



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

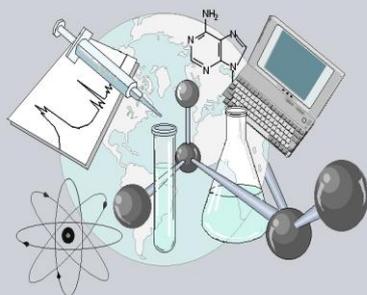
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Caracterização de complexos polieletrólíticos de
Quitosana/Sulfato de Condroitina em diferentes
condições de pH e tempo de imersão”**

Dissertação de Mestrado apresentada por **André Ricardo Fajardo** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para promoção direta e antecipada para o curso de doutorado em Química.

CCE



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, 2009

André Ricardo Fajardo

**Caracterização de complexos polieletrólíticos de
Quitosana/Sulfato de Condroitina em diferentes
condições de pH e tempos de imersão**

Maringá

2009

“Aos meus pais Olívio e Cleuza, a minha irmã Andressa e a minha namorada Karina pelo apoio incondicional, incentivo e, principalmente, pelo amor e amizade, primordiais em todos os momentos.”

O Vencedor

*“Olha lá, quem vem do lado oposto
Vem sem gosto de viver
Olha lá, que os bravos são
Escravos são e salvos de sofrer
Olha lá, quem acha que perder
É ser menor na vida
Olha lá, quem sempre quer vitória
E perde a glória de chorar
Eu que já não quero mais ser um vencedor
Levo a vida devagar pra não faltar amor*

*Olha você e diz que não
Vive a esconder o coração*

*Não faz isso, amigo
Já se sabe que você
Só procura abrigo
Mas não deixa ninguém ver
Por que será?*

*Eu que já não sou assim
Muito de ganhar
Junto às mãos ao meu redor
Faço o melhor que sou capaz
Só pra viver em paz”*

Marcelo Camelo – Los Hermanos

AGRADECIMENTOS

A Deus pelos dons da vida e da saúde, pela sabedoria, paciência e perspicácia.

Aos meus pais, Olívio e Cleuza, que com seu amor, carinho e dedicação formam a base forte de nossa família.

A minha irmã Andressa pelo amor, pela amizade e pela revisão desta dissertação.

A minha namorada Karina pelo amor, carinho e cumplicidade, que sempre estiveram presentes em todos os momentos.

Ao professor Dr. Edvani C. Muniz pela oportunidade, orientação, apoio, amizade e prestatividade.

Ao professor Dr. Adley F. Rubira pelo incentivo, apoio, amizade e prestatividade.

Aos professores do Grupo de Materiais Poliméricos e Compósitos (GMPC): Dr. Eduardo, Dr. Emerson e Dra. Gizilene, pela amizade e prestatividade.

Aos amigos Juliana F. Piai; Marcos R. Guilherme e Adonilson R. Freitas pelo auxílio na interpretação dos resultados, pelo esclarecimento de dúvidas, amizade e prestatividade.

Ao COMCAP pelas análises de WAXS, DSC, TGA e Texturômetro.

A Sílvia L. Fávaro e Alberto G. V. de Carvalho pelas imagens de MEV e pela amizade.

Aos amigos do Lab. 18 - Sala 04: Alexandre, Luciana, Elizângela, Laís, Mateus, André Riu, Vinícius, Guilherme, Ricardo, Adriana, Thiago e Letícia, pela paciência e amizade.

Aos amigos do GMPC: Marcos Roberto, Marcos Kunita, Guilherme e Rafael pela amizade.

A secretária da Pós-Graduação: Claudemir e Cristina, pela prestatividade.

Aos meus grandes amigos do Ap. 203 - Ed. Sevilha: Marcos, Christofer e Júnior pela amizade, apoio e cumplicidade.

Aos meus grandes amigos: Rodolfo, Olsen Rodrigo, Bruno e Vinícius pela amizade, apoio e cumplicidade.

A CAPES pela concessão da Bolsa de Mestrado.

A todos que contribuíram de forma direta e/ou indireta para a concretização deste trabalho e por isso são dignos de agradecimento.

CONTRIBUIÇÕES EM CONGRESSOS

1. Fajardo A. R., Piai J. F., Rubira A. F. e Muniz E. C. *Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate polyelectrolyte complex by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains*. In: 2nd International Congress on Biohydrogels, 2009, Viarregio, Itália.
2. Fajardo A. R., Piai J. F., Rubira A. F. e Muniz E. C. *Reorganization of The 3d Matrix of Polyelectrolytes Complexes of Chitosan/Chondroitin Sulfate Swollen in Different Conditions of pH And Immersion Time*. In: 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol, 2009, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.
3. Fajardo A. R., Reis A. V., Guilherme M. R., Schuquel I. T., Vidotti G. J., Rubira A. F. e Muniz E. C. *Clearing The Mechanism of Reaction of Glycidyl Methacrylate at The Hydroxyl And Carboxylic Groups of Poly(vinyl Alcohol) And Poly(acrylic Acid)*. In: 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol, 2009, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.
4. Bonfietti M. S., Piai J. F., Fajardo A. R., Rubira A. F., Lopes L. C. e Muniz E. C. *Hydrogels Based in Chondroitin Sulfate Entrapped on The Matrix of Sodium Alginate Crosslinked Through Calcium Ions*. In: 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol, 2009, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.
5. Lopes L. C., Rubira A. F., Fajardo A. R., Piai J. F. e Muniz E. C. *Propriedades de Hidrogéis Constituídos de Quitosana e Sulfato de Condrotina na Presença de Teofilina Intumescidos em Diferentes pHs*. In: 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol, 2009, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.
6. Muller V., Piai J. F., Fajardo A. R., Favaro S. L., Muniz E. C. e Rubira A. F. *Preparação e Caracterização de Microesferas Constituídas de Quitosana e Zeína, Como Matrizes Poliméricas Para Posterior Liberação Controlada de Fármacos*. In: 10^o Congresso Brasileiro de Polímeros – CBPol, 2009, Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil.

PUBLICAÇÕES

1. Fajardo A. R., Piai J. F., Rubira A. F. and Muniz E. C. *Time- and pH-dependent reorganization of swollen polymer network based in polyelectrolytes complexes of chitosan/chondroitin sulfate*. Submetido à revista ***Carbohydrate Polymers***.
2. Guilherme M. R., Fajardo A. R., Moia T. A., Kunita M. H., Gonçalves M. C., Radovanovic E., Rubira A. F. and Tambourgi E. B. *Carbon-Carbon π bond-Functionalized Montmorillonite as a Radical Inorganic Crosslinker for Porous Nanocomposite Hydrogel*. Submetido à revista ***Biomacromolecules***.
3. Fajardo A. R., Silva M. B., Piai J. F., Rubira A. F. and Muniz E. C. *Hydrogels based in chondroitin sulfate entrapped into a network of sodium Alginate crosslinked through calcium ions*. A ser submetido à revista ***Soft Matter***.

SUMÁRIO

Índice de Figuras	x
Índice de Tabelas	xiii
Índice de Equações	xv
Lista de Abreviações	xvi
Resumo	xvii
Abstract	xx
CAPÍTULO I – Considerações Iniciais	1
1 – Introdução	1
1.1 - Biopolímeros	1
1.2 - Biomateriais	4
1.3 - Liberação Controlada de Fármacos	7
1.4 - Complexos Polieletrólíticos (PEC)	9
1.5 - Quitosana (QT)	10
1.6 - Sulfato de Condroitina (SC)	12
1.7 - Objetivos	14
1.7.1 - Objetivos Gerais	14
1.7.2 - Objetivos Específicos	14
CAPÍTULO II – Complexos Polieletrólíticos de QT/SC	15
2.1 - Introdução	15
2.2 - Experimental	17
2.2.1- Reagentes	17

2.2.2 - Equipamentos	18
2.2.3 - Formação do PEC de QT/SC	18
2.2.4 - Preparação das Soluções Tampão	19
2.2.5 - Índice de Intumescimento (S)	20
2.2.6 - Reorganização da rede polimérica formada por PEC de QT/SC	20
2.2.7 - Análises de difração de raios-X de ângulo amplo (WAXS)	21
2.2.8 - Análises termogravimétricas (TGA)	21
2.2.9 - Análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC)	21
2.2.10 - Imagens de MEV do PEC de QT/SC	22
2.3 - Resultados e Discussão	23
2.3.1 - Determinação do índice de intumescimento (S).....	23
2.3.2 - Análise dos difratogramas de raios-X	25
2.3.3 - Análises de DSC e TGA	36
2.3.4 - Análise Morfológica das amostras de PEC	41
2.4 - Conclusão	46
CAPÍTULO III – Planejamentos Fatoriais	48
3.1 - Introdução.....	48
3.2 - Experimental	52
3.2.1 - Reagentes	52
3.2.2 - Equipamentos	52
3.2.3 - Planejamento Fatorial 2 ³	53
3.2.4 - Planejamento Fatorial 2 ²	55
3.3 - Resultados e Discussão	57
3.3.1 - Análise do Fatorial 2 ³	57

3.3.2 - Análise do Fatorial 2^2	62
3.4 - Conclusão	66
CAPÍTULO IV - Considerações Finais	67
CAPÍTULO V - Referências Bibliográficas	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1.1	6
Polímeros utilizados como biomateriais.	
Figura 1.2	11
Unidade repetitiva da quitosana ($m > n$).	
Figura 1.3	13
Unidade repetitiva do sulfato de condroitina.	

Capítulo II

Figura 2.1	23
Índice de intumescimento (S) em função do tempo de imersão de amostras PEC de QT/SC em soluções tampão com diferentes valores de pH.	
Figura 2.2	28
Difratogramas de raios-X dos polieletrólitos puros e das amostras de PEC intumescidas nas soluções tampão com pH 2, 6, 8 e 10, durante os intervalos de 100, 200, 400 e 800 h.	
Figura 2.3	30
Esquema demonstrativo do comportamento da rede polimérica formada por PEC de QT/SC, quando essa é intumescida em meios com diferentes valores de pH.	
Figura 2.4	32
Perfis de difração das substâncias químicas utilizadas no preparo das soluções tampão e das soluções tampão usadas como meio de intumescimento para as amostras de PEC.	

Figura 2.5	34
Razão entre as áreas dos sinais de difração em 64,2° e 43,2° em função do tempo de imersão das amostras para soluções tampão com diferentes pHs.	
Figura 2.6	35
Esquema ilustrativo sobre a transição da estrutura enovelada e a formação de regiões ordenadas na rede polimérica do PEC segundo a variação do pH.	
Figura 2.7	37
Curvas DSC dos (a) polieletrólitos puros e das amostras de PEC de QT/SC intumescidas em soluções tampão com pHs (b) 6, (c) 8 e (d) 10 por diferentes intervalos de tempo.	
Figura 2.8	39
Curvas TGA dos (a) polieletrólitos puros e das amostras de PEC de QT/SC intumescidas em soluções tampão com pH (b) 6, (c) 8 e (d) 10 e por diferentes intervalos de tempo.	
Figura 2.9	42
Imagens obtidas por MEV das amostras de PEC liofilizadas após serem intumescidas em tampão pH 6 nos intervalos de imersão de 100, 200, 400 e 800 h.	
Figura 2.10	44
Imagens obtidas por MEV das amostras de PEC secas após serem intumescidas por um intervalo de 800 h em soluções tampão com pHs 6, 8 e 10.	

Capítulo III

Figura 3.1	48
Estágios críticos de um processo estatístico em investigações científicas.	

Figura 3.2	60
Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2 ³ para a interação dos fatores razão QT/SC e conc. HCl.	
Figura 3.3	60
Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2 ³ para a interação dos fatores razão QT/SC e pH de imersão.	
Figura 3.4	61
Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2 ³ para a interação dos fatores conc. HCl e pH de imersão.	
Figura 3.5	64
Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2 ² com duplicata para a interação dos fatores razão QT/SC e pH de imersão.	

ÍNDICE DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1.1	3
Tabela demonstrativa de alguns biopolímeros e suas respectivas fontes.	

Capítulo II

Tabela 2.1	19
Quantidade de reagentes utilizados na produção das soluções tampão com força iônica constante (0.1 mol L^{-1}).	

Tabela 2.2	33
Áreas dos sinais de difração em $64,2^\circ$ e $43,2^\circ$ observados nos difratogramas de raios-X das amostras de PEC (Figura 2.2) e a razão entre suas áreas.	

Tabela 2.3	43
Tamanho médio dos poros das amostras de PEC secas após serem intumescidas em meios com diferentes valores de pH e por diferentes intervalos de tempo.	

Capítulo III

Tabela 3.1	50
Representação de um planejamento fatorial 2^3 completo.	
Tabela 3.2	54
Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 completo.	

Tabela 3.3	55
Planejamento fatorial 2^3 completo.	
Tabela 3.4	56
Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 com duplicata.	
Tabela 3.5	56
Planejamento fatorial 2^2 com duplicata.	
Tabela 3.6	57
Valores de E obtidos para as amostras de PEC em cada experimento do planejamento fatorial 2^3 completo.	
Tabela 3.7	58
Tabela de resultados ANOVA para o planejamento fatorial 2^3 completo.	
Tabela 3.8	59
Valores dos efeitos principais e de interação para o fatorial completo 2^3 completo.	
Tabela 3.9	62
Valores para a razão entre sinais de difração obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2^2 com duplicata.	
Tabela 3.10	63
Tabela de resultados ANOVA para o planejamento fatorial 2^2 com duplicata.	
Tabela 3.11	63
Valores dos efeitos principais e de interação para o fatorial completo 2^2 .	

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Capítulo II

Equação 2.1	20
Cálculo do índice de intumescimento.	
Equação 2.2	26
Lei de Bragg.	

Capítulo III

Equação 3.1	53
Cálculo da tensão de compressão.	
Equação 3.2	54
Cálculo da deformação.	
Equação 3.3	59
Equação em termos das variáveis codificadas para o modelo obtido no planejamento fatorial 2^3 .	
Equação 3.4	59
Equação em termos das variáveis reais para o modelo obtido no planejamento fatorial 2^3 .	
Equação 3.5	64
Equação em termos das variáveis codificadas para o modelo obtido no planejamento fatorial 2^2 .	
Equação 3.6	64
Equação em termos das variáveis reais para o modelo obtido no planejamento fatorial 2^2 .	

LISTA DE ABREVIATURAS

θ	Ângulo de incidência dos raios-X
μm	Micrometro
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
Å	Angstrom
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
conc.	Concentração
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRX	Difração de raios-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
E	Módulo de elasticidade de compressão
g	Gramas
h	Hora
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minuto
M_v	Massa molar viscosimétrica
M_w	Massa molar em peso
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEC	Complexo Polieletrólito
PET	Polietileno tereftalato
PF	Planejamento Fatorial
pH	Potencial hidrogeniônico
pK_{aQT}	pKa da Quitosana
PLA	Poli(ácido láctico)
PMMA	Poli(metil metacrilato)
PTFE	Politetrafluoretileno
QT	Quitosana
S	Grau de intumescimento
S_{máx}	Valor máximo para o grau de intumescimento
RNA	Ácido ribonucléico
Tg	Temperatura de transição vítrea

TGA	Termogravimetria
u.a.	Unidade arbitrária
v	Volume
WAXD	Difratometria de raios-X de ângulo amplo
W_i	Massa do complexo polieletrólito intumescido
W_o	Massa do complexo polieletrólito seco
σ	Tensão compressiva

RESUMO

Neste trabalho, foi estudado o comportamento de reorganização de redes poliméricas formadas por complexos polieletrólíticos (PEC) de quitosana (QT) e sulfato de condroitina (SC). Estes PEC são obtidos a partir das interações eletrostáticas, originadas pela mistura dos polieletrólitos QT e SC, em solução aquosa ácida. Para este estudo, foram produzidos PEC de QT (M_v igual a $87 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$ e com grau de desacetilação igual a 85 %) e SC (M_v igual a $22 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$), posteriormente intumescidos em soluções tampão com diferentes valores de pH por diferentes intervalos de tempo, o que foi avaliado por meio da determinação do índice de intumescimento. O estudo da reorganização da rede polimérica foi realizado através das técnicas de WAXS, DSC, TGA e imagens obtidas por MEV, após as amostras de PEC serem previamente intumescidas em meios com diferentes valores de pH e por diferentes intervalos de tempo. De acordo com os dados obtidos a partir das técnicas acima descritas foi possível inferir que os PEC de QT/SC produzidos apresentaram a capacidade de reorganizar sua rede polimérica quando comparados com o material formado inicialmente. A reorganização é dependente também, do intervalo de tempo no qual o PEC é intumescido. É proposto que a ocorrência desta reorganização se deve ao rearranjo das cadeias de QT e SC que formam o PEC, após a liberação de parte do SC durante o processo de intumescimento do mesmo, principalmente, em soluções tampão com pH próximo ou maior que o pKa do ácido conjugado da QT ($\text{pKa}_{\text{QT}} \approx 6.2$). A variação do pH do meio de intumescimento faz com que a rede polimérica não mais seja formada por interações eletrostáticas passando a ser formada por ligações de hidrogênio, originadas pela aproximação das cadeias de QT e as não liberadas de SC. Este fenômeno aumenta a cristalinidade e a estabilidade térmica do material quando comparado com as amostras que não intumescidas em menores condições de pH. O tamanho médio dos poros, presentes no PEC, também é influenciado por este comportamento, conforme visualizado nas imagens obtidas por MEV. Logo, através deste estudo foi possível

confirmar que o material analisado possui um interessante caráter pH dependente, podendo portanto, ser previamente tratado para exibir características específicas, adequando assim seu uso para um determinado fim. Em uma etapa subsequente a influência da razão QT/SC, da concentração de ácido clorídrico (HCl) utilizada na solubilização da QT e do pH da solução tampão na qual o PEC é intumescido, na variação do módulo de elasticidade de compressão (E) do PEC após intumescido, foi estudada através da execução de um planejamento fatorial do tipo 2^3 completo. Foram realizadas medidas de compressão em um equipamento Texturômetro para determinar o valor de E . As variáveis concentração de ácido clorídrico (HCl) utilizada na solubilização da QT e pH da solução tampão na qual o PEC é intumescido, bem como a interação dessas duas variáveis, foram consideradas significativas no aumento no valor de E . Por outro lado, a variável razão QT/SC mostrou-se não significativa. Outro planejamento fatorial do tipo 2^2 com duplicata foi executado para estudar a influência das variáveis razão QT/SC e pH da solução tampão no qual o PEC é intumescido, na variação das distâncias periódicas entre as regiões cristalinas presentes na rede polimérica do PEC de QT/SC. A distância periódica foi calculada a partir dos sinais de difração observados nos perfis de difração do material previamente intumescido. Foi possível verificar que o material analisado possui uma interessante dependência em relação ao pH, podendo portanto, ser previamente tratado para exibir características específicas, adequando assim seu uso para um determinado fim. Este biomaterial poderá ser aplicado em estudos futuros como veículo carreador de fármacos para liberação específica ou atuar como substrato para o cultivo de células.

Palavras-chave: Biomateriais, Complexos Polieletrólítico, Quitosana, Sulfato de Condroitina, Reorganização de Cadeias.

ABSTRACT

In this work was developed a study about the self-reorganization of polymeric networks based on polyelectrolytes complexes (PEC) of chitosan (QT) and chondroitin sulfate (SC). These PEC was processed by electrostatic interaction between the charged groups of QT and SC, when these polyelectrolyte are mixing. For this study, was processed PEC of QT (M_v equal to $87 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$ and deacetylation degree of 85 %) and SC (M_v equal to $22 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$) that were swelled in buffer solution with different pH values. The swelling characteristic was evaluated by swelling degree parameter. The self-reorganization of polymeric network was performed by WAXS, DSC, TGA techniques and MEV images, before the PEC samples were previously swell in media with different pH and different time intervals. According to the data from the techniques above described was inferred the processed PEC of QT/SC show the ability to reorganize its polymeric network when compared with the original processed material. This reorganization has a pH- and time-dependent character. It was proposed that these reorganization occur due to the rearrangement of QT and SC chains before part of SC releasing during the swelling, mainly in buffers with pH near or higher the pKa of conjugate acid of QT ($pK_{aQT} \approx 6.2$). The variations in the media pH causes to polymeric network leave to be formed by electrostatic interactions and pass to be formed by hydrogen bond, originated by QT chains and not released SC chains approximation. This phenomenon increases the material crystallinity and thermal stability when it is compared with the sample not swelled in a media with less pH condition. The pores size also is affected by this self-reorganization according to MEV images. Therefore, this study confirms that material has a interesting pH-sensitive property. It can be pre-treated to exhibit specific characteristics suiting its use in a more specific way. In a subsequent step the influence of factors, ratio QT/SC, concentration of hydrochloric acid (HCl) used in the QT solubilization and pH of buffer in which PEC is swollen, in the variation of the elastic

modulus in compression (E) of PEC after swollen, was studied by a complete 2^3 factorial design. Measurements in a Texturometer were made to determine the E value. The factors hydrochloric acid (HCl) used in the solubilization of QT and pH of buffer in which PEC is swollen, as well as the interaction of these two variables were significant to increase of E . Moreover the factor ratio QT/SC proved to be not significant. Another 2^2 factorial design with duplicate was performed to study the influence of the factors, ratio QT/SC and pH of buffer in which PEC is swollen, in the variation of periodic distances between crystalline regions present in the QT/SC PEC polymer network. Thus, to evaluate the predominance of a certain periodic distance, was calculated the ratio between the diffraction signals observed by WAXS analysis of dry PEC after-swelled. In this factor design both factor studied, as well as their interaction, proved to be significant for the formation of crystalline regions with smaller periodic distance. The factorial designs performed allowed to infer from the information obtained, which can produce QT/SC PEC with distinct properties, according to changes in variables. The formed biomaterial will be able to be applied in future studies how devices to controlled release or act how scaffold to cell culture.

Keywords: Biopolymers, Polyelectrolyte Complex, Chitosan, Chondroitin Sulfate, Chains Reorganization.

CAPÍTULO I – Considerações Iniciais

1 - Introdução

1.1 - Biopolímeros

Biopolímeros são polímeros produzidos por organismos vivos. Celulose, proteínas e peptídeos e DNA e RNA são todos exemplos de biopolímeros [1,2]. A celulose é um dos exemplos mais comuns de biopolímeros e o composto orgânico mais comum em nosso planeta. Já o biopolímero DNA é, sem dúvida, o mais importante, pois é o meio pelo qual a herança genética de um indivíduo é transferida aos seus descendentes.

A principal diferença entre os polímeros convencionais e os biopolímeros pode ser encontrada nas suas estruturas. Polímeros, incluindo os biopolímeros, são feitos de unidades repetitivas chamadas de meros. Na maioria dos casos, os biopolímeros têm sua estrutura bem definida, embora esta não seja esta uma característica predominante. A exata composição química e a sequência na qual estas unidades repetitivas estão ordenadas é chamada de estrutura primária como, no caso das proteínas. Muitos biopolímeros apresentam como principal característica estrutura complexa, a qual determina suas funções biológicas e depende de um modo complexo de sua estrutura primária. Ao contrário disso, os polímeros sintéticos geralmente possuem estrutura simples e mais aleatória (ou estocástica). Isso faz com que os polímeros sintéticos apresentem, na maioria das vezes, certa distribuição de massa molar, característica esta geralmente não observada nos biopolímeros. Em contraste aos polímeros sintéticos, os biopolímeros tendem a ter uma estrutura bem definida, apresentando distribuição uniforme de massas moleculares que são construídas utilizando um modelo de processo direcionado. Cada molécula de um determinado biopolímero possui um sequenciamento similar do número de monômeros e, portanto, a incidência de distribuição de massa molar nos biopolímeros é baixa. Este fenômeno é chamado de monodispersividade, que contrasta na maioria das vezes com a polidispersividade observada nos polímeros sintéticos.

Além disso, estes polímeros de ocorrência natural têm complexos padrões de dobramento, incluindo as estruturas secundárias e terciárias, que surgem com base nas propriedades da estrutura primária [2,3].

Muitos biopolímeros são desenvolvidos para o uso comercial e vários outros são estudados tanto para ampliar as aplicações já existentes quanto para as novas aplicações. Algumas destas novas aplicações estão voltadas prioritariamente para substituição dos materiais derivados do petróleo (por exemplo, as embalagens plásticas), para tecnologia de alimentos, na demanda por alimentos convenientes e menos calóricos e para atuar na obtenção de biomateriais, fundamentais para o desenvolvimento da biotecnologia. Em um futuro próximo, os biopolímeros irão desempenhar um importante papel nestas áreas através de seu uso em plásticos biodegradáveis, tais como os aditivos alimentares (incluindo análogos de lipídios), o óleo de reforço da recuperação de produtos químicos, na engenharia de tecidos e também como carreadores de fármacos. Esta ampla aplicabilidade dos biopolímeros deve-se ao fato dos mesmos apresentarem relativa biodegradabilidade e grande biocompatibilidade, além de serem obtidos a partir de recursos renováveis, aspectos muito interessantes e desejados na obtenção de novos materiais [4]. A Tabela 1.1 mostra alguns dos biopolímeros atualmente disponíveis e suas respectivas fontes:

Tabela 1.1 – Tabela demonstrativa de alguns biopolímeros e suas respectivas fontes [4]

Origem Vegetal	Origem Animal	Bactérias
<i>Amido</i>	<i>Ácido hialurônico</i>	<i>Quitina</i>
<i>Celulose</i>	<i>Quitina</i>	<i>Quitosana</i>
<i>Pectina</i>	<i>Quitosana</i>	<i>Xantana</i>
<i>Alginato</i>	<i>Glicosaminoglicanos</i>	<i>Poligalactosamina</i>
<i>Carraginato</i>		<i>Gelano</i>
<i>Gomas</i>		<i>Dextrana</i>
<i>Caseína</i>		
<i>Sedas</i>		
<i>Elastina</i>		
<i>Polihidroxialcanoatos</i>		

Uma área emergente dentre às pesquisas com biopolímeros é a aplicação na síntese de novos materiais. Os biopolímeros vêm desempenhando um papel fundamental na nanotecnologia e na síntese de materiais biomiméticos. Por apresentarem propriedades físicas, químicas e biológicas únicas, estes materiais proporcionam a realização de diversas pesquisas de ponta como a utilização dos biopolímeros como substratos para a formação de arquiteturas moleculares. A formação de túbulos lipídicos e proteínas reticuladas sob estruturas biopoliméricas podem abrir novas oportunidades de um mercado altamente especializado para biopolímeros [5]. Portanto, todos estes avanços tecnológicos e biotecnológicos, eventualmente, desempenham um papel fundamental na mudança do equilíbrio que tende a se voltar, no futuro próximo, mais para o uso de biopolímeros do que para o uso de polímeros sintéticos à base de petróleo.

1.2 - Biomateriais

A formulação de uma definição clara para o termo “biomaterial” tem esbarrado em certas dificuldades. Dentre as definições mais comumente encontradas em trabalhos pode ser citada: “Um biomaterial é qualquer material, de característica natural ou não, que compreende o todo ou parte de uma estrutura viva ou dispositivo biomédico que realiza, aumenta, ou substitui uma função natural” [6]. Deve ser salientado que a definição de biomaterial não contempla apenas materiais naturais ou sintéticos. Um biomaterial pode também ser um auto-enxerto, do enxerto heterólogo ou usados como material de transplante. Os biomateriais são materiais destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo [7]. Muitas vezes, associa-se o conceito de biomateriais a materiais de origem natural, mais conhecidos por biopolímeros, mas esta associação não é inteiramente correta, já que existem biomateriais de origem sintética que podem entrar em contato com o organismo, desempenhando diversas funções benéficas na área da saúde. A evolução dos biomateriais é relativamente recente e juntamente com ela surgiram também novas especialidades do conhecimento. A engenharia biomédica, biotecnologia, biomecânica, liberação controlada de fármacos (*drug delivery*), engenharia de tecidos e medicina regenerativa são alguns exemplos dessas novas especialidades [7].

A área de biomateriais engloba o conhecimento e a colaboração de diversas especialidades, desde o comportamento mecânico até as funções biológicas em nível molecular nos tecidos, passando pela engenharia de materiais, onde são desenvolvidos sistemas com propriedades adequadas e, também, determinadas aplicações no organismo. A evolução atual dos biomateriais depende, assim, dos avanços das diversas áreas, de maneira global da biotecnologia e da ciência dos materiais.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [8], grande parte dos "materiais de uso em saúde", são enquadrados como biomateriais como próteses, lentes, enxertos, *stents*, cateteres, tubos de circulação extracorpórea e arcabouços (*scaffolds*) empregados na engenharia de tecidos (*Tissue Engineering*), entre outros. Ao se levar em conta todas essas aplicações, faz-se necessário definir um parâmetro fundamental para a viabilidade dos biomateriais: a biocompatibilidade. A biocompatibilidade com o organismo pode ser definida como a capacidade do material de ter uma resposta favorável numa aplicação específica, com o mínimo de reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluídos orgânicos [9]. Não existem materiais totalmente inertes, há sempre uma resposta dos tecidos a qualquer corpo estranho quando inserido no corpo humano. Logo, ao alterar algumas propriedades dos materiais é possível minimizar ou controlar a resposta do tecido.

Além da biocompatibilidade, os biomateriais poliméricos não devem exibir toxicidade, comportamento irritante ou quaisquer respostas fisiológicas adversas [10]. Neste sentido, a bioatividade é também importante na funcionalidade de um biomaterial. Um material é bioativo quando há uma resposta biológica específica na interface do material, por exemplo, permitindo o crescimento ósseo e a ligação entre o tecido e o material [11]. Os polímeros com caráter biocompatível apresentam grande potencial em aplicações biomédicas, como por exemplo, em placas ósseas, parafusos de fixação ou suturas [12]. As três principais classes de materiais utilizados em medicina são os metais, os polímeros e as cerâmicas. Além das combinações destes três tipos por meio de compósitos. A Fig. 1.1 demonstra algumas das possíveis aplicações de polímeros que atuam como biomateriais.

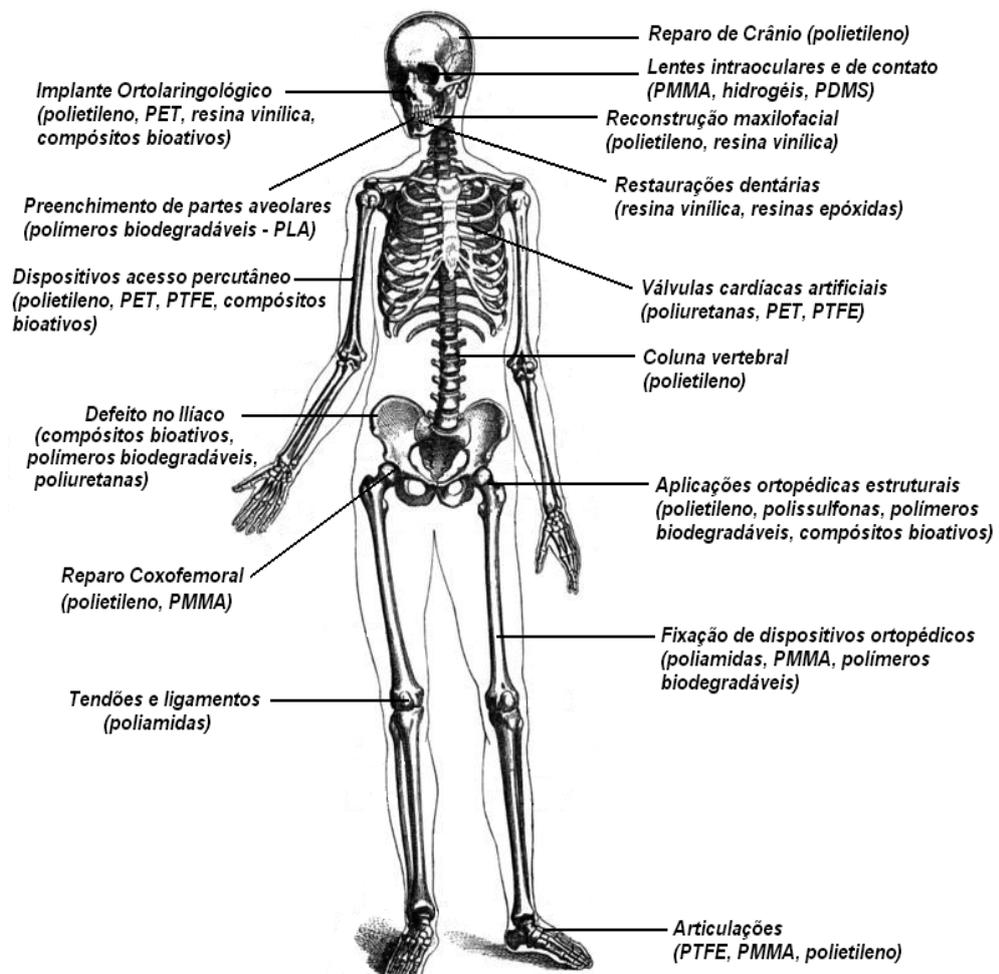


Figura 1.1 – Polímeros utilizados como biomateriais [13].

A grande aplicabilidade dos biomateriais e a ascendência dos materiais produzidos em escala nano, estreita cada vez mais esta relação. O desenvolvimento de novos produtos passa, na maioria das vezes, pelo entendimento do papel da interação (em escala nano), do material com o meio biológico que definirá se haverá formação óssea (caso de hastes femorais ou implantes dentários) ou uma indesejável adesão plaquetária (caso das próteses endovasculares). Além disso, existem várias linhas de pesquisa voltadas para a produção de nanopartículas como carreadoras de fármacos ou para uso em terapias localizadas.

1.3 - Liberação Controlada de Fármacos

O advento dos biomateriais aguça o desenvolvimento de novas tecnologias e a busca por materiais com maior biocompatibilidade, ampla aplicabilidade e que possuam inúmeras vantagens sobre os materiais convencionais aplicados no campo da biotecnologia. O desenvolvimento dos sistemas de liberação controlada de fármacos, freqüentemente descritos na literatura como *drug delivery systems*, são bons exemplos deste expressivo aumento na aplicação dos biomateriais. Os sistemas de liberação controlada oferecem inúmeras vantagens quando comparados aos métodos convencionais de medicação. Dentre estas vantagens, destaca-se sua maior eficácia terapêutica, a qual diminui significativamente o risco de toxicidade e garante um maior tempo de permanência na circulação sanguínea [14]. O uso de biomateriais como carreadores de fármacos possibilita ainda uma redução nas reações adversas provocadas pela administração do fármaco (sem reações inflamatórias locais) aumentando assim sua segurança. Além disso, o fármaco é direcionado a alvos específicos, sem imobilização significativa das espécies bioativas. Isto garante maior comodidade e conveniência ao paciente (menor número de doses). O principal objetivo de um sistema de liberação controlada é o de sustentar a liberação do fármaco dentro do nível terapêutico por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. Esse nível terapêutico encontra-se situado entre o nível sub-terapêutico e o nível tóxico, respectivamente [15]. Dentre os polímeros biocompatíveis podem ser citados os polímeros naturais (colágeno, celulose, quitina, etc.), os polímeros naturais modificados (quitosana reticulada com glutaraldeído, por exemplo) e os polímeros sintéticos (poli(vinil álcool), poliésteres, etc.).

Os sistemas de liberação controlada do tipo polimérico são classificados de acordo com vários mecanismos, já conhecidos há algum tempo. Os sistemas controlados por difusão são os mais comuns e dois tipos são descritos. No primeiro, o agente bioativo (fármaco) forma uma partícula interna (caroço) envolvida por uma barreira de difusão inerte. Estes

sistemas incluem membranas [16], cápsulas [17], nanocápsulas [18], lipossomas [19] e fibras ocas [20]. O segundo tipo é um sólido monolítico no qual, o agente ativo é disperso ou dissolvido em um polímero inerte e a difusão do fármaco é a etapa limitante, sendo a taxa de liberação dependente da escolha do polímero [14].

Sistemas controlados quimicamente fazem uso da bioerosão de polímeros, resultando na absorção dos resíduos pelo organismo. A droga também pode estar ligada covalentemente ao polímero e ser liberada por cisão da ligação por ação da água ou de enzimas. Nos sistemas controlados por solvente o agente ativo está dissolvido ou disperso na matriz polimérica e não se difunde através da matriz. Para que ocorra a difusão, o polímero deve ser intumescido (por exemplo, com água), diminuindo a temperatura de transição vítrea (T_g) e aumento a plasticidade do material. Deste modo, o fármaco contido na matriz pode se difundir para o meio externo [14].

A utilização desses sistemas em liberação controlada de fármacos envolve um vasto campo de estudos e tem reunido esforços na determinação de materiais passíveis de aplicação, dentre os quais se destacam os biopolímeros. Além disso, busca-se ainda potencializar os novos sistemas carreadores para liberação controlada e dirigida de fármacos aumentando desta forma, a permanência do fármaco na circulação sistêmica para que se alcance maior eficácia terapêutica [21]. Dentre esses objetivos, os complexos polieletrólíticos (PEC) mostram grande potencialidade. Inúmeros trabalhos, onde PECs são produzidos a partir de biopolímeros, descrevem a versatilidade desses interessantes materiais como carreadores de fármacos [22-24].

1.4 - Complexos Polieletrólíticos (PEC)

Os complexos polieletrólíticos são formados por macromoléculas que possuem um número relativamente grande de grupos funcionais com carga ou que em condições adequadas podem adquirir carga. Essas macromoléculas podem consistir de policações ou poliânions ou ambos, dependendo dos grupos funcionais presentes [25]. Estes complexos são formados por interações iônicas com redes reticuladas ionicamente. Logo, são formados pela interação entre dois polieletrólitos com cargas opostas em solução aquosa. A rede formada por interações iônicas é caracterizada por um microambiente hidrofílico contendo bastante água e uma alta densidade de carga. A atração eletrostática entre os grupos com cargas opostas é a principal forma de interação entre as macromoléculas. Isto é, ela é mais forte que as interações secundárias tais como, ligações de hidrogênio e interações do tipo dipolo-dipolo [26].

Para que um PEC seja formado, ambos os polieletrólitos devem apresentar seus grupos funcionais na forma ionizada. Levando em consideração esse requisito, a complexação entre os polieletrólitos pode ocorrer em uma faixa de pH que abranja os valores de pKa dos dois polímeros [27], não sendo esta uma via de regra. Durante a complexação os polieletrólitos, esses podem também coacervar, ou seja, formar um hidrogel mais ou menos compacto. Além disso, se as interações são muito fortes podem proporcionar a ocorrência de precipitação do material formado [28]. As propriedades do PEC são, principalmente, determinadas pelo grau de interação entre os polímeros. O grau de interação depende, essencialmente, de sua densidade de carga global e determina desse modo, as proporções relativas dos componentes no PEC então formados [29].

Neste sentido, dependendo do meio em que os PECs são intumescidos, eles podem exibir alta densidade de carga e diferentes comportamentos de intumescimento. Desta forma, permitem a difusão de água e/ou moléculas de solutos, tais como fármacos e proteínas. Os PECs podem apresentar maiores índices de intumescimento em meios em que o pH se situa

entre os valores dos pKa dos grupos predominantes que geram as cargas opostas do PEC [30]. Esta característica de sensibilidade encontrada nas variações do pH do meio no qual está inserido torna o PEC um material interessante para atuar como carreador para liberação controlada de fármacos não somente em meio ácido, mas também, nos meios neutro e básico [30].

Complexos polieletrólíticos têm atraído muita atenção dos pesquisadores devido as suas propriedades únicas e seu modo relativamente fácil de preparo [31,32]. Nos últimos anos, muitas publicações dissertam sobre a formação de complexos polieletrólíticos envolvendo o polieletrólito quitosana (QT) e espécies polianiônicas (principalmente as de origem natural) [33]. Os complexos polieletrólíticos contendo QT como um dos seus componentes apresentam potencialidade para aplicações biomédicas, farmacêuticas, na indústria alimentícia etc. [34].

1.5 - Quitosana (QT)

Um dos polímeros amplamente utilizado na obtenção de PEC é a quitosana (QT), um copolímero linear da *D*-glucosamina e da *N*-acetil-*D*-glicosamina com ligação tipo $\beta(1\rightarrow4)$ (Fig. 1.2). É derivada do polímero natural quitina que, por sua vez, é o principal componente das conchas dos crustáceos, cutículas dos insetos e paredes das células dos fungos [35]. Os principais parâmetros que influenciam nas características da quitosana são a sua massa molecular e o seu grau de desacetilação. Esses parâmetros são determinados pelas condições selecionadas durante a sua preparação, mas podem ser, além disso, modificados em um estágio posterior. Por exemplo, a QT pode ser reacetilada e a massa molar pode ser diminuída por despolimerização ácida [26]. Outra característica importante da QT é a sua insolubilidade em água pura. Contudo, é possível solubilizá-la em água contendo ácidos orgânicos como ácido acético, fórmico, cítrico, além de ácidos inorgânicos como ácido clorídrico diluído

resultando em soluções viscosas. A solubilidade da quitosana está relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na sua cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade desses grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também, maior a solvatação pela água.

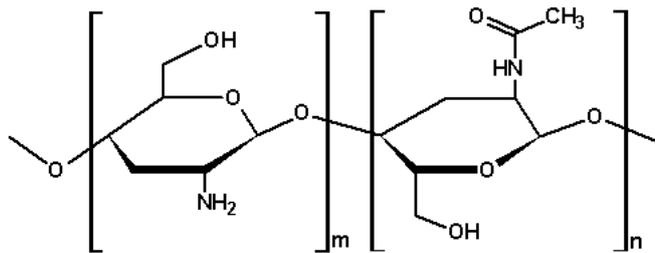


Figura 1.2 – Unidade repetitiva da quitosana ($m > n$)

A QT tem sido objeto de muitas pesquisas, pois possui propriedades físicas únicas. Ela é um interessante biopolímero com boa biocompatibilidade, baixa toxicidade, potencial hemostático, boa característica de formação de filmes e atividade anti-infecciosa [36,37]. Além disso, a quitosana é metabolizada por certas enzimas humanas, (ex: lisozima) podendo assim, ser considerada biodegradável.

Este versátil polímero tem encontrado aplicações em muitas indústrias primárias como a agricultura, de papel, têxtil, farmacológica, cosmética e no tratamento de água [38]. Por apresentar grupos amino e hidroxila em posições adjacentes, a quitosana é um polímero quelante natural que pode ser utilizado para remover íons de metais de transição de águas poluídas [39]. Outro fator observado, é que ela atua na cicatrização de ferimentos, possui ação antitumoral e as suas propriedades anticoagulantes permitem a sua utilização na medicina como transportadores de fármacos, para o reparo de nervos ou substratos porosos biodegradáveis para regeneração da pele. Pesquisas sobre o uso de quitosana em sistemas de liberação controlada de fármacos indicam aplicações do tipo oral, parental, transdermal,

ocular e nasal. Além disto, a quitosana tem sido utilizada na obtenção de sistemas implantados de liberação controlada [40].

Devido as suas diferentes aplicações, a quitosana tem sido formulada em pó, géis e filmes, esponjas, tabletes intragástricos e, especialmente, no formato de partículas esféricas (micro e macropartículas). Duas das propriedades mais importantes da quitosana são a sua natureza catiônica e a alta densidade de carga em solução ácida. A quitosana, forma complexos iônicos insolúveis com espécies polianiónicas solúveis em água em condições neutras [41]. Isto faz com que os complexos polieletrólíticos, sendo a QT um dos seus componentes, apresentem um grande potencial para serem utilizados em aplicações biomédicas e/ou farmacêuticas.

1.6 - Sulfato de Condroitina (SC)

O sulfato de condroitina (SC) integra a família dos glicosaminoglicanos (GAGs), sendo caracterizado como um copolímero alternado de $\beta(1,4)$ -*D*-ácido glucurônico e $\beta(1,3)$ -*N*-acetil-*D*-galactosamina que podem ser sulfatados nos carbonos C₄ ou C₆ (Fig. 1.3). Logo, é um importante componente estrutural de ligações dos tecidos sendo, também, um componente chave da matriz cartilaginosa. Na ligação de tecidos forma uma rede com o colágeno para permitir a passagem de macromoléculas com as proteínas globulares. Uma característica interessante do SC é a sua degradação por bactérias anaeróbicas, *Bacteroides thetaiotaomicron* e *B. ovatus*, que residem no intestino grosso [42,43]. Esta situação sugere que o SC seja, potencialmente, um bom candidato em carregador de fármacos para atuar na região do cólon [44,45].

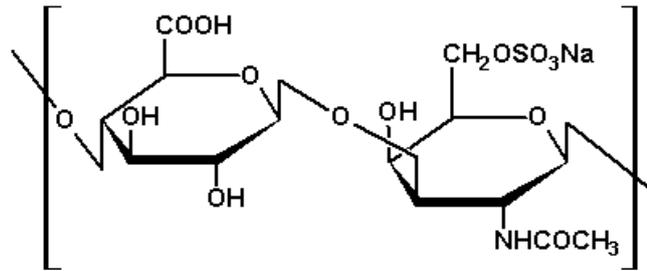


Figura 1.3 – Unidade repetitiva do sulfato de condroitina.

Este biopolímero, extraído principalmente da aorta bovina, é utilizado há bastante tempo no combate de doenças relacionadas à aterosclerose, trombose, hiperlipidemia e osteoartrite [46,47]. Estudos clínicos já têm demonstrado efeitos terapêuticos do SC administrado via oral em pacientes com osteoporose, com a melhoria na função articular e redução de dores. Contudo, o fato do SC ser altamente solúvel sob condições fisiológicas limita sua aplicação como veículo em estado sólido para liberação de fármacos. Neste sentido, por ser um polieletrólito com caráter aniônico, o SC pode formar complexos polieletrólíticos (PEC) através de interação eletrostática com substâncias carregadas opostamente podendo ser uma ótima estratégia para manter o SC no estado sólido para o seu uso como sistema de liberação de fármacos.

1.7 - Objetivos

1.7.1 - Objetivos Gerais

Formar redes poliméricas formadas por complexos polieletrólíticos (PEC) constituídos de quitosana e sulfato de condroitina (QT/SC) e realizar a caracterização químico-estrutural, após esses serem submetidos a tratamentos em diferentes condições de pHs e por diferentes intervalos de tempo.

1.7.2 Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o índice de intumescimento (S) das amostras de PEC de QT/SC quando imersas em diferentes soluções tampão.
- ✓ Após serem intumescidos em soluções com diferentes valores de pH e por diferentes intervalos de tempo, analisar amostras de PEC de QT/SC liofilizadas, através de técnicas instrumentais, para:
 - I. Determinar mudanças microestruturais provocadas na rede polimérica do PEC;
 - II. Verificar mudanças no comportamento térmico do material;
 - III. Avaliar mudanças na morfologia do PEC.
- ✓ Estudar o efeito das variáveis razão entre as massas de QT e SC (razão QT/SC), concentração de ácido clorídrico (HCl) utilizado na solubilização da QT (conc. HCl) e pH da solução tampão onde a amostra de PEC é previamente intumescida (pH imersão), sobre o módulo elástico de compressão (E) do PEC de QT/SC.
- ✓ Estudar o efeito das variáveis razão entre as massas de QT e SC (razão QT/SC), e pH da solução tampão onde a amostra de PEC é previamente intumescida (pH imersão), sobre as distâncias periódicas predominantes das regiões ordenadas formadas pelo reordenamento das cadeias de QT e SC na rede polimérica formada por PEC.

CAPÍTULO II – Complexos Polieletrólíticos de QT/SC

2.1 - Introdução

Nos últimos anos, muitas publicações têm dado ênfase ao estudo e a aplicação dos chamados biomateriais, especialmente, no campo da biotecnologia, devido às diversas vantagens que esses apresentam sobre os outros materiais (baixa toxicidade, biocompatibilidade, etc.) e também, por sua grande aplicabilidade [48].

Os sistemas utilizados para liberação controlada de fármacos [49], os quais demonstram superioridade quando comparados com as formas de administração convencionais (sprays, pílulas, injeções, etc.) [50] são considerados alguns exemplos de aplicação dos biomateriais. Dentre os materiais usados na produção destes sistemas encontra-se, a quitosana (QT); um polímero linear derivado do polímero natural quitina, o principal componente formador das conchas dos crustáceos, das cutículas dos insetos e da parede das células dos fungos [51]. Diversas pesquisas com QT têm sido desenvolvidas devido às suas excelentes propriedades físicas e biológicas [32,35]. Devido à sua natureza catiônica e alta densidade de carga, quando em contato com soluções ácidas, a QT pode formar redes poliméricas de complexos polieletrólíticos (PEC) na presença de espécies polianiónicas solúveis [52]. Esta rede polimérica é formada por macromoléculas contendo um número relativamente grande de grupos funcionais carregados ou que em condições apropriadas podem tornar-se carregados [34]. Logo, a atração eletrostática é a principal interação para a formação do PEC, a qual se sobrepõe às interações secundárias, como é o caso, das ligações de hidrogênio e as ligações do tipo dipolo-dipolo [28].

Neste sentido, dependendo do meio no qual a rede polimérica formada por PEC é intumescida, ela pode exibir alta densidade de carga e diferentes comportamentos de intumescimento [53] permitindo assim, a difusão de água e/ou moléculas de, por exemplo,

fármacos e proteínas [54]. A rede polimérica pode alcançar altos índices de intumescimento quando intumescida em um meio onde o pH está entre os valores dos pKa dos grupos predominantes que, por sua vez, geram cargas elétricas opostas necessárias para sua formação. Este comportamento característico faz com que PEC seja um material interessante para atuar como carreador na liberação controlada de fármacos não somente em meio ácido, mas também em meios neutros e básicos.

Neste trabalho, a espécie polianiônica usada para formar o complexo polieletrólito juntamente com a QT foi o sulfato de condroitina (SC). Esse é um importante componente estrutural dos tecidos conectivos e é um componente chave da matriz cartilaginosa. Este biopolímero extraído principalmente da aorta bovina é utilizado como fármaco no combate de doenças relacionadas à arteriosclerose, trombose e osteoartrite [46].

Vários trabalhos discutem a formação e a implementação destes sistemas formados por PEC [55], contudo, uma maior atenção não tem sido dada ao estudo e a compreensão da estrutura destes materiais. Segundo Piai *et al.* (2009) [56], após a liberação de uma fração de SC do PEC de QT/SC intumescido, ocorre o reordenamento da rede polimérica em uma faixa de pH entre 6 e 12 em tempo de intumescimento de 200 h. Nesta Dissertação de Mestrado, foi realizado o estudo do comportamento da reordenação das cadeias de QT e SC formadoras do PEC, aprofundando deste modo, os estudos previamente realizados no nosso laboratório de pesquisas (GMPC/UEM).

2.2 - Experimental

2.2.1 - Reagentes

Quitosana (Golden-Shell Biochemical, China) com grau de desacetilação igual a 85 % e massa molar viscosimétrica (M_V) igual a 87×10^3 g mol⁻¹. A M_V foi obtida de acordo com o método proposto por Mao *et al.* (2004) [57]. Por este método foi medida a viscosidade intrínseca da QT em solução de ácido acético (HAc) 2% / 0,2 mol L⁻¹ de acetato de sódio (NaAc), utilizando um viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde (Modelo Cannon 100/E534) a 25,0 °C. As concentrações das soluções foram ajustadas baseando-se na viscosidade das amostras. As constantes de Mark-Houwink utilizadas para QT com grau de desacetilação igual a 85 % foram $K = 1,38 \times 10^{-5}$ e $a = 0,85$;

Sulfato de Condroitina, (lote OP1141/08, gentilmente fornecida pela Solabia, Maringá-Brasil) com M_V igual a 22×10^3 g mol⁻¹. M_V obtida de acordo com o método proposto por Wasteson *et al.* (1971) [58]. Novamente utilizando um viscosímetro do tipo Ubbelohde (Modelo Cannon 100/E534), mediu-se a viscosimetria de soluções de contendo de 1-5 miligramas de SC em 0,2 mol L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl). Para este método o valor da constante K é $5,0 \times 10^{-5}$ e para a é 1,14;

Ácido clorídrico (HCl) P.A. 37 % em massa (Nuclear, Brasil);

Cloreto de potássio (KCl) P.A. 99,5 % em massa (Dinâmica, Brasil);

Fosfato de potássio monobásico anidro (KH₂PO₄) P.A. 98 % em massa (Nuclear, Brasil);

Biftalato de potássio (KHC₆H₄(COO)₂) P.A. 99,95 % em massa (Vetec, Brasil);

Hidróxido de sódio (NaOH) P.A. 95 – 100 % em massa (Nuclear, Brasil);

Ácido bórico (H₃BO₃) P.A. 95 % em massa (Nuclear, Brasil)

Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado (Na₂HPO₄•12H₂O) P.A. 98 % em massa (Nuclear, Brasil).

2.2.2 - Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento marca Fisatom;

pHmetro marca Hanna Instruments modelo HI 9321;

Bloco de aquecimento marca Stuart Scientific;

Liofilizador marca Christ Gefriertrocknungsanlagen modelo Alpha 1-2/LD;

Difratômetro de raios-X marca Shimadzu modelo D6000, com fonte de Cu K_{α} 40Kv e 30mA ($\lambda = 0,15418$ nm);

Sistema de Análise Térmica Simultânea (STA) marca Netzsch modelo STA 409 PG/4/G Luxx,

Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) marca Shimadzu modelo SS-550 Superscan;

Balança Analítica marca Gehaka modelo AG 200, com precisão 1/10000.

2.2.3 - Formação do PEC de QT/SC

Os PEC de QT/SC foram formados a partir de uma solução aquosa, resultante da mistura de duas outras soluções aquosas individuais de QT e SC. Para obtenção da primeira solução, 6,4 g de QT foram dissolvidos em 400 mL de solução aquosa ácida, com concentração de HCl igual a $0,57 \text{ mol L}^{-1}$. Esta solução foi aquecida até a temperatura de 65°C e agitada até a completa solubilização da QT produzindo, assim, uma solução aquosa ácida com concentração igual a 1,6 % m/v. Já para a segunda solução, 25,0 g de SC foram solubilizados em água até a obtenção de uma solução aquosa de 100 mL com concentração igual a 25,0 % m/v.

Após isto, as duas soluções produzidas foram misturadas lentamente sob agitação vigorosa a temperatura ambiente. A solução resultante foi então estocada por 24 h para a sedimentação do PEC. Decorrido este período, o material recém formado foi separado do sobrenadante e purificado em 500 mL de água destilada por outras 24 h. Durante o processo

de purificação, o pH do meio foi ajustado à neutralidade (pH 7) com o gotejamento de uma solução aquosa de NaOH 0,2 mol L⁻¹. Por fim, o material purificado foi cortado em pequenos cubos, cujas arestas apresentaram cerca de 1,50 cm, e então, foram secos a temperatura ambiente por 48 h.

2.2.4 - Preparação das Soluções Tampão

As soluções tampão utilizadas neste trabalho, foram produzidas segundo o Livro Nacional de Fórmulas – Farmacopéia dos Estados Unidos (USP30-NF2520, 2007) [59]. Diferentes soluções tampão foram preparadas numa faixa de pH de 2 a 10 com concentração de 50 mmol L⁻¹. L. A força iônica foi ajustada em uma concentração constante de 0,1 mol L⁻¹ com a adição de KCl. As quantidades necessárias das soluções de partida para a produção da cada solução tampão são descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Quantidade de reagentes utilizados na produção das soluções tampão com força iônica constante (0,1 mol L⁻¹).

pH	Soluto	Solução	HCl	NaOH	KCl
		0,5 mol L ⁻¹ (mL)	0,2 mol L ⁻¹ (mL)	0,2 mol L ⁻¹ (mL)	adicionado (g)
2,00	KCl	100	53,0	0	2,94
6,00	KH ₂ PO ₄	100	0	29	3,30
8,00	KH ₂ PO ₄	100	0	234	3,04
10,00	H ₃ BO ₃ / KCl	100	0	220	0,45

2.2.5 - Índice de Intumescimento (S)

Para caracterizar a capacidade de absorção de líquido aquosos do PEC de QT/SC, foi utilizado neste trabalho o parâmetro índice de intumescimento (S) [60], o qual é dado pela razão entre a massa do PEC intumescido (W_I) e a massa do PEC seco (W_0). Para o cálculo de S foi usada a seguinte equação:

$$S = \frac{W_I - W_0}{W_0} \times 100 \quad (2.1)$$

Para a determinação de S, as amostras de PEC secas, preparadas conforme o item 2.2.3, foram previamente pesadas e posteriormente imersas em soluções tampão nos pHs 2, 6, 8 e 10, respectivamente. Este valores de pH foram escolhidos aleatoriamente não seguindo nenhum padrão ou regra específica. Após intervalos de tempo programados, as amostras foram recolhidas e pesadas possibilitando assim, determinar os valores de S. As medidas foram realizadas em triplicata.

2.2.6 - Reorganização da rede polimérica formada por PEC de QT/SC

Os pequenos cubos de PEC secos, os quais foram preparados conforme o item 2.2.3, foram imersos em recipientes cilíndricos contendo cerca de 30 mL de solução tampão. Os valores de pH das soluções tampão foram 2, 6, 8 e 10, respectivamente. No que tange os recipientes, esses foram mantidos a temperatura de 37 °C, temperatura essa próxima a temperatura corpórea, em um bloco aquecido com intervalos de imersão em cada tampão de 100, 200, 400 e 800 h. Estes intervalos de tempo foram escolhidos ao acaso. Decorridos os intervalos de imersão, as amostras de PEC foram coletadas e trituradas em pequenos pedaços. Este material foi então, liofilizado a -55 °C por 24 h e, após a realização dessa etapa, as

amostras se apresentaram na forma de pó sendo esse posteriormente analisado pelas técnicas instrumentais descritas abaixo.

2.2.7 - Análises de difração de raios-X de ângulo amplo (WAXS)

As amostras de PEC secas, depois de serem intumescidas em soluções tampão com diferentes pHs e por diferentes intervalos de tempo, foram caracterizadas através da técnica de WAXS. Os dados de difração de raios-X (DRX) foram coletados em uma faixa de varredura de $2\theta = 5^\circ - 70^\circ$, com resolução de $0,02^\circ$, em uma velocidade de varredura de 2° min^{-1} . Foram também caracterizados por esta técnica os respectivos compostos polieletrólíticos puros (QT e SC), os sais utilizados na produção das respectivas soluções tampão e as próprias soluções tampão.

2.2.8 - Análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC)

Estas análises foram realizadas utilizando-se um calorímetro com escaneamento a uma taxa de $10^\circ \text{ C min}^{-1}$ sob uma atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL min^{-1} em um intervalo de temperatura de 22 a 400° C . As análises foram desenvolvidas utilizando recipientes hermeticamente fechados, para reduzir os efeitos da perda de umidade.

2.2.9 - Análises termogravimétricas (TGA)

As análises termogravimétricas das amostras de PEC foram efetuadas por meio de um analisador termogravimétrico a uma taxa de $10^\circ \text{ C min}^{-1}$, sob uma atmosfera de nitrogênio com vazão de 20 mL min^{-1} em um intervalo de temperatura de 22 a 400° C .

2.2.10 - Imagens de MEV do PEC de QT/SC

As morfologias dos poros presentes nas amostras de PEC foram investigadas através de imagens de MEV. Já, essas imagens foram obtidas após o PEC de QT/SC ser intumescido em soluções tampão com diferentes valores de pH e intervalos de imersão. Após intumescidas, as amostras foram removidas dos respectivos recipientes e rapidamente congeladas em nitrogênio líquido por 5 minutos. Após o congelamento das amostras, essas foram fraturadas em pequenos pedaços. Posteriormente, esses pedaços foram liofilizados a -55 °C por 48 h. As superfícies das amostras liofilizadas, por sua vez, foram metalizadas com ouro por *sputtering*, para torná-las eletricamente condutora e possibilitar a visualização por MEV. As imagens foram obtidas por meio da aplicação de uma voltagem de aceleração dos elétrons de 8 kV.

2.3 - Resultados e Discussão

2.3.1 - Determinação do índice de intumescimento (S)

A capacidade de intumescimento do PEC de QT/SC foi avaliada através do parâmetro índice de intumescimento (S). Na Fig. 2.1 são apresentadas as curvas de intumescimento das amostras de PEC imersas em soluções tampão com diferentes valores de pH. Cada amostra foi mantida em uma solução tampão com um valor de pH fixo e as medidas foram feitas em um intervalo de tempo de 0 a 350 h. A escolha dos valores de pH estudados foi feita sem a utilização de um critério específico.

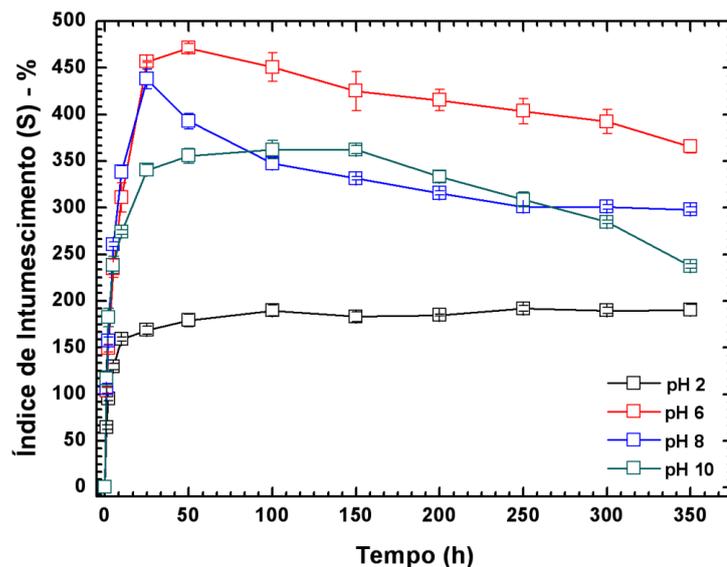


Figura 2.1 – Índice de intumescimento (S) em função do tempo de imersão de amostras PEC de QT/SC em soluções tampão com diferentes valores de pH.

Segundo os dados obtidos e demonstrados na Fig. 2.1 as amostras de PEC que foram intumescidas em tampão pH 2 atingiram o equilíbrio mais rapidamente que as amostras intumescidas em soluções tampão com maior valor de pH. O valor de S calculado para esta condição de pH mostra que as amostras de PEC apresentam a capacidade de absorver uma quantidade de líquido cerca de 175 % maior que sua massa seca. Contudo, este foi o menor valor calculado para o parâmetro S dentre todas as condições de pH do meio de

intumescimento testadas. Quando as amostras de PEC são intumescidas em um meio onde o pH é menor que o pKa do ácido conjugado da QT ($pK_{a_{QT}} \approx 6,20$) [60], os grupos amino ($-NH_2$) presentes na estrutura da QT encontram-se na forma ionizada ($-NH_3^+$). Isto possibilita que estes grupos interajam fortemente com os grupamentos sulfônicos ($-OSO_3^-$) presentes nas cadeias de SC. Deve ser mencionado que o valor do pKa dos grupos sulfônicos é aproximadamente 2,60 [62]. Dessa forma, esta forte interação faz com que a rede polimérica formada entre cadeias de QT e SC permaneça estável e enovelada de modo que não ocorra uma expansão significativa da mesma, reduzindo assim a sua capacidade de absorção de líquidos.

Para as amostras de PEC intumescidas nas outras soluções tampão, com pHs 6, 8 e 10, é verificado que estas intumescem até um certo valor máximo ($S_{m\acute{a}x}$) e então suas respectivas curvas apresentam decaimento com o tempo de imersão. O decaimento foi atribuído à perda de massa das amostras de PEC, que quando intumescidas em tampão com pH maior que o $pK_{a_{QT}}$ não mais apresentam forte interação entre as cadeias de QT e SC. Isso ocorre, pois nestas condições de pH não há a ionização dos grupos amino da QT [56], enquanto que os grupos sulfônicos ($pK_a \approx 2.60$) [62] e carboxílicos ($pK_a \approx 4.57$) [62] do SC são convertidos nas suas respectivas formas ionizadas. Com isto, há um aumento na densidade de cargas negativas no interior da rede polimérica e as cargas negativas promovem a repulsão eletrostática do tipo ânion-ânion entre as cadeias de SC. Tal repulsão, somada à diminuição das interações eletrostáticas entre as cadeias de ambos os polieletrólitos, desestabiliza a rede possibilitando que as cadeias de SC anteriormente aprisionadas, adquiram maior mobilidade. A desestabilização da rede promove a expansão da mesma, ocasionando o aumento na difusão de líquidos pelo seu interior. Durante a difusão de líquidos as cadeias de SC podem sofrer hidrólise catalítica e os seus fragmentos e/ou cadeias pequenas, são capturadas e posteriormente liberadas por difusão durante o efluxo de líquido [56]. Esta suposição é

sustentada, além das inferências acima discutidas, pelo fato de que o SC apresenta boa solubilidade em condições próximas à neutralidade [63], sendo essa característica não observada para a QT [64]. Isto reforça a hipótese de que a redução de massa observada nas amostras intumescidas em meios com $\text{pH} \geq 6$ é devida a liberação de parte das cadeias de SC.

Os maiores valores de S foram observados para as amostras intumescidas nas soluções tampão com pH 6 ou 8, pois nestas condições a rede polimérica apresenta-se desestabilizada e, conseqüentemente, expandida. O aumento no pH do meio de intumescimento favorece a disponibilidade de grupos básicos (OH⁻) que, por sua vez, reagem com os grupos amino protonados da QT através de uma simples reação do tipo ácido-base ($-\text{NH}_3^+ + \text{OH}^- \rightarrow -\text{NH}_2 + \text{H}_2\text{O}$). Isto possibilita que os grupos presentes na QT passem a interagir com os grupos sulfônicos e carboxilato do SC por meio de ligações de hidrogênio. Com a diminuição da repulsão eletrostática entre as cadeias, essas passam a se aproximar e possibilita que a rede polimérica adquira novamente estabilidade. Por isso, é observado que para as amostras intumescidas em tampão pH 10 o valor máximo de S é menor que os valores observados para as amostras intumescidas em soluções tampão com pHs 6 ou 8. A determinação do parâmetro S para as amostras de PEC intumescidas em diferentes condições de pH permitiu deduzir que o comportamento de intumescimento é dependente do pH e do tempo de imersão. Assim, o PEC de QT/SC descrito neste trabalho pode ser classificado com um “biomaterial inteligente” [65].

2.3.2 - Análise dos difratogramas de raios-X

A difração de raios-X de ângulo amplo (WAXS) é uma das principais técnicas de caracterização microestrutural utilizada na área de materiais. Tem sido usada, principalmente, na caracterização de novos materiais micro e nanoestruturados. Seu funcionamento, de forma simplificada pode ser assim entendido: ao atingirem um material, os raios-X podem ser

espalhados elasticamente, sem perda de energia pelos elétrons de um átomo (dispersão ou espalhamento coerente). Após a colisão com o elétron, o fóton de raios-X muda sua trajetória, mantendo, porém, a mesma fase e a energia do fóton incidente. Sob o ponto de vista da física ondulatória, pode-se dizer que a onda eletromagnética é instantaneamente absorvida pelo elétron e reemitida, isto é, cada elétron atua como centro de emissão de raios-X. Se os átomos que geram este espalhamento estiverem arranjados de maneira estruturada, como em uma estrutura cristalina, apresentando entre eles distâncias próximas ao do comprimento de onda da radiação incidente, pode-se verificar que as relações de fase entre os espalhamentos tornam-se periódicas e que efeitos de difração dos raios-X podem ser observados em ângulos específicos.

Considerando-se dois ou mais planos de uma estrutura cristalina, as condições para que ocorra a difração de raios-X (interferência construtiva ou numa mesma fase) vão depender da diferença do caminho percorrido pelos raios-X e o comprimento de onda da radiação incidente. Esta condição é expressa pela lei de Bragg (Equação 2.2).

$$\lambda = 2d \sin \theta \quad (2.2)$$

Onde λ corresponde ao comprimento de onda da radiação incidente, sendo que para as análises realizadas neste trabalho, o valor de λ , foi de 0,154 nm para raios-X provenientes da fonte (Cu- k_{α}), d é a distância interplanar da estrutura cristalina e θ é relativo ao ângulo de incidência dos raios-X (medido entre o feixe incidente e os planos cristalinos).

Na Fig. 2.2, são apresentados os difratogramas de raios-X dos polieletrólitos puros (QT e SC) e das amostras de PEC intumescidas em soluções tampão com os valores de pH 2, 6, 8, e 10 e por diferentes intervalos de imersão. Os sinais de difração em $2\theta = 10,8^{\circ}$ and $2\theta = 19,9^{\circ}$ no difratograma da QT são atribuídos às correspondentes regiões cristalinas presentes

na estrutura do polieletrólito. Estas regiões cristalinas são formadas por interações entre as suas cadeias (ligações de hidrogênio, por exemplo) [64]. Um sinal de difração de baixa intensidade em $2\theta = 21.9^\circ$ corresponde às regiões cristalinas do SC. Após a formação do complexo entre QT e SC, as regiões cristalinas observadas nos polieletrólitos puros são rompidas [25]. Diferentemente dos polieletrólitos puros as interações entre suas próprias cadeias deixam de ocorrer e dão lugar a interações do tipo inter-cadeias, onde predominam as interações eletrostáticas entre grupos funcionais dos dois polímeros.

Após terem sido intumescidas em solução tampão com pH 2, não foram observados sinais de difração nos perfis de WAXS nas amostras liofilizadas de PEC, mesmo após um intervalo de 800 h de intumescimento (ver Fig. 2.2). Isto evidencia que não ocorre a formação de regiões organizadas no interior da estrutura das amostras de PEC após essas terem sido intumescidas nesta condição de pH, independentemente do tempo de imersão. Como discutido anteriormente, quando as amostras são intumescidas em tampão pH 2, as interações eletrostáticas entre as cadeias dos polieletrólitos são fortes o suficiente para evitar o desprendimento e subsequente liberação do SC. A liberação de parte do SC para o meio externo é discutido na literatura com sendo um fator chave para que ocorra o rearranjo das cadeias que formam o PEC [56]. Este fenômeno de rearranjo é responsável pela formação das regiões ordenadas no interior da rede. Então, a ausência de sinais de difração nos perfis de WAXS das amostras intumescidas em tampão pH 2 permite que seja deduzido que não houve a liberação de SC tampouco o reordenamento das cadeias nesta condição de pH.

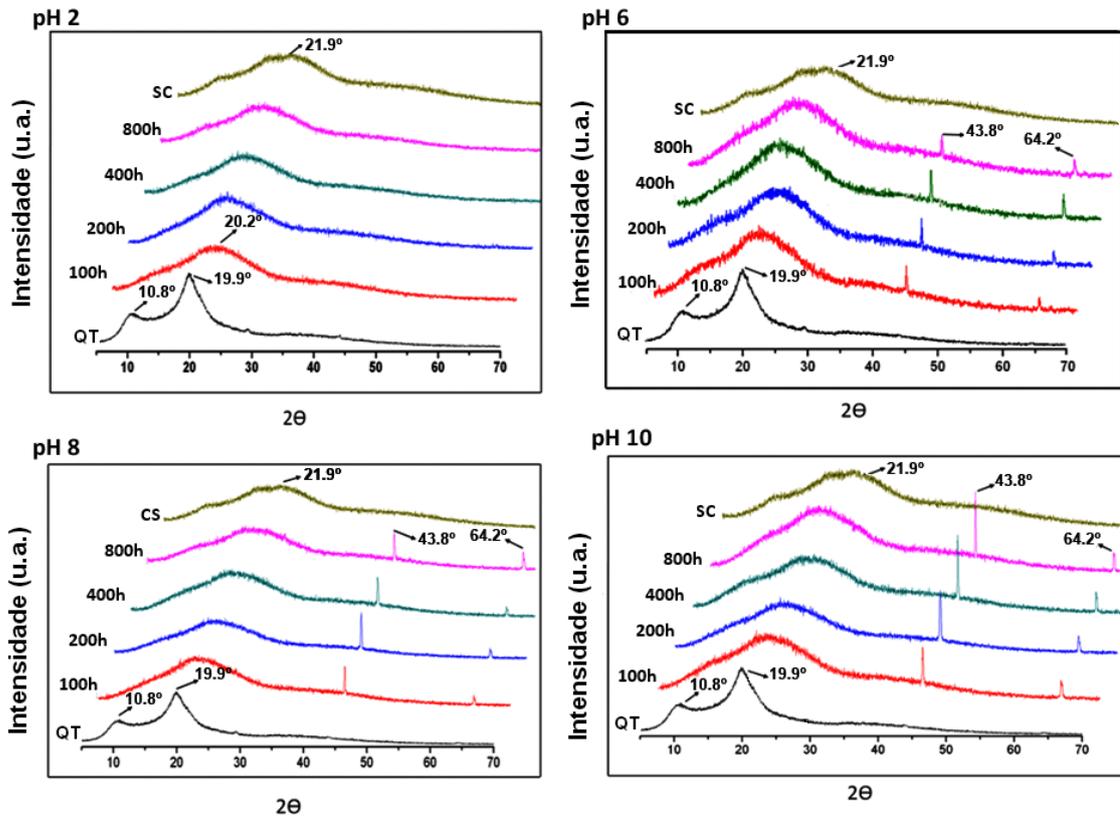


Figura 2.2 – Difratoformas de raios-X dos polieletrólitos puros e das amostras de PEC intumescidas nas soluções tampão com pH 2, 6, 8 e 10, durante os intervalos de 100, 200, 400 e 800 h.

Diferentemente do que ocorre com as amostras intumescidas em tampão pH 2, os perfis de difração das amostras liofilizadas após terem sido intumescidas em soluções tampão com pHs iguais a 6, 8 e 10 mostram sinais de difração com alta intensidade em $2\theta = 43,8^\circ$ e $2\theta = 64,2^\circ$. O aparecimento destes sinais sugere a formação de regiões ordenadas na rede do PEC seco quando esses são intumescidos em soluções com pHs na faixa de 6–10. Estes sinais de difração também se tornam mais intensos com o aumento do tempo de imersão, indicando que a formação destas regiões é dependente também do fator tempo de imersão. Quando as amostras são intumescidas previamente em condições onde o pH é próximo ou maior que o pKa do ácido conjugado da QT, como observado pelo estudo do grau de intumescimento, a quantidade de líquido que flui através da rede é muito maior. Isto é devido à desestabilização

da mesma, pois as forças repulsivas entre as cadeias de SC expandem a rede substancialmente. Ao difundir para o interior da rede de PEC, o líquido de intumescimento faz com que o SC, o qual não mais interage fortemente com a QT, seja parcialmente liberado. Na faixa de pH entre 6 e 7, não ocorre a liberação de todo o SC, pois não há no meio quantidade suficiente de grupos básicos (OH⁻) para reagirem com os grupos amino protonados da QT. Com o aumento do pH do meio, a disponibilidade de grupos básicos aumenta, fazendo com que os grupos -NH₃⁺ sejam convertidos em grupos -NH₂. Assim, os grupos -OSO₃⁻ e -COO⁻ das cadeias de SC não liberadas passam a interagir com os grupos -NH₂ da QT por meio de ligações de hidrogênio. Vale ainda ressaltar que o SC possui em sua estrutura um grupo amida (ver Fig. 1.3), o qual devido ao longo tempo de intumescimento pode ser hidrolisado a amina. Assim, o SC poderia contar com mais um grupo funcional efetivo na formação de ligações de hidrogênio com os grupos amino da QT. Contudo, para evitar o caráter especulativo dessa possibilidade estudos futuros serão realizados no intuito de validá-la ou descartá-la. De acordo com os dados experimentais e com as inferências feitas a partir destes, é verificada a mudança nas forças de interação que formam o PEC onde, a princípio, predominavam as interações eletrostáticas. A complexação dos polieletrólitos passa a ser regida pelas ligações de hidrogênio.

Na Fig. 2.3 é demonstrado um esquema alusivo ao comportamento da rede polimérica, bem como dos grupos funcionais predominantes nas macromoléculas de QT e SC, quando o PEC é intumescido em meios com diferentes valores de pH.

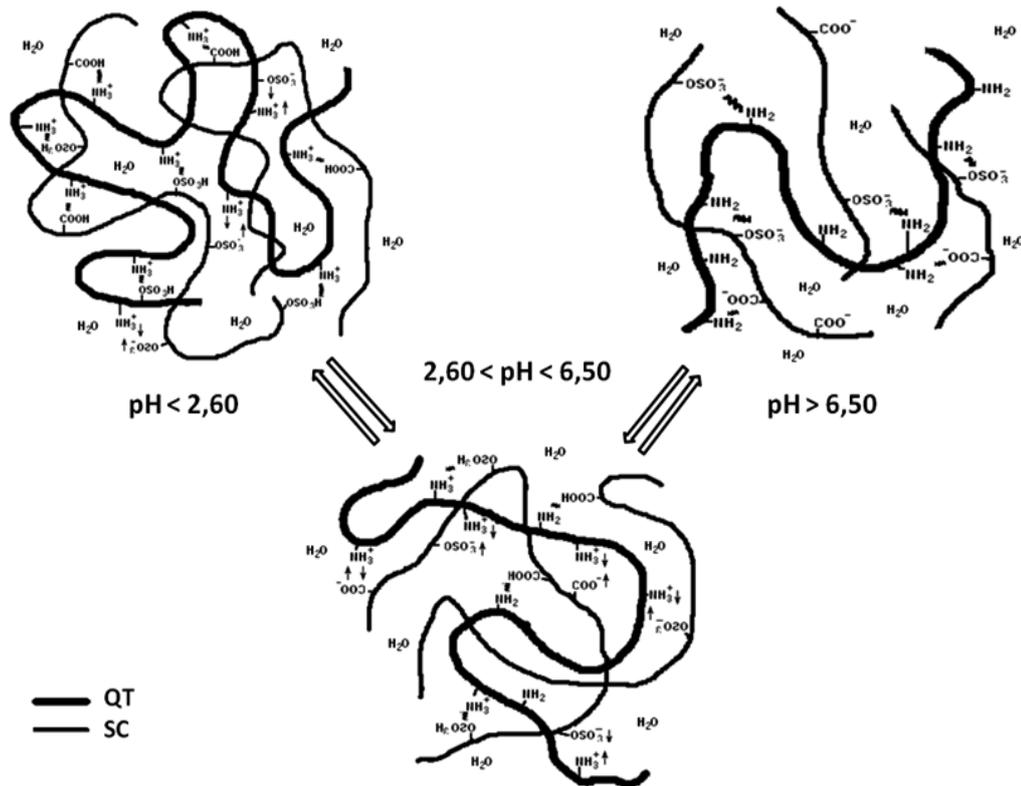


Figura 2.3 – Esquema demonstrativo do comportamento da rede polimérica formada por PEC de QT/SC, quando essa é intumescida em meios com diferentes valores de pH.

Durante a formação do PEC (em meio ácido) e quando suas amostras são intumescidas em tampão pH 2 nos diferentes tempos investigados, as interações eletrostáticas entre os grupos de ambos os polieletrólitos predominam pois não foi observada perda de massa do hidrogel intumescido e nem sinais de difração no PEC após liofilização. Nestes casos, como as interações eletrostáticas são tidas como de longo alcance, as cadeias da QT e do SC não precisam necessariamente estarem relativamente próximas para que ocorra a interação entre os grupos com cargas opostas. Nestas condições, somente ocorrem interações entre as cadeias de um mesmo polieletrólito e a estrutura formada e/ou mantida tende ao estado enovelado e com baixo grau de expansão. Por isso não são observados sinais de difração referentes a regiões ordenadas nos perfis de WAXS das amostras secas de PEC, após estas terem sido intumescidas em tampão pH 2 e uma baixa capacidade de absorção de líquido (Fig. 2.1). Foi observado um comportamento transitório na estrutura do PEC de QT/SC quando o

intumescimento ocorre em soluções com maiores valores de pH. Nestas soluções, o material apresenta uma expansão em sua rede devido à repulsão do tipo ânion-ânion entre as cadeias de SC, pois há um aumento do grau de intumescimento. Há, nestas condições, a prevalência das interações por ligações de hidrogênio. As interações deixam de ter caráter exclusivamente inter-cadeias e passam a apresentar também interações entre as cadeias de um mesmo polieletrólito. Do ponto de vista energético, as ligações de hidrogênio são menos intensas que as interações eletrostáticas. Dessa forma, para que ocorram as interações as cadeias dos polieletrólitos devem estar mais próximas. O rearranjo das cadeias faz com que sejam formadas as regiões ordenadas observadas nos perfis de WAXS das amostras secas e previamente intumescidas em soluções tampão com $\text{pH} \geq 6$. As amostras intumescidas em tampão pH 10 apresentaram maior ordenamento das cadeias e consequente aumento em sua estabilidade, como observado pelo aumento de intensidade dos sinais de difração nos perfis de WAXS. Tal comportamento é dependente também do intervalo de tempo no qual as amostras de PEC permaneceram imersas em cada uma das soluções tampão. Estas inferências são consistentes com o comportamento observado para o índice de intumescimento (S). Para as amostras intumescidas em tampão pH 10, o valor $S_{\text{máx}}$ é reduzido a um valor menor que os observados para as amostras intumescidas nos tampões pH 6 e 8, pois sua rede está estabilizada por ligações de hidrogênio, as quais restringem a expansão da mesma.

O aparecimento dos sinais de difração nos difratogramas das amostras de PEC não são originados e/ou influenciados pelos sais utilizados na preparação das soluções tampão (H_3BO_3 , KCl , KH_2PO_4 e NaOH) e das misturas destas, utilizadas como meio de intumescimento para o PEC. Os perfis de difração apresentados por estes materiais não apresentaram sinais de difração em $2\theta = 43.8^\circ$ and $2\theta = 64.2^\circ$ (Fig. 2.4), sendo portanto, descartada a participação destes no resultado das análises de DRX das amostras secas de PEC.

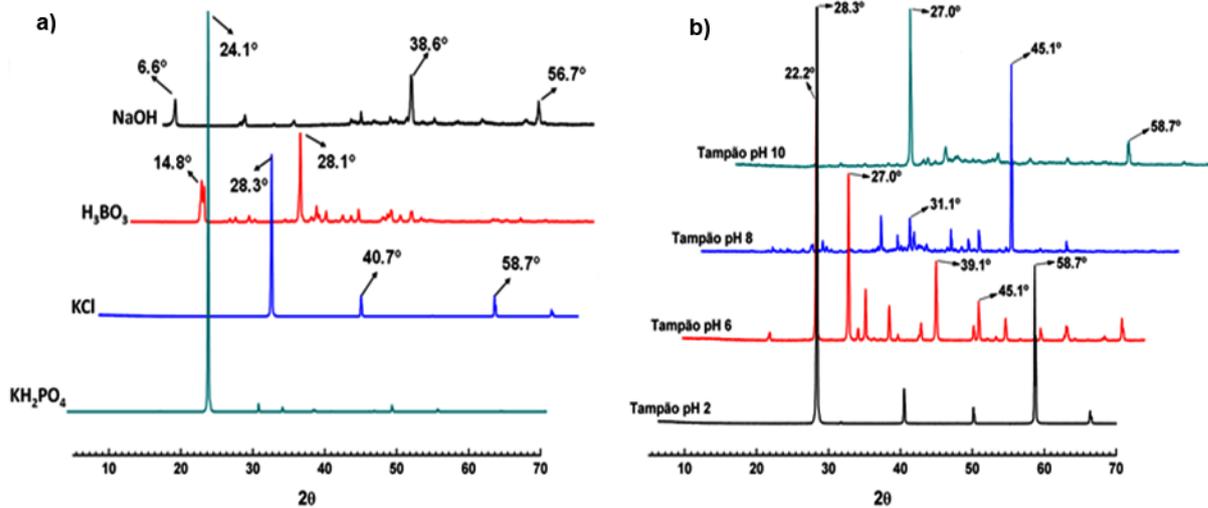


Figura 2.4 – Perfis de difração das substâncias químicas utilizadas no preparo das soluções tampão e das soluções tampão usadas como meio de intumescimento para as amostras de PEC.

Aplicando a lei de Bragg (Equação 2.2), foi possível calcular as distâncias periódicas entre as regiões cristalinas observadas pela técnica de WAXS nas amostras secas de PEC após serem previamente intumescidas em soluções tampão com os valores de pH 6, 8 e 10 por diferentes intervalos de tempo. Os valores determinados para as distâncias periódicas entre as regiões cristalinas, utilizando a lei de Bragg, foram 2,06 Å para o sinal de difração em $2\theta = 43,8^\circ$ e de 1,45 Å para o segundo sinal de difração observado em $2\theta = 64,2^\circ$. Isto demonstra que as amostras de PEC de QT/SC secas após prévio tratamento por imersão em solução tampão, apresentam regiões ordenadas dispersas na rede polimérica e com distâncias periódicas distintas. A partir dos difratogramas obtidos para cada amostra, foram estimadas as áreas relativas aos sinais de difração em $2\theta = 43,8^\circ$ e $64,2^\circ$ para cada condição de intumescimento. A razão entre as áreas dos sinais de difração (razão $64,2^\circ/43,8^\circ$) permite estimar a distância periódica preferencial entre as regiões ordenadas dos PEC secos. Os valores obtidos são apresentados na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Áreas dos sinais de difração em 64,2° e 43,2° observados nos difratogramas de raios-X das amostras de PEC (Fig. 2.2) e a razão entre as áreas.

Condição de Intumescimento	Área dos sinais (u.a.)		Razão entre as áreas (64,2° / 43,8°)
	2θ = 43,8°	2θ = 64,2°	
Tampão pH 6 – 100 h	439,03	131,33	0,299
Tampão pH 6 – 200 h	553,93	228,66	0,413
Tampão pH 6 – 400 h	652,85	413,26	0,633
Tampão pH 6 – 800 h	789,40	676,18	0,869
Tampão pH 8 – 100 h	333,49	184,04	0,552
Tampão pH 8 – 200 h	595,08	358,26	0,602
Tampão pH 8 – 400 h	724,53	525,32	0,725
Tampão pH 8 – 800 h	990,19	937,71	0,947
Tampão pH 10 – 100 h	313,63	197,04	0,629
Tampão pH 10 – 200 h	674,43	515,19	0,764
Tampão pH 10 – 400 h	778,61	683,15	0,877
Tampão pH 10 – 800 h	1054,47	1023,39	0,971

Avaliando os valores descritos na Tabela 2.2 referentes à razão entre as áreas dos sinais de difração, é possível afirmar que ambos os fatores, intervalo de imersão e pH da solução tampão onde o PEC é intumescido, ao serem elevados para maiores valores acabam por influenciar no reordenamento das cadeias dos polieletrólitos formadores do PEC. Logo, o resultado dessa influência é observado na formação de regiões ordenadas com uma menor distância periódica entre as mesmas.

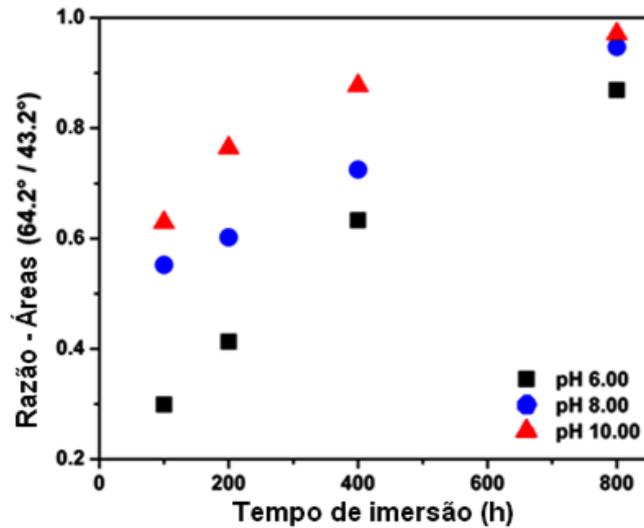


Figura 2.5 – Razão entre as áreas dos sinais de difração em 64,2° e 43,2° em função do tempo de imersão das amostras para soluções tampão com diferentes pHs.

Pode-se verificar na Fig. 2.5 que ocorre o reordenamento das cadeias de QT e SC em amostras de PEC intumescidas em tampão pH 6 durante intervalos de 100 e 200 h. Nestas há a formação regiões ordenadas com predominância da distância periódica de 2,06 Å. Isto se baseia no fato que em tampão pH 6 até o intervalo de 200 h de imersão, os grupos amino presentes na QT estão ainda parcialmente protonados o que colabora no aumento da interação eletrostática entre as cadeias dos dois polímeros e, conseqüentemente, mantêm a rede polimérica parcialmente enovelada. Contudo, quando o intervalo de imersão em tampão pH 6 é superior a 400 h e/ou pH do meio no qual as amostras intumescidas são elevadas para valores maiores, a razão entre as áreas aumenta. A repulsão do tipo ânion-ânion entre as cadeias de SC, devido aos grupos sulfônico e carboxilato, que nestas condições de pH não são mais estabilizados pelos grupos amino protonados da QT ($pK_{a_{QT}} \approx 6,2$), provoca a desestabilização da rede polimérica e a conseqüente liberação de parte das cadeias de SC. Nestas condições as cadeias remanescentes de SC juntamente com as de QT se reordenam de modo a formar regiões ordenadas com predominância de uma menor distância periódica (1,45 Å). Dessa forma, pode se inferir que a rede polimérica do PEC seco após esse ser intumescido

em tampão com $\text{pH} \geq 6$ e durante maiores intervalos de tempo, converte-se de uma estrutura enovelada em outra com cristalinidade. A Fig. 2.6 mostra uma ilustração esquemática para a transição entre a estrutura enovelada do PEC causada pela mudança do pH do tampão onde a amostra foi intumescida.

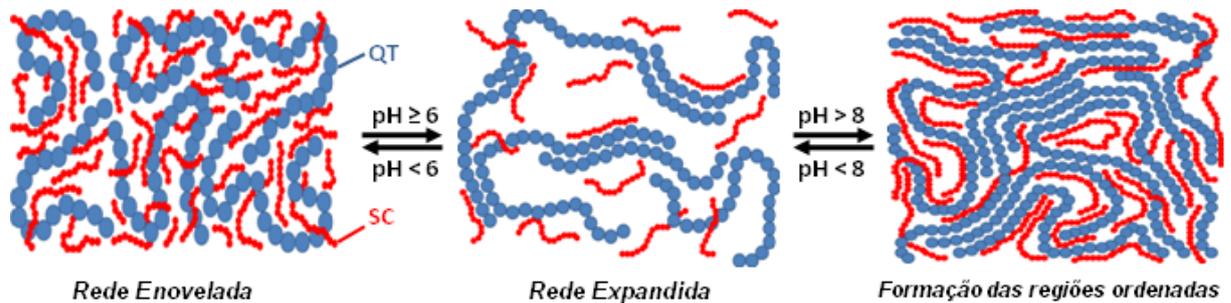


Figura 2.6 – Esquema ilustrativo sobre a transição da estrutura enovelada e a formação de regiões ordenadas na rede polimérica do PEC segundo a variação do pH.

Quando as amostras são intumescidas em tampão pH 2 a forte interação do tipo polímero-polímero evita que as cadeias de SC sejam liberadas, mantendo assim a estabilidade da estrutura enovelada do PEC. O aumento do pH do meio de intumescimento para valores próximos ao pK_{aQT} ocasiona a desestabilização e a expansão da rede do PEC. Em um meio onde o pH está entre 6 e 8, os grupos amino protonados da QT reagem com os grupos básicos presentes no meio. Os grupos amino na forma neutra passam a interagir com os grupos sulfônicos e carboxilatos do SC por meio de ligações de hidrogênio. Para que isso ocorra é necessário o reordenamento das cadeias de QT e SC, de modo que as mesmas se aproximem o suficiente para que ocorra a formação deste tipo de interação. A aproximação e o posicionamento das cadeias de maneira mais organizada são responsáveis pela formação das regiões ordenadas observadas nas análises de WAXS das amostras secas de PEC após serem intumescidas em soluções tampão com pH maior que 6. Quando as amostras são intumescidas em solução tampão com pH maior que 8, há um aumento na quantidade de ligações de

hidrogênio e assim um conseqüente aumento na quantidade de regiões ordenadas. Isto é corroborado pelo aumento na intensidade dos sinais de difração decorrentes do aumento do pH da solução tampão onde as amostras são intumescidas e/ou o aumento do intervalo de tempo de intumescimento das amostras.

2.3.3 - Análises de DSC e TGA

A técnica termo analítica DSC determina a diferença nas quantidades de calor necessárias para aumentar a temperatura de uma amostra e de uma referência. São realizadas medidas em função da temperatura tanto durante o aquecimento como durante o resfriamento das mesmas. A partir dos dados obtidos, é possível identificar transições de fases no material como determinar seu ponto de fusão, transições vítreas ou decomposições exotérmicas, entre outras. Neste trabalho, a técnica de DSC foi utilizada com a intenção de caracterizar as respectivas mudanças no comportamento térmico do material devido à reorganização das cadeias de QT e SC, posteriormente à liberação de parte do SC. Na Fig. 2.7 são demonstrados as curvas DSC dos polieletrólitos puros (Fig. 2.7a) e das amostras de PEC secas após serem intumescidas em tampão pH 6 (Fig. 2.7b), 8 (Fig. 2.7c) e 10 (Fig. 2.7d), por diferentes intervalos de tempo.

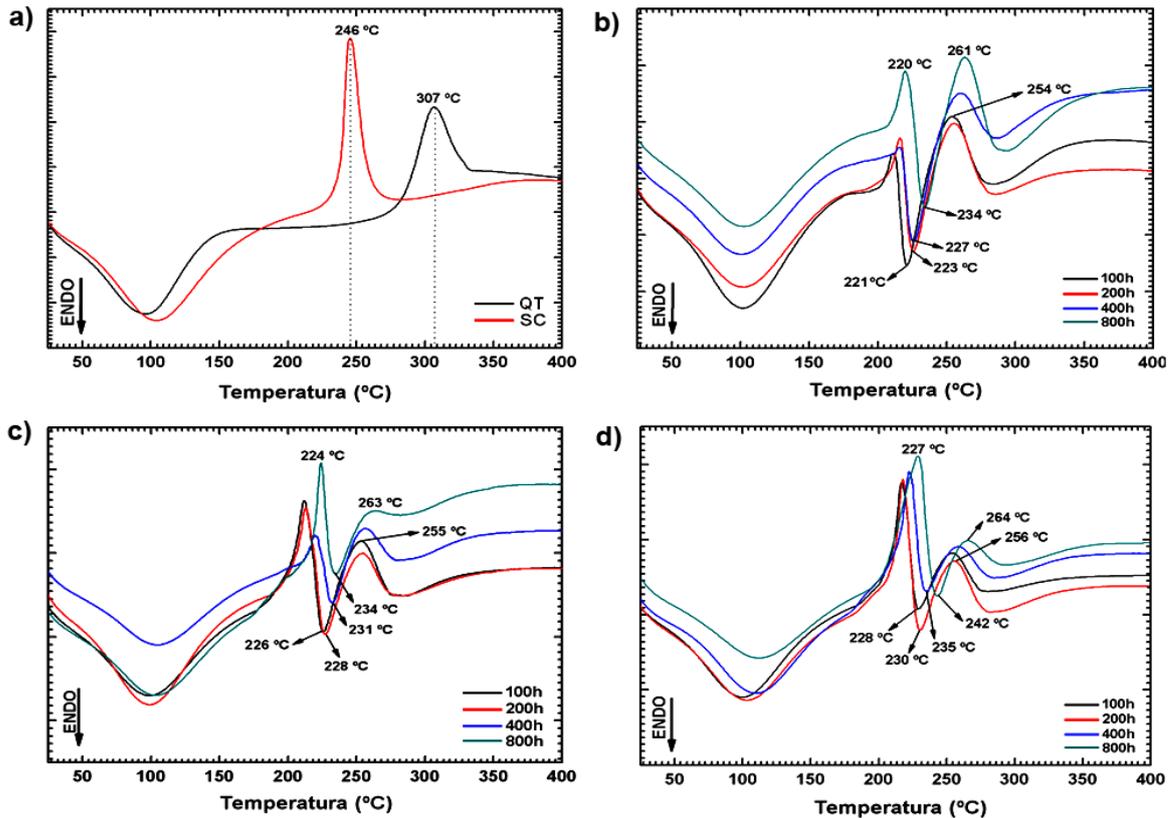


Figura 2.7 – Curvas DSC dos (a) polieletrólitos puros e das amostras de PEC de QT/SC intumescidas em soluções tampão com pHs (b) 6, (c) 8 e (d) 10 por diferentes intervalos de tempo.

Na faixa de temperatura entre 50 ° e 150 °C, as curvas DSC dos polieletrólitos puros (Fig. 2.7a) apresentam um pico endotérmico alargado atribuído à evolução de componentes voláteis, principalmente água. A curva DSC do SC apresenta um pico exotérmico intenso em 246 °C enquanto que a da QT apresenta um pico exotérmico em 307 °C, sendo ambos atribuídos às degradações dos respectivos polieletrólitos (dados confirmados pelas curvas TGA – Fig. 2.8).

No trabalho desenvolvido por Du *et al.* (2006) [25] foi sugerido que da forte interação eletrostática entre os grupos carregados de diferentes polieletrólitos pode resultar na perda de parte das ligações de hidrogênio do entre as cadeias e inter-cadeias. Como consequência, ocorre a ruptura das respectivas estruturas cristalinas presentes nos polímeros precursores. A partir desta sugestão, é possível ressaltar que a formação de uma rede polimérica formada por

PEC deve apresentar estabilidade térmica diferente daquela demonstrada pelos polieletrólitos puros. Então, a formação da estrutura enovelada do PEC de QT/SC pode ser caracterizada pela presença de um pico endotérmico no termograma desse material [67,68].

A Fig. 2.7b mostra as curvas DSC das amostras de PEC de QT/SC após serem intumescidas em tampão pH 6 durante os intervalos de 100, 200, 400 e 800 h. Para a amostra intumescida durante o intervalo de 100 h, foi observado um pico exotérmico em 254 °C. No entanto, após ser intumescida neste mesmo tampão (pH 6) mas durante 800 h a amostra seca exibe este pico exotérmico em uma temperatura maior, no caso, 261°C. Este mesmo comportamento com relação ao intervalo de tempo no qual a amostra é intumescida pode ser também verificado quando as amostras são intumescidas nas soluções tampão com pH 8 e 10. Se o PEC QT/SC é intumescido em soluções tampão com pH próximo ou maior que o pK_{aQT} , os grupos amino encontram-se na forma neutra [60]. Isto reduz, significativamente, a atração eletrostática desses grupos com os grupos sulfônicos e carboxilatos do SC o que proporciona o enfraquecimento dos pontos de interação para formar a rede polimérica. Assim, as cadeias de SC adquirem mobilidade suficiente para serem liberadas para fora da rede formada por PEC. Após a liberação de parte das cadeias de SC, as cadeias de QT presentes no PEC possuem liberdade similar à da QT pura. Por isso, os picos exotérmicos observados nas curvas DSC das amostras deslocam-se para valores mais próximos ao observado para o da QT pura, 307 °C (Fig. 2.7a).

Nas Fig. 2.7b-d o pico endotérmico característico da formação da estrutura enovelada da rede polimérica aparece em uma faixa de temperatura entre 220 °C e 240 °C. Para a amostra intumescida em tampão pH 10 durante 100 h, por exemplo, esse pico aparece em 228 °C e eleva-se para 242 °C quando o intervalo de tempo é aumentado para 800 h. Com o aumento no pH da solução tampão na qual a amostra foi intumescida, para valores próximos ou maiores que o pK_{aQT} , ou seja $pH \geq 6$, e do intervalo de tempo de imersão ocorre a reação

dos grupos amino da QT com as hidroxilas presentes no meio de intumescimento. Isto aumenta a densidade de cargas negativas devido a não protonação dos grupos sulfônico e carboxilato. Assim, o excesso de cargas negativas aumenta a repulsão entre as cadeias de SC formadoras do PEC ocasionando a expansão da rede polimérica. O movimento gerado no interior da rede polimérica devido à difusão de líquido durante o intumescimento induz a liberação parcial das cadeias de SC causando um aumento na erosão do material.

Nas curvas DSC apresentadas nas Fig. 2.7b-d, é possível observar picos exotérmicos próximos a temperatura de 220 °C. Logo, quando os fatores estudados são aumentados, pode ser verificado aumento na intensidade desses picos bem como na temperatura em que ocorrem.

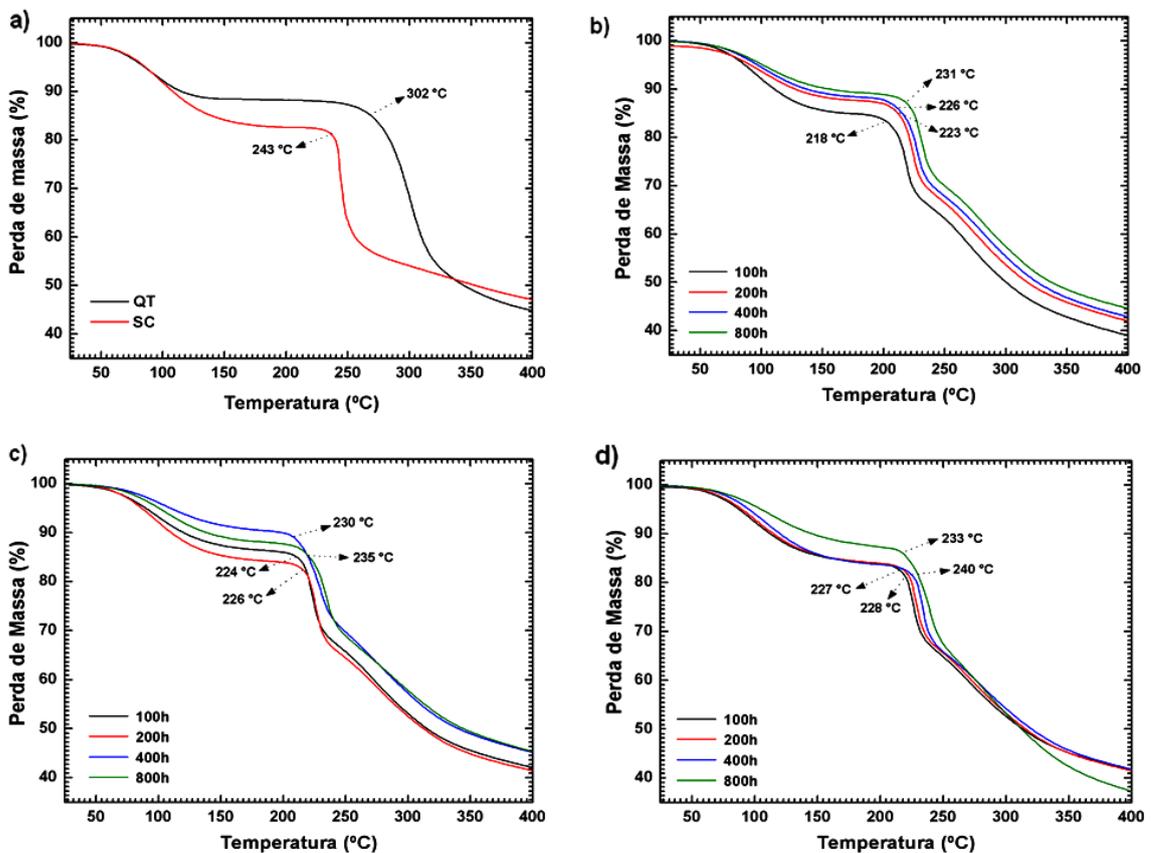


Figura 2.8 – Curvas TGA dos (a) polieletrólitos puros e das amostras de PEC de QT/SC intumescidas em soluções tampão com pH (b) 6, (c) 8 e (d) 10 e por diferentes intervalos de tempo.

A análise termogravimétrica (TGA) é um método utilizado para determinação da estabilidade térmica e/ou a taxa de decomposição de uma substância em função da temperatura. Esta técnica é amplamente usada no estudo da eficácia da aplicação de aditivos em materiais orgânicos quando se deseja avaliar a estabilidade térmica e oxidativa desses materiais. Na Fig.2.8, são mostradas as curvas TGA para as amostras de PEC secas após serem intumescidas em soluções tampão com pH 6 (Fig. 2.8b), 8 (Fig. 2.8c) e 10 (Fig. 2.8d) em diferentes intervalos de tempo. Em todas as curvas, a perda de cerca de 15 % na massa dos materiais entre 50° e 150 °C o que se deve à evolução de componentes voláteis das amostras, principalmente água. Tal como nas análises de DSC, o aumento do tempo de imersão das amostras em um tampão com certo valor de pH, por exemplo, pH 6, proporcionou uma elevação da estabilidade térmica das amostras. Esta observação permite inferir, que ao se tratar previamente uma amostra de PEC QT/SC em uma solução tampão com pH próximo ou maior que 6, essa irá apresentar maior estabilidade térmica. O aumento no tempo de imersão e do valor do pH da solução tampão, na qual o material é intumescido, contribui para a intensificação desse efeito. A ampliação da estabilidade térmica do material deve-se ao reordenamento desse material. Já as regiões ordenadas formadas pelo reordenamento das cadeias de QT, e das cadeias de SC remanescentes, aumentam a estabilidade térmica do PEC. Deste modo, após a reordenação da rede polimérica a degradação do material ocorre em temperatura maior.

2.3.4 - Análise Morfológica das amostras de PEC

A técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV) é capaz de produzir imagens com alta ampliação e com boa resolução. As imagens fornecidas pelo MEV possuem um caráter virtual, pois a imagem é formada através da detecção dos elétrons secundários gerados pela interação dos elétrons primários de alta energia e a amostra. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de um feixe de elétrons primários por um filamento de tungstênio, mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. Essa variação de voltagem permite a variação da aceleração dos elétrons e conseqüentemente de sua energia. A correção do percurso dos feixes é realizada por lentes condensadoras que alinham o feixe de elétrons em direção à abertura da lente objetiva. A lente objetiva ajusta o foco do feixe de elétrons antes destes atingirem a amostra e bobinas de varredura são responsáveis pelo processo de varredura dos elétrons na superfície da amostra.

Devido à maneira com que as imagens são criadas, as imagens de MEV acabam tendo uma aparência tridimensional, característica que permite a avaliação da estrutura superficial de uma dada amostra, no entanto, as medidas de dimensão nestas amostras somente podem ser feitas nos eixos X e Y, não sendo possível fazer medidas de altura (eixo Z).

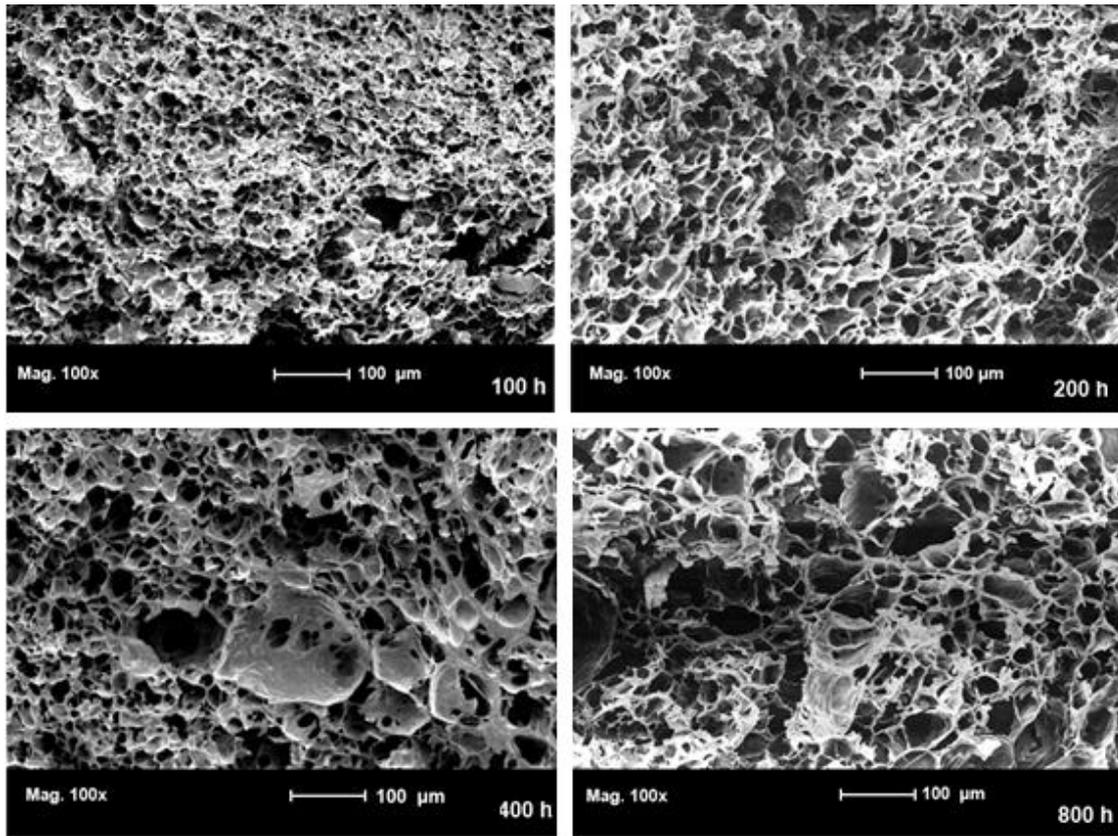


Figura 2.9 – Imagens obtidas por MEV das amostras de PEC liofilizadas após serem intumescidas em tampão pH 6 nos intervalos de imersão de 100, 200, 400 e 800 h.

Nota-se pelas imagens obtidas por MEV apresentadas na Fig. 2.9 um relativo aumento no tamanho dos poros presentes nas superfícies das amostras, especialmente para os maiores tempos de imersão. Isto ocorre devido à desestabilização da rede polimérica ocasionada por esta condição de pH. Com o aumento no fluxo de líquido para o interior da rede e a liberação de parte das cadeias de SC é possível caracterizar o desencadeamento de um processo erosivo [69], o qual provoca o aumento na quantidade e no tamanho dos poros.

O tamanho médio dos poros em cada amostra intumescida previamente em diferentes soluções tampão e/ou intervalos de tempo, foi calculado utilizando o software *Size Meter*[®], versão 1.1. Para determinar o tamanho médio dos poros em cada amostra, o limiar de diferenciação do software foi calibrado de acordo com a escala das imagens (neste caso, 100 μm). Devido ao fato dos poros não possuírem formato definido, as medidas foram feitas entre

os pontos extremos de cada poro. A média foi calculada a partir da medida dos tamanhos de 50 poros selecionados aleatoriamente. Este procedimento foi realizado para cada amostra de PEC liofilizada depois de ter sido intumescida em uma condição específica. Logo, os valores referentes às médias são descritos na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Tamanho médio dos poros das amostras de PEC secas após serem intumescidas em meios com diferentes valores de pH e por diferentes intervalos de tempo.

Tempo de imersão (h)	Tamanho médio dos poros (μm)		
	pH 6	pH 8	pH 10
100	38,66 \pm 5,02	45,06 \pm 6,62	48,80 \pm 8,28
200	42,52 \pm 3,41	48,72 \pm 5,36	49,12 \pm 7,53
400	50,24 \pm 7,16	50,75 \pm 4,77	46,92 \pm 6,81
800	56,47 \pm 9,95	52,82 \pm 7,02	42,41 \pm 4,77

Nota-se que as amostras de PEC secas tenderam a um aumento no tamanho médio de poros, especialmente quando essas foram intumescidas em soluções tampão com maiores valores de pH. Contudo, ao se aumentar o fator tempo de imersão para as amostras intumescidas em tampão pH 10 observa-se uma ligeira diminuição nessa tendência. Como discutido anteriormente, isto ocorre nesta condição, pois a rede polimérica que anteriormente apresentava-se desestabilizada passa a ser novamente estabilizada em função da formação das ligações de hidrogênio entre os grupos NH_2 da QT e grupos sulfônicos e carboxilatos da SC. Este comportamento corrobora com os dados apresentados pelas curvas de índice de intumescimento (S), difratogramas de raios-X e dados de DSC e TGA. Deste modo, é possível inferir que ambos os fatores, pH da solução na qual a amostra de PEC é intumescida e o tempo em que a mesma permanece imersa, contribuem para que ocorra uma variação na quantidade e no tamanho médio dos poros do material.

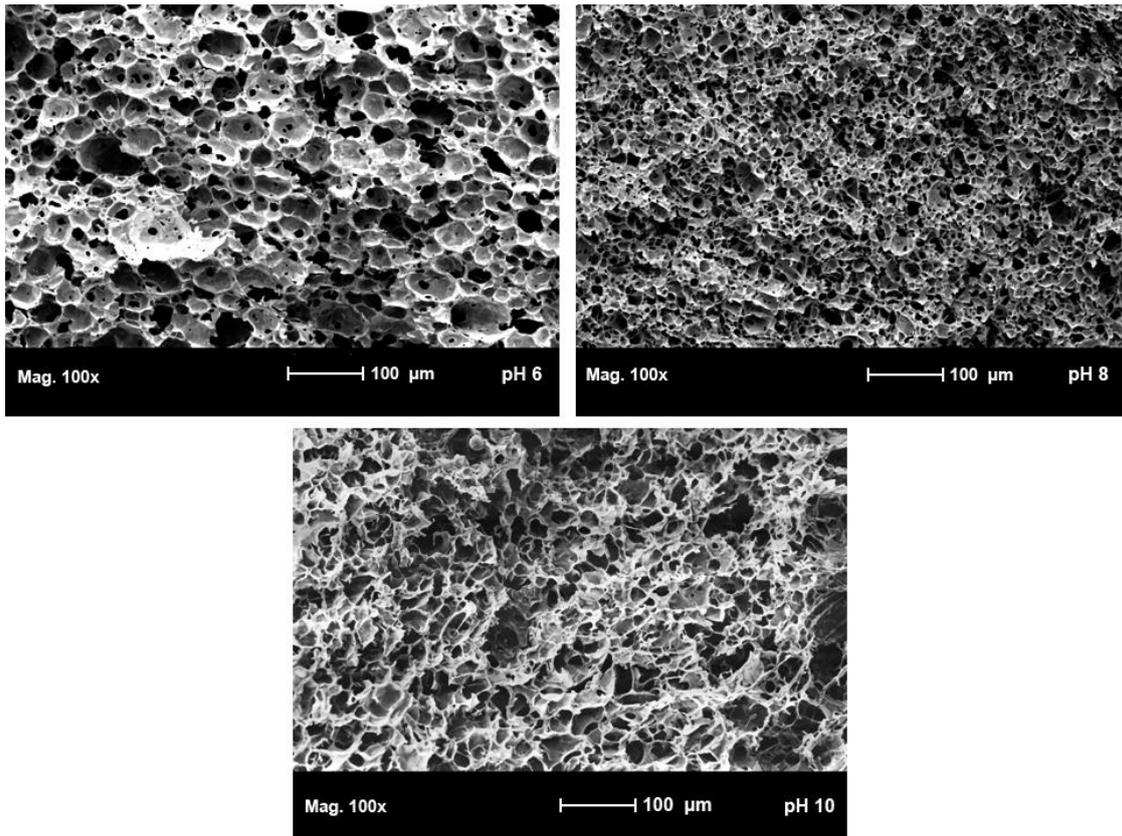


Figura 2.10 – Imagens obtidas por MEV das amostras de PEC secas após serem intumescidas por um intervalo de 800 h em soluções tampão com pHs 6, 8 e 10.

Na Fig. 2.10 são mostradas imagens obtidas por MEV de amostras liofilizadas após serem intumescidas em soluções tampão com pHs 6, 8 e 10 por um tempo de imersão de 800 h. Diferentemente do que ocorre com as amostras intumescidas nos tampões pH 6 ou 8, nas amostras intumescidas em tampão pH 10 é observado uma tendência de redução no tamanho médio de poros. Tal tendência está diretamente relacionada ao tempo de imersão, como observado por meio dos dados dispostos na Tabela 2.3. Como enfatizado anteriormente, este comportamento se deve ao rearranjo das cadeias devido à formação das ligações de hidrogênio e proporciona um aumento na quantidade de regiões ordenadas no interior da rede. Esta relativamente maior organização reduz a quantidade e o tamanho médio dos poros. Além disso, a formação das ligações de hidrogênio estabiliza a rede polimérica evitando que o restante das cadeias de SC sejam liberadas e contribui para que cesse o processo erosivo.

Estas imagens obtidas por MEV das amostras secas de PEC enfatizam a característica pH dependente do material.

2.4 - Conclusão

Foram formadas redes poliméricas baseadas em complexos polieletrólíticos de QT/SC. As redes apresentaram a capacidade de reordenar sua estrutura quando intumescidas em soluções tampão com pH próximo ou maior que o pKa do ácido conjugado da QT ($pK_{a_{QT}} \approx 6.2$). Tal reorganização mostrou-se também dependente do intervalo de tempo no qual as amostras PEC permaneceram imersas em uma dada solução tampão com pH definido. As razões entre as áreas dos sinais de difração, ($64,2^\circ/43,2^\circ$), observados nos difratogramas das amostras de PEC liofilizadas após serem intumescidas, aumentaram com o pH da solução tampão e/ou com o tempo de intumescimento. Isto implica na formação de regiões ordenadas, após a reorganização da rede polimérica, com a predominância de uma menor distância periódica. O reordenamento das cadeias dos polímeros formadores do PEC ocorre devido à clivagem hidrolítica de parte do SC e a liberação das cadeias clivadas durante o intumescimento do PEC, principalmente em tampão com pH próximo ou maior que o $pK_{a_{QT}}$. Isto permitiu que o material deixasse de apresentar uma estrutura altamente enovelada, devido às fortes interações eletrostáticas, passando a ter cristalinidade devido à formação de ligações de hidrogênio entre as cadeias de um mesmo polieletrólito e inter-cadeias. Dessa forma, este fenômeno de reorganização descaracteriza a rede polimérica formada como sendo um complexo polieletrólítico, pois as interações eletrostáticas, característica utilizada na classificação do material como PEC, deixam de ocorrer e dão lugar as ligações de hidrogênio.

A formação de regiões ordenadas no interior da rede polimérica promove um aumento na estabilidade térmica do material e aumenta a cristalinidade no material liofilizado. O tamanho médio dos poros tem a tendência de torna-se maior quando o material é intumescido em soluções tampão com pH entre 6 e 8 e tende a torna-se menor quando o PEC é intumescido em tampão com $pH \geq 8$. Este estudo confirma que a reorganização das redes poliméricas do PEC de QT/SC é sensivelmente dependente do pH na qual é intumescida, além disso, mostrou

que em nível de reorganização é também dependente do tempo de imersão. Dessa forma, PEC de QT/SC pode ser previamente tratado para que apresente diferentes estruturas (enovelado ou mesmo alguma cristalinidade), aumento na estabilidade térmica, diferentes tendências no tamanho médio de poros (maiores ou menores dimensões) e diferentes comportamentos de intumescimento. Este material demonstra habilidade de ser moldado para apresentar uma dada característica de acordo com as necessidades de sua aplicação, principalmente na área de biomateriais. Além disso, poderão ser realizados, em uma etapa posterior do trabalho, estudos sobre aplicações específicas desse material, como veículo carreador para liberação de fármacos ou como substrato para o cultivo de células.

CAPÍTULO III – Planejamentos Fatoriais

3.1 - Introdução

A estatística pode ser definida como uma ciência focada na resolução de problemas na presença de incerteza ou variabilidade. Este processo de resolução de problemas envolve certo grau de flutuação dentro da variação natural de todos os resultados que ocorrem em praticamente todos os trabalhos experimentais [70]. A aplicação de ferramentas estatísticas nas mais diversas áreas da ciência como, por exemplo, no planejamento, coleta, análise e interpretação de dados, podem ajudar a responder certas questões de forma racional e econômica [71]. A Fig. 3.1 simboliza o fato de que os estudos estatísticos deveriam desenvolver um papel fundamental em toda observação, coleta e análises dos dados, desde a formulação do problema até a descrição das conclusões finais. Esta figura distingue dois tipos de estudos: um experimental e outro observacional.

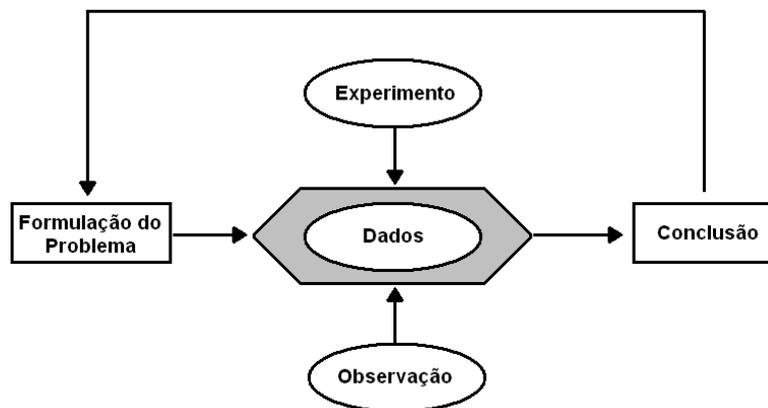


Figura 3.1 – Estágios críticos de um processo estatístico em investigações científicas.

Freqüentemente, em estudos experimentais as variáveis (fatores) de interesse podem ser controladas e fixadas em valores predeterminados em cada corrida experimental. Já nos estudos observacionais, muitas das variáveis de interesse não podem ser controladas, mas sim, listadas e analisadas [72].

A maneira convencional, e trivial, de se fixar todas as demais variáveis em relação a uma única variável escolhida ao se estudar o comportamento de uma ou mais respostas, não é uma boa estratégia de experimentação quando se deseja estudar um sistema multivariado. Esta metodologia não permite obter informações de como as variáveis se influenciam mutuamente, ou seja, de como os fatores interagem entre si, se de forma sinérgica ou antagônica, contribuindo para a resposta [70,71]. Contudo, ao se fazer uso de planejamentos experimentais baseados em princípios estatísticos, como no caso de planejamentos fatoriais, pode-se extrair de um sistema em estudo o máximo de informação útil, fazendo um número mínimo de experimentos [71].

Em um planejamento fatorial (PF), o que se deseja é avaliar como k variáveis [(fatores), $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$] influenciam a(s) resposta(s) $y(y_1, y_2, \dots, y_n)$ no sistema em estudo. Neste tipo de abordagem, a resposta é a variável dependente do sistema, ou seja, é afetada por modificações provocadas nos fatores. Fazendo uso de um PF pode-se estudar o comportamento dessa resposta em função dos k fatores fixando-os em apenas dois níveis. Assim, o número de experimentos necessários será 2^k e diz-se que é um fatorial tipo 2^k . Portanto, se o número de fatores for três (três) ter-se-á um fatorial 2^3 com $2 \times 2 \times 2 = 8$ experimentos.

Nos algoritmos usados para calcular os efeitos dos fatores sobre uma resposta, os níveis dos fatores são codificados como -1 (nível inferior) e +1 (nível superior) [72]. Para uma variável quantitativa, ex. temperatura, subtrai-se o valor de cada nível de sua média e divide-se pela metade de sua amplitude. Logo, se um fator x_1 (concentração) variar de um nível inferior de $x_{-1} = 50$ °C a um nível superior $x_{+1} = 100$ °C, algebricamente tem-se:

$$x_{-1} = \frac{50 - 75}{\frac{(100 - 50)}{2}} = \frac{-25}{25} = -1 \quad \text{e} \quad x_{+1} = \frac{100 - 75}{\frac{(100 - 50)}{2}} = \frac{25}{25} = +1$$

Sendo a variável qualitativa (categórica), por exemplo, tipo de catalisador usado numa reação, atribui-se a cada tipo de catalisador um nível +1 ou -1 [72]. Na Tabela 3.1 é apresentada uma matriz planejamento fatorial 2^3 completo, com as combinações possíveis entre os níveis dos fatores e suas respectivas respostas em y .

Tabela 3.1 – Representação de um planejamento fatorial 2^3 completo.

Ensaio	Fatores			Resposta
	x_1	x_2	x_3	
1	-1	-1	-1	y_1
2	+1	-1	-1	y_2
3	-1	+1	-1	y_3
4	+1	+1	-1	y_4
5	-1	-1	+1	y_5
6	+1	-1	+1	y_6
7	-1	+1	+1	y_7
8	+1	+1	+1	y_8

Após a modelagem do PF, a execução dos experimentos e a coleta dos dados, com auxílio de programas computacionais estatísticos como Design-Expert®, Estatística® e Minitab®, entre outros, é possível calcular os valores dos efeitos associados aos fatores e, assim, quantificar os efeitos dos fatores a uma determinada resposta e ainda como esses efeitos interagem entre si. Os modelos obtidos por esses programas computacionais são ditos empíricos, pois descrevem o comportamento do sistema apenas no intervalo estudado. Depois de feita a escolha dos fatores que influenciam significativamente na resposta do sistema em estudo, é possível “caminhar” em direção às melhores respostas.

No desenvolvimento desta dissertação, foram executados entres outros experimentos, dois planejamentos fatoriais. No primeiro deles, PF completo 2^3 , analisaram-se os fatores: i) razão entre as massas de QT e SC (razão QT/SC) utilizada na produção do PEC; ii) concentração de ácido clorídrico (HCl) usado na solubilização da QT; iii) pH no qual os PECs depois de formados foram intumescidos por 500 h. e como resposta foi analisado o valor do módulo elástico de compressão (E). O segundo PF executado, sendo esse do tipo 2^2 com duplicata, tendo como resposta a razão entre as áreas dos sinais de difração observados através da técnica de WAXS para as amostras secas de PEC previamente tratadas.

3.2 - Experimental

3.2.1 - Materiais

Quitosana (Golden-Shell Biochemical, China) com grau de desacetilação igual a 85 % e massa molar viscosimétrica (M_v) igual a $87 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, obtida de acordo com o item 2.2.1;

Sulfato de Condroitina, (lote OP1141/08, gentilmente fornecida pela Solabia, Brasil) com M_v igual a $22 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$, obtida de acordo com o item 2.2.1;

Ácido clorídrico (HCl) P.A. 37 % em massa (Nuclear, Brasil);

Cloreto de potássio (KCl) P.A., 99,5 % em massa (Dinâmica, Brasil);

Hidróxido de sódio (NaOH) P.A. 95 – 100 % em massa (Nuclear, Brasil);

Fosfato de sódio bibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) P.A. 98 % em massa (Nuclear, Brasil).

3.2.2 - Equipamentos

Agitador magnético com aquecimento marca Fisatom;

pHmetro marca Hanna Instruments modelo HI 9321;

Bloco de aquecimento marca Stuart Scientific;

Liofilizador marca Christ gefriertrocknungsanlagen modelo Alpha 1–2/LD;

Difratômetro de raios-X marca Shimadzu modelo D6000, com fonte de Cu K_α 40Kv e 30mA ($\lambda = 0,15418 \text{ nm}$);

Equipamento Texturômetro marca Stable Micro System modelo TA.TXT2.

3.2.3 - Planejamento Fatorial 2³

Neste planejamento fatorial 2³ completo, variou-se os níveis da razão entre as massas quitosana e sulfato de condroitina utilizadas na formulação do PEC (razão QT/SC), da concentração de ácido clorídrico utilizado na solubilização da QT (conc. HCl) e do pH da solução onde as amostras de PEC foram posteriormente intumescidas (pH imersão), para avaliar a influência e a interação desses fatores no módulo elástico de compressão (E) das amostras de PEC. Este estudo permite avaliar o comportamento compressível do material, adequando assim seu uso a uma dada finalidade. O intervalo de intumescimento das amostras nas condições de pH estudadas foi fixado em 500 h e a temperatura em 37 °C. Este intervalo de tempo foi escolhido aleatoriamente, já a temperatura foi fixada em 37 °C para que fosse verificado o comportamento do material em uma temperatura próxima a temperatura corpórea normal. Já os procedimentos utilizados para a produção das amostras de PEC foram os mesmos descritos na seção 2.2.3. As amostras com formato cúbico (aresta de ± 1 cm), após o intervalo de tempo de intumescimento pré-fixado foram recolhidas e submetidas as medidas de compressão no Texturômetro para determinação do valor de E . O equipamento continha uma célula de carga de 5 N e um corpo de prova com área seccional igual a 126 mm². Os parâmetros experimentais foram ajustados em uma taxa de deformação de 10 % a uma velocidade de teste (*test speed*) igual a 1 mm s⁻¹. Os testes de compressão, por sua vez, foram realizados na temperatura ambiente. Os dados produzidos pelo equipamento foram subsequentemente convertidos em tensão de compressão por deformação. A tensão de compressão é a força compressiva necessária para comprimir a amostra e foi calculada utilizando a seguinte equação [73]:

$$\sigma = \frac{F}{A} = E(\lambda - \lambda^{-2}) \quad (3.1)$$

Onde σ é a tensão compressiva, F é a força aplicada, A é a área seccional do corpo de prova que comprime as amostras de PEC e λ é a deformação relativa. Usando a equação 3.1 foi possível determinar o valor de E para cada amostra. Logo, o valor de E é calculado a partir da inclinação da reta obtida de acordo com a equação 3.1. A deformação de compressão, ($\lambda - \lambda^{-2}$), é calculada a partir da equação:

$$\lambda = \frac{\Delta L}{L_0} \quad (3.2)$$

Onde ΔL é a deformação da amostra e L_0 é o seu comprimento inicial. Os dados estatísticos foram analisados usando o programa computacional Design-Expert[®]. Na Tabela 3.2 são apresentados os níveis inferiores (-1) e superiores (+1) das variáveis razões QT/SC (A), conc. HCl (B) e pH de imersão (C). Vale ressaltar que estes níveis foram escolhidos ao acaso.

Tabela 3.2 – Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^3 completo.

Fator	Nome	Unidade	Tipo	Nível	Nível
				(-1)	(+1)
<i>A</i>	<i>Razão QT/SC</i>	-	<i>Numérica</i>	<i>0,43</i>	<i>2,33</i>
<i>B</i>	<i>conc. HCl</i>	<i>mol L⁻¹</i>	<i>Numérica</i>	<i>0,05</i>	<i>0,50</i>
<i>C</i>	<i>pH Imersão</i>	-	<i>Numérica</i>	<i>2,00</i>	<i>12,00</i>

Este planejamento fatorial gerou um total de 8 experimentos, como mostrado na Tabela 3.3, onde são apresentadas as condições utilizadas para cada experimento.

Tabela 3.3 – Planejamento fatorial 2^3 completo

AMOSTRAS	FATORES		
	A	B	C
	Razão QT/SC	conc. HCl (mol L ⁻¹)	pH Imersão
1	0,43 (-)	0,05 (-)	2,00 (-)
2	2,33 (+)	0,05 (-)	2,00 (-)
3	0,43 (-)	0,50 (+)	2,00 (-)
4	2,33 (+)	0,50 (+)	2,00 (-)
5	0,43 (-)	0,05 (-)	12,00 (+)
6	2,33 (+)	0,05 (-)	12,00 (+)
7	0,43 (-)	0,50 (+)	12,00 (+)
8	2,33 (+)	0,50 (+)	12,00 (+)

3.2.4 - Planejamento Fatorial 2^2

No planejamento fatorial 2^2 , com duplicata, variaram-se os níveis da razão QT/SC e do pH da solução onde as amostras de PEC foram posteriormente intumescidas (pH imersão). Este planejamento foi executado para avaliar a influência e a interação desses fatores na razão entre as áreas dos sinais de difração observados através da técnica de WAXS para as amostras secas de PEC previamente intumescidas. O tempo de intumescimento das amostras nas condições de pH estudadas foi fixado em 500 h e a temperatura em 37 °C. Os procedimentos utilizados para a preparação das amostras de PEC foram os mesmos descritos na seção 2.2.3.

Tabela 3.4 – Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2^2 com duplicata.

Fator	Nome	Unidade	Tipo	Nível (-1)	Nível (+1)
<i>A</i>	<i>Razão QT/SC</i>	-	<i>Numérica</i>	<i>0,43</i>	<i>2,33</i>
<i>B</i>	<i>pH Imersão</i>	-	<i>Numérica</i>	<i>2,00</i>	<i>12,00</i>

Este segundo planejamento fatorial gerou um total de 8 experimentos, como mostrado na Tabela 3.5, onde são apresentadas as condições utilizadas para cada experimento.

Tabela 3.5 – Planejamento fatorial 2^2 com duplicata.

AMOSTRAS	FATORES	
	A Razão QT/SC	B pH Imersão
<i>1 e 2</i>	<i>0,43 (-)</i>	<i>2,00 (-)</i>
<i>3 e 4</i>	<i>2,33 (+)</i>	<i>2,00 (-)</i>
<i>5 e 6</i>	<i>0,43 (-)</i>	<i>12,00 (+)</i>
<i>7 e 8</i>	<i>2,33 (+)</i>	<i>12,00 (+)</i>

3.3 - Resultados e Discussão

3.3.1 - Análise do Fatorial 2³

Na Tabela 3.6 abaixo, são apresentados os valores calculados para o módulo de elasticidade de compressão (*E*) das amostras de PEC para cada um dos experimentos do PF 2³.

Tabela 3.6 – Valores de *E* obtidos para as amostras de PEC em cada experimento do planejamento fatorial 2³ completo.

AMOSTRAS	FATORES			RESPOSTA
	A	B	C	Mód. Elasticidade de Compressão (<i>E</i>) (KPa)
	Razão QT/SC	Conc. HCl (mol L ⁻¹)	pH Imersão	
1	0,43 (-)	0,05 (-)	2,00 (-)	0,515
2	2,33 (+)	0,05 (-)	2,00 (-)	0,250
3	0,43 (-)	0,50 (+)	2,00 (-)	0,192
4	2,33 (+)	0,50 (+)	2,00 (-)	0,215
5	0,43 (-)	0,05 (-)	12,00 (+)	1,315
6	2,33 (+)	0,05 (-)	12,00 (+)	0,843
7	0,43 (-)	0,50 (+)	12,00 (+)	0,424
8	2,33 (+)	0,50 (+)	12,00 (+)	0,324

Com os valores da Tabela 3.6 e utilizando o programa computacional Design-expert[®] obteve-se os valores dos efeitos principais, de interação e a análise de variância (ANOVA), descrita na Tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Tabela de resultados ANOVA para o planejamento fatorial 2^3 completo.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor P
<i>Modelo</i>	<i>1,04</i>	<i>5</i>	<i>0,21</i>	<i>28,76</i>	<i>0,0339</i>
<i>A – Razão QT/SC</i>	<i>0,083</i>	<i>1</i>	<i>0,083</i>	<i>11,43</i>	<i>0,0775</i>
<i>B – conc. HCl</i>	<i>0,39</i>	<i>1</i>	<i>0,39</i>	<i>53,91</i>	<i>0,0180</i>
<i>C – pH imersão</i>	<i>0,38</i>	<i>1</i>	<i>0,38</i>	<i>51,86</i>	<i>0,0187</i>
<i>AB</i>	<i>0,054</i>	<i>1</i>	<i>0,054</i>	<i>7,51</i>	<i>0,1113</i>
<i>BC</i>	<i>0,14</i>	<i>1</i>	<i>0,14</i>	<i>19,09</i>	<i>0,0486</i>
<i>Resíduo</i>	<i>0,014</i>	<i>2</i>	<i>$7,247 \times 10^{-3}$</i>		
<i>Total</i>	<i>1,06</i>				

Através da análise de variância ANOVA (Tabela 3.7) pode ser observado, que o efeito principal A (razão QT/SC) e sua interação com o fator B (conc. de HCl), AB, não são estatisticamente significativos, pois apresentaram valor P (teste F) maiores que 0,05, o que significa que existe uma probabilidade maior que 5 % de que a hipótese nula seja verdadeira, isto é, que o valor de F_0 possa ser tão grande quanto o valor de F obtido. Já os efeitos principais B (conc. HCl) e C (pH imersão) e seu efeito de interação, BC, demonstraram ser significantes, pois apresentaram valor P menores que 0,05. Os valores dos efeitos principais e de interação estão descritos na Tabela 3.8.

Tabela 3.8 – Valores dos efeitos principais e de interação para o fatorial completo 2³ completo.

Termo	Efeitos studentizados	Soma dos quadrados	Contribuição - %
<i>A – Razão QT/SC</i>	-0,20	0,083	7,84
<i>B – conc. HCl</i>	-0,44	0,39	36,98
<i>C – pH imersão</i>	0,43	0,38	35,57
<i>AB</i>	0,17	0,054	5,15
<i>AC</i>	-0,082	0,014	1,29
<i>BC</i>	-0,26	0,14	13,09
<i>ABC</i>	0,021	8,820 x 10 ⁻⁴	0,083

O modelo obtido explica 95,20 % da variação total, que comparado com a porcentagem de variação explicável, 98,63 %, indica que o modelo linear pode ser usado para prever resultados dentro do intervalo estudado. As equações obtidas para este modelo em termos de variáveis codificadas (3.3) e das variáveis reais (3.4), ambas com margem de confiança de 95% são descritas abaixo:

$$E = + 0,51 - 0,10*A - 0,22*B + 0,22*C + 0,083*AB - 0,13*BC \quad (3.3)$$

$$E = + 0,54568 - 0,21325*razão QT/SC - 0,69663*conc. HCl + 0,038596*razão QT/SC*conc. HCl - 0,11689*conc. HCl*pH \quad (3.4)$$

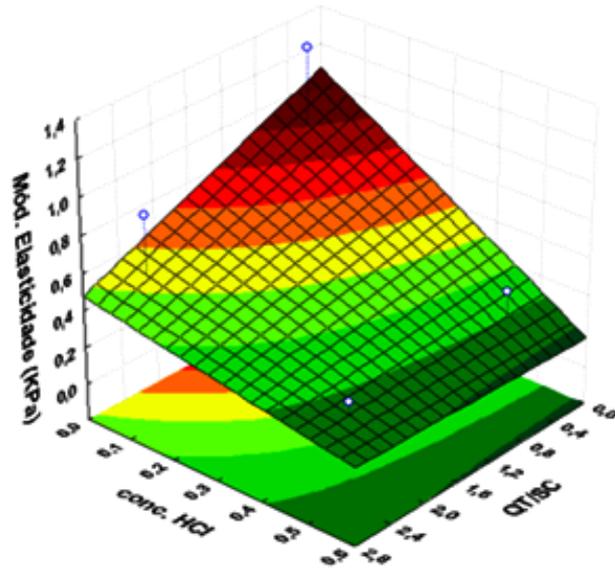


Figura 3.2 – Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2^3 para a interação dos fatores razão QT/SC e conc. HCl.

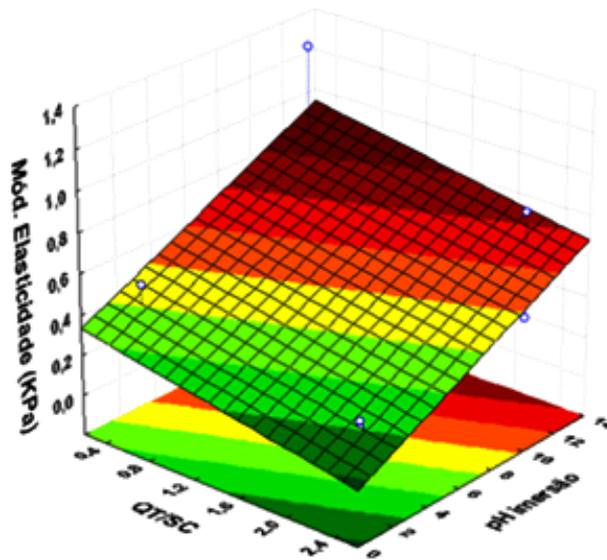


Figura 3.3 – Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2^3 para a interação dos fatores razão QT/SC e pH de imersão.

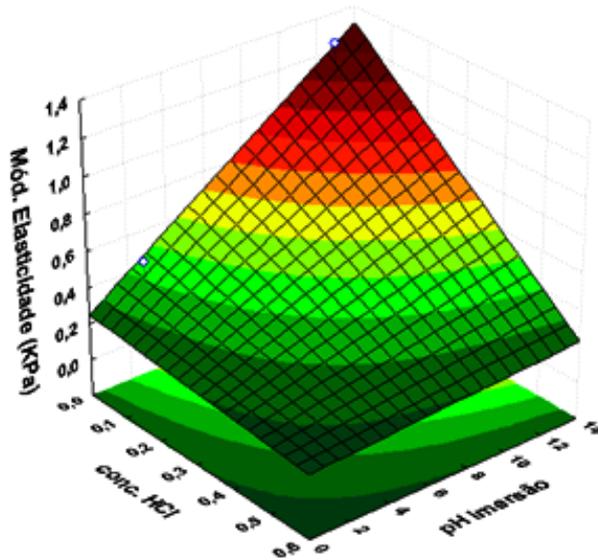


Figura 3.4 – Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2³ para a interação dos fatores conc. HCl e pH de imersão.

Nas figuras seguintes (Fig. 3.2, 3.3 e 3.3) são apresentadas as superfícies de resposta obtidas segundo o modelo linear obtido, logo, pode-se observar que as melhores condições para se obter um material com maior módulo de elasticidade, estão próximas à razão QT/SC igual a 0,43, ao utilizar uma solução aquosa ácida 0,05 mol L⁻¹ de HCl e também, as amostras intumescidas em soluções tampão com pH próximo a 12. Isto pode ser entendido pelo fato de que nestas condições a menor quantidade de QT demanda da adição de uma menor quantidade de ácido para sua solubilização. Além disso, após o PEC ser intumescido em tampão pH 12, o mesmo deixa de apresentar estrutura envelada e passa a apresentar cristalinidade devido o reordenamento das cadeias de QT e de SC. Como discutido anteriormente, este reordenamento faz com que a rede polimérica deixe de ser formado por interações eletrostática e passa ser formada por ligações de hidrogênio. O reordenamento das cadeias e o seu posicionamento de modo mais ordenado fazem com que o material exiba uma característica mais elástica quando comprimido.

3.3.2 - Análise do Fatorial 2²

Na Tabela 3.9 são apresentadas as áreas dos sinais de difração de raios-X observados nos difratogramas das amostras de PEC secas após, terem sido intumescidas durante 500 h. Estes sinais de difração foram observados para valores de 2θ iguais a 43,9° e 64,4°, respectivamente.

Tabela 3.9 – Valores para a razão entre sinais de difração obtidos nos experimentos do planejamento fatorial 2² com duplicata.

AMOSTRAS	FATORES		RESPOSTA
	A	B	Razão entre as áreas (64,4 °/43,9 °)
	Razão QT/SC	pH Imersão	
1	0,43 (-)	2.00 (-)	0,00
2	0,43 (-)	2.00 (-)	0,00
3	2,33 (+)	2.00 (-)	0,00
4	233 (+)	2.00 (-)	0,00
5	0,43 (-)	12.00 (+)	0,343
6	0,43 (-)	12.00 (+)	0,358
7	2,33 (+)	12.00 (+)	0,596
8	2,33 (+)	12.00 (+)	0,563

Os valores da Tabela 3.9 foram analisados utilizando o programa computacional Design-expert[®] e os valores dos efeitos principais, de interação e a análise de variância (ANOVA), estão descritos na Tabela 3.10.

Tabela 3.10 – Tabela de resultados ANOVA para o planejamento fatorial 2^2 com duplicata.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor P
<i>Modelo</i>	0,48	3	0,16	984,05	< 0,0001
<i>A – Razão QT/SC</i>	0,026	1	0,026	159,64	0,0002
<i>B – pH imersão</i>	0,43	1	0,43	263,88	< 0,0001
<i>AB</i>	0,026	1	0,026	159,64	0,0002
<i>Erro Puro</i>	$6,570 \times 10^{-4}$	4	$1,643 \times 10^{-4}$		
<i>Total</i>	0,49	7			

A análise de variância ANOVA (Tabela 3.10) demonstrou que os efeitos principais A (razão QT/SC), B (pH de imersão) e sua interação, AB, são estatisticamente significativos, pois apresentaram valor P (teste F) muito menor que 0,05, o que significa que existe uma probabilidade menor que 5 % de que a hipótese nula seja verdadeira. Os valores dos efeitos principais e de interação estão descritos na Tabela 3.11.

Tabela 3.11 – Valores dos efeitos principais e de interação para o fatorial completo 2^2 .

Termo	Efeitos studentizados	Soma dos quadrados	Contribuição - %
<i>A – Razão QT/SC</i>	0,11	0,026	5,40
<i>B – pH imersão</i>	0,46	0,43	89,06
<i>AB</i>	0,11	0,026	5,40

O modelo obtido para este planejamento fatorial, explica 99,76 % da variação total, que comparado com a porcentagem de variação explicável, 99,86 %, indica que o modelo linear pode ser usado para prever resultados dentro do intervalo estudado. Neste sentido, as equações obtidas para este modelo em termos de variáveis codificadas (3.5) e das variáveis reais (3.6), ambas com margem de confiança de 95,00 % são descritas abaixo:

$$\text{Razão (64,4°/43,9°)} = + 0.26 + 0.057*A + 0.23*B + 0.057*AB \quad (3.5)$$

$$\text{Razão (64,4°/43,9°)} = -0,059735 - 0,024105*\text{Razão QT/SC} + 0,029867*\text{pH imersão} + 0,012053*\text{razão QT/SC}*\text{pH imersão} \quad (3.6)$$

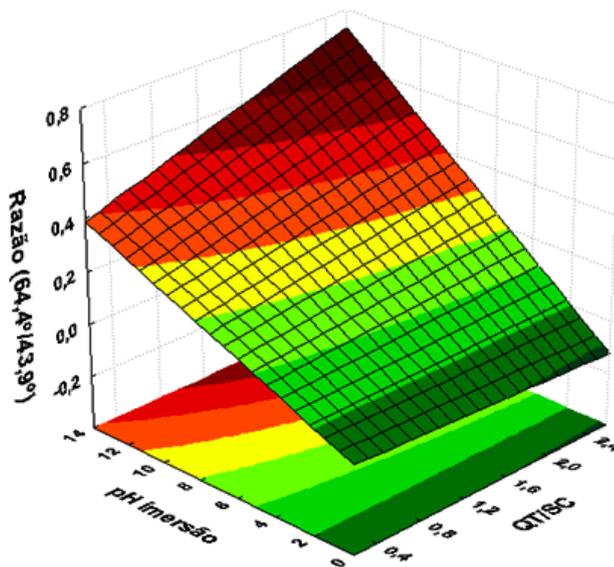


Figura 3.5 – Superfície de resposta segundo o modelo obtido para o PF 2² com duplicata para a interação dos fatores razão QT/SC e pH de imersão.

Na Fig. 3.5 é apresentada a superfície de resposta confeccionada segundo o modelo obtido. Desta forma, pode ser observado que as melhores condições para se obter uma maior razão entre os sinais de difração de raios-X, estão próximas à razão QT/SC igual a 2,4 e as amostras são previamente intumescidas em soluções tampão com maiores valores de pH. Este aumento na razão entre os sinais observados nos perfis de difração das amostras secas após serem intumescidas em solução tampão com maior pH, indica que o reordenamento das cadeias de QT juntamente com as restantes de SC tende a formar regiões ordenadas com menor distância periódica entre si. Isto ocorre, pois com o aumento na quantidade de QT na formação da rede polimérica e o seu posterior intumescimento em tampão pH 12, o reordenamento da cadeias e a formação de interação entre as cadeias de um mesmo polieletrólito contribuem efetivamente para a formação de regiões ordenadas com menor distância periódica entre si.

3.4 - Conclusão

Após a execução desses dois planejamentos fatoriais e a partir das informações obtidas, pode-se concluir que é possível produzir complexos polieletrólíticos de QT e SC com propriedades distintas entre si. Sendo assim, o módulo de elasticidade e a distância periódica entre as regiões ordenadas, formadas na rede polimérica do PEC após o reordenamento das cadeias de QT e SC, podem ser ajustadas segundo os fatores razão QT/SC, conc. de HCl necessária para solubilização da QT e do pH no qual o PEC, depois de ser produzido, é intumescido.

CAPÍTULO IV – Considerações Finais

Os estudos desenvolvidos e discutidos nesta dissertação justificam-se como uma forma sistemática para se obter melhor compreensão do comportamento de reorganização exibidos pelos complexos polieletrólíticos de QT/SC, cujos estudos pioneiros foram realizados no nosso grupo de pesquisa [56]. Estes estudos demonstraram que os complexos de QT/SC apresentam interessante capacidade de reorganização de sua rede polimérica, quando intumescidos em diferentes condições de pH. Tal fenômeno, a reordenação das cadeias formadoras da rede polimérica do PEC de QT/SC, foi caracterizado pela formação de regiões ordenadas no interior da matriz concomitantemente à liberação de parte do SC para o meio de intumescimento. Este reordenamento faz com que o material, depois de liofilizado, deixe de apresentar uma estrutura altamente enovelada e passe a ter certa cristalinidade, fazendo com que sua estabilidade térmica seja melhorada. Foi verificado também, que as distâncias periódicas entre essas regiões cristalinas são fortemente dependentes da faixa de pH na qual o material fora intumescido bem como, do tempo em que o mesmo permaneceu imerso. Um processo erosivo na rede polimérica, devido à desestabilização da matriz e a perda de parte das cadeias de SC, ocasionam o aumento no tamanho médio dos poros alterando assim, morfologia do PEC.

Os dados coletados a partir dos planejamentos fatoriais executados permitem inferir, que é possível produzir complexos polieletrólíticos utilizando os polieletrólitos QT e SC com propriedades distintas entre si. Este interessante comportamento somado ao aprofundamento do estudo sobre a reordenação da rede polimérica formada por PEC de QT/SC confirma que este material pode ser previamente tratado para adequar seu uso a um propósito específico, atuando como biomaterial, no campo da biotecnologia ou, especificamente, na liberação controlada de fármacos tipo sulfato de condroitina, entre outros.

CAPÍTULO V - Referências

1. Mano, E. **Introdução à Polímeros**. 2ª ed. São Paulo: Edgard Blucher (1989).
2. Júnior, CDW. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5ª ed.. São Paulo: LTC (2002).
3. Swift, G. *Water-soluble polymers*. **Polymer Degradation and Stability** 45 (1994) 215-231.
4. Kaplan, DL. *Introduction to Biopolymers from renewable resources*. In: **Biopolymers from renewable resources**, Springer-Verlag (1998) 1-29.
5. Hayash, T. *Biodegradable polymers for biomedical use*. **Progress in Polymers Science** 19 (1994) 663-702.
6. Williams, DF. *Definitions in biomaterials*. In: **Proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials**. New York: Elsevier (1987).
7. Amaral, IF, Barbosa MA, Barrias CC, Cavalheiro J, Ferraz MP, Granja PL, Lopes MA, Martins MCL, Monteiro FJ, Ribeiro CC, Santos JD, Souza SR e Queiroz, AC. *Biomateriais*. In: **Biotecnologia, Lidel** (2003) 377-397.
8. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acesso em 19 ago. 2009.
9. Booth, CE e Price C. *Polymers as biomaterials*. In: *Compressive Polymer Science – The Synthesis, Characterization, Reaction and Applications of Polymers*. Pergamon Press (1989) 202-208.
10. Buddy, DR. **Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine** (2004).

11. Ducheyne, P. *Bioceramics: Material characteristics versus in vivo behavior*. **Applied Biomaterials** 21 (1987) 219-236.
12. Gilding, DK. *Biodegradable polymers*. In: *Biocompatibility of Clinical Implants Materials*. **CRC Press** (1981) 210-228.
13. *Tipos de biomateriais - Os Biopolímeros*. **RECET - Associação dos Centros Tecnológicos de Portugal**. Disponível em <www.recet.pt/pi/implantesmedicos.php?pag=7>. Acesso em 02 dez. 2009.
14. de Azevedo, MMM. *Nanoesferas e a liberação controlada de fármacos*. 20f. Monografia (Tópicos Especiais em Química Inorgânica IV - Introdução à Nanotecnologia: Um Enfoque Químico) - LQES - Laboratório de Química do Estado Sólido – Instituto de Química – **UNICAMP**, 2002.
15. Henrique JS, Falcare RS e Lopes PS. *Sistemas de Liberação Controlada*. **Pharmacia Brasileira** 56 (2006) 22.
16. Simon L. *Analysis of heat-aided membrane-controlled drug release from a process control perspective*. **International Journal of Heat and Mass Transfer** 50 (2007) 2425-2433.
17. Gröning R, Bensmann H e Müller RS. *Control drug release from capsules using high frequency energy transmissions systems*. **International Journal of Pharmaceutics** 364 (2008) 9-13.
18. Limayen Blouza I, Charcosset C, Sfar S e Fessi H. *Preparation and characterization of Spironlactone-loaded nanocapsules for pediatric use*. **International Journal of Pharmaceutics** 325 (2006) 124-131.
19. Jagur-Grodzinski J. *Polymers for target and/or sustained drug delivery*. **Polymers for Advanced Technologies** 20 (2009) 595-606.

20. Lazzeri L, Cascone MG, Quiriconi S, Morabito L e Giusti P. *Biodegradable hollow microfibers to produce bioactive scaffolds*. **Polymer International** 1 (2005) 101-107.
21. Hoffman AS. *The origins of "Controlled" Drug Delivery*. **Journal of Controlled Drug Release** 132 (2008) 153-163.
22. Park We Na K. *Polyelectrolyte complex of Chondroitin Sulfate and Peptide with lower pI value in Poly(lactide-co-glycolide) microsphere for stability and controlled release*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 72, (2002) 193-200.
23. Srinatha A e Pandit JK. *Alternative polyelectrolyte coating of Chitosan beads for extending drug release*. **Drug Delivery** 15 (2008) 193-199.
24. Sajeesh S e Sharma CP. *Novel polyelectrolyte complexes based on Poly(methacrylic acid)-bis-(2-aminopropyl) Poly(ethylene glycol) for oral protein delivery*. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition** 18 (2007) 1125-1139.
25. Du J, Dai J, Liu J e Dankovich T. *Novel pH-sensitive polyelectrolyte Carboximethyl Konjac Glucomannan-Chitosan beads as drug carriers*. **Reactive & Functional Polymers** 66 (2006) 1055-1061.
26. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O e Gurny R. *Structure and interaction in Chitosan hydrogels formed by complexation and aggregation for biomedical applications*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 57 (2004) 35-42.
27. Chen WB, Wang LF, Chen JS e Fan SY. *Characterization of polyelectrolyte complexes between Chondroitin Sulfate and Chitosan in the solid state*. **Journal of Biomedical Materials Research, Part A** 75 (2005) 128-137.
28. Park WH. *Insoluble polyelectrolyte complex formed chitosan and α -keratose: Conformational change of α -keratose*. **Macromolecular Chemical Physics** 197 (1996) 2175-2183.

29. Takahashi T, Takayama K, Machida Y e Nagait T. *Characteristics of polyion complexes of Chitosan with Sodium Alginate and Sodium Poly acrylate*. **International Journal of Pharmaceutics** 61 (1990) 35-41.
30. Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA e Gurny R. *Structure and interactions in covalently and ionically Chitosan hydrogels for biomedical applications*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 57 (2004) 19-34.
31. Kumar MNVR, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Sashiwa H, Domb AJ. *Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives*. **Chemical Reviews** 104 (2004) 6017-6084.
32. Izumrudov VA, Parashchuk VV e Sobachin AV. *Unusual behavior of saline solutions of polyelectrolyte complexes containing guest oligomers*. **Polymer Science Series B** 48 (2006) 78-79.
33. Il'na AV e Varlamov VP. *Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review*. **Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia** 41 (2005) 9-16.
34. Denuziere A, Ferrier D e Domard A. *Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico-chemical Aspects*. **Carbohydrate Polymers** 29 (1996) 317-323.
35. Kas HS. *Chitosan: Properties, preparations and application to microparticulate systems*. **Journal of Microencapsulation** 14 (1997) 689-711.
36. Radhankrishnan VV, Viajaya NMS, Sambasiavan M, Jamaluddin M e Rao SB. *Haemostatic potential of chitosan*. **Biomedicine** 2 (1991) 3-6.
37. Rao SB e Sharma CP. *Use of chitosan as a biomaterial: Studies on its safety and hemostatic potential*. **Journal Biomedic Materials Research** 34 (1997) 21-8.

38. Krayukhina MA, Samoilova NA e Yamskov IA. *Polyelectrolyte complexes of chitosan: Formation, properties and applications*. **Russian Chemical Reviews** 77 (2008) 799-813.
39. Gupta KC e Ravi Kumar MNV. *An overview on chitin and chitosan applications with an emphasis on controlled drug release formulations*. **Biomaterials** 21 (2000) 1115-1119.
40. Dean JR e Dixon BG. *Advances in Chitin and Chitosan*. London UK: **Elsevier Applied Science** (1992).
41. Capitani D, De Angelis AA, Crescenzi V, Masci G e Segre AL. *NMR study of a novel chitosan-based hydrogel*. **Carbohydrate Polymers** 45 (2001) 245-252.
42. Saylers AA. *Energy sources of major intestinal fermentative anaerobes*. **American Journal of Clinical Nutrition** 32 (1979) 158-163.
43. Saylers AA e O'Brien M. *Cellular location of enzymes involved in chondroitin sulfate breakdown by bacteroides Thetaiotaomicron*. **Journal of Bacteriology** 143 (1980) 772-780.
44. Sintov A, Di-Capua N e Rubinstein A. *Cross-linked chondroitin sulfate: Characterization for drug delivery purposes*. **Biomaterials** 16 (1996) 473-478.
45. Rubinstein A, Nakar D e Sintov A. *Colonic Drug Delivery: Enhanced release of Indomethacin from cross-linked chondroitin matrix in rat cecal content*. **Pharmacological Research** 9 (1992) 276-280.
46. Richy F, Bruyere O, Ethgen O, Cucherat M, Henrotin Y e Reginster JY. *Structural and symptomatic efficacy of glucosamine and chondroitin in knee osteoarthritis: A comprehensive meta-analysis*. **Archives of Internal Medicine** 163 (2003) 1514-1522.

47. Johnson DW e Mokler DJ. *Chondroitin sulfate. Continuing Education Module. New Hope Institute of Retailing* (2001).
48. Zavan B, Brun P, Vindigni V, Amadori A, Habeler W, Pontisso P, Montemurro D, Abatangelo G e Cortivo R. *Extracellular matrix – Enriched polymeric scaffolds as a substrate for hepatocyte cultures: in vitro and in vivo studies. Biomaterials* 26 (2005) 7038-7045.
49. Serra L, Doménech J e Peppas NA. *Drug transport mechanisms and release kinetics from molecularly designed Poly(acrylic acid-ethylene glycol) hydrogels. Biomaterials* 27 (2006) 5440-5451.
50. Wirtanen G, Aalto M, Härkönen P, Gilbert P e Sandholm TM. *Efficacy testing of commercial disinfectants against food borne pathogenic and spoilage microbes in biofilm-constructs. European Food Research and Technology* 213 (2001) 409-414.
51. Peter MG. *Applications and environmental aspects of chitin and chitosan. Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry A* 32 (1995) 629-640.
52. Vasiliu S, Popa M e Rinaudo M. *Polyelectrolyte capsules made of two biocompatible natural polymers. European Polymer Journal* 41 (2005) 923-932.
53. Dai Z, Yang XL e Huang WQ. *Preparation of narrow-disperse or monodisperse poly[[poly(ethylene glycol) methyl ether acrylate]-co-(acrylic acid)] microspheres with ethyleneglycol dimethacrylate as crosslinker by distillation precipitation polymerization. Polymer International* 56 (2007) 224-230.
54. Ghaffari A, Navaee K, Oskoui M, Bayati K e Tehrani MR. *Preparation and characterization of free mixed-film of pectin/chitosan/Eudragit((R)) RS intended for sigmoidal drug delivery. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 67 (2007) 175-186.

55. Thunemann AF, Muller M, Dautzenberg H, Joanny JFO e Lowne H. *Polyelectrolyte complexes*. **Polyelectrolytes with defined molecular architecture** 166 (2004) 113-171.
56. Piai JF, Rubira AF e Muniz EC. *Self-assembly of a swollen chitosan/chondroitin sulfate hydrogel by outward diffusion of the chondroitin sulfate chains*. **ActaBiomaterialia** 5 (2009) 2601-2609.
57. Mao S, Shuai X, Unger F, Simon M, Bi D e Kissel T. *The depolymerization of chitosan: Effects on physicochemical and biological properties*. **International Journal of Pharmaceutics** 281 (2004) 45-54.
58. Wasteson A. Properties of fractionated chondroitin sulphate from ox nasal septa. **Biochemistry Journal** 122 (1971) 477-485.
59. USP30–NF25, *United States Pharmacopeia-National Formulary*, **The United Pharmacopeia Convention**, Rockville, MD, U.S.A., 2007.
60. Yildiz B, Isik, B e Kis M. *Thermoresponsive poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels*. **Reactive and Functional Polymers** 52 (2002) 3-10.
61. Strand SP, Tommeraas K, Varum KM e Ostgaard K. *Electrophoretic light scattering studies of chitosans with different degrees of N-acetylation*. **Biomacromolecules** 2 (2001) 1310-1314.
62. Larsson B, Nilsson M e Tjalve H. *The binding of inorganic and organic cations and H⁺ to cartilage in vitro*. **Biochemical Pharmacology** 30 (1981) 2963-2970.
63. Wang SC, Chen BH, Wang LF e Chen JS. *Characterization of chondroitin sulfate and its interpenetrating polymer network hydrogels for sustained-drug release*. **International Journal of Pharmaceutics** 329 (2007) 103-109.

64. Kurita K. *Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans*. **Marine Biotechnology** 8 (2006) 203-226.
65. Furth ME, Atala A e Van Dyke ME. *Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine*. **Biomaterials** 28 (2007) 5068-5073.
66. Pillai CKS, Paul W e Sharma CP. *Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation*. **Progress in Polymer Science** 34 (2009) 641-678.
67. Mothé CG, Damico A e Machado MGS. *Estudo termoanalítico, CLAE e fracionamento físico e químico do subproduto industrial do milho*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos** 25 (2005) 1-7.
68. Relkin P. *Differential calorimetry scanning: a useful tool for studying protein denaturation*. **Thermochemical Acta** 246 (1994) 371-386.
69. Makino K, Idenuma R. e Oshina H. *A model for erosion kinetic of a hydrogel matrix*. **Colloids and Surface B: Biointerfaces** 8 (1996) 93-100.
70. Neto BB, Scarmino IS e Bruns RE. *Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2ª Ed.. Campinas, São Paulo: Editora da UNICAMP, 2001.
71. Mason RL, Gunst RF e Hess JL. *Statistical Design and Analysis Experiments – With application to engineering and sciences*. 2ª Ed. New York: John Wiley & Sons, 2003.
72. Montgomery DC. *Design and Analysis of Experiments*. New York: John Wiley & Sons, 1997.
73. Gutowska A, Bae YH, Jacobs H, Feijen J, Kim SW, *Thermosensitive interpenetrating polymer network: synthesis, characterization and macromolecular release* **Macromolecules**, 1994, **27**, 4167-4175.