC2-8 foi o que apresentou maior alteração. Ainda, foi verificado que as áreas de P1, P2 e P3 nos PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12 apresentam valores decrescentes de áreas com o aumento do pH de obtenção dos materiais (Tabela 2 e Figura 23). Na Figura 23 é apresentada a razão das áreas de P1, P2 e P3 dos PEC2 em relação aos mesmos picos no difratograma da TMC. Na Figura 23a é ilustrada a razão das áreas de P1 (PEC2/TMC), enquanto a Figura 23b mostra a razão das áreas de P2 (PEC2/TMC) e a Figura 23c ilustra a razão das áreas de P3 (PEC2/TMC). Como já discutido acima, o PEC2-8 apresentou as maiores áreas de P1, P2 e P3 (Fig. 23). Isto significa que o PEC2-8 apresenta maior ordenamento que os demais PEC2 obtidos em meio alcalino. Tal fato pode ser atribuído à maior proporção

de HP neste PEC quando comparado aos outros materiais obtidos. Esta afirmação também pode estar relacionada ao maior conteúdo de água adsorvida no PEC2-8 em relação aos outros PEC2.

As áreas de P1, P2 e P3 decrescem com o aumento de pH de obtenção para os PECs obtidos em meio alcalino. Tal fato sugere que nos pHs 10 e 12 a quantidade de HP complexada perturba o ordenamento das cadeias de TMC, se comparada ao PEC2-8. Este fato pode ser relacionado com a crescente estabilidade térmica dos PEC2 com a elevação do pH de preparo. O aumento de pH favorece maior aproximação das cadeias de HP e TMC (afirmação feita com base na crescente estabilidade térmica com o aumento de pH). Assim, uma maior repulsão entre as cadeias poliméricas da HP podem favorecer interações mais fortes entre TMC e HP levando a formação de materiais mais consistentes em elevados valores de pH. Entretanto, sugere-se que para diminuir a repulsão das cadeias poliméricas uma menor quantidade de HP deve se complexar.

Tabela 2. Áreas dos Picos em $2\theta = 30.11^\circ$ (P1), 43.04° (P2) e 54.91° (P3) obtidos pelos difratogramas de raio-X referentes a TMC e PEC2 (Fig. 23).

	P1 ($2\theta = 30.11^\circ$) (Área)	P2 ($2\theta = 43.04^\circ$) (Área)	P3 ($2\theta = 54.91^\circ$) (Área)
TMC	0,252	0,150	0,054
PEC2-5	0,292	0,165	0,057
PEC2-8	0,710	0,354	0,152
PEC2-10	0,688	0,344	0,131
PEC2-12	0,638	0,304	0,122

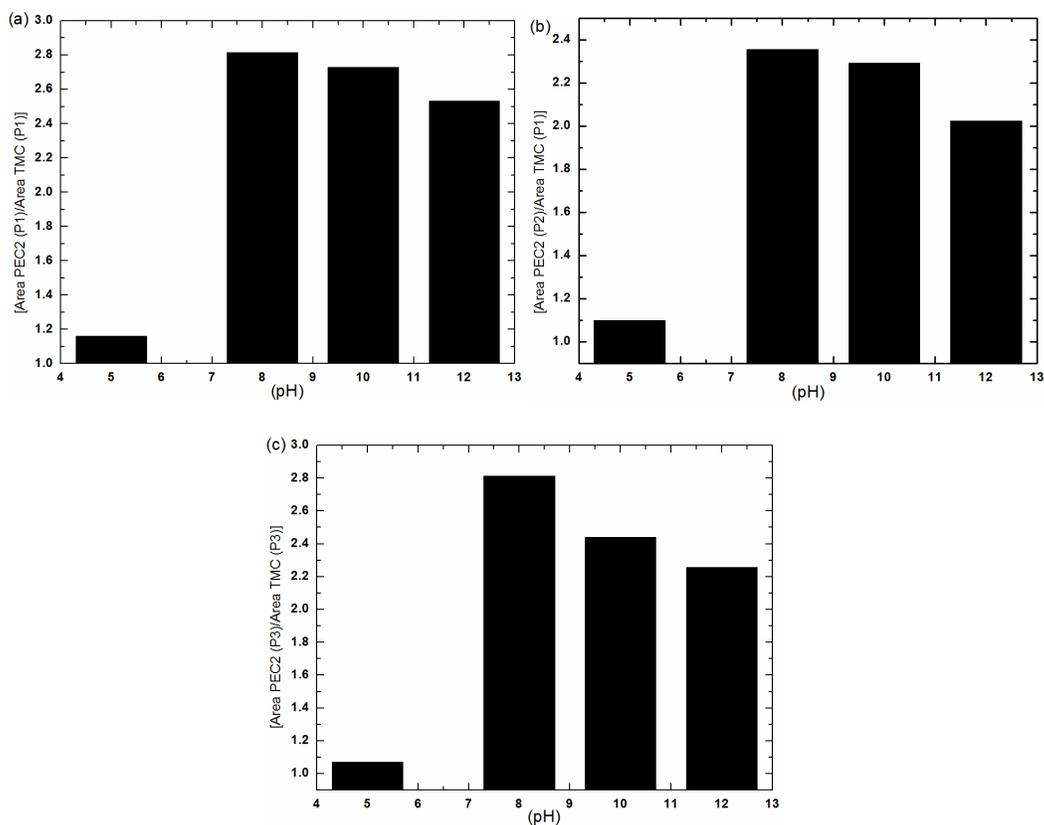


Figura 23. Razão das áreas de P1 (23a), P2 (23b) e P3 (23c) PEC2/TMC.

Outro fator que deve ser considerado é que as menores áreas de P1, P2 e P3 no PEC2-12 estão relacionadas à baixa disponibilidade da densidade de cargas positivas dos sítios ^+NT quando o PEC2 é obtido em maiores valores de pH. Isto possibilita maior aproximação dos polímeros na complexação (maior estabilidade térmica), porém tal fato pode indicar uma menor quantidade de HP complexada, devido à menor disponibilidade de cargas positivas em relação aos outros PEC2 obtidos em valores baixos de pH. Desta forma, o PEC2-12 apresenta maior estabilidade térmica, menor conteúdo de água de hidratação e menor cristalinidade em relação aos demais PEC2 obtidos em meio básico. Já o PEC2-5 foi o que apresentou menores valores de P1, P2 e P3. Isto ocorre devido à elevada densidade de cargas positivas na TMC ($C2/C\omega < 0,69$) e pelo fato da HP estar com os grupamentos $-COO^-$ ($pK_a = 4,57$) apenas parcialmente ionizados em pH 5. A

diferentemente do AM puro, que possui duas bandas de absorção características, uma em 660 nm referente aos monômeros de AM na forma livre e outra banda em 610 nm atribuídos ao processo de dimerização do AM [94]. Foi observado que a absorbância da coloração roxa do complexo AM/HP aumenta linearmente com o aumento da concentração das soluções de HP adicionadas, conforme mostrado na Figura 25. O coeficiente de determinação, R^2 , para a curva da Figura 25 é 0,9869.

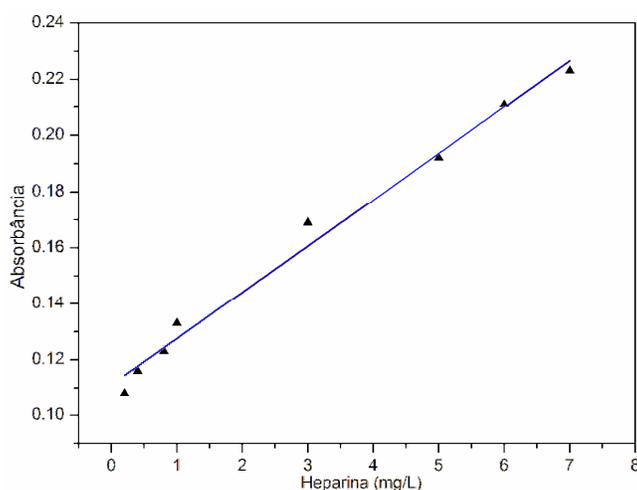


Figura 25. Curva de calibração do complexo metacromático AM/HP obtida em água destilada (pH ~ 6), utilizada para quantificar heparina ($R^2 = 0,9869$).

A dependência linear da Figura 25 é representada pela equação 6. Portanto, a partir desta equação foi possível quantificar a liberação de HP em água destilada (pH ~ 6) a partir de pastilhas de 100 mg do PEC2-8 e PEC2-12.

$$Y = 0,01649 x + 0,11114 \quad (6)$$

Na Figura 26 são mostrados os perfis de liberação de HP referente ao PEC2-8 e PEC2-12 em termos de fração liberada (Fig. 26a) e concentração (Fig. 26b).

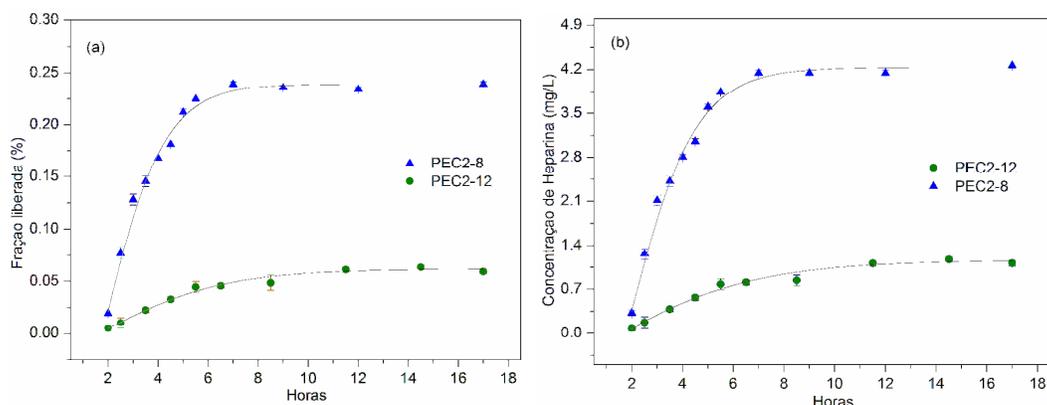


Figura 26. Fração liberada (%) (26a) e concentração (mg. L^{-1}) (26b) de Heparina a partir do PEC2-8 e PEC2-12 em água destilada ($\text{pH} \sim 6$).

Os resultados apresentados na Figura 26 estão diretamente relacionados à razão C_2/C_0 e estabilidade térmica dos PEC2. O PEC2-12 apresenta a maior razão C_2/C_0 ($>0,69$) e estabilidade térmica (Fig. 21) dentre todos os PEC2 preparados. Com isso, no PEC2-12 as cadeias poliméricas de HP e TMC estão mais próximas, ou seja, a reticulação física entre estes polímeros ocorre com maior efetividade. A maior efetividade de complexação no PEC2-12 dificulta a liberação de HP, quando se compara com o PEC2-8. Do perfil de liberação de HP a partir do PEC2-12 observa-se que a fração de HP liberada não ultrapassa 0,05% (Fig. 26a) que corresponde aproximadamente $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ em 12 horas de estudo (Fig. 26b).

Já para o PEC2-8 a razão dos carbonos C_2/C_0 e a estabilidade térmica são menores em relação ao PEC2-12. A diferença de estabilidade térmica do PEC2-8 em relação ao PEC2-12 fica em torno de $17 \text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 21a). Além disso, dentre os pHs estudados, a melhor condição para TMC e HP complexarem foi o pH 8 (Fig. 23). Portanto, em pH 8 a HP ligada a TMC encontra-se mais livre, devido à menor efetividade de complexação, quando comparada a HP ligada a TMC no PEC2-12. Tal fato explica o perfil de liberação da curva do PEC2-8 em relação à curva de liberação do

PEC2-12. A fração liberada de HP a partir do PEC2-8 durante 7 horas de ensaio foi, aproximadamente, 0,25% (Fig. 26a), o que corresponde $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ (Fig. 26b).

A baixa fração de HP liberada tanto para o PEC2-12 e PEC2-8 ocorre devido ao elevado GQ da TMC que proporciona elevada estabilidade térmica para os PEC2. Entretanto, o PEC2-8 mostrou ser um material promissor para a utilização de sistemas de entrega específica de HP através da via oral, próxima a condição de pH intestinal, pois a partir do PEC2-8 libera-se em torno de $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ (420 UI Kg^{-1}) de HP (Fig. 26b).

Não foi realizado o estudo de liberação de HP partindo-se do PEC2-5 e PEC2-10. Seria interessante estudar a liberação de HP a partir da matriz do PEC2-5, todavia a pastilha deste PEC se desfez após a imersão em água destilada, impossibilitando a quantificação de HP por UV-Vis. O desmanche da pastilha do PEC2-5 ocorre devido à complexação da HP acontecer preferencialmente com os sítios $^+ \text{NM}$ em pH 5, fato este atribuído a baixa razão C_2/C_0 . O estudo de liberação da HP foi realizado próximo a neutralidade (pH acima de 5), condição em que provavelmente os sítios $^+ \text{NM}$ voltam a ficar no estado NM, liberando a HP instantaneamente para o meio o que provoca a desintegração da pastilha do PEC2-5.

4.9. Análise do sobrenadante do PEC2-8 e PEC2-12.

A análise do sobrenadante do PEC2-8 (SBPEC2-8) e PEC2-12 (SBPEC2-12) revelaram que a TMC atua como agente limitante na complexação. Cerca de 30 mg de HP foram inicialmente utilizadas no preparo dos PEC2, e a massa deste polímero sem complexar remanescente em solução encontra-se na Tabela 3. Pode-se observar que quase toda HP se liga a TMC, entretanto uma maior massa deste biopolímero

permanece sem complexar no SBPEC2-12 em relação ao SBPEC2-8. Esta diferença de massa é mínima, todavia este fato pode ser atribuído a maior efetividade de complexação entre TMC e HP em pH 12, que confere elevada estabilidade térmica e maior razão $C2/C\omega$ para o PEC2-12 em relação aos demais PEC2 obtidos. Isto também pode estar relacionado à melhor condição de pH para a HP e TMC se complexarem, fato já relatado anteriormente através da análise das áreas de P1, P2 e P3 (Fig. 23). Sabe-se que a melhor condição para a TMC e HP interagirem foi o pH 8. Isto pode estar ligado à menor massa de HP no SBPEC2-8 quando comparado ao SBPEC2-12. Na Tabela 3 constam, ainda, os valores de absorvância do complexo metacromático AM/HP e as concentrações de HP referentes ao SBPEC2-8 e ao SBPEC2-12.

Tabela 3. Análise do SPECT-8 e SPECT-12, valores de absorvância do complexo metacromático AM/HP (n = 2), concentração e massa de heparina remanescente em solução relativo a cada sobrenadante em estudo.

Sobrenadante	PEC2-8	PEC2-12
Absorvância (AM/HP)	0,182±0,0074	0,201±0,0041
Concentração de HP (mg/L)	4,29	5,45
Massa de HP (mg)	0,055	0,071

Através da Figura 16b verifica-se que ocorreu a formação dos PEC2 em condições básicas. Observa-se que parte destes materiais precipitou e o sólido coexiste com um sobrenadante turvo o que gera certa opalescência (Fig. 16b). Este fato é um indicativo de que parte dos PEC2 obtidos em meio básico não adquiriram estabilidade suficiente para precipitar permanecendo em solução aquosa, juntamente com o excesso de HP que não complexou. A Figura 27 lista os espectros de FTIR dos precursores (TMC e HP), do PEC2-8 e de seu respectivo sobrenadante (SBPEC2-8).

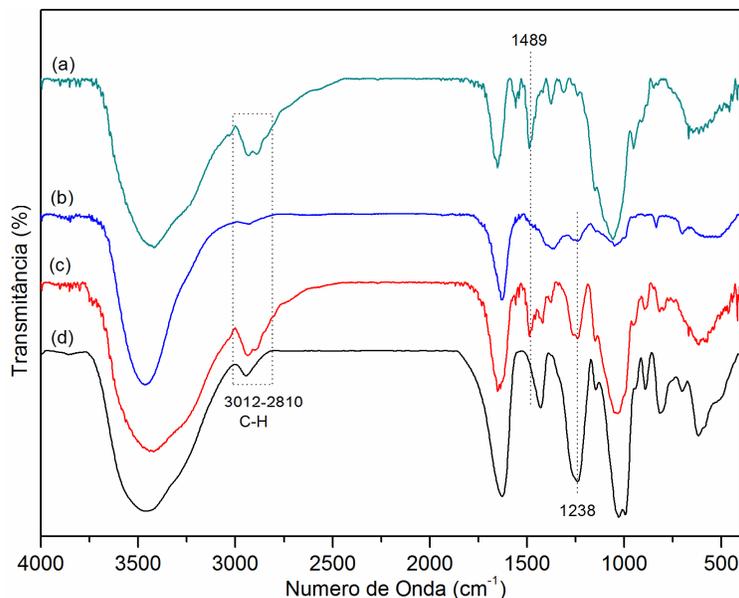


Figura 27. Espectros de FTIR da TMC (a), SBPEC2-8 (b), PEC2-8 (c), HP (d).

A existência de PEC2-8 no sobrenadante é confirmada analisando os espectros de FTIR da Figura 27. O espectro do SBPEC2-8 não é similar ao espectro do PEC2-8 e aos espectros dos precursores (TMC e HP). Isto pode ser atribuído à existência de PEC2-8 e HP no SBPEC2-8. O pico em 1489 cm^{-1} atribuído à deformação angular das ligações C-H dos grupamentos metílicos dos sítios ^+NT , [75-77] e a banda em 1238 cm^{-1} , referente à deformação axial assimétrica dos grupos S=O [80,82], persistem no espectro do SBPEC2-8. Estas bandas aparecem com menor intensidade no espectro do SBPEC2-8 (Fig. 27b), porém apresentam maior similaridade às mesmas bandas observadas no espectro do PEC2-8, quando se compara com os espectros FTIR dos precursores TMC e HP (Fig. 27). Já a região entre 2810 a 3012 cm^{-1} do espectro do SBPEC2-8 (Fig. 27b) se mostra similar à respectiva banda do espectro de FTIR da HP (Fig. 27d), fato este que deve ser atribuído à fração em massa de HP remanescente no SBPEC2-8, pois a HP está em excesso. Portanto, a existência de PEC2 remanescente nos sobrenadantes pode ser confirmada pela análise dos respectivos espectros (Fig. 27).

O estudo do sobrenadante é importante, pois o seu descarte interfere na quantificação exata de HP, fato que é conferido à incerteza na massa deste biopolímero complexada com a TMC. Desta forma, o rejeito dos sobrenadantes do PEC2-8 e PEC2-12 contribuem para um erro na fração de HP liberada (Fig. 26a), pois não se conhece com exatidão a massa de HP complexada com a TMC, massa esta presente na fração dos PEC2 que apresentam estabilidade para precipitar em solução (Fig. 16b – direita). Porém, o importante deste estudo foi a concentração de 420 UI kg^{-1} de HP liberada a partir da matriz do PEC2-8 em aproximadamente 7 horas de estudo.

4.10. Estabilidade do PEC2-8 em pH 2.

Na Figura 28a é mostrado o espectro de FTIR do PEC2-8 imediatamente após o seu preparo e na Figura 28b é apresentado o espectro de FTIR do PEC2-8 após este ter sido imerso em uma solução aquosa de ácido clorídrico (pH 2) por 24 horas sob agitação magnética a temperatura ambiente. O PEC2-8 submerso em ácido clorídrico será referido de agora em diante como PEC2-8*. Como discutido anteriormente, o PEC2-8 mostrou ser bastante promissor para a entrega específica de HP na condição de pH próxima da intestinal (Fig. 26). Assim, o objetivo do estudo da estabilidade do PEC2-8 em pH 2, descrito nessa seção, foi avaliar a estabilidade do PEC2-8 nas condições gástricas. Se o PEC2-8 apresentar estabilidade em tal condição, esse fato reforçaria a sua potencialidade para seu uso na entrega específica de HP no intestino.

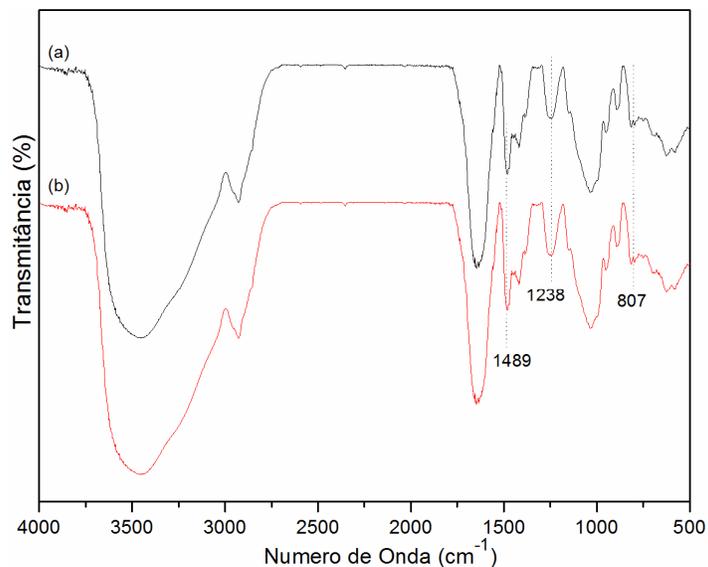


Figura 28. Espectros de FTIR do PEC2-8 (28a) e PEC2-8* (28b).

No espectro de FTIR do PEC2-8 as bandas em 1238 e 807 cm^{-1} são atribuídas, respectivamente, à deformação axial assimétrica dos grupos S=O e à deformação axial das ligações C-O-S [80,82] e o pico em 1489 cm^{-1} é atribuído à deformação angular das ligações C-H dos grupamentos metílicos [75-77] (Fig. 28a). Todos estes sinais característicos do PEC2-8 aparecem no espectro de FTIR do PEC2-8* e são idênticos, considerando o espectro FTIR do PEC2-8. Além disso, observa-se grande semelhança entre os espectros de FTIR (Fig. 28a e 28b). Isto ratifica que o PEC2-8 conserva a sua estrutura após contato com uma solução ácida (pH 2) por 24 horas. A estabilidade química do PEC2-8 em pH gástrico é importante, pois este meio é uma via de acesso até atingir a região do trato gastrointestinal, local onde o PEC2-8 precisa liberar a HP para que esta possa ser absorvida pelo organismo humano. Além disso, o PEC2-8 manteve-se consistente todo o período (24 h) que esteve em contato com a solução de pH 2.

5. CONCLUSÕES

Os PECs de QT/HP (PEC1-5) e TMC/HP (PEC2) foram obtidos e caracterizados através das técnicas de CP-MAS RMN ^{13}C , TGA, DSC e difração de Raios-X. A obtenção dos PEC2, como descrito nesta dissertação, é inédita e o preparo destes em pH > 6,5 ocorre devido à solubilidade da TMC em ampla faixa de pH. Dentre os PEC2, o obtido em pH 5 (PEC2-5) foi o que apresentou menor efetividade de complexação, fato este atribuído à elevada densidade de cargas positivas na TMC nesta condição de pH ($C2/C\omega < 0,69$). Além do pH do meio, o alto valor de GQ (59%) da TMC contribui para a elevada densidade de carga positiva neste polímero. O PEC2-5 é o PEC que apresentou menor razão $C2/C\omega$ dentre todos os PECs obtidos neste trabalho, pois a existência de sítios ^{+}NM e ^{+}NT (DQ=59%) em pH 5 favorece o aumento de carbonos $C\omega$ na estrutura da TMC em relação aos carbonos C2. Quando comparada com a razão $C2/C\omega$ em meio ácido, a elevada razão $C2/C\omega$ nos PEC2 obtidos em meio básico favorece a complexação entre TMC e HP. A maior efetividade de complexação entre estes polímeros em meio básico foi comprovada pela maior similaridade dos espectros de CP-MAS ^{13}C do PEC2-8, PEC2-10 e PEC2-12 com o espectro de CP-MAS ^{13}C da HP e também pela maior estabilidade térmica dos PEC2 preparados em meio básico.

Os PEC2 obtidos em meio básico apresentaram estabilidade térmica crescente (dependência linear) com a elevação do pH de obtenção do PEC. Isto foi atribuído à complexação entre TMC e HP ocorrer com maior efetividade em meios mais básicos e também pelo fato da HP estar, nestas condições, totalmente ionizada. O PEC2-12 apresentou maior estabilidade térmica dentre todos os PECs obtidos. A análise por DSC também confirmou a crescente estabilidade térmica adquirida pelos PEC2 com o aumento do pH. Desta forma, pode-se inferir que em condições de pH maiores, ocorre maior aproximação das cadeias poliméricas de TMC e HP, resultando em uma

complexação mais efetiva entre estes polissacarídeos. A análise por difração de raios-X revelou que os difratogramas dos PEC2 apresentaram mudanças significativas no perfil de cristalinidade em relação à TMC e à HP puras. Através dos difratogramas pode-se perceber que o PEC2-8 foi o que apresentou maior cristalinidade dentre todos os PEC2 obtidos em meio alcalino. Este fato pode estar relacionado com o maior favorecimento em complexar TMC e HP no pH 8.

Estudos *in vitro* de liberação de HP a partir do PEC2-8 e PEC2-12 mostraram que a quantidade de HP liberada é dependente da razão $C2/C\omega$. Dos parâmetros avaliados neste trabalho, pode-se concluir que o PEC2-8 é um material bastante promissor para a utilização de sistemas de entrega específica de HP através da via oral, na condição de pH próxima da intestinal. Foi possível liberar em torno de $4,2 \text{ mg L}^{-1}$ (420 UI Kg^{-1}) de HP a partir do PEC2-8. Vale ressaltar ainda que este material mostrou-se quimicamente estável e mecanicamente consistente em condições de pH próxima da gástrica. Isto pode viabilizar a liberação específica de HP na região do intestinal, após transito pela região gástrica. Assim, a HP e também outros fármacos podem ser incorporados aos PEC2 e finalmente serem absorvidos para circularem na corrente sanguínea.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- (1) O'Neill, A. N. *Can. J. Chemistry* **1955**, *33*, 1097-11101.
- (2) Mueller, R. L. *Best Pract. Res. Cl. Ha.* **2004**, *17*, 23-53.
- (3) Kakkar A. K. *Best Pract. Res. Cl. Ha.* **2004**, *17*, 77-87.
- (4) Jandik, K. A.; Gu, K.; Linhardt, R. J. *Glycobiology* **1994**, *4*, 289-296.
- (5) Lindahl, U.; Axelson, O. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246*, 72-82.
- (6) Martichen, J. C. **Propriedades Anticoagulantes e Antitrombóticas de Polissacarídeos Quimicamente Sulfatados de Liquens.** Tese de Doutorado, Faculdade de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2005**.
- (7) Baughan, D. R.; Woodward, P. M. *Bull. Wid. Hith. Org.* **1970**, *42*, 129-149.
- (8) Boneu, B. *Thromb. Res.* **2000**, *100*, 113-120.
- (9) Cohen, M. *Thromb. Res.* **2000**, *100*, 131-139.
- (10) Rosenberg, R. D. *Am. J. Clin. Med.* **1989**, *89*, 2-9.
- (11) Bourin, M. C.; Lindahl, U. *Biochem. J.* **1993**, *289*, 313-330.
- (12) Barrowcliffe, T. W.; Mulloy, B.; Johnson, E. A. *J. Pharmaceut. Biomed.* **1989**, *7*, 217-226.
- (13) Agnelli, G. *Haemostasis* **1996**, *26*, 2-9.
- (14) Rej, R. N.; Ludwing-Baxter, K. G.; Perlin, A. S. *Carbohydr. Res.* **1991**, *210*, 299-310.
- (15) Hirata, A.; Itol, W.; Tabata, K.; Kojima, T.; Itoyama, S.; Sugawara, I. *Biotechnol. Biochem.* **1994**, *58*, 406-407.
- (16) Uchiyama, H.; Metori, A.; Ogamo, A.; Nagasawa, K. *J. Biochem.* **1990**, *107*, 377-380.
- (17) Hirish, J.; Warketin, T. E.; Raschke, R. *Chest* **1998**, *114*, 4895-5105.

- (18) Money, S. R.; York, J. W. *Cardiovasc. Surg.* **2001**, *9*, 211-218.
- (19) Hiebert, L. M.; Ping, T.; WICE, S. M. *Haemostasis* **2000**, *30*, 196-203.
- (20) Hiebert, L. M.; Wice, S. M.; Ping, T.; Herrr, D.; Laux, V. *Thromb. Haemostasis* **2001**, *85*, 114-118.
- (21) Pineo, G.; Hull, R.; Marder, V. *Best Pract. Res. Cl. Ha.* **2004**, *17*, 153-160.
- (22) Jaques, L. B.; Hiebert, L. M.; Wice, S. M. *J. Labor. Clin. Med.* **1991**, *117*, 122-130.
- (23) Fabris, F.; Luzzato, G.; Stefani, P. M.; Girolami, B.; Cella, G.; Girolami, A. *Haematologica* **2000**, *85*, 72-81.
- (24) Kelton, J. G. *Blood* **2002**, *16*, 77-80.
- (25) Jonathan, R. S.; Landis, R. C.; Taylor, K. M. *J. Cardiothor. Vasc. An.* **2004**, *18*, 93-100.
- (26) Jaques, B. L. *Science* **1979**, *206*, 528-533.
- (27) Ju, X. J.; Zhang, S. B.; Zhou, M. Y. *J. Hazard. Mater.* **2009**, *167*, 114-118.
- (28) Tarley, C. R. T.; Arruda, M. A. Z.; *Chemosphere* **2004**, *54*, 987.
- (29) Kumar, P.; Dara, S. S.; *Agr. Wastes* **1982**, *4*, 213.
- (30) Tang, Y. F.; Wang, X. Y.; Li, Y. *Carbohydr. Polym.* **2010**, *82*, 833-841.
- (31) Rathke, T. D.; Hudson, S. M. *J. Macromol. Sci. R. M. C.* **1994**, *34*, 375-437.
- (32) Mathur, N. K.; Narang, C. K.; *J. Chem. Educ.* **1990**, *67*, 938.
- (33) Justi, K. C.; Favere, V. T.; Laranjeira, M. C. M. *J. colloid Interf. Sci.* **2005**, *291*, 369-374.
- (34) Vieira, R. S.; Guibal, E.; Silva, E. A. *Adsorption* **2007**, *13*, 603-611.
- (35) Fávere, V. T.; Laus, R.; Laranjeira, M. C.; Martins, A. O.; Pedrosa, R. C.; *Environ. Technol.* **2004**, *25*, 861.

- (36) Coelho, T. C.; Laus, R.; Mangrich, A. S.; Fávere, V. T.; Laranjeira, M. C. M. *React. Funct. Polym.* **2007**, *67*, 468-475.
- (37) Guibal, E. *Sep. Purif. Technol.* **2004**, *38*, 43.
- (38) Mi, F-L.; Shyu, S-S.; Lee, S-T.; Wong, T-B. *J. Polym. Sci.* **1999**, *37*, 1551-1564.
- (39) Lee, S-T.; Mi, F-L.; Shen, Y-J. *Polymer* **2001**, *42*, 1879-1892.
- (40) Redeschi, M. C. M. **Preparação e Caracterização de Filmes a Base de Xiloglucana Extraída de Sementes de *Hymenaea Coubaril* (Jatobá)** 95f. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista "Julio De Mesquita Filho", Campus de Araraquara, **2006**.
- (41) Henrique, J. S.; Falcare, R. S.; Lopes, P. S. *Fharmácia Brasileira* **2006**, *56*, 22-26.
- (42) Denuziere, A.; Ferrier, D.; Domard, A. *Carbohydr. Polym.* **1996**, *29*, 317-323.
- (43) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J.M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57*, 19-34.
- (44) Ghaffari A.; Navaee, K.; Oskoui, M.; Bayati, K.; Tehrani, M. R. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2007**, *67*, 175-186.
- (45) Du, J.; Dai, J.; Liu, J-L.; Dankovich, T. *React. Funct. Polym.* **2006**, *66*, 1055-1061.
- (46) Kweon, D-K.; Song, S-B.; Park, Y-Y. *Biomaterials* **2003**, *24*, 1595-1601.
- (47) Zhu, D. W.; Jin, X.; Leng, X. G. *Int. J. nanomed.* **2010**, *5*, 1095-1102.
- (48) Peppas, N.A.; Bures, P.; Leobandung, W.; Ichikawa, H. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2000**, *50*, 27-46.
- (49) Soppimath, K. S.; Aminabhavi, T. M.; Dave, A. M. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2002**, *28*, 957-974.
- (50) Hejazi, R.; Amiji, M. *Pharm. Dev. Technol.* **2003**, *8*, 253-262.

- (51) Dai, C. Y.; Wang, B. C.; Zhao, H. W. *Colloids Surfaces B* **2005**, *41*, 117-120.
- (52) Muzzarelli, R. A. A. *Carbohydr. Polym.* **2009**, *77*, 1-9.
- (53) Kaminski, K.; Zazakowny, K.; Szczubiałka, K.; Nowakowska, M. *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 3127-3132.
- (54) Chiono V.; Pulieri E.; Vozzi G.; Ciardelli G.; Ahluwalia A.; Giusti P. *J. Mater. Sci-Mater. M.* **2008**, *19*, 889-898.
- (55) Mi, F-L.; Sung, H-W.; Shyu, S-S.; Su, C-C.; Peng, C-K. *Polymer* **2003**, *44*, 6521-6530.
- (56) Ravi Kumar, M. N. V.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa H.; Domb, A. *J. Chem. Rev.* **2004**, *104*, 6017-6084.
- (57) Huang H.; Yang, X. *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 2340-2346.
- (58) Fu, J.; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J. *Biomaterials* **2005**, *26*, 6684-6692.
- (59) Thanou, M.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. *Adv. Drug Deliver Rev.* **2001**, *52*, 117-126.
- (60) Saether, H. V.; Holme, H. K.; Maurstald G.; *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 813-821.
- (61) Jintapattanakit, A.; Junyaprasert, V. B.; Mao, S.; Sitterberg, J.; Bakowsky, U.; Kissel, T. *Int. J. Pharm.* **2007**, *342*, 240-249.
- (62) Le Dung, P.; Milas, M.; Rinaudo, M.; Desbriires, J. *Carbohydr. Polym.* **1994**, *24*, 209-214.
- (63) Sieval, A. B.; Thanou, M. M.; Kotzé, A. F.; Verhoef, J. C.; Brussee, J.; Junginger, H. E. *Carbohydr. Polym.* **1998**, *36*, 157-165.
- (64) Van der Merwe, S. M.; Verhoef, J. C.; Verheijden, J. H. M. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 225-235.

- (65) Hamman, J. H.; Schultz, C. M.; Kotzé, A. F. *Drug Dev. Ind. Pharm.* **2003**, *29*, 161-172.
- (66) Kotzé, A. F.; Thanou, M. M.; Luebetaen, H.L.; De Boer, A. G.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. *J. Pharm. Sci.* **1999**, *88*, 253-257.
- (67) Sadeghi, A. M. M.; Dorkoosh, F. A.; Avadi, M. R.; Saadat, P.; Rafiee-Tehrani, M.; Junginger, H. E. *Int. J. Pharm.* **2008**, *355*, 299-306.
- (68) Thanou, M.; Florea, B. I.; Langemeyer, M. W.; Verhoef, J. C.; Junginger, H. E. *Pharm. Res.* **2000**, *17*, 27-31.
- (69) Chang, Y. H.; Xiao, L.; Du, Y. M. *Polym. Bull.* **2009**, *63*, 531-545.
- (70) Bae, K. H.; Mok, H.; Park, T. G. *Biomaterials* **2008**, *29*, 3376-3383.
- (71) Zhu, A. P.; Ming, Z.; Jian, S. *Appl. Surf. Sci.* **2005**, *241*, 485-492.
- (72) Paula, J. P. **Desenvolvimento de Nanopartículas de Poli(Ácido Láctico) para Administração oral de Heparina.** Tese de Doutorado, Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, **2009**.
- (73) Jiao, Y.; Ubrich, N.; Marchand-Avier, M.; Vigneron, C.; Hoffman, M.; Lecompte, T.; Maincent, P. *Circulation* **2002**, *105*, 230-235.
- (74) Farndale, R.W.; Buttle, D.J.; Barrett, A.J. *Biochim. Biophys. Acta* **1986**, *883*, 173-177.
- (75) De Britto, D.; Assis, B. G. O. *Carbohydr. Polym.* **2007**, *69*, 305-310.
- (76) De Britto, D.; Forato, A. L.; Assis, B.G O. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *74*, 86-91.
- (77) Mi, F-L.; Wu, Y-Y.; Lin, Y-H.; Sonaje, K.; Ho, Y-C.; Chen, C-T.; Juang, J-H.; Sung, H-W. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1248-1255.
- (78) Ho, Y-C.; Mi, F-L.; Sung, H-W.; Kuo, P-L. *Int. J. Pharm.* **2009**, *376*, 69-75.
- (79) De Britto, D.; Campana-Filho, P. S. *Polym. Degrad. Stabil.* **2004**, *84*, 353-361.
- (80) Grant, D.; Long, W. F.; Williamson, F. B. *Biochem. J.* **1987**, *244*, 143-149.

- (81) Kweon, D-K.; Lim, S-T. *J. Appl. Polym. Sci.* **2003**, *87*, 1784-1789.
- (82) Oliveira, G. B.; Carvalho, L. B; Silva, M. P. C. *Biomaterials* **2003**, *24*, 4777-4783.
- (83) De Britto, D.; Assis, O. B. G. *Int. J. Biol. Macromol.* **2007**, *41*, 198-203.
- (84) Jintapattanakit, A.; Mao, S.; Kissel, T.; Junyaprasert, V. B. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2008**, *70*, 563-571.
- (85) Hamman, J. H.; Stander, M. Kotzé, A. F. *Int. J. Pharm.* **2002**, *232*, 235-242.
- (86) Boonyo, W.; Junginger, H. E.; Waranuch, N.; Polnok, A.; Pitaksuteepong, T. *J. Control. Release* **2007**, *121*, 168-175.
- (87) Mourya, V. K.; Inamdar, N. N. *J. Mater Sci-Mater. M.* **2009**, *20*, 1057-1079.
- (88) Curti, E.; Campana-Filho, P. S. *J. Macromol. Sci. A* **2006**, *43*, 555-572.
- (89) Yates, A. E.; Santini, F.; Cristofano, B.; Payre, N.; Cosentino, C.; Guerrini, M.; Naggi, A.; Torri, G.; Hricovini, M. *Carbohydr. Res.* **2000**, *329*, 239-247.
- (90) Yates, A. E.; Santini, F.; Guerrini, M.; Naggi, A.; Torri, G.; Casu, B. *Carbohydr. Res.* **1996**, *294*, 15-27.
- (91) Juliana, F. P.; Adley, F. R.; Edvani, C. M. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 2601-2609.
- (92) Chaves, D. S. de Almeida. **Estudo químico e potencial antitrombótico da espécie medicinal *Petroselinum crispum* (Apiaceae)**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Química (Produtos naturais), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, **2008**.
- (93) Piai, J. F. **Preparação e Caracterização de Complexos Polieletrólitos de Quitosana/Sulfato de Condroitina e Estudos de Liberação Controlada**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, **2008**.
- (94) Junqueira, H. C. **Síntese e Estudos das Propriedades Fotoinduzidas de Derivados Fenotiazínicos em Sistemas Biomiméticos**. Tese de Doutorado,

Faculdade de Ciências Biológicas (Bioquímica), Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.