



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

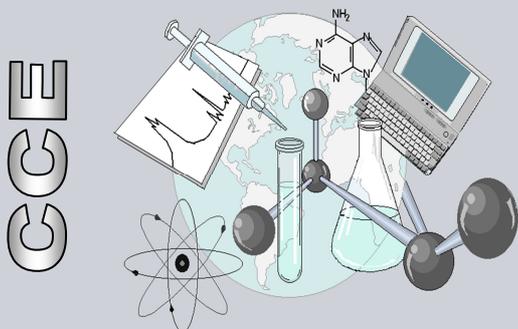
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE COMPLEXOS  
POLIELETROLÍTICOS A BASE DE POLI[(2-  
DIMETILAMINO)ETIL METACRILATO] E SULFATO DE  
CONDROITINA”**

Dissertação apresentada por **Leticia Caroline Bonkovoski** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.



**Centro de  
Ciências Exatas**

**LETICIA CAROLINE BONKOVOSKI**

*Preparação e caracterização de complexos polieletrólíticos a base de poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato] e sulfato de condroitina*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: **Prof. Dr. Edvani Curti Muniz**

MARINGÁ  
2014

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

B715p Bonkovoski, Leticia Caroline  
Preparação e caracterização de complexos polieletrólíticos a base de poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato] e sulfato de condroitina / Leticia Caroline Bonkovoski. - Maringá, 2014.  
58 f. : il., tabs., figs.

Orientador: Prof. Dr. Edvani Curti Muniz.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Polímero. 2. Sulfato de condroitina. 3. Complexos polieletrólíticos. 4. Sensibilidade temperatura e pH. 5. PDMAEMA. I. MUNIZ, Edvani Curti, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.  
CDD 22.ed.541.2254

MGC - 001836

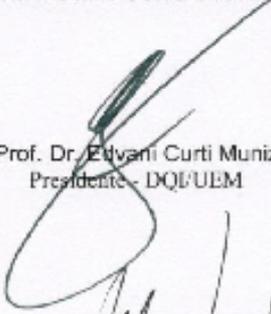


**Universidade Estadual de Maringá**

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

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Leticia Caroline Bonkovoski**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 09 de maio de 2014.

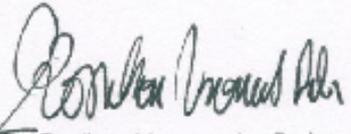
**COMISSÃO JULGADORA:**



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



Prof. Dr. Adley Forti Rubira  
Membro - DQI/UEM



Prof. Dr. Ronilson Vasconcelos Barbosa  
Membro - UFPR

Dedico este trabalho aos meus pais, Carlos e Rose, que sempre priorizaram a educação e apoiaram as escolhas de suas filhas.

“O sucesso não é final, a falha não é fatal; é a coragem de continuar que importa.”

**Winston Churchil**

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que me fornece saúde e capacidade, fatores essenciais para a execução de qualquer atividade que realizamos em nossa vida.

Aos meus pais, Rose e Carlos, e à minha irmã Amanda, que sempre me deram forças e que me acompanham desde o início.

Ao meu noivo Ricardo, pelo amor e incentivo em todos os momentos.

À todos os meus amigos e familiares que me deram força e carinho para continuar a crescer.

Ao Prof. Dr. Edvani Curti Muniz pela atenção, orientação, amizade e apoio.

Aos colegas do bloco 18: Heveline, Letícia Camargo, Fernanda, Bárbara, Guilherme, Cátia, Pedro, Paulo e André pelos momentos de estudos e descontração no laboratório.

Aos amigos ‘antigos’ do laboratório Juliana, Alessandro, Adonilson, Ricardo e Elisângela que muito contribuíram para o meu desenvolvimento inicial no laboratório.

À Juliana pela realização dos experimentos de MEV apresentados neste trabalho.

Ao Ismael (UFSC) pela realização dos experimentos de DLS apresentadas nessa dissertação.

Ao Antônio Frimmel pela realização dos experimentos de TGA .

Ao Valmir Calsavara (DEQ-UEM) e ao Prof. Dr. Ivair A. Santos (DFI-UEM) pelas análises de DRX durante o transcorrer deste trabalho.

Ao grupo do Prof. Dr. Celso V. Nakamura pelas análises bactericidas realizadas.

Ao Claudemir e à Cristina, da secretaria da pós-graduação, pela prestatividade.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

À Universidade Estadual de Maringá, em especial ao Departamento de Química e ao Programa de Pós-graduação em Química pela oportunidade.

## RESUMO

Este trabalho trata da preparação de complexos polieletrólíticos (PEC), inéditos, constituídos de poli [2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) e sulfato de condroitina (SC). O PDMAEMA foi sintetizado via radicalar a partir dos monômeros em THF e usando AIBN como iniciador. A fim de investigar a melhor condição para o preparo dos complexos, foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^2$  em que foram analisados os efeitos dos fatores pH de preparação e concentração da solução de PDMAEMA na quantidade de SC incorporada. O único fator identificado como estatisticamente significativo foi o pH. As amostras que forneceram os maiores rendimentos foram o PEC2a e o PEC3a, que foram preparadas em pH 1 e nas concentrações de PDMAEMA de 1,9 e 2,5% (m/v), respectivamente. Estes complexos foram caracterizados por meio de difração de raios-X, FTIR, TGA, MEV e DLS. Os resultados de TGA mostraram que os PECs possuem maior teor de água adsorvida quando comparados aos polímeros precursores e também que a complexação modifica a estrutura cristalina do PDMAEMA. As micrografias obtidas por MEV indicaram que a amostra PEC3a apresentou superfície porosa e mais compacta que o PEC2a. Este resultado foi atribuído à maior proporção de PDMAEMA na matriz do PEC3a. O efeito do PDMAEMA e dos complexos PEC3a e PEC2a sobre bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* foi analisado a partir de testes bactericidas. Constatou-se que tanto o polímero quanto os complexos não apresentaram atividade bactericida. Este resultado foi associado à baixa massa molar do PDMAEMA sintetizado neste trabalho. Além disso, por meio de medidas de DLS, foi verificado que os complexos PEC2a e PEC3a apresentaram transição de fases em pH 6 e 7, em contradição com o observado para o PDMAEMA, que apresentou tal transição em 52 °C somente em pH = 8. Este fato foi associado à perda de mobilidade do PDMAEMA quando complexado com o SC. O aumento do pH do meio provocou diminuição da LCST dos complexos. Esta relação está

ligada aos diferentes processos de ionização que podem ocorrer nos grupos do PDMAEMA e SC com a variação do pH do meio. A característica de termo- e pH-sensibilidade mostra que os complexos PDMAEMA/SC preparados nesta dissertação possuem grande potencial para aplicações na área farmacêutica. Estudos de liberação de SC a partir do PEC3a confirmaram que este complexo apresenta propriedade de liberação específica de SC no cólon. A partir deste PEC foi observada liberação de SC apenas em meio básico (pH = 8). Ainda, com o controle da temperatura da liberação acima ou abaixo da LCST, o PEC3a mostrou ser termo-responsivo, podendo esta característica ser melhor explorada nos tratamentos de câncer com hipertemia.

**Palavras-chave:** poli [2-(dimetilamino)etil metacrilato], sulfato de condroitina, complexo polieletrólítico, planejamento fatorial, sensibilidade temperatura e pH.

## ABSTRACT

This work reports the preparation of a novel polyelectrolyte complex (PEC) between poly [2-(dimethylamino)ethyl methacrylate] (PDMAEMA) and chondroitin sulfate (CS). The PDMAEMA was synthesized by radical polymerization from the monomers in THF and using AIBN as initiator. In order to investigate the best condition for preparing the complexes, a 2<sup>2</sup> factorial design was used for evaluating the effects of i) pH on preparation; and ii) PDMAEMA solution concentration, on amount of incorporated SC in each prepared complex. The only factor found to be statistically significant was the pH. Samples that gave the highest yields were the PEC2a and PEC3a, which were prepared at pH 1 and PDMAEMA concentrations of 1,9 and 2,5% (w/v), respectively. These complexes were characterized by WAXD, FTIR, TGA, SEM and DLS. The TGA results showed that the PECs have higher water content compared to the adsorbed precursor polymers and that the complexation modifies the crystalline structure of PDMAEMA. The SEM micrographs achieved indicated that the PEC3a sample showed porous and more compact surface than the PEC2a. This result was attributed to the higher proportion of PDMAEMA in PEC3a matrix. The antibacterial activities of the PDMAEMA and PEC3a and PEC2a complexes against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* were evaluated. It was found that the polymer as well as the complexes showed no bactericidal activity. This result was associated to the low molar mass of PDMAEMA synthesized in this work. Moreover, by means of DLS measurements, it was found that the PEC2a and PEC3a complexes showed phase transition at pHs 6 and 7, in contradiction with the observed for PDMAEMA that showed such a transition at 52 °C as in aqueous solution at pH = 8. This was associated to the loose of PDMAEMA mobility as complexed with SC. The increase of pH caused a reduction in LCST of the complexes. This relationship was connected to the different ionization processes that can occur in groups of PDMAEMA and SC with the variation of pH. The thermo- and pH-

sensitive properties show that the PDMAEMA/SC complexes prepared in this work have great potential for applications in the pharmaceutical field. Release studies of SC from PEC3a confirmed this complex to possess specific ability for SC release in the colon. This PEC can release SC only whether in basic medium (pH = 8). In addition, the PEC3a proved to be thermo-responsive by temperature controlling for releasing to occur above or below the LCST. This characteristic may be better exploited in cancer treatment with hyperthermia

**Keywords:** Poly [2-(dimethylamino) ethyl methacrylate], chondroitin sulfate, polyelectrolyte complex, factorial design, temperature and pH sensitivity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da unidade repetitiva do poli [2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA). .....	3
Figura 2 – Esquema do diagrama de fases do tipo LCST. O desenho em amarelo representa uma molécula de PDMAEMA e ilustra a morfologia do polímero acima e abaixo da LCST. Fonte: Adaptado de Dong et al (2012) [7]. .....	4
Figura 3 - Representação esquemática do processo de formação de complexos polieletrólíticos. Fonte: Adaptado de Lankapalli et al (2009) [19]. .....	6
Figura 4 - Estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina. ....	8
Figura 5 – Modelo esquemático representando um processo ou sistema que é desenvolvido por aplicação de modelo estatístico aos fatores controláveis. ....	10
Figura 6 - Modelo simplificado de liberação controlada de fármacos. Fonte: Adaptado de Azevedo (2005) [33]. .....	12
Figura 7 – Localização do cólon no corpo humano. Fonte: www.adam.com. ....	14
Figura 8 - Espectros de RMN (A) $^{13}\text{C}$ e (B) $^1\text{H}$ do polímero PDMAEMA e do monômero DMAEMA. ....	23
Figura 9 - Estrutura molecular e atribuição dos sinais dos espectros de RMN: (A) $^{13}\text{C}$ e (B) $^1\text{H}$ do polímero PDMAEMA. ....	24
Figura 10 - Efeito da temperatura no raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) durante o processo de aquecimento de soluções de PDMAEMA em pH = 6,7 e 8. ....	26
Figura 11 - Imagens fotográficas dos PECs formados de acordo com o fatorial $2^2$ (Tabela I), após serem liofilizados. ....	27
Figura 12 - Superfície de resposta obtida quando se aplica o modelo quadrático: $\text{Rendimento} = 94,43 - 0,57*A - 2,62*B - 0,43*A*B + 0,99*A^2$ .....	30
Figura 13 - Estrutura do corante azul 1,9-dimetil-metileno (DMB) (Fonte: <a href="http://www.sigmaaldrich.com">http://www.sigmaaldrich.com</a> ) .....	31
Figura 14 - Curva de calibração do complexo metacromático DMB/SC obtida em água destilada (pH ~ 6), utilizada para quantificar sulfato de condroitina ( $R^2 = 0,9962$ ). ....	32
Figura 15 - Representação química proposta do complexo polieletrólítico (PEC) entre PDMAEMA e SC. ....	33
Figura 16 - Espectros de FTIR do PDMAEMA, SC, PEC2a e PEC3a. ....	34
Figura 17 – Curvas de TGA do PDMAEMA, SC e dos PECs 2a 3a. ....	35
Figura 18 - Curvas de TGA do PDMAEMA, SC e da mistura física 50/50 (em massa) de PDMAEMA/SC. ....	37

Figura 19 - Difratoogramas de raios-X referentes aos PEC2a e 3a e aos precursores PDMAEMA e SC.....	38
Figura 20 - Imagens obtidas por MEV das amostras (A) PEC2a e (B) PEC3a após serem liofilizados.....	39
Figura 21 - Imagens da colônia de (A) <i>S aureus</i> (B) <i>E. coli</i> (C) <i>P. aeruginosa</i> cultivadas em placa de ágar. Em cada imagem tem-se à direita o controle e à esquerda cada espécie incubada com as amostras: (1) PEC2a, (2) PEC3a, (3) SC e (4) PDMAEMA.....	41
Figura 22 – Dependência do raio hidrodinâmico com a temperatura durante o processo de aquecimento das amostras (a.1) PEC2a em pH = 6; (a.2) PEC2a em pH = 7; (a.3) PEC2a em pH = 8; (b.1) PEC3a em pH = 6; (b.2) PEC3a em pH = 7, (b.3) PEC3a em pH = 8. ....	42
Figura 23 – Esquema da alteração morfológica do PDMAEMA nos PECs em diferentes soluções tampão associadas à LCST. Fonte: Adaptado de Dong et al (2012) [7].....	44
Figura 24 - Fração liberada de SC (%) a partir do PEC3a em pH 6 e 8 na temperatura (A) 36,5°C e (B) 60°C. ....	46
Figura 25 - Perfis experimentais e teóricos segundo Peppas e Reis (Eq. 4 e 5) obtidos para a liberação de SC a partir do PEC3a em função do tempo na temperatura (A) 36,5°C (B) 60°C. ....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela I – Representação de um planejamento fatorial $2^2$ completo. ....	11
Tabela II - Planilha utilizada para o preparo de soluções tampão com força iônica constante ( $0,1\text{mol.L}^{-1}$ ).....	17
Tabela III - Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial $2^2$ , com duplicata. ....	19
Tabela IV – Planejamento fatorial $2^2$ completo.....	19
Tabela V - Valores de rendimento calculados para as amostras de PEC em cada ensaio para o fatorial $2^2$ . ....	28
Tabela VI - Tabela de resultados ANOVA para o planejamento fatorial $2^2$ , com duplicata....	29
Tabela VII - Temperaturas dos eventos, perda de água e degradação térmica do PDMAEMA, SC, PEC2a e PEC3a, determinadas por meio de curvas de TGA .....	36
Tabela VIII – LCST em diferentes pH observado para as amostras PEC2a, PEC3a e PDMAEMA.....	43
Tabela IX - Valores do expoente difusional ( $n$ ) e constante ( $k$ ) obtidos por meio da aplicação do modelo de Ritger-Peppas (Equação 3) para os dados das curvas de liberação de SC obtidos a partir do PEC3a em diferentes temperaturas em pH 8.....	49
Tabela X - Valor da constante de liberação ( $k_L$ ) obtida a partir da aplicação do modelo de difusão-partição (cinética de segunda ordem) para os dados coletados durante o estudo de liberação de SC a partir do PEC3a em diferentes temperaturas em pH 8. ....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>SC</b>	Sulfato de condroitina
<b>DMAEMA</b>	2-(dimetilamino)etil metacrilato
<b>PDMAEMA</b>	Poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato]
<b>DMB</b>	Azul 1,9-dimetil-metileno
<b>AIBN</b>	Azo-bis-isobutironitrila
<b>PEC</b>	Complexo polieletrólítico
<b>PEC2a</b>	Complexo Polieletrólítico preparado em pH=1 a partir de uma solução 1,9% (m/v) PDMAEMA e 25% (m/v) de SC
<b>PEC3a</b>	Complexo Polieletrólítico preparado em pH=1 a partir de uma solução 2,5% (m/v) PDMAEMA e 25% (m/v) de SC
<b>RMN</b>	Ressonância magnética nuclear
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no infravermelho
<b>GPC</b>	Cromatografia de permeação em gel
<b>DLS</b>	Espalhamento dinâmico da luz
<b>TGA</b>	Termogravimetria
<b>DTG</b>	Termogravimetria derivativa
<b>DRX</b>	Difração de raios-X
<b><math>\theta</math></b>	Ângulo de incidência dos raios-X
<b>LCST</b>	Temperatura consoluta inferior
<b><math>R_h</math></b>	Raio hidrodinâmico
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico

<b>M<sub>w</sub></b>	Massa molar média ponderal
<b>M<sub>n</sub></b>	Massa molar numérica média
<b>M<sub>z</sub></b>	Massa molar média
<b>M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub></b>	Índice de polidispersidade
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>R<sup>2</sup></b>	Coefficiente de determinação
<b>M<sub>t</sub>/ M<sub>∞</sub></b>	Fração de soluto liberada da matriz do PEC
<b>K<sub>L</sub></b>	Constante de velocidade de liberação
<b>n</b>	Expoente de difusão
<b>α</b>	Atividade de partição
<b>F<sub>L</sub></b>	Fração de SC liberado a partir do PEC em um tempo específico
<b>F<sub>max</sub></b>	Fração de SC liberado a partir do PEC quando o sistema atinge o estágio de equilíbrio de liberação
<b>t<sub>1/2</sub></b>	Tempo necessário para que a concentração do soluto na solução atinja 50% (h)

## SUMÁRIO

1. Introdução .....	2
1.1. Polímeros inteligentes .....	2
1.1.1. Poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) .....	2
1.2. Complexos polieletrólíticos (PECs).....	5
1.2.1. Sulfato de condroitina.....	7
1.3. Planejamentos fatoriais.....	9
1.4. Liberação controlada de fármacos.....	12
1.4.1. Liberação específica no cólon.....	13
2. Objetivos .....	15
2.1. Objetivo geral .....	15
2.2. Objetivos específicos .....	15
3. Materiais e métodos .....	16
3.1. Reagentes.....	16
3.2. Procedimentos .....	16
3.2.1. Síntese do PDMAEMA.....	16
3.2.2. Determinação da massa molar do PDMAEMA por cromatografia de permeação em gel (GPC) .....	16
3.2.3. Preparação das soluções tampão .....	17
3.2.4. Ensaio com o corante azul 1,9-dimetil-metileno, para a quantificação de SC.....	17
3.2.5. Formação dos PECs PDMAEMA/SC.....	18
3.2.6. Planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> .....	18
3.2.7. Liberação <i>in vitro</i> de SC a partir da matriz do PEC3a.....	19
3.3. Caracterizações .....	20
3.3.1. Análises de RMN <sup>1</sup> H e RMN <sup>13</sup> C.....	20

3.3.2. Análise de FTIR .....	20
3.3.3. Análise termogravimétrica .....	20
3.3.4. Análise por difração de raios-X.....	20
3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura .....	21
3.3.6. Teste bactericida.....	21
3.3.7. Medidas de espalhamento dinâmico da luz (DLS).....	22
4. Resultados e discussões .....	23
4.1. Caracterização do PDMAEMA.....	23
4.2. Influência da concentração de PDMAEMA e do pH na formação dos PECs .....	27
4.3. Ensaio com o corante azul 1,9-dimetil-metileno para a quantificação de SC .....	31
4.4. Caracterização dos complexos polieletrólíticos .....	32
4.4.1. Análise por meio de espectroscopia de infravermelho (FTIR).....	33
4.4.2. Análises por meio de TGA.....	35
4.4.3. Análise dos difratogramas de raios-X.....	38
4.4.4. Análise morfológica dos PEC .....	39
4.4.5. Teste bactericida.....	40
4.4.6. Medidas de espalhamento dinâmico da luz (DLS).....	41
4.4.7. Liberação <i>in vitro</i> de SC a partir da matriz do PEC3a utilizando DMB.....	46
4.4.8. Estudo da cinética de liberação de SC em pH 8 .....	48
5. Conclusões .....	53
6. Referências.....	55

## **1. Introdução**

### **1.1. Polímeros inteligentes**

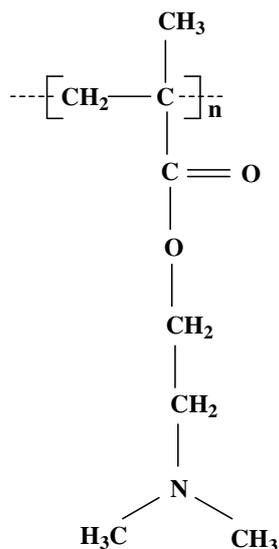
Biopolímeros tais como proteínas, polissacarídeos e ácidos nucleicos estão presentes como componentes básicos em sistemas orgânicos vivos. Os sistemas vivos respondem a estímulos externos de forma a se adaptarem às mudanças nas condições do ambiente. Pesquisadores da área de polímeros vêm tentando imitar este comportamento durante as últimas décadas por meio do desenvolvimento dos chamados polímeros inteligentes [1].

Os polímeros inteligentes também são conhecidos como polímeros estímulo-responsivos, pois apresentam mudança de propriedade em resposta a um ou mais estímulos externos (temperatura, pH, potencial elétrico, luz, e/ou campo magnético). Uma grande variedade de polímeros inteligentes, com propriedades específicas, tem sido sintetizada. Exemplos de polímeros inteligentes sintéticos são poli(ácido acrílico) (PAA), poli(N-isopropilacrilamida) (PNIPAAm), poli(N,N-dietilaminoetil metacrilato) (PDEAEMA), poli(lisina) (PL), entre outros [2].

A singularidade desses polímeros não reside apenas nas alterações macroscópicas rápidas que ocorrem na sua estrutura em função de variações de estímulos externos, mas também no fato destas alterações serem reversíveis [3]. Desta forma, os polímeros inteligentes têm aplicações em diversas áreas da medicina e biomedicina [4-6].

#### **1.1.1. Poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA)**

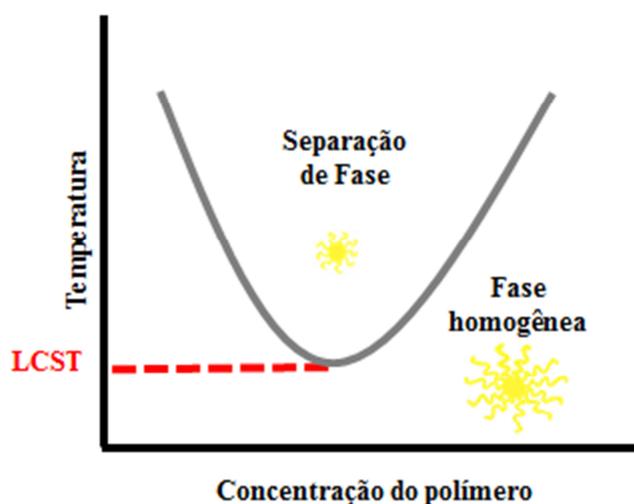
O poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) é um polímero sintético que vem sendo bastante investigado devido principalmente a sua dupla sensibilidade a variações de pH e temperatura. Sua estrutura química está representada na Figura 1.



**Figura 1** - Estrutura da unidade repetitiva do poli [2-(dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA).

O PDMAEMA apresenta modificação estrutural quando aquecido em meio aquoso cujo resultado é um diagrama de fases tipo temperatura consoluta inferior (ou LCST, do inglês *Lower Critical Solution Temperature*). Na transição, a estrutura hidrofílica do PDMAEMA passa para uma estrutura hidrofóbica quando aquecido acima da LCST. Em tal condição, as interações entre as cadeias PDMAEMA e as moléculas de água são rompidas e prevalecem interações polímero-polímero, ocorrendo então o colapso entre cadeias de PDMAEMA [7]. Na Figura 2 está ilustrado, de forma esquemática, o diagrama de fases do PDMAEMA.

A LCST do PDMAEMA ocorre na faixa de 32-53° C em condições básicas [7-9]. A faixa de temperatura na qual é observada tal transição está ligada principalmente à massa molar média do polímero e ao pH do meio [10]. Ao mesmo tempo, o PDMAEMA é um polieletrólito fraco cuja densidade de cargas pode ser alterada por variação do pH devido ao fato dos grupos amino terciários estarem (ou não) protonados. O pKa deste polímero é de aproximadamente 7,0 [11], o que indica que em meio ácido os grupos amino são protonados (ionizados), tornando o PDMAEMA um polycation.



**Figura 2** – Esquema do diagrama de fases do tipo LCST. O desenho em amarelo representa uma molécula de PDMAEMA e ilustra a morfologia do polímero acima e abaixo da LCST. Fonte: Adaptado de Dong et al (2012) [7].

Dong et al [7] sintetizaram uma série de nanopartículas de sílica com PDMAEMA enxertado na forma de escovas. Medidas de DLS das nanopartículas em solução tampão revelaram a dependência da LCST de cada formulação com o pH da solução e com o comprimento da cadeia do PDMAEMA enxertado. Com a diminuição do pH, a LCST deslocou para temperaturas mais altas, o que foi atribuído às interações eletrostáticas formadas na nova condição de pH. O aumento do comprimento das cadeias enxertadas causou um decréscimo na LCST, quando o pH é mantido constante. Tal fato pode ser atribuído à diminuição da mobilidade da macromolécula, portanto diminuição de entropia. Tendo sido constatado que estes materiais são pH-responsivos, cuja LCST pode ser variada de forma controlada, eles são, portanto, considerados potenciais candidatos para serem utilizados na preparação de materiais com superfícies ativas para aplicações em cromatografia líquida, sensores, entrega de fármacos, entre outros.

Recentemente foi demonstrado que a quaternização dos grupos amino do PDMAEMA permite que este polímero possua atividade bactericida [12-14]. Além disso, o PDMAEMA

quaternizado é solúvel não somente em meio aquoso ácido, mas também em meios aquosos neutro e básico.

Yancheva et al [12] sintetizaram complexos polieletrólíticos entre o poli[2-(dimetilamino)etil metacrilato] quaternizado (PDMAEMAQ) e a N-carboxitetilquitosana (CECh). Foram avaliadas as atividades antibacteriana da CECh, do PDMAEMAQ e de seus complexos contra *Escheria coli*. Dentre esses polímeros, somente o PDMAEMAQ apresentou tal atividade. No entanto, foi constatado que a formação do complexo resultou em uma perda da atividade antibacteriana do PDMAEMAQ em meio neutro. Já em meio ácido, os complexos apresentaram uma forte atividade antibacteriana devido à desintegração e liberação do PDMAEMA (quaternizado). Em outro estudo [13], o mesmo grupo de pesquisadores verificaram que o complexo PDMAEMAQ/CECh em contato com o sangue possui atividade hemostática, que depende fortemente do grau de quaternização do PDMAEMA.

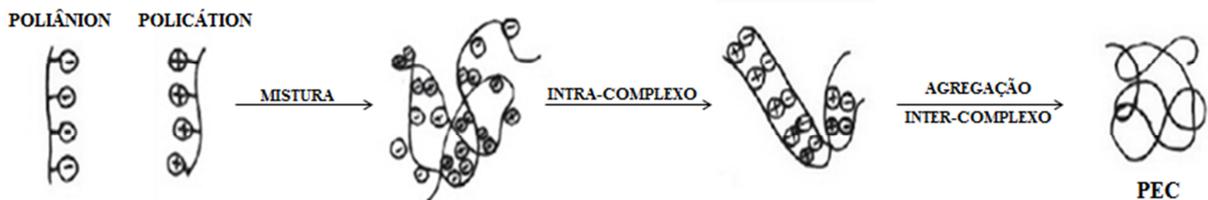
Devido principalmente à característica de termo- e pH-sensibilidade, o PDMAEMA vem sendo aplicado em diversas formas de materiais, como em nanofibras [15], hidrogéis [9], copolímeros [3, 16] e complexos polieletrólíticos [17].

## 1.2. Complexos polieletrólíticos (PECs)

Complexos polieletrólíticos são estruturas formadas por interações físicas entre um polímero que possui grupos com cargas positivas e outro que possui grupos carregados negativamente [18].

Como mostrado na Figura 3, na formação de PECs estão envolvidas, principalmente, três etapas. Primeiramente ocorre a formação do complexo primário a partir das interações eletrostáticas cátion/ânion. A segunda etapa é o processo de formação intra-complexo. Trata-se de formação de novas interações (de hidrogênio e dipolo-dipolo) e/ou a correção das

distorções das cadeias de polímero. Na terceira etapa ocorre a agregação inter-complexo, que envolve a agregação dos complexos secundários principalmente por meio de interações hidrofóbicas [19].



**Figura 3** - Representação esquemática do processo de formação de complexos polieletrólíticos. Fonte: Adaptado de Lankapalli et al (2009) [19].

É conhecido que vários parâmetros influenciam a formação dos PECs. Fatores relacionados aos polímeros precursores tais como massa molar, flexibilidade, estrutura de grupos funcionais, densidade de carga, equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico, bem como as condições de preparo: pH, força iônica, temperatura, solventes e concentração, entre outros são importantes para o desenvolvimento de complexos polieletrólíticos com propriedades específicas. Diante disso, PECs de diferentes características podem ser obtidos por pequenas alterações na metodologia empregada. Assim a influência de tais fatores nas características do complexo é de extrema importância e pode ser estudada a partir de experimentos planejados com bases em métodos estatísticos, tal como o planejamento fatorial [20].

No preparo dos PECs não são utilizados agentes de reticulação, catalisadores ou iniciadores que são, frequentemente, tóxicos ao organismo humano [19]. Além disso, os complexos são formados em solução aquosa, portanto em condições brandas e não agressivas ao ambiente. Estes fatores fazem com este tipo de material presente melhor biocompatibilidade quando comparados aos que são reticulados por meio de ligações covalentes [21].

Em termos de composição, os PECs são versáteis. Podem ser constituídos por polímeros naturais ou sintéticos ou ainda pela combinação entre eles; polieletrólitos de sal, surfactantes e proteínas; onde cada componente mantém suas características individuais, porém o complexo pode apresentar características não observadas nos componentes [21]. A partir de seus polímeros precursores, os complexos polieletrólíticos podem apresentar, simultaneamente ou não, sensibilidade a variações de temperatura, de pH e de força iônica. Dependendo do meio em que os PECs estão inseridos, eles podem exibir alta densidade de cargas e diferentes comportamentos de intumescimento [22, 23].

Recillas et al [24] sintetizaram complexos polieletrólíticos entre o copolímero quitosana-g-N-isopropilacrilamida (PNIPAAm) e pectina. Os PECs apresentaram um comportamento de intumescimento durante o aquecimento, com um ponto de inflexão em 33,1 °C. Esta temperatura foi atribuída à LCST, referente à transição da fase rica em PNIPAAm. A entalpia de transição diminuiu com o aumento do pH, demonstrando que esta propriedade termodinâmica é dependente da variação do pH em tais complexos. A LCST não variou com a quantidade de PDMAEMA, nem com o pH do meio, apresentando um valor de 33 °C em todos os casos.

Diante da diversidade das características que os complexos polieletrólíticos podem adquirir, estes vêm sendo aplicados em vários campos, mas principalmente na área farmacêutica e na medicina. Algumas aplicações destes materiais incluem preparação de membranas para diálise e ultrafiltração, implantes médicos, carreadores para liberação de fármacos (*drug delivery*), entre outros [12].

### **1.2.1. Sulfato de condroitina**

O sulfato de condroitina (SC) é um glicosaminoglicano (GAG), composto por N-acetilgalactosamina e ácido glucurônico, extraído da aorta bovina ou suína (Figura 4). É um

importante componente da matriz extracelular (ECM), promove formação da estrutura, retenção de água e nutrientes. É também responsável pela resistência à compressão que são características da cartilagem [25].

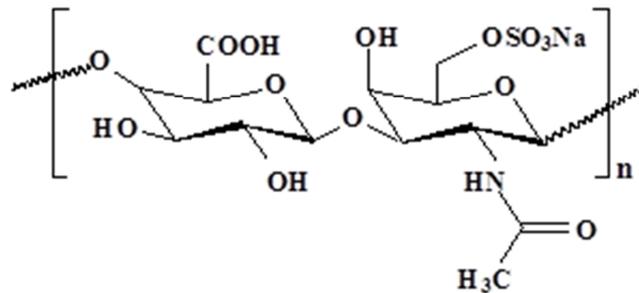


Figura 4 - Estrutura da unidade repetitiva do sulfato de condroitina.

O SC é altamente solúvel sob condições fisiológicas, sendo esta uma limitação para sua aplicação em estado sólido, como veículo para liberação de fármacos. Neste sentido, a formação de PECs de SC com substâncias catiônicas é uma alternativa para manter o SC no estado sólido [22, 26] e, ao mesmo tempo, diminuir ou mesmo evitar a sua solubilidade. Neste sentido, Fajardo et al [27] sintetizaram redes de polímeros com base em complexos polieletrólíticos constituídos de sulfato de condroitina e quitosana (SC/QT). Os complexos apresentaram capacidade de se auto-reorganizar quando intumescido em meio cujo pH é maior que 6,2. A reorganização também se mostrou dependente do tempo de intumescimento dos PECs. Através de um estudo aprofundado avaliando a reorganização da rede polimérica do PEC baseado em SC/QT, foi confirmado que este material é sensível a alterações do pH. Dessa forma, este material pode ser previamente tratado em condições específicas de pH para se obter diferentes propriedades, tal como estabilidade térmica mais elevada, diferenciados comportamentos de intumescimento e diferentes quantidades e tamanhos de poros, tornando este biomaterial muito versátil para aplicações específicas.

Sabe-se que o SC possui várias funções biológicas, incluindo atividades anti-aterogênico, anti-inflamatória, anti-trombogênico, e anti-coagulantes. Além disso, o SC é biocompatível e vem sendo utilizado no desenvolvimento de veículos de entrega de fármacos no tratamento de doenças relacionadas à arterosclerose, trombose, hiperlidemia e osteoartrites [22]. Em relação ao uso farmacológico do SC, este é classificado como uma substância que produz alívio sintomático de ação demorada, mostrando eficácia terapêutica na dose de 800 a 1200 mg diariamente, em dose única ou em doses divididas e oralmente administradas [28].

Devido às características do SC e do PDMAEMA (Seção 1.1.1) apresentadas, a hipótese a ser estudada nesta dissertação é que complexos polieletrólíticos envolvendo esses dois polímeros poderão apresentar propriedades termo- e pH-sensitivas. Ainda, ao serem sintetizados PECs em condições de excesso de SC, pode haver a liberação de parte do SC complexado, fato que pode ser controlado por alterações de pH e/ou temperatura do meio. Enfatiza-se que na literatura não há menção de estudo de complexos polieletrólíticos baseados nestes dois polímeros, o que torna este estudo inédito.

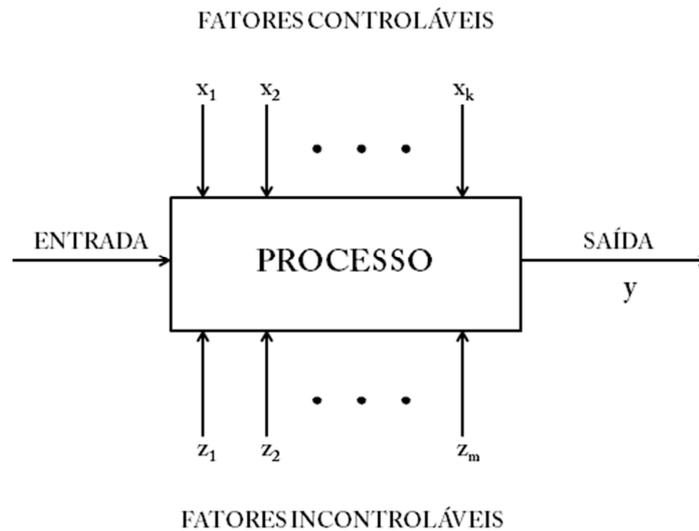
### 1.3. Planejamentos fatoriais

Nas últimas décadas, planejamentos experimentais têm sido utilizados para diversas aplicações. Estes podem ser adotados em várias fases de um processo de otimização, tais como em experimentos de triagem de fatores, coleta, análise e interpretação de resultados.

Em um planejamento fatorial, o que se deseja é avaliar como  $k$  fatores [(ou variáveis),  $x_1, x_2, x_3, \dots, x_k$ ] influenciam a(s) resposta(s)  $y$  [ $(y_1, y_2, \dots, y_n)$ ] num dado sistema em estudo. Este sistema pode ser representado pelo modelo esquemático apresentado na Figura 5.

Podemos visualizar o processo como uma combinação de operações, máquinas, métodos, pessoas e outros recursos que transformam alguma entrada (geralmente um

material) direcionando para uma saída que possui uma ou mais respostas observáveis. Algumas das variáveis do processo são controláveis ( $x_k$ ) e as propriedades do material podem ser determinadas por estas variáveis, enquanto outras variáveis são incontroláveis ( $z_m$ ) [29].



**Figura 5** – Modelo esquemático representando um processo ou sistema que é desenvolvido por aplicação de modelo estatístico aos fatores controláveis.

Para executar um planejamento fatorial tem-se primeiramente que determinar quais fatores são mais influentes na resposta. A partir da escolha, especificam-se os níveis em que cada fator deve ser estudado, isto é, os valores dos fatores (ou as classes, nos casos qualitativos) que vão ser usados para fazer os experimentos. Cada experimento deve ser realizado de forma que os fatores incontroláveis ( $z_m$ ) sejam minimizados ou mesmo eliminados.

Para um planejamento fatorial completo devem-se realizar experimentos em todas as possíveis combinações de níveis. Assim, é possível estudar o comportamento da resposta em função dos  $k$  fatores variando-os todos ao mesmo tempo. Um planejamento completo de dois níveis exige a realização de  $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$  ensaios diferentes, sendo este chamado de planejamento fatorial  $2^k$ . Portanto, se o número de fatores ( $k$ ) for dois, tem-se um fatorial  $2^2$

com  $2 \times 2 = 4$  experimentos. Nos planejamentos de dois níveis são adotados os sinais (+) e (-) para identificar, respectivamente, os níveis superior e inferior. Na Tabela I é apresentada a matriz de experimentos de um planejamento fatorial completo  $2^2$  [30, 31].

**Tabela I** – Representação de um planejamento fatorial  $2^2$  completo.

Ensaio	Fatores		Resposta
	$x_1$	$x_2$	
1	-1	-1	$y_1$
2	+1	-1	$y_2$
3	-1	+1	$y_3$
4	+1	+1	$y_4$

Após a execução dos experimentos e a respectiva coleta dos dados, com auxílio de programas computacionais estatísticos (por exemplo, Design-Expert® e Estatística®) é possível quantificar efeitos associados a cada fator sobre a(s) resposta(s) analisada(s), bem como a interação entre eles. Os modelos obtidos são ditos empíricos, pois apenas descrevem o comportamento do sistema e tais modelos são válidos unicamente no intervalo estudado [26].

Os resultados de planejamento experimental são mais bem aceitos do que os obtidos por métodos convencionais onde se estuda o efeito, na resposta, de um fator a cada vez mantendo os demais constantes. A metodologia de superfície de resposta já é estabelecida como um método conveniente para o desenvolvimento e otimização de processos, e tem sido utilizada para estudos que minimizem o custo de desenvolvimento e produção em diversas áreas [20].

#### 1.4. Liberação controlada de fármacos

Entre os novos materiais inteligentes que têm sido desenvolvidos estão inseridos aqueles que envolvem a liberação de fármacos. A tecnologia de liberação representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares. Biologia, farmácia, química, física e medicina trabalham conjuntamente para fornecer avanços rápidos e consistentes nesta área de extrema importância para a saúde humana [32].

Os sistemas de liberação de fármacos, frequentemente descritos na língua inglesa como “*drug delivery systems*”, oferecem várias vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional. Na Figura 6 são ilustrados o processo de liberação convencional e o processo de liberação controlada de fármacos. A partir da Figura 6 podem ser observadas diferenças significativas entre os dois processos.

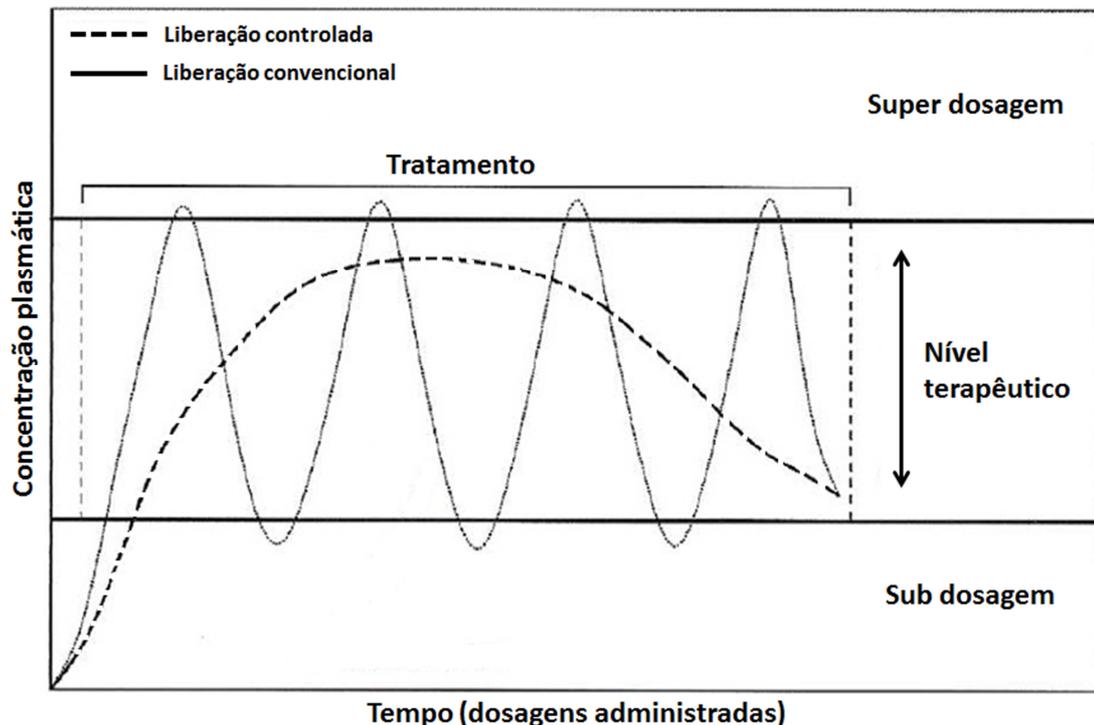


Figura 6 - Modelo simplificado de liberação controlada de fármacos. Fonte: Adaptado de Azevedo (2005) [33].

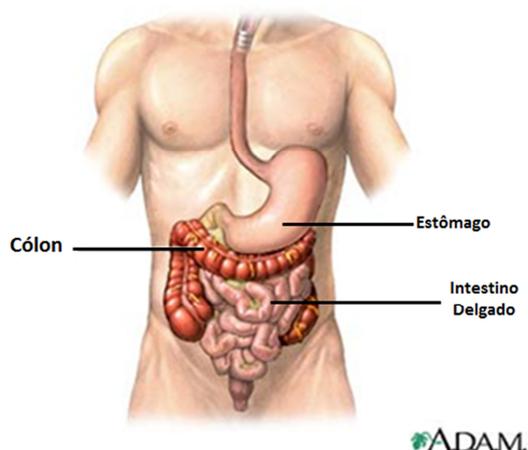
Desde que cada fármaco possui uma faixa de ação terapêutica acima da qual é tóxica e abaixo desta é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático principalmente se a dose efetiva estiver próxima do valor limítrofe a partir do qual a dose passa a ser tóxica. O objetivo de um sistema de liberação controlada é manter a concentração do fármaco no nível terapêutico por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem. A dosagem correta para o tratamento específico maximiza a eficácia terapêutica, além de reduzir os efeitos colaterais [33].

Polímeros inteligentes, naturais ou sintéticos, são grandes aliados dos materiais utilizados para entrega de fármaco e tem a função de ‘liberar’ o fármaco a partir de estímulos externos. Os estímulos externos podem ser ambientais tais como variações de pH e de temperatura ou serem aplicados remotamente, como campo magnético, ultrassom e luz, entre outros. Os polímeros inteligentes ainda podem melhorar as propriedades do material tais como solubilidade, resistência térmica, e ainda evitar a degradação em ambientes ácidos ou básicos. Dessa forma, garantem que o fármaco seja liberado no ambiente específico [34].

Os materiais para liberação controlada de fármacos incluem nanopartículas [35], nanofibras [36], hidrogéis de diferentes formas geométricas e tamanhos [9], dentre outros.

#### **1.4.1. Liberação específica no cólon**

No organismo humano, a maioria das substâncias, tais como nutrientes e fármacos, são absorvidas no intestino delgado para, então, serem levadas para todo o corpo por meio da corrente sanguínea. Além disso, muitas substâncias degradam quando entram em contato com a condição ácida da região estomacal ( $\text{pH} \approx 1-2$ ). Nos últimos anos, houve um crescente interesse no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos administrados via oral passando por determinadas regiões do trato gastrointestinal, como é o caso do cólon (Figura 7) [22, 37].



**Figura 7** – Localização do cólon no corpo humano. Fonte: [www.adam.com](http://www.adam.com).

Diante disso, dois tipos de sistemas vêm sendo estudados: a liberação retardada e a liberação específica no cólon. A liberação retardada consiste em utilizar formulações que prolongam a dissolução do fármaco até que este chegue ao cólon. Nestes sistemas, geralmente, é utilizado um polímero que tem o grau de intumescimento dependente do tempo. A liberação específica no cólon consiste em explorar as suas propriedades como pH e atividade enzimática. Esta especificidade pode ser obtida por meio do revestimento do fármaco com polímeros naturais e polímeros sintéticos pH-sensíveis [38] e/ou que sejam degradados enzimaticamente.

Uma importante aplicação dos sistemas de liberação específica no cólon consiste no tratamento local de patologias do cólon como a doença inflamatória do intestino, algumas infecções, diarreia, obstipação ou carcinomas colorretais [39].

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

Formar redes poliméricas de complexos polieletrólíticos (PECs) constituídos de poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato] e sulfato de condroitina (PDMAEMA/SC) que sejam sensíveis a variações externas de temperatura e de pH e avaliar a possível liberação de SC em condições específicas.

### 2.2. Objetivos específicos

- Obter o polímero PDMAEMA via polimerização radicalar (radical livre);
- Determinar a temperatura consoluta crítica inferior (LCST) do PDMAEMA em meio aquoso em diferentes condições de pH;
- Obter redes de PDMAEMA e SC em diferentes razões PDMAEMA/SC em diferentes pHs;
- Estudar o efeito dos fatores razão PDMAEMA/SC (em massa) e o pH do meio sobre o rendimento dos PECs formados;
- Caracterizar, por meio de diferentes técnicas instrumentais, os complexos formados e seus polímeros precursores;
- Testar a sensibilidade dos PECs frente a variações de temperatura e de pH.
- Estudar, utilizando sistemas *in vitro*, a liberação controlada de SC em diferentes pHs e temperatura.

### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Reagentes**

2-(Dimetilamino)etil metacrilato (DMAEMA, 98%, Sigma-Aldrich); sulfato de condroitina (fornecido pela Solabia, Brasil); tetrahidrofurano (THF, Química Moderna); hexano (Química Moderna); 2,2-azobis(isobutironitrila) (AIBN, 98% Sigma-Aldrich); ácido bórico (Nuclear); hidróxido de sódio (NaOH, 97%, Vetec); cloreto de sódio (NaCl, Nuclear); cloreto de potássio (Synth); glicina ( $\geq 98,5\%$ , Sigma-Aldrich); azul 1,9-dimetil-metileno (DMB, 80%, Sigma-Aldrich).

#### **3.2. Procedimentos**

##### **3.2.1. Síntese do PDMAEMA**

O PDMAEMA foi preparado por polimerização radicalar a partir de monômeros DMAEMA. A síntese foi realizada, solubilizando cerca de 5 mL do monômero (DMAEMA) em 100 mL do solvente THF. Após a completa solubilização do DMAEMA, foi borbulhado nitrogênio na solução durante 30 min e, então, adicionado 0,4 g de AIBN (iniciador). A solução contendo DMAEMA e AIBN em THF foi condicionada a uma cela conectada a um banho termostaticado a 60 °C, mantido nessa condição durante 20 h. Por fim, o PDMAEMA obtido foi precipitado em excesso de hexano, a frio, e seco em estufa à vácuo por 24 h [40].

##### **3.2.2. Determinação da massa molar do PDMAEMA por cromatografia de permeação em gel (GPC)**

A massa molar do PDMAEMA foi determinada utilizando o equipamento de cromatografia de permeação em gel (GPC) modelo Viscotek GPCmax VE2001 (Malvern Instruments) equipado com detector de índice de refração. A preparação da amostra foi realizada solubilizando 0,010 g da amostra em 5,0 mL de THF. Após completa solubilização,

a amostra foi filtrada diretamente no vial de 2,0 mL utilizando filtro seringa de 0,45  $\mu\text{m}$  e, então, levada para análise no equipamento. A amostra injetada (200  $\mu\text{L}$ ) foi submetida à separação em 3 colunas de leito misto KF806M termoestabilizadas à 40 °C e THF sob fluxo de 1,0 mL/min foi utilizado como fase móvel. A massa molar obtida foi referente à curva de calibração utilizando poliestireno como padrão.

### 3.2.3. Preparação das soluções tampão

Soluções tampão foram preparadas em uma faixa de pH de 6 a 9, com concentração de 50 mmol/L. A força iônica foi ajustada em uma concentração constante de 0,1 mol/L com a adição de KCl. As quantidades necessárias dos reagentes e soluções aquosas de partida para a produção de 1 L de solução tampão estão descritas na Tabela II [41].

**Tabela II** - Planilha utilizada para o preparo de soluções tampão com força iônica constante (0,1 mol.L<sup>-1</sup>).

pH	Soluto	Soluções		Adição
		0,5 mol.L <sup>-1</sup> (mL)	0,2 mol.L <sup>-1</sup> (mL)	KCl (g)
6,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	29	3,30
7,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	148	1,52
8,0	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100	234	3,04
9,0	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> /KCl	100	107	2,13

### 3.2.4. Ensaio com o corante azul 1,9-dimetil-metileno, para a quantificação de SC

Para cada ensaio, foram utilizados 400  $\mu\text{L}$  da solução contendo SC e 5 mL de solução de DMB (preparada pela dissolução de 16 mg DMB em 1 L de água destilada contendo 40 mmol/L de glicina, 40 mmol/L de NaCl, e 95 mL de HCl 0,1 mol/L, pH 3,0). Foi feita uma

curva de calibração com soluções padrões de SC no intervalo de 1 a 50 mg/L. A absorvância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis (Femto, modelo 800XI) a  $\lambda = 525$  nm [42].

### 3.2.5. Formação dos PECs PDMAEMA/SC

Para a formação dos PECs PDMAEMA/SC foram preparadas duas soluções. Em uma delas o PDMAEMA foi solubilizado em 80 mL de solução tampão. A outra solução foi preparada ao dissolver SC em 20 mL de solução tampão para obter uma concentração de 25% (m/v) [22]. A concentração em % (m/v) da solução de PDMAEMA e o pH das soluções tampão foram variados para se adequar a um planejamento fatorial  $2^2$  que será detalhado na próxima seção.

Após o preparo das duas soluções, estas foram misturadas lentamente, e sob agitação magnética, à temperatura ambiente. A mistura resultante foi deixada em repouso por 24 h. O precipitado formado foi isolado por centrifugação a 9500 rpm por 30 min em temperatura 2 °C. O PEC isolado foi então purificado por imersão em 400 mL de água destilada por 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. Depois de purificado, o PEC foi congelado e liofilizado a -55 °C por 24 h.

### 3.2.6. Planejamento fatorial $2^2$

A fim de avaliar o efeito dos fatores i) razão PDMAEMA/SC; e ii) pH na formação dos PECs, foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$ . Neste planejamento variou-se, em dois níveis e com ponto central, a concentração [em % (m/v)] da solução de PDMAEMA e o pH de preparo das soluções iniciais (Tabela III).

Como resposta, foi avaliado o rendimento de incorporação do SC na matriz dos PECs por meio de um ensaio com o corante azul 1,9-dimetil-metileno (DMB), como detalhado na

seção 3.2.4. Este planejamento fatorial foi realizado em triplicata no ponto médio e em duplicata nos demais experimentos, o que gerou um total de 11 experimentos, como mostrado na Tabela IV, onde são apresentadas as condições e a nomenclatura utilizadas para cada formulação.

**Tabela III** - Fatores e níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com duplicata.

Fator	Nome	Unidade	Tipo	Nível (-1)	Nível (0)	Nível (+1)
A	PDMAEMA	% (m/v)	Numérica	1,9	2,2	2,5
B	pH	adimensional	Numérica	1	3	5

**Tabela IV** – Planejamento fatorial 2<sup>2</sup> completo.

Amostra	PEC	Fatores	
		A	B
<b>1 e 2</b>	2a	1,9 (-)	1 (-)
<b>3 e 4</b>	3a	2,5 (+)	1 (-)
<b>5 e 6</b>	2c	1,9 (-)	5 (+)
<b>7 e 8</b>	3c	2,5 (+)	5 (+)
<b>9, 10, 11</b>	3	2,2 (0)	3 (0)

### 3.2.7. Liberação *in vitro* de SC a partir da matriz do PEC3a

Após serem liofilizadas, amostras do PEC3a (350 mg) foram imersas em 150 mL de solução tampão. Os experimentos foram realizados em um dissolutor *Ethik Technology* (Nova Ética) modelo 299-6TS onde cada solução permaneceu sob agitação de 60 rpm. O pH e a temperatura da solução foram variados em dois níveis. Foram coletadas alíquotas do sobrenadante em intervalos de tempo. A concentração de SC liberada a partir do complexo

polieletrólítico, em cada condição e em cada intervalo de tempo analisado, foi avaliada por meio do ensaio de DMB (descrito na seção 3.2.4). Cada experimento foi realizado em duplicata [43].

### **3.3. Caracterizações**

#### **3.3.1. Análises de RMN $^1\text{H}$ e RMN $^{13}\text{C}$**

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$  foram obtidos usando um espectrômetro *Varian* modelo *Oxford 300* operando a 300 MHz. Espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do monômero DMAEMA e do polímero PDMAEMA foram obtidos utilizando o  $\text{CDCl}_3$  como solvente.

#### **3.3.2. Análise de FTIR**

As amostras, em pó, dos polímeros PDMAEMA, SC e dos PECs 2a e 3a foram misturadas com KBr e prensadas até obter a forma de pastilha. Os espectros foram adquiridos no modo de transmitância utilizando um espectrômetro Bomem modelo MB 100.

#### **3.3.3. Análise termogravimétrica**

Análises de TGA dos PECs 2a e 3a e dos precursores PDMAEMA e SC foram realizadas em um analisador termogravimétrico Shimadzu, modelo TG-50, operando com taxa de aquecimento  $10\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , em atmosfera de gás nitrogênio com fluxo de  $50\text{ mL}/\text{min}$ , na faixa de temperatura entre  $25$  a  $700\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### **3.3.4. Análise por difração de raios-X**

Amostras dos PEC2a e PEC3a foram liofilizadas, trituradas e caracterizadas por meio de difração de raios-X. Também foram realizadas medidas de difração de raios-X de amostras secas do PDMAEMA e sulfato de condroitina. As medidas foram conduzidas em um

difratômetro XRD-6000 Shimadzu, operando na região de 5° a 70° com resolução 0,02 ° e velocidade de  $2\theta = 0,1 \text{ }^\circ \text{ min}^{-1}$ .

### 3.3.5. Microscopia eletrônica de varredura

Os PEC2a e PEC3a foram analisados por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV) utilizando um equipamento SHIMADZU, modelo SS-550. Para isso, os PECs foram inicialmente congelados e, em seguida, liofilizados por 48 h à -55 °C e fraturados. Antes das análises por MEV foi depositada uma fina camada de ouro sobre a superfície das amostras para torná-las eletricamente condutoras.

### 3.3.6. Teste bactericida

Foi utilizado o método difusão em ágar (halo de inibição) para testar a atividade de três microorganismos sobre as amostras PDMAEMA, SC, PEC2a e PEC3a. As bactérias utilizadas foram gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATC 25923). Para cada teste, mergulhou-se um swab de algodão estéril na suspensão dos micro-organismos ajustadas segundo a escala McFarland (0,5), correspondente a concentração de  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo para a retirada de qualquer excesso de inóculo no swab. A superfície seca da placa de ágar Müeller-Hinton (bactérias) ou ágar Sabouraud (leveduras) foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar. Repetiu-se o procedimento esfregando outras duas vezes, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo por toda a placa, inclusive na margem. As amostras foram colocadas sobre a placa de Ágar semeada com os micro-organismos e estas foram incubadas em estufa, a 37° C, por 24 h. Após a incubação examinou-se cada placa, verificando se foi observada a inibição ou crescimento das bactérias nas regiões próximas a amostra, mediante a formação ou não de

halos de inibição. O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu [44].

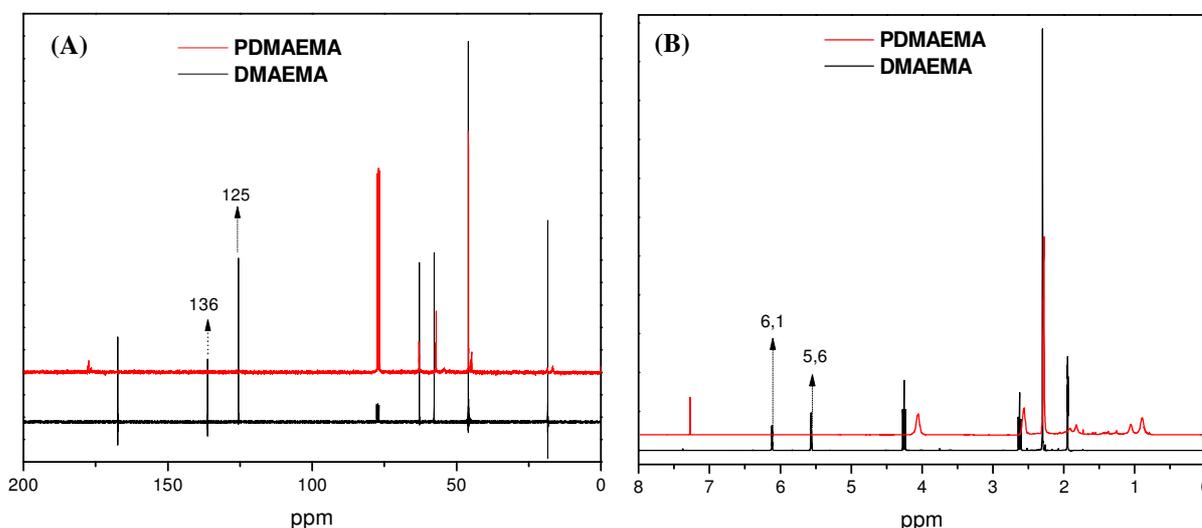
### **3.3.7. Medidas de espalhamento dinâmico da luz (DLS)**

O raio hidrodinâmico ( $R_h$ ) foi determinado usando um equipamento Zetasizer Nano ZS com laser de He-Ne (633nm) em um ângulo fixo de  $173^\circ$ . Soluções de tampão com força iônica constante igual a 0,1 mol/L a pH = 6,0, 7,0, 8,0, e 9,0 (Tabela II) foram utilizadas para avaliar a LCST do PDMAEMA e dos complexos polieletrólíticos. As medidas de  $R_h$  e LCST do polímero foram realizadas com as amostras contendo 20 mg/mL e as dos complexos contendo 0,2 mg/mL. Antes das medidas, foi aguardado um período de dois minutos em cada temperatura para que o sistema atingisse o equilíbrio térmico. As medidas foram realizadas em triplicata [7].

## 4. Resultados e discussões

### 4.1. Caracterização do PDMAEMA

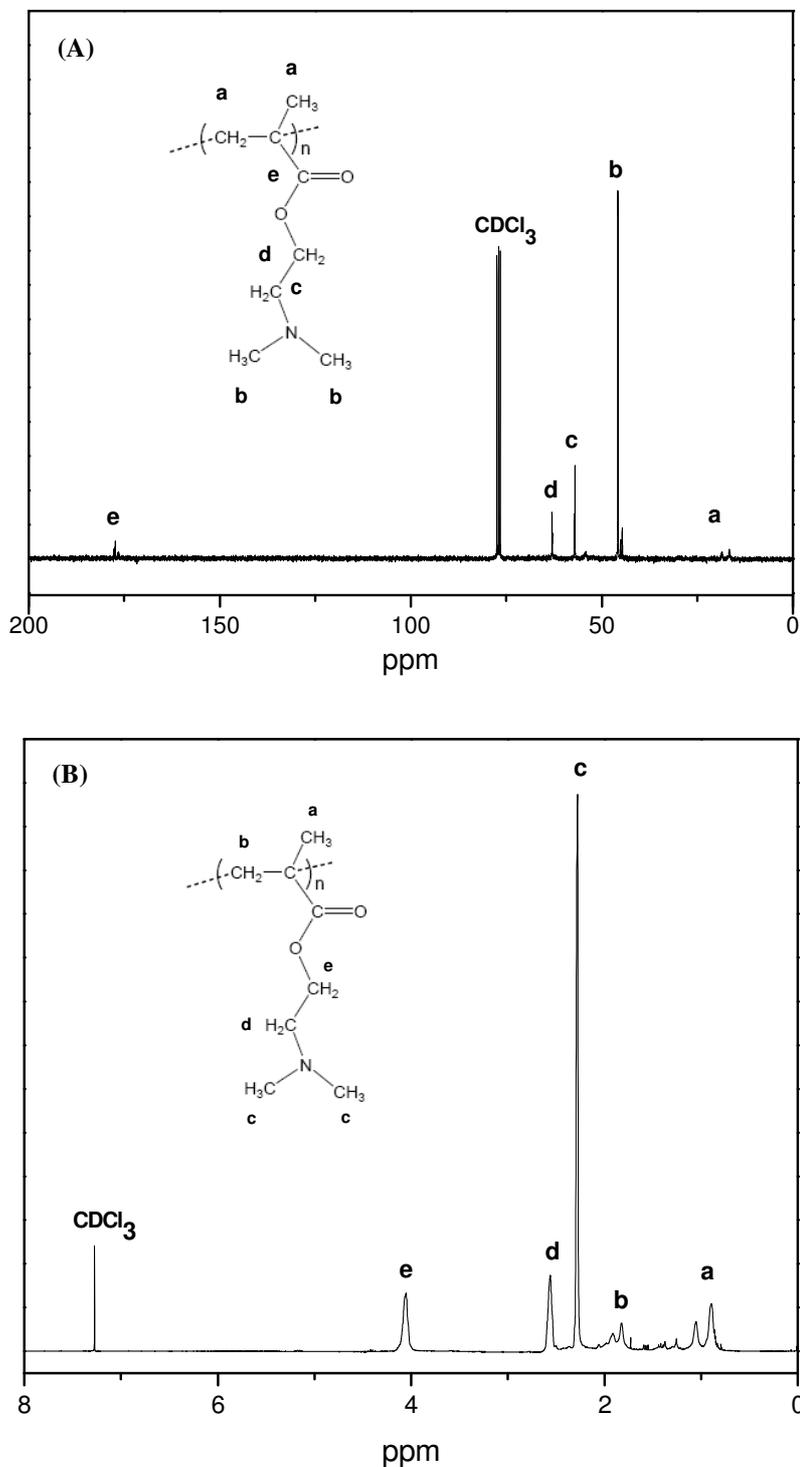
Comparando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do monômero DMAEMA e do polímero PDMAEMA (Figura 8) pode-se constatar que o polímero foi efetivamente obtido. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do DMAEMA (Figura 8a) apresenta sinais em 125 e 136 ppm, referentes aos carbonos com hibridização  $\text{sp}^2$  de grupo vinílico presente nas moléculas dos monômeros. Este resultado é confirmado pela presença de dois sinais em 5,6 e 6,1 ppm no espectro de RMN  $^1\text{H}$ , que são deslocamentos de hidrogênios ligados a carbonos vinílicos (Figura 8b) [45]. Nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do polímero estes sinais não aparecem, indicando que não há a presença de grupos vinílicos na estrutura polimérica, o que era esperado com a ocorrência do processo de polimerização.



**Figura 8** - Espectros de RMN (A)  $^{13}\text{C}$  e (B)  $^1\text{H}$  do polímero PDMAEMA e do monômero DMAEMA.

A formação do polímero ainda pode ser confirmada pela análise mais detalhada dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  deste material, que apresentam sinais característicos da estrutura do polímero (Figura 9). O espectro RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura 9a) apresenta sinais com deslocamentos na região de 177 ppm [s, C=O], 63 ppm [O-CH<sub>2</sub>], 57 ppm [CH<sub>2</sub>-N<], 46 ppm

$[-N(CH_3)_2]$ . O espectro de RMN  $^1H$  (Figura 9b) apresenta sinais em 4,08 ppm  $[O-CH_2]$ , 2,55 ppm  $[-CH_2-N<]$ , 2,27  $[N(CH_3)_2]$ , 1,8 ppm  $[C(CH_2)]$ , 0,9 ppm  $[C(CH_3)]$  [12].



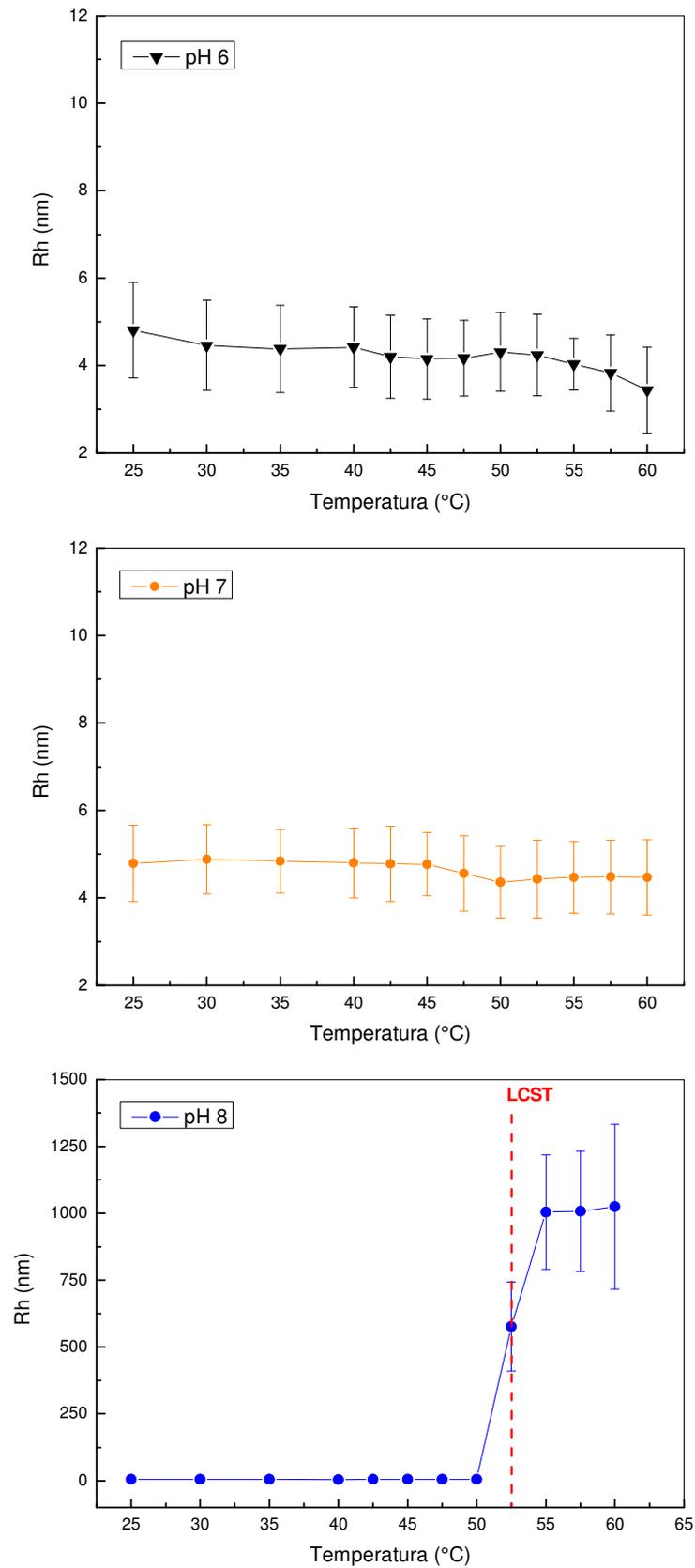
**Figura 9** - Estrutura molecular e atribuição dos sinais dos espectros de RMN: (A)  $^{13}C$  e (B)  $^1H$  do polímero PDMAEMA.

Por meio da técnica de GPC foi possível determinar o valor da massa molar média ponderal ( $M_w$ ), da massa molar numérica média ( $M_n$ ) e da massa molar Z média ( $M_z$ ) do PDMAEMA sintetizado, que foram respectivamente 8.194 Da, 4.004 Da e 10.740 Da. Assim, o índice de polidispersidade ( $M_w/M_n$ ) do polímero obtido foi 2,05.

O alto índice de polidispersidade encontrado para o PDMAEMA é característico da polimerização radicalar. Neste mecanismo de polimerização há o crescimento inicial rápido e desordenado das cadeias, onde os macrorradicais apresentam tamanhos diferentes, ou seja, várias cadeias de PDMAEMA que crescem rapidamente e ao mesmo tempo gerando uma larga distribuição de massa molar [46].

Sabe-se que o PDMAEMA exhibe separação de fases (hidrofílica/hidrofóbica) levando a um diagrama de fases do tipo LCST em uma determinada faixa de pH. A fim de avaliar o valor da LCST, soluções aquosas de PDMAEMA foram submetidas à análise de espalhamento dinâmico da luz (DLS). Foi medido o raio hidrodinâmico do polímero em solução aquosa nos pHs 6, 7 e 8 variando-se a temperatura (Figura 10).

Em meio ácido, os grupos amino terciários presentes ao longo das cadeias do PDMAEMA são protonados e o polímero se solubiliza completamente em água. Esta boa relação do polímero com a água traduz-se numa impossibilidade de haver gelificação nesta condição [11]. Este comportamento pode ser observado na curva obtida em solução com pH 6,0 (Figura 10). Em pH 7 (Figura 10) a transição também não é verificada, visto que este pH é muito próximo do pKa do PDMAEMA [12]. Nestas duas condições de pH (6,0 e 7,0) não houve variação significativa do raio hidrodinâmico no intervalo de temperatura de 25 °C a 60 °C. Assim, pode-se concluir que, nos pHs 6 e 7, não foi constatada transição de fases hidrofílica para hidrofóbica para o polímero em meio aquoso, prevalecendo no polímero a característica hidrofílica.



**Figura 10** - Efeito da temperatura no raio hidrodinâmico (Rh) durante o processo de aquecimento de soluções de PDMAEMA em pH = 6,7 e 8.

Quando o pH da solução polimérica é igual a 8 (Figura 10), portanto maior que o pKa do polímero, na mesma faixa de temperatura é observada uma variação significativa no raio hidrodinâmico ( $\Delta R_h = 998,7$  nm). Nesta condição, os segmentos poliméricos do PDMAEMA tornam-se mais hidrofóbicos e as interações com a água se enfraquecem. Assim, as interações entre grupos do polímero passam a prevalecer o que causa o colapso dos novelos poliméricos que estavam expandidos na condição hidrofílica. Com isso, os novelos hidrofóbicos tendem a atrair mutuamente o que causa o aumento do raio hidrodinâmico. Dada esta dependência do raio hidrodinâmico com a temperatura e com o pH do meio, pode-se inferir que à medida que o pH aumenta os grupos amino terciários são desprotonados (polímero neutro) conduzindo ao aumento da hidrofobicidade do polímero o que leva à ocorrência da LCST [11]. Assim, com base na transição hidrofílica-hidrofóbica observada em pH 8, pôde-se determinar que a temperatura de transição de fase neste pH é próxima de 52 °C.

#### 4.2. Influência da concentração de PDMAEMA e do pH na formação dos PECs

Para cada nível de concentração de PDMAEMA e de pH estudados (Tabela III) houve a formação do respectivo PEC. Na Figura 11 são apresentadas imagens fotográficas dos PECs obtidos em cada uma das formulações preparadas.



**Figura 11** - Imagens fotográficas dos PECs formados de acordo com o fatorial  $2^2$  (Tabela I), após serem liofilizados.

Em cada complexo, foi quantificado o SC remanescente, tanto no sobrenadante quanto na água de lavagem utilizada para a purificação do PEC. A quantificação foi realizada segundo um experimento com o corante DMB (Ver Seção 4.3). Assim, foi possível determinar o rendimento do processo de complexação em termos de incorporação de SC em cada PEC, cujos resultados são descritos na Tabela V.

**Tabela V** - Valores de rendimento calculados para as amostras de PEC em cada ensaio para o fatorial 2<sup>2</sup>.

Amostra	PEC	Fatores		Resposta	
		A PDMAEMA	B pH	Rendimento (%) (SC incorporado)	PDMAEMA/SC
1 e 2	2a	(-)	(-)	98,2±0,8	24/76
3 e 4	3a	(+)	(-)	97,9±0,6	29/71
4 e 5	2c	(-)	(+)	93,8±0,4	24/76
6 e 7	3c	(+)	(+)	91,8±2	30/70
8, 9, 10	3	(0)	(0)	94,4±2	30/70

Os dados da Tabela V foram tratados por meio do software Design-Expert®, versão 7.0. Foi obtido um modelo quadrático a partir do planejamento fatorial por meio do qual se procedeu a análise de variância (ANOVA) para estimar a significância estatística dos efeitos principais, e de interação, associados aos fatores estudados. Foram considerados estatisticamente significativos os valores associados com nível de confiança mínima de 95% (valores de  $p \leq 0,05$ ).

Na Tabela VI são apresentados os dados da ANOVA. Analisando os resultados obtidos para o modelo quadrático, observa-se que este apresentou valor de  $p$  estatisticamente significativo. Diante disso, a função quadrática (Equação 1) pode ser adotada como boa

aproximação para se obter a superfície de resposta [31] relativa aos dados da Tabela V. Dentre os fatores estudados, o fator B (pH) foi o único cujo efeito no rendimento dos PECs é significativo, sendo sua interação com o fator A não significativa.

**Tabela VI** - Tabela de resultados ANOVA para o planejamento fatorial 2<sup>2</sup>, com duplicata.

Fonte	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor F	Valor p
Modelo	61,36	4	15,34	6,47	0,0229
A-PDMAEMA	2,64	1	2,64	1,12	0,3315
B-pH	55,12	1	55,12	23,25	0,0029
AB	1,45	1	1,45	0,61	0,4647
A <sup>2</sup>	2,15	1	2,15	0,90	0,3782
Erro puro	14,23	6	2,37		
Total	75,59	10			

A Equação 1 representa o modelo de ajuste da regressão quadrática aplicado:

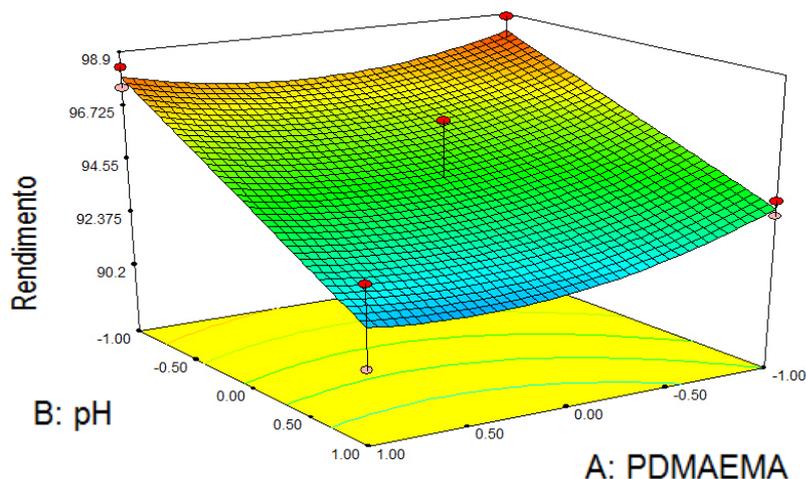
$$\text{Rendimento} = +94,43 - 0,57*A - 2,62*B - 0,43*A*B + 0,99*A^2 \quad \text{[Equação 1]}$$

onde A e B representam, respectivamente, a concentração %, (em m/v) de PDMAEMA e o pH de formação do PEC de PDMAEMA/SC.

Baseando-se nos dados da ANOVA, o termo com maior magnitude presente na equação (1) é referente ao efeito principal B (pH). Isto significa que este fator é o que mais contribui para o modelo. O sinal negativo que acompanha o termo indica que o menor nível

para o fator B analisado é o que conduz a um melhor rendimento. Analisando os outros termos da equação e associando-os aos valores da Tabela V, pode-se concluir que níveis mais altos (+1) dos fatores A e B analisados contribuem de forma decrescente para o rendimento [31].

A superfície de resposta obtida segundo o modelo quadrático (Equação 1) está apresentada na Figura 12. Pode-se observar que as melhores condições para se obter um material com maior rendimento em termos de incorporação de SC é prepará-lo em pH próximo a 1 (nível -1). Em meio ácido tem-se uma grande concentração de íons  $H^+$  dissociados, que aumentam com a diminuição do pH. Quando se prepara a solução de PDMAEMA em pH=1, os grupos amino presentes na estrutura deste polímero são protonados com mais eficiência do que em pH 3 ou 5. Diante disso, haverá forte interação eletrostática do PDMAEMA (positivamente carregado) com o SC o que facilita a formação do complexo polieletrólítico PDMAEMA/SC, resultando em um maior rendimento.



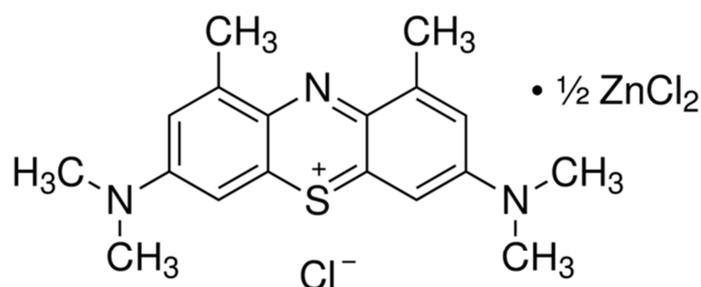
**Figura 12** - Superfície de resposta obtida quando se aplica o modelo quadrático:  $\text{Rendimento} = 94,43 - 0,57*A -$

$$2,62*B - 0,43*A*B + 0,99*A^2$$

#### 4.3. Ensaio com o corante azul 1,9-dimetil-metileno para a quantificação de SC

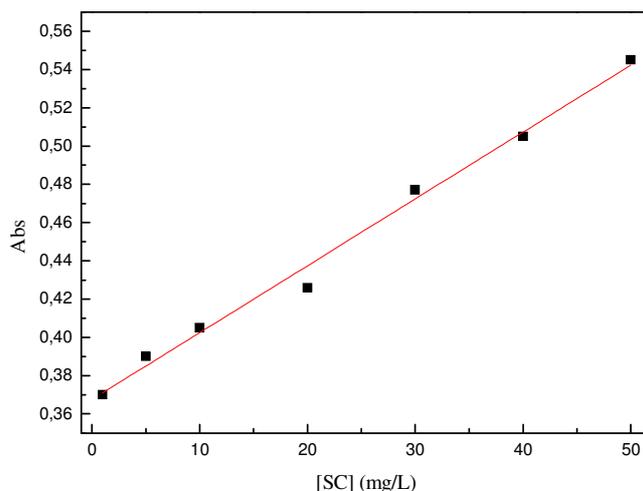
A quantificação de SC foi baseada na característica de metacromasia do corante azul 1,9-dimetil-metileno (DMB) [47]. Metacromasia é definida como a propriedade de um corante mudar de cor quando outras substâncias específicas estão presentes. A intensidade da nova cor é dependente da quantidade de substância que induz a alteração da coloração.

Dessa forma, o DMB, um corante catiônico, é empregado para identificar e quantificar polissacarídeos sulfatados, como o sulfato de condroitina. Na Figura 13 é mostrada a estrutura do DMB. Como resultado de forças eletrostáticas entre os grupos ionizados do SC e do DMB forma-se um complexo metacromático SC/DMB, que apresenta como particularidade a cor roxa [18, 48].



**Figura 13** - Estrutura do corante azul 1,9-dimetil-metileno (DMB) (Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com>)

Foi feita uma curva de calibração com soluções padrões de SC no intervalo de 1-50 mg/L (Figura 14), onde a absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis a  $\lambda = 525$  nm [42]. Foi observado que a absorbância (intensidade da coloração roxa do complexo DMB/SC) aumenta linearmente como o aumento da concentração de SC na solução. O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) para a curva de calibração foi de 0,9962.



**Figura 14** - Curva de calibração do complexo metacromático DMB/SC obtida em água destilada (pH ~ 6), utilizada para quantificar sulfato de condroitina ( $R^2 = 0,9962$ ).

A dependência linear da curva de calibração realizada é representada pela Equação 2. A partir desta equação foi possível quantificar o SC presente no sobrenadante utilizado para a preparação dos PECs e na água de lavagem dos PECs obtidos.

$$\text{Abs} = 0,36754 + 0,003 [\text{SC}] \quad \text{[Equação 2]}$$

#### 4.4. Caracterização dos complexos polieletrólíticos

A partir da análise do planejamento fatorial  $2^2$  realizado e cujos resultados foram discutidos na seção 4.2, foram selecionadas as amostras PEC3a e PEC2a para serem caracterizadas por difração de raios-X, TGA, MEV e DLS. Foram realizados testes de liberação *in vitro* de SC a partir da matriz do PEC3a. Na Figura 15 tem-se uma representação química, esquemática, do complexo formado entre PDMAEMA e SC que será útil nas discussões dos resultados obtidos das caracterizações, descritas a seguir.

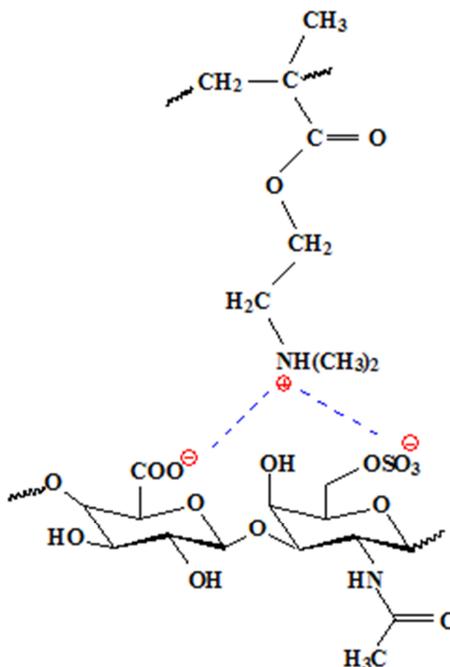


Figura 15 - Representação química proposta do complexo polieletrólítico (PEC) entre PDMAEMA e SC.

#### 4.4.1. Análise por meio de espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR do PDMAEMA, SC, PEC2a e PEC3a são apresentados na Figura 16. No espectro do PDMAEMA é possível observar uma banda bem definida em  $1730\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde ao estiramento vibracional de carbonila de ésteres. Outras bandas características do PDMAEMA aparecem em  $2772$  e  $2836\text{ cm}^{-1}$ , que são resultantes da vibração de alongamento C-H no grupo  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  e, em  $1154\text{ cm}^{-1}$ , referente à vibração de alongamento C-N de grupos amino terciários [10, 49, 50].

As bandas referentes à vibração de alongamento C-H no grupo  $\text{N}(\text{CH}_3)_2$  do PDMAEMA ( $2772$  e  $2836\text{ cm}^{-1}$ ) aparecem com menos intensidade no espectro do PEC3a e praticamente desapareceram no espectro do PEC2a. Isto pode ser explicado pela menor quantidade de PDMAEMA nos PECs em comparação com o SC (Tabela V) [20]. Além disso, estes resultados podem indicar que no PEC2a houve uma melhor interação entre os grupos carregados de PDMAEMA e SC.

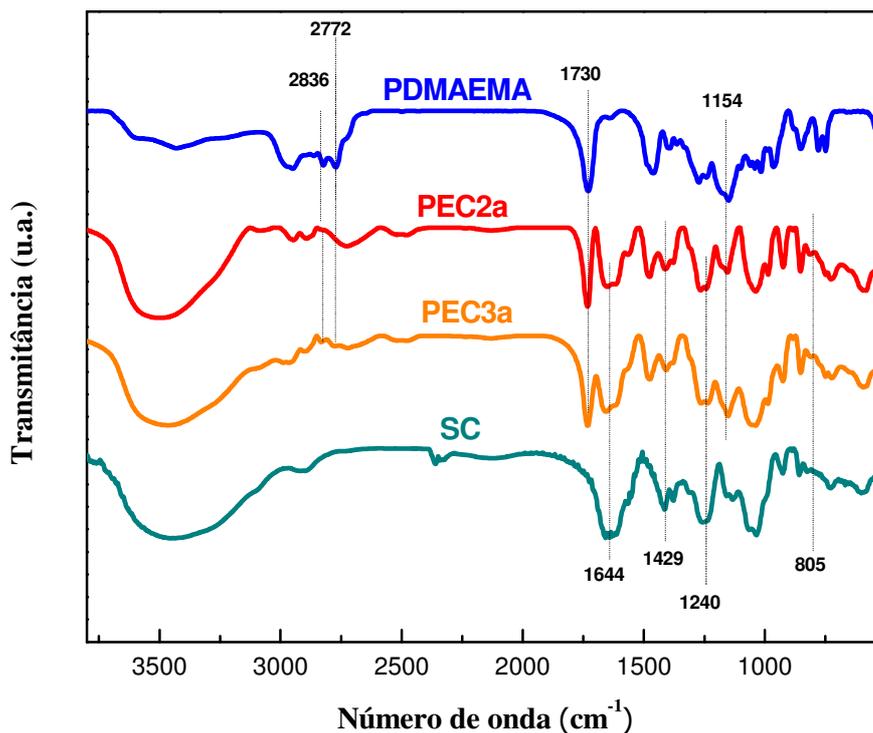


Figura 16 - Espectros de FTIR do PDMAEMA, SC, PEC2a e PEC3a.

As bandas que aparecem no espectro de FTIR do SC em 1644 e 1429  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas respectivamente às deformações axiais assimétrica e simétrica do ânion carboxilato. Já nos espectros dos complexos PEC 2a e 3a pode ser observada uma diminuição significativa na intensidade de tais bandas. Esta mudança ocorre devido à complexação dos grupos  $\text{COO}^-$  do SC com os grupamentos catiônicos do PDMAEMA.

Ainda, no espectro de FTIR do SC as bandas em 1240 e 806  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas à deformação axial assimétrica dos grupos  $\text{S}=\text{O}$  e à deformação axial das ligações  $\text{C}-\text{O}-\text{S}$  [51]. Nos espectros dos complexos observa-se esta banda na mesma região e com a mesma intensidade. Isto permite inferir que os grupos sulfonatos não interagem com os grupos catiônicos do PDMAEMA no processo de complexação do SC com o PDMAEMA. Portanto, interações iônicas existentes entre grupos de PDMAEMA e de SC nos respectivos PECs podem ser evidenciadas pela análise dos espectros de FTIR.

#### 4.4.2. Análises por meio de TGA

Na Figura 17 são mostradas curvas de TGA dos PEC2a, PEC3a e de seus precursores. Dois estágios de perda de massa foram observadas nas curvas de TGA, a primeira ocorreu na faixa de 25 a 125 °C, atribuída à evaporação de água e compostos voláteis. Os teores de água nas amostras estão descritos na Tabela VII.

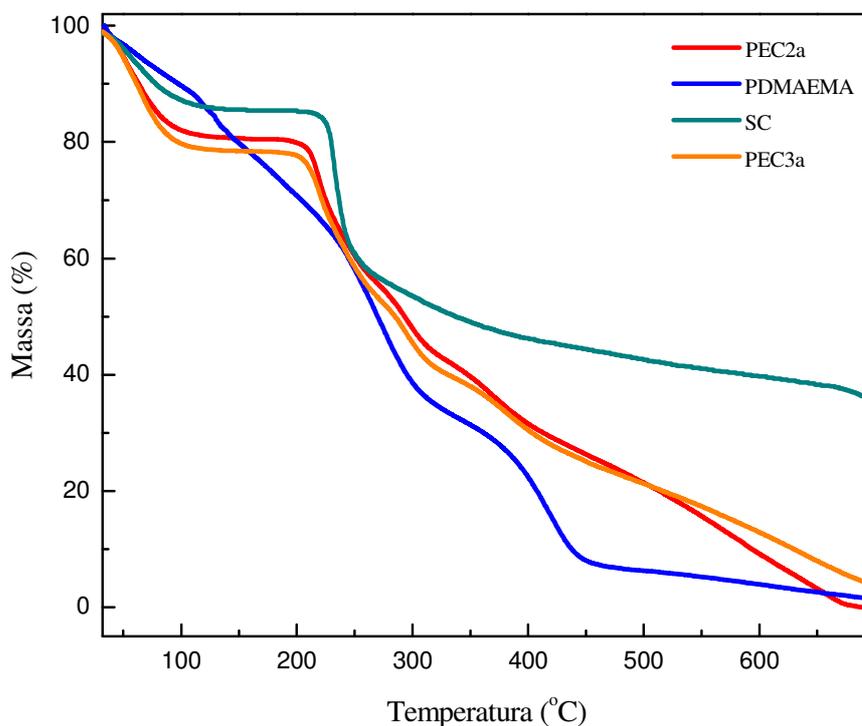


Figura 17 – Curvas de TGA do PDMAEMA, SC e dos PECs 2a 3a.

A perda de água no SC ocorre devido à alta densidade de cargas negativas em sua estrutura. Grupos como carboxilato ( $-\text{COO}^-$ ) e sulfonato ( $-\text{OSO}_3^-$ ) são altamente hidrofílicos e interagem fortemente com moléculas de água via interações tipo ligação de hidrogênio, dipolo-dipolo e íon-dipolo. Já o PDMAEMA possui grupos amino terciários em sua estrutura e tais grupos são sítios para interações tipo ligação hidrogênio e dipolo-dipolo com moléculas de água. Portanto, a quantidade de SC e PDMAEMA no PEC influenciam no teor de água dos PECs.

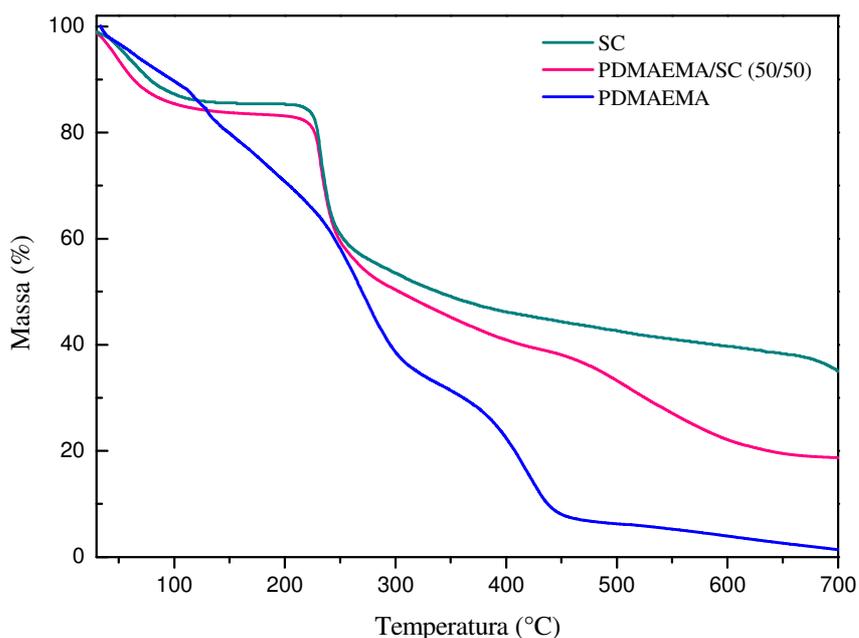
Quando comparado ao PEC3a, o PEC2a apresentou menor perda de água. Este fato está associado à menor quantidade de PDMAEMA na matriz do PEC2a, que é protonada com mais eficiência, promovendo mais interações eletrostáticas entre o PDMAEMA e SC. Tal efetividade faz com que grupos positivamente carregados do PDMAEMA prefiram interagir com grupos do SC ao invés de serem simplesmente solvatados pela água fazendo com que o PEC2a tenha menor quantidade de água adsorvida que o PEC3a [18].

**Tabela VII** - Temperaturas dos eventos, perda de água e degradação térmica do PDMAEMA, SC, PEC2a e PEC3a, determinadas por meio de curvas de TGA

Amostras	Temperatura (°C)		Perda de massa (%)
	Faixa	Pico (DTG)	
<b>Primeiro Evento</b>			
PDMAEMA	25-125	--	14,7
SC	25-125	--	13,5
PEC2a	25-125	--	18,7
PEC3a	25-125	--	21,1
<b>Segundo Evento</b>			
PDMAEMA	230-320	270	65,1
SC	230-250	230	20,2
PEC2a	190-260	216	45,4
PEC3a	190-260	218	46,3
<b>Terceiro Evento</b>			
PDMAEMA	330-450	415	92,56

Além da perda de água, ocorreram outros eventos térmicos referentes à degradação dos polímeros. Os valores da temperatura associada a cada evento são também apresentados na Tabela VII. Para o PDMAEMA, a degradação se iniciou em 230 °C e a quase completa decomposição ocorreu até em 450 °C. O SC apresentou uma grande perda de massa em 230-250 °C (25%), porém este polímero apresentou melhor estabilidade térmica quando comparado com o PDMAEMA. Este comportamento pode estar relacionado à formação de resíduos sulfatados (cerca de 36% à 700 °C).

Até 280 °C as curvas de TGA para PECs são mais semelhantes à curva de TGA do SC do que a do PDMAEMA. No entanto, acima desta temperatura as curvas de TGA dos PECs apresentaram um comportamento diferente das curvas de TGA dos seus precursores, com resíduos observados a 700 °C (menores que 5%). Este resultado foi inesperado e para melhor compreensão uma amostra foi preparada pela mistura física constituída de PDMAEMA/SC 50%/50% (m/m) e analisada por TGA (nas mesmas condições que as utilizadas para obter as curvas da Figura 17).

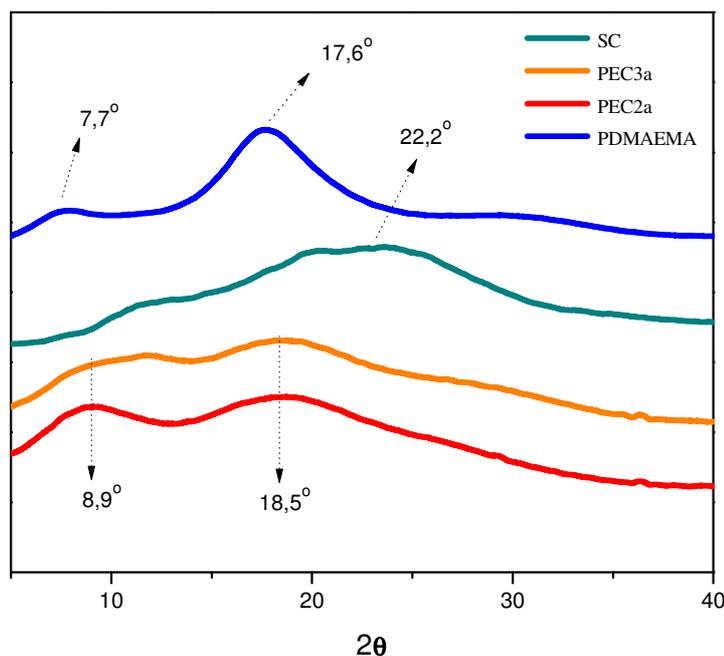


**Figura 18** - Curvas de TGA do PDMAEMA, SC e da mistura física 50/50 (em massa) de PDMAEMA/SC.

Pode-se observar na curva de TGA da mistura (Figura 18) a presença de resíduos (ca. de 18%) na temperatura 700 °C. Já nas curvas de TGA obtidas para os complexos (Figura 17), na mesma temperatura, o resíduo foi menor que 5% para o PEC3a e ainda menor que 0,2 % para o PEC2a. A partir destes resultados é possível inferir que as interações que ocorrem entre o PDMAEMA e o SC são responsáveis pelo perfil de degradação do material.

#### 4.4.3. Análise dos difratogramas de raios-X

Na Figura 19 são apresentados os difratogramas de raios-X (DRX) obtidos dos polímeros precursores (PDMAEMA e SC) e dos PEC2a e PEC3a.



**Figura 19** - Difratogramas de raios-X referentes aos PEC2a e 3a e aos precursores PDMAEMA e SC.

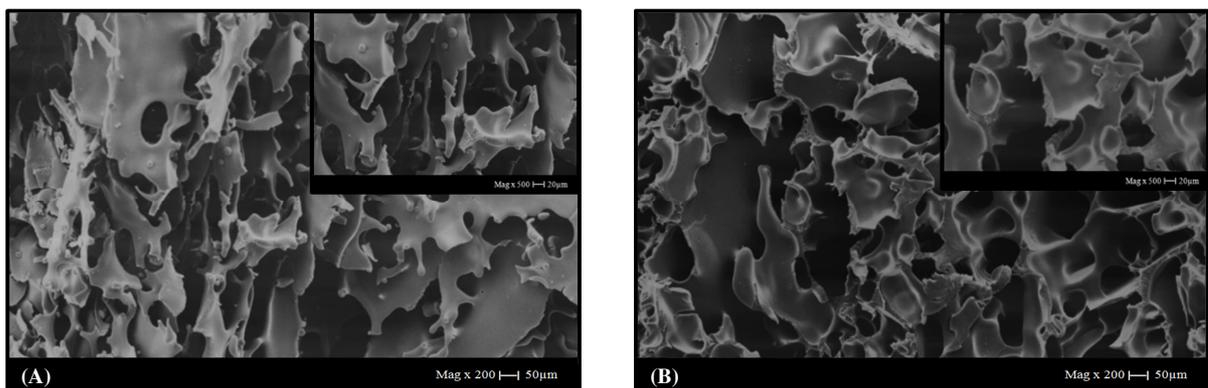
No perfil de DRX do SC há somente um sinal alargado (halo) de intensidade fraca e com um máximo na região de  $2\theta = 22,2^\circ$ , o que mostra que este polímero tem baixa ou nenhuma cristalinidade. No difratograma do PDMAEMA os picos de difração ocorrem,

embora pouco intensos, em  $2\theta = 7,7^\circ$  e  $17,6^\circ$ . A presença destes picos indica a existência de domínios cristalinos na estrutura deste polímero.

Os perfis de difração de raios-X dos PECs mostraram que a complexação modifica a cristalinidade do PDMAEMA. Foram observados picos de difração distintos em  $2\theta = 8,9^\circ$  e  $18,5^\circ$  para os PECs. Pode-se ainda notar que a complexação diminui a intensidade dos picos de difração com relação ao PDMAEMA, tornando as bandas de difração mais largas para os complexos polieletrólíticos [52].

#### 4.4.4. Análise morfológica dos PEC

As imagens de MEV dos PECs 2a e 3a, obtidas após os PECs serem liofilizados, são mostradas na Figura 20. As imagens ilustram a dependência da morfologia com a composição dos complexos. As micrografias obtidas do PEC2a e PEC3a mostram que estes materiais possuem morfologia porosa, sendo a do PEC3a mais compacta que o PEC2a. A maior compactação e porosidade (poros menores) do PEC3a está correlacionada com a maior proporção de PDMAEMA na matriz do complexo [9].



**Figura 20** - Imagens obtidas por MEV das amostras (A) PEC2a e (B) PEC3a após serem liofilizados.

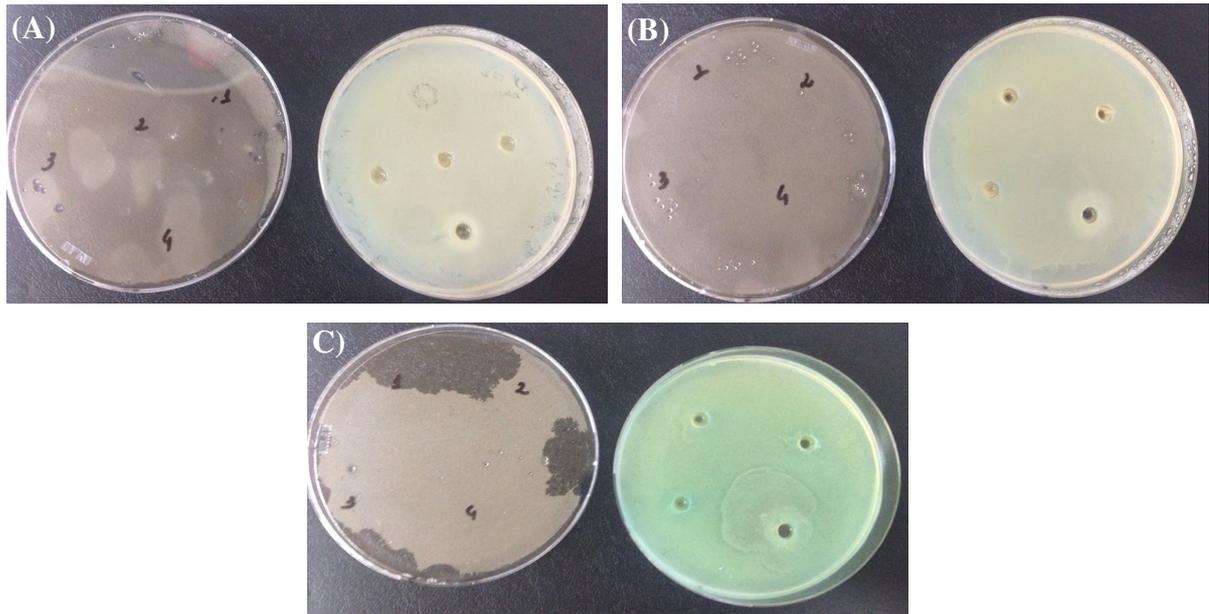
Ao analisar uma determinada área da imagem obtida para o PEC2a, em maior ampliação, observa-se pequenos fragmentos desprendidos da matriz, aspecto que não foi

observado na micrografia do PEC3a, na mesma ampliação. Estes fragmentos são provavelmente resíduos de SC que não complexaram, ou ainda fragmentos do complexo que permaneceram dentro da matriz polimérica.

#### 4.4.5. Teste bactericida

Polímeros a base de amônio quaternário, que causam a morte da célula bacteriana pela interação com as membranas bacterianas carregadas negativamente, foram classificados como biocidas. Em particular, o PDMAEMA quaternizado e seus derivados têm sido intensivamente estudados como materiais antimicrobianos eficazes [12, 14, 53]. No entanto, vários estudos têm mostrado que certos polímeros contendo amino podem proporcionar um desempenho antibacteriano sem quaternização adicional. Neste caso, esta atividade pode depender de diversos fatores, como a estrutura do polímero [54] e a massa molar [55].

O efeito dos polímeros PDMAEMA e SC e dos complexos PEC3a e PEC2a sobre bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* após 24h de incubação estão apresentadas na Figura 21. Em todas as amostras não foi observada a presença de halos de inibição, demonstrando que as amostras analisadas não apresentam atividade bactericida. Na literatura não foi encontrado que o sulfato de condroitina apresente tal atividade sem estar associado com outros polímeros. Já o resultado observado para o PDMAEMA pode estar associado à baixa massa molar obtida pela polimerização radicalar utilizada neste trabalho. A quaternização dos grupos amino do PDMAEMA poderia fornecer tal atividade ao polímero e aos complexos.

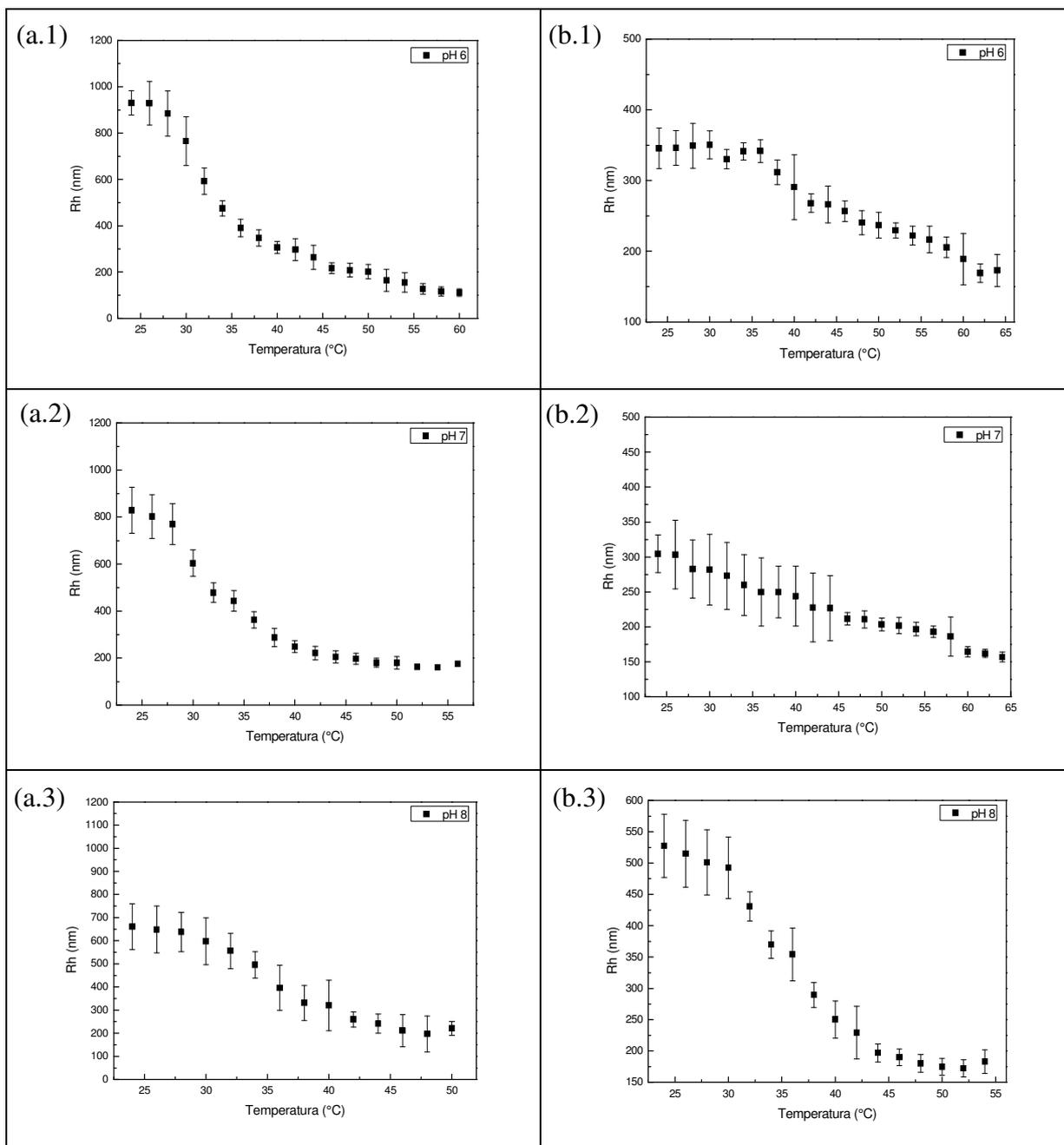


**Figura 21** - Imagens da colônia de (A) *S. aureus* (B) *E. coli* (C) *P. aeruginosa* cultivadas em placa de ágar. Em cada imagem tem-se à direita o controle e à esquerda cada espécie incubada com as amostras: (1) PEC2a, (2) PEC3a, (3) SC e (4) PDMAEMA.

#### 4.4.6. Medidas de espalhamento dinâmico da luz (DLS)

A sensibilidade dos PEC2a e PEC3a frente a variações de temperatura e pH foi investigada por meio de medidas de DLS em dispersões aquosas destes materiais. Na Figura 22 é mostrada a dependência do raio hidrodinâmico (Rh) medido durante o processo de aquecimento das amostras da temperatura ambiente (ca. 23 °C) até ca. de 60 °C quando imersos em soluções tampão (pH 6, 7 e 8).

Pode-se observar que com o aumento da temperatura, o Rh das partículas dos PECs apresentaram significativa diminuição em todas as condições de pH analisadas (pH 6, 7 e 8). O Rh das partículas em pH 9,0 não pôde ser medida porque ocorreu floculação das cadeias de PDMAEMA neste meio. A temperatura de transição (LCST) para cada amostra em cada pH foi determinada a partir dos gráficos da Figura 22 e são apresentados na Tabela VIII.



**Figura 22** – Dependência do raio hidrodinâmico com a temperatura durante o processo de aquecimento das amostras (a.1) PEC2a em pH = 6; (a.2) PEC2a em pH = 7; (a.3) PEC2a em pH = 8; (b.1) PEC3a em pH = 6; (b.2) PEC3a em pH = 7, (b.3) PEC3a em pH = 8.

Os resultados da Tabela VIII revelam que a transição de fase hidrofílica-hidrofóbica do PDMAEMA complexado nos PECs abrange uma ampla faixa de temperatura. Além disso, verificou-se que a LCST exibe forte dependência do pH da solução. O aumento do pH, de 6,0

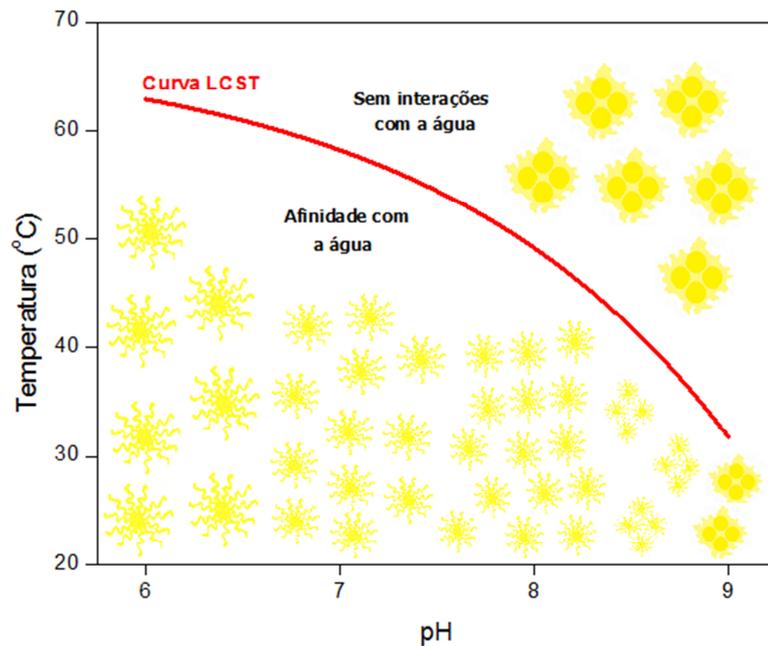
para 8,0, conduz a um deslocamento da LCST para uma temperatura mais baixa tanto no PEC2a quanto no PEC3a.

**Tabela VIII** – LCST em diferentes pH observado para as amostras PEC2a, PEC3a e PDMAEMA.

pH	LCST (°C)		
	PEC2a	PEC3a	PDMAEMA
6	58±2	62±2	--
7	52±2	60±2	--
8	46±2	50±2	52±2

A dependência da LCST com o pH é atribuída principalmente à ionização dos grupos  $-N(CH_3)_2$ ,  $COOH$  e  $-SO_3H$  residuais dos polímeros de partida [24]. Em um pH relativamente baixo, as cadeias de PDMAEMA tornam-se mais carregadas fazendo com que a atração eletrostática com o SC seja reforçada. Dessa forma, necessita-se de uma maior energia térmica para que ocorra a separação de fases no sistema. Isto explica o alto valor da LCST em condições mais ácidas.

Quando a solução muda de meio ácido para meio básico, as interações existentes no meio ácido são enfraquecidas e as interações hidrofóbicas predominam no PEC. Este fato leva a ocorrência de valores mais baixos para a LCST nos pHs 7 e 8. Além disso, quando a solução é suficientemente básica, as cadeias de PDMAEMA complexadas são rapidamente colapsadas devido a potente interação hidrofóbica, levando a formação de agregados, como ocorrido em pH 9. Na Figura 23 são ilustradas as possíveis alterações morfológicas que ocorrem no PDMAEMA complexado imerso em diferentes condições de pH e temperatura do meio [7].



**Figura 23** – Esquema da alteração morfológica do PDMAEMA nos PECs em diferentes soluções tampão associadas à LCST. Fonte: Adaptado de Dong et al (2012) [7].

Observa-se, ainda, que o PEC3a apresentou maiores valores de LCST em todos os meios analisados quando comparado com o PEC2a, ou seja, a maior concentração de PDMAEMA na matriz dos complexos leva a um aumento da temperatura de separação de fases. Este resultado não está de acordo com o observado na literatura. Costa [11] verificou que o aumento da concentração de PDMAEMA em solução, provoca uma diminuição da LCST, que foi atribuído ao aumento do número de associações hidrofóbicas. No entanto, no caso dos complexos esse comportamento oposto pode ter ocorrido devido às interações físicas existentes no sistema que são mais frequentes no PEC3a, por isso este apresenta características mais hidrofílicas comparado ao PEC2a.

Outro fato que foi investigado é que em pH 6,0 e 7,0 os complexos exibiram uma transição de fase na faixa de 24-65°C o que está em contradição com as características de PDMAEMA puro. O PDMAEMA não complexado não apresentou transição (sensibilidade à

temperatura) nesta condição de pH, como foi apresentado nos resultados deste trabalho (Seção 4.1).

Dong et al [7] verificaram a transição de fase do PDMAEMA em pH 6 em nanopartículas de sílica com PDMAEMA enxertado na forma de escovas. Esta transição foi atribuída a alta densidade das escovas de PDMAEMA, que com uma pressão osmótica mais elevada impedem a protonação dos grupos amino no sistema, o que faz com que o pKa do PDMAEMA quando em forma de escovas seja menor que o PDMAEMA linear.

Mao et al [10] investigaram o comportamento termo- e pH-responsivo de copolímeros em bloco poli(ácido l-láctico)-PDMAEMA e foi observado que em meio ácido não ocorreu transição de fases, sendo somente observada em  $\text{pH} > 7,4$ .

Até o presente momento não foi encontrado na literatura estudos sobre a termo- e pH-sensibilidade de PECs envolvendo o PDMAEMA. No entanto, diante dos estudos existentes e já publicados envolvendo este polímero em outros materiais, como citados acima, pode-se concluir que a transição de fases hidrofílica-hidrofóbica do PDMAEMA depende das interações existentes no sistema.

No presente estudo, a transição observada nos PECs em pH 6 e em pH 7 é atribuída principalmente a perda de mobilidade do PDMAEMA no complexo formado. As interações eletrostáticas que ocorrem entre o SC e o PDMAEMA são suficientemente fortes para que os segmentos poliméricos do PDMAEMA no PEC tenha menor mobilidade em meio ácido do que o PDMAEMA puro, que neste meio se solubiliza totalmente (vide Seção 4.1). Com a perda de entropia ( $\Delta S$  negativo) há um aumento na energia livre de mistura o que causa o colapso das cadeias de PDMAEMA.

#### 4.4.7. Liberação *in vitro* de SC a partir da matriz do PEC3a utilizando DMB

Experimentos de liberação *in vitro* de SC foram realizados utilizando a amostra PEC3a. Os ensaios foram conduzidos em duas diferentes condições de pH (6 e 7) e em duas temperaturas, sendo uma abaixo (36,5 °C) e outra acima (60 °C) da LCST, conforme Figura 24 [24].

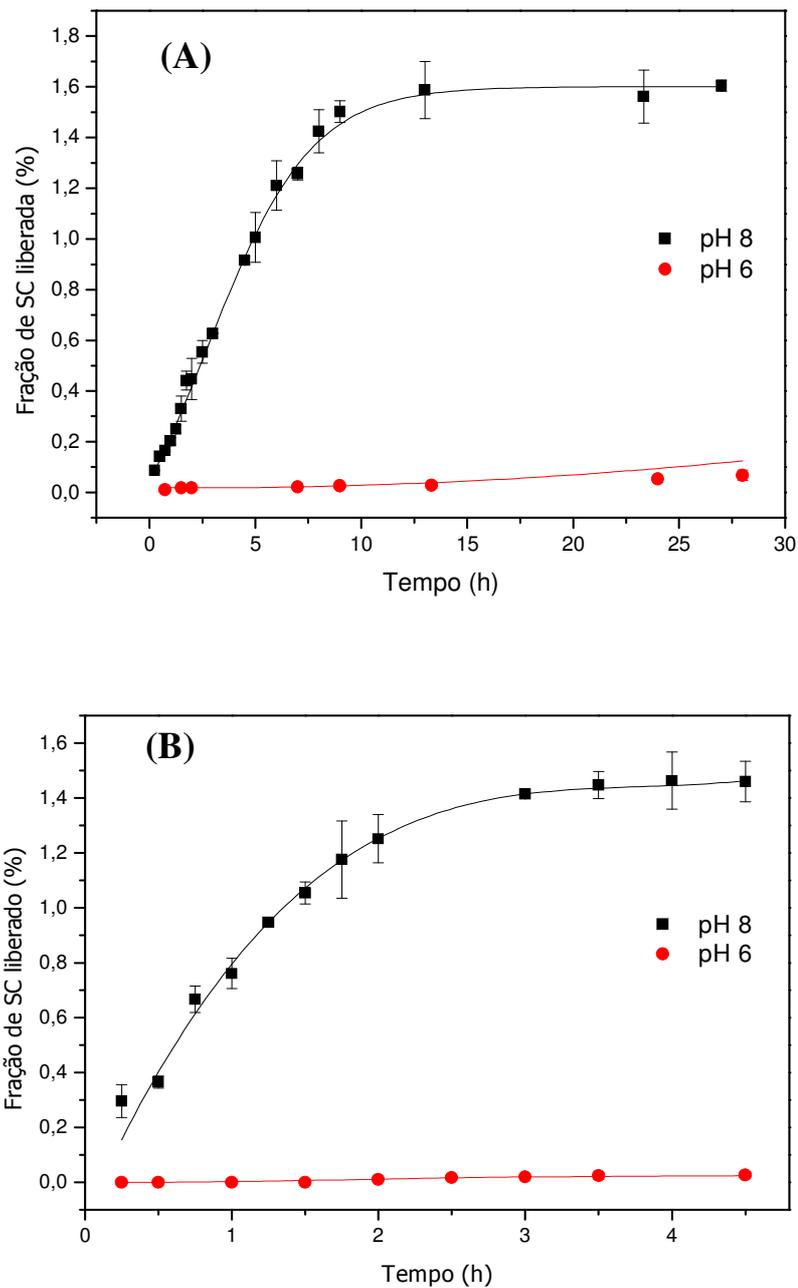


Figura 24 - Fração liberada de SC (%) a partir do PEC3a em pH 6 e 8 na temperatura (A) 36,5°C e (B) 60°C.

Para ambas as temperaturas estudadas, a maior fração de SC liberado ocorreu em pH 8 (~1,6%). Este resultado está de acordo com o discutido na seção 4.4.6. No meio básico as interações existentes entre PDMAEMA e SC são enfraquecidas, predominando as interações hidrofóbicas. A repulsão eletrostática permite que parte do SC que estava complexado seja liberado para o meio. Já em pH = 6 foram liberadas frações de SC menores que 0,1%. Portanto, em meio ácido, o PDMAEMA está positivamente carregado, intensificando suas interações com o SC no complexo. Em adição a isto, a maior efetividade de complexação no PEC3a limita a liberação de SC a partir da matriz neste meio.

Outro resultado interessante observado na Figura 24 é que a liberação de SC em pH 8 na temperatura 60 °C ocorreu cerca de 5,5 vezes mais rápida que em 36,5°C. Este fato pode ser atribuído às mudanças estruturais no complexo induzidas pela temperatura causando a separação de fase do PDMAEMA. Abaixo da LCST, as cadeias de PDMAEMA ficam totalmente estendidas (Figura 23) estabilizando o SC na matriz do PEC. No entanto, quando a temperatura é elevada para acima da LCST (60 °C), as cadeias de PDMAEMA tendem a se contrair devido a hidrofobicidade. Assim, o SC é liberado mais rapidamente da matriz do complexo [23].

Tendo sido constatado que os complexos formados entre o PDMAEMA/SC são termo- e pH-responsivos, este material tem um grande potencial para ser explorado em diversas áreas. Em meio ácido e temperatura ambiente, o PEC3a se mostrou estável, podendo ser utilizado como proteção de fármacos específicos para tratamento na região do cólon [39]. Ainda, a termo-sensibilidade apresentada pode ser explorada em tratamentos contra o câncer, como a hipertemia local, onde o tecido tumoral é seletivamente aquecido (atinge-se em determinados locais temperaturas maiores que a corpórea) [56].

#### 4.4.8. Estudo da cinética de liberação de SC em pH 8

O mecanismo de liberação de solutos a partir de uma matriz polimérica pode ocorrer por meio de transporte difusional e/ou ainda como um fenômeno de partição [57]. O perfil de liberação pode ser descrito por modelos matemáticos. Ritger e Peppas propuseram um modelo semi-empírico que descreve o mecanismo de transporte de solutos a partir de uma matriz flexível, dado pela seguinte equação [58].

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad \text{[Equação 3]}$$

onde a razão  $M_t / M_\infty$  representa a fração de soluto liberada da matriz,  $t$  é o tempo de liberação,  $k$  é uma constante que integra as características do sistema (solvente/polímero, pH, temperatura, etc) e  $n$  é o expoente difusional. É importante expor que esta relação proposta é aplicável somente para um determinado intervalo de tempo, isto é, o tempo no qual 60% da quantidade inicial de soluto é liberada [58].

O expoente difusional presente no modelo de Ritger e Peppas está relacionado com o tipo mecanismo de liberação. Quando  $n$  é próximo de 0,5 o mecanismo de liberação é comandado por difusão Fickiana. Um valor de  $n = 1$  significa que a liberação do fármaco é independente do tempo e ocorre principalmente por cinética de liberação de ordem zero. Quando o valor de  $n$  fica entre 0,5 e 1,0, é observado o transporte anômalo, que é resultante da contribuição simultânea dos efeitos de difusão e relaxação da matriz polimérica [58].

Os valores dos parâmetros  $n$  e  $k$  obtidos para a liberação do PEC3a em pH 8 nas temperaturas 36,5 °C e 60 °C estão apresentados na Tabela IX. Os valores de  $n$  obtidos para ambas as temperaturas de liberação estão no intervalo entre 0,5 e 1,0 sendo possível concluir que o mecanismo de difusão do SC a partir do PEC3a em pH=8 ocorre por transporte

anômalo. Como  $k$  é uma constante dependente das condições do sistema, os valores obtidos confirmam que o PEC3a é sensível à variação de temperatura, sendo encontrados valores de  $k$  maiores quando a temperatura da liberação foi mantida em 60 °C.

**Tabela IX** - Valores do expoente difusional ( $n$ ) e constante ( $k$ ) obtidos por meio da aplicação do modelo de Ritger-Peppas (Equação 3) para os dados das curvas de liberação de SC obtidos a partir do PEC3a em diferentes temperaturas em pH 8.

Temperatura (°C)	$N$	$K$	$R^2$
36,5	0,93	$1,43 \times 10^{-3}$	0,99
60,0	0,93	$5,37 \times 10^{-3}$	0,96

Na Figura 24, foi apresentada a dependência da fração de SC liberado ( $F_L$ ) a partir do PEC3a em função do tempo, variando a temperatura e o pH. Nesta seção em particular estamos analisando somente as curvas de liberação obtida em pH=8. Quando o equilíbrio é estabelecido em tais curvas, as velocidades de liberação e absorção do SC são equivalentes, e a fração liberada atinge um valor máximo ( $F_{max}$ ). Nesta condição, a fração de SC liberada a partir do PEC3a pode ser tratada como fenômeno de partição. O parâmetro que determina a ocorrência de tal fenômeno é  $\alpha$ , que é calculado por meio da seguinte equação [57].

$$\alpha = \frac{F_{max}}{1-F_{max}} \quad \text{[Equação 4]}$$

Na matriz polimérica, a difusão é dependente de inúmeras variáveis como temperatura, pressão, tamanho molecular do soluto, concentração do soluto e grau de intumescimento, diante disso o valor do parâmetro  $\alpha$  pode assumir um número ilimitado de valores [57].

A partir dos parâmetros  $F_{max}$  e  $F_L$  obtidos das curvas de liberação (Figura 24) e os valores de  $\alpha$  calculados para o PEC3a em cada condição (Tabela IX), a respectiva constante de liberação ( $k_L$ ) pode ser determinada utilizando o modelo matemático proposto por Reis et al [57] descrito pela equação 5 (Tabela X). Assumiu-se que a liberação ocorre através de uma cinética de segunda ordem.

$$\frac{\alpha}{2} \ln \left( \frac{F_L - 2F_L F_{max} + F_{max}}{F_{max} - F_L} \right) = k_L t \quad \text{[Equação 5]}$$

**Tabela X** - Valor da constante de liberação ( $k_L$ ) obtida a partir da aplicação do modelo de difusão-partição (cinética de segunda ordem) para os dados coletados durante o estudo de liberação de SC a partir do PEC3a em diferentes temperaturas em pH 8.

Temperatura (°C)	$\alpha$	$k_L (10^2)$	$R^2$
36,5	0,016	0,295	0,97
60	0,014	0,943	0,99

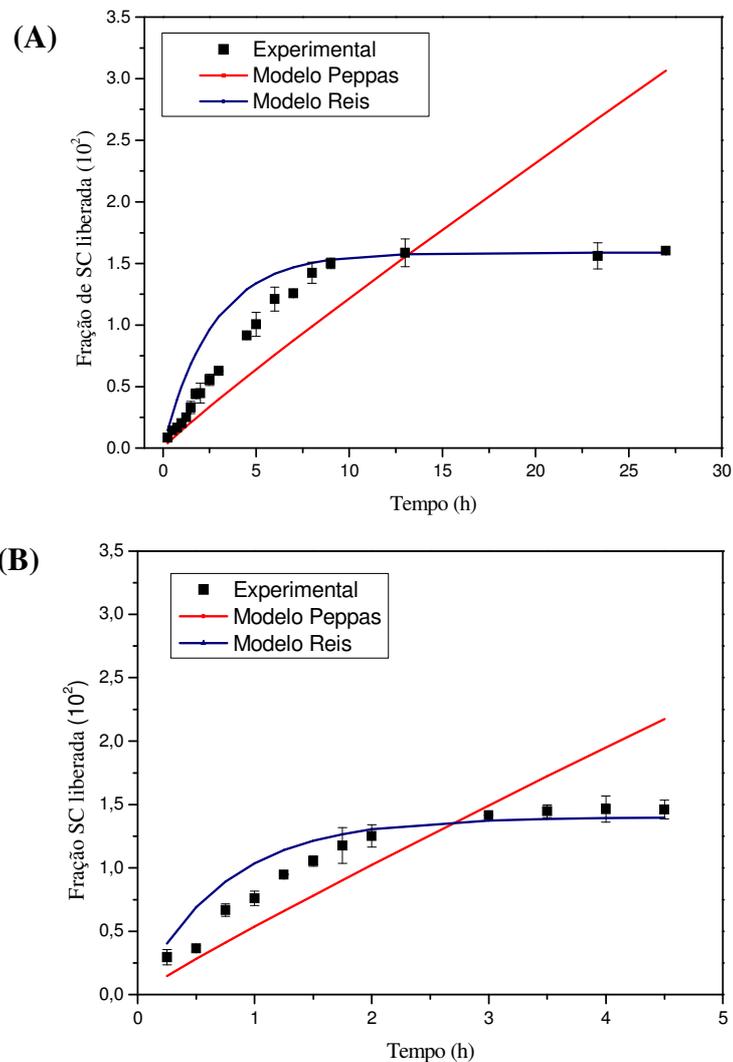
Sendo a cinética de liberação definida como de segunda ordem reversível (Equação 5), o tempo necessário para que a concentração do soluto no solvente atinja 50% do valor da  $F_{max}$  ( $t_{1/2}$ ) pode ser determinado através da seguinte equação:

$$t_{1/2} = \frac{\alpha}{2k_L} \ln(3 - 2F_{max}) \quad \text{[Equação 6]}$$

Para a liberação de SC a partir do PEC3a estudado foram obtidos os valores de  $t_{1/2}$  (em horas) iguais a 2,97 e 0,83 para as temperaturas 36,5 °C e 60 °C, respectivamente. Isso significa que, em maiores temperaturas o tempo necessário para que 50 % do SC seja liberado da matriz do PEC3a é menor. Este resultado aliado ao alto valor de  $k_L$  obtido para a liberação

na temperatura 60 °C (Tabela X) explica a rápida liberação de SC observada na Figura 24 em comparação com a temperatura 36,5 °C

Como já enfatizado, o modelo proposto por Ritger e Peppas (Equação 4) é aplicável até 60% da quantidade inicial do soluto liberado. Por outro lado, o modelo descrito por Reis et al (Equação 5) pode prever 100%, além disso, os mecanismo de difusão fickiana e relaxamento macromolecular, considerado no modelo de Ritger e Peppas, também são considerados no modelo de Reis et al [57]. As curvas relativas a cada modelo foram sobrepostas aos dados experimentais nas respectivas temperaturas (Figura 25).



**Figura 25** - Perfis experimentais e teóricos segundo Peppas e Reis (Eq. 4 e 5) obtidos para a liberação de SC a partir do PEC3a em função do tempo na temperatura (A) 36,5°C (B) 60°C.

Foi possível observar que os dados descritos pelo modelo de Ritger e Peppas estão de acordo com os resultados experimentais apenas nas primeiras horas de liberação. Por outro lado, as curvas obtidas para o modelo de Reis et al está em concordância com os resultados experimentais obtidos tanto na temperatura 36,5 °C como em 60 °C. Dessa forma, com o auxílio de modelos matemáticos, é possível concluir que o mecanismo de liberação do SC a partir do PEC3a é bastante complexo: ocorre tanto por um processo anômalo (que envolve efeitos de difusão e relaxação da matriz) quanto como um fenômeno de partição.

## 5. Conclusões

O poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) foi preparado por polimerização radicalar de monômeros DMAEMA, utilizando AIBN como iniciador. A síntese do polímero foi confirmada por espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ . A massa molar foi determinada por GPC, com  $M_w$  igual a 8.194 Da e índice de polidispersidade de 2,05. Medidas de DLS obtidas do polímero em solução aquosa nos pHs 6, 7 e 8 revelaram que o PDMAEMA apresenta transição de fases somente em meio básico (pH = 8) levando a um diagrama tipo LCST. Estes resultados foram associados à melhor solubilidade do PDMAEMA em meio ácido, devido à protonação de grupos amino terciários presentes nas cadeias do polímero. A temperatura de transição hidrofílico-hidrofóbico (LCST) do PDMAEMA foi 52 °C, em pH = 8.

Complexos polieletrólíticos (PECs) a base de sulfato de condroitina (SC) e poli[(2-dimetilamino)etil metacrilato] (PDMAEMA) foram preparados em diferentes condições de pH e de concentração % (m/v) de PDMAEMA. Foi realizado um planejamento fatorial  $2^2$ , onde os fatores pH e concentração de PDMAEMA foram analisados em dois níveis e no ponto central. Em todos os níveis analisados, foi possível observar a formação dos complexos polieletrólíticos. A resposta, rendimento em termos da quantidade de SC incorporada na matriz dos PECs, foi obtida por meio de ensaios realizados com o corante DMB e os valores dos rendimentos situaram-se entre 90 e 99%. Dentre os dois fatores analisados, o pH de obtenção dos PECs foi o único fator estatisticamente significativo.

As amostras PEC2a e PEC3a foram as que apresentaram os maiores rendimentos (quantidade de SC incorporada), cerca de 98-99%. Estes PECs foram caracterizados por meio das técnicas de FTIR, TGA, MEV, difração de raios-X e DLS. A formação dos PECs foi confirmada pelos espectros de FTIR, onde foi possível observar a presença das bandas características dos dois polímeros. Por TGA foi verificado que os complexos apresentaram maiores teores de água absorvida quando comparados com seus precursores. Além disso, os

difratogramas de raios-X mostraram que a formação do complexo modifica a cristalinidade do PDMAEMA. Foram observadas algumas diferenças na morfologia das amostras 2a e 3a, sendo que o PEC3a apresentou superfície porosa e mais compacta que PEC2a devido à maior proporção de PDMAEMA na matriz. Os complexos não apresentaram atividade bactericida, este resultado foi associado à baixa massa molar do PDMAEMA.

Por meio de medidas de DLS dos PEC2a e PEC3a, em meio aquoso e nos pHs 6, 7 e 8, foi verificado que, em contradição com o obtido para o PDMAEMA não complexado, o PDMAEMA complexado com SC apresentou transição de fase nas três condições de pH analisadas (pH = 6, 7 e 8). Este fato foi associado à perda de mobilidade do PDMAEMA quando complexado.

Os valores da LCST nos PEC2a e PEC3a foram determinados nos pHs 6, 7 e 8. Foi observado que o aumento do pH provoca uma diminuição da LCST. Esta dependência foi atribuída a diferentes ionizações que os grupos amino (do PDMAEMA) e grupos sulfato e carboxilato (do SC) podem apresentar com a variação do pH do meio.

Estudos de liberação de SC a partir do PEC3a mostraram que o perfil de liberação é dependente do pH e da temperatura do meio. O complexo não apresentou liberação de SC significativa em pH = 6 nas duas temperaturas analisadas (36,5 °C e 60 °C). Já em meio básico, pH = 8, ocorreu a liberação de cerca de 1,6 % do SC complexado. A liberação neste meio foi acelerada quando a temperatura foi alterada de 36,5°C (abaixo da LCST) para 60 °C (acima da LCST). A partir de modelos matemáticos foi verificado que a liberação do SC a partir do PEC3a por meio de um processo anômalo (efeitos de difusão e relaxação da matriz) assim como a ocorrência de partição.

Uma vez que os complexos PDMAEMA/SC mostraram ser termo- pH-responsivos, estes são candidatos para futuras pesquisas no desenvolvimento de carreadores de fármacos.

## 6. Referências

- [1] Kumar, A.; Srivastava, A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. **Progress in polymer science** 32 (2007) 1205-1237.
- [2] Ashammakhi, N.; Reis, R.; Chiellini, E. **Topics in tissue engineering**, Smart polymers and their applications as biomaterials, Eds, vol.3.
- [3] Pietsch, C. et al. **Macromolecules** 45 (2012) 9292-9302.
- [4] Shang, Y. Z.; Yan, Y. F.; Hou, X. **Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition** 25 (2014) 101-120.
- [5] Joglekar, M.; Trewyn, B. G. **Biotechnology Journal** 8 (2013) 931-945.
- [6] Galaev, I. Y.; Mattiasson, B. **Trends in biotechnology** 17 (1999) 335-340.
- [7] Dong, H.; Wei, H.; Mao, J.; Wang, D.; Yang, M.; Bo, S.; Ji, X. **Polymer** 53 (2012) 2074-2084.
- [8] Zhang, M.; Liu, L.; Zhao, H.; Yang, Y.; Fu, G.; He, B. **Journal of Colloid and Interface Science** 301 (2006) 85-91.
- [9] Wu, W.; Liu, J.; Cao, S.; Tan, H.; Li, J.; Xu, F.; Zhang, X. **International Journal of Pharmaceutics** 416 (2011) 104-109.
- [10] Mao, J.; Ji, X; Bo, S. **Macromolecular Chemistry and Physics** 212 (2011) 744-752.
- [11] Costa, M. C. M. **Caracterização de Polímeros Inteligentes para Aplicações Biomédicas**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de ciências e tecnologia, Universidade de Coimbra, 2012.
- [12] Yancheva, E., D. Paneva, V. Maximova, L. Mespouille, P. Dubois, N. Manolova, I. Rashkov. **Biomacromolecules** 8 (2007) 976-984.
- [13] Yancheva, E.; Paneva, D.; Danchev, D.; Mespouille, L.; Dubois, P.; Manolova, N.; Rashkov, I. **Macromolecular Bioscience** 7 (2007) 940-954.
- [14] Wang, H.; Wang, L.; Zhang, P.; Yuan, L.; Yu, Q., Chen, H. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 83 (2011) 355-359.
- [15] Paneva, D.; Bougard, F.; Manolova, N.; Dubois, P.; Rashkov, I. **European Polymer Journal** 44 (2008) 566-578.
- [16] Liu, X.; Ni, P.; He, J.; Zhang, M. **Macromolecules** 43 (2010) 4771-4781.
- [17] Sung, D. K.; Kong, W. H.; Park, K.; Kim, J. H.; Kim, M. Y.; Kim, H.; Hahn, S. K. **Biomaterials** 34 (2013) 1261-1269.
- [18] Martins, A. F. **Preparo, caracterização e estudos das propriedades físico-químicas de complexos polieletrólíticos de N,N,N-trimetilquitosana/heparina obtidos em diferentes pHs para uso em liberação controlada de heparina**. Dissertação de

- Mestrado, Departamento de química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2011.
- [19] Lankalapalli, S; Kolapalli, V. R. M. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences** 71 (2009) 481-487.
- [20] Sankalia, M.G.; Mashru, R. C.; Sankalia, J. M.; Sutariya, V.B. **Eur J Pharm Biopharm** 65 (2007) 215-232.
- [21] Berger, J.; Reis, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Gurny, R. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 57 (2004) 35–52.
- [22] Piai, J. F. **Preparação e caracterização de complexos polieletrólitos de quitosana/sulfato de condroitina e estudos de liberação controlada**. Dissertação de Mestrado, Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2008.
- [23] Li, G.; Song, S.; Zhangg, T.; Qi, M.; Liu, J. S. **International Journal of Biological Macromolecules** 62 (2013) 203-210.
- [24] Recillas, M.; Silva, L. L.; Peniche, C.; Goycoolea, F. M.; Rinaudo, M.; San Roman, J.; Arguelles-Monal, W. M. **Carbohydrate Polymers** 86 (2011) 1336-1343.
- [25] Cho, H.; Oh, J.; Choo, M.; Ha, J.; Park, Y.; Maeng, H. **International Journal of Biological Macromolecules** 63 (2014) 15-20.
- [26] Fajardo, A. R. **Caracterização de complexos polieletrólíticos de Quitosana/Sulfato de Condroitina em diferentes condições de pH e tempo de imersão**. Dissertação de Mestrado, Departamento de química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.
- [27] Fajardo, A. R.; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. **Carbohydrate Polymers** 80 (2010) 934-943.
- [28] Bourgeois, P.; Chales, G.; Dehais, J.; Delcambre, B.; Kuntz, J. L.; Rozenberg, S. **Osteoarthritis and Cartilage** 6 (1998) 25-30.
- [29] Montgomery, D., **Design and Analysis of experiments**, ed. Oitava Edição. 2013, Tempe, Arizona.
- [30] Neto, B. B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E., **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2001.
- [31] Galdámez, E. V. C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. Dissertação de Mestrado, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2002.
- [32] Mainardes, R. M.; Silva, L. P. . **Current Drug Targets** (2004) 449-455.
- [33] Azevedo, M. M. M. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica,**

- conseqüências e perspectivas.** Dissertação de Doutorado, Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- [34] Wang, B.; Chen, K.; Yang, R.; Yang, F.; Liu, J. **Carbohydrate Polymers** 103 (2014) 510-519.
- [35] Yang, J.; Huang, Y.; Gao, C.; Liu, M.; Zhang, X. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** 115 (2014) 368-376.
- [36] Sohrabi, A.; Shaibani, P. M.; Etayash, H.; Kaur, K.; Thundat, T. **Polymer Chemistry** 54 (2013) 2699-2705.
- [37] Das, S.; Chaudhury, A.; Ng, K. **International Journal of Pharmaceutics** 406 (2011) 11-20.
- [38] Freire, A. C.; Podczec, F.; Sousa, J.; Veiga, F. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 42 (2006) 337-355.
- [39] Freire, A. C.; Podczec, F.; Sousa, J.; Veiga, F. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** 42 (2006) 319-335.
- [40] You, Y.; Manickam, D. S.; Zhou, Q; Oupický, D. **Journal of Controlled Release** 122 (2007) 217-225.
- [41] USP30–NF25, **United States Pharmacopeia-National Formulary, The United Pharmacopeia Convention.** Rockville, MD, U.S.A.
- [42] Wa'el, K.; Sims, T. J. **Biochemical methods for the analysis of tissue-engineered cartilage**, Methods in Molecular Biology, A. P.; Hatton Hollander, P. V. , Human Press Inc, vol.238, Totowa. p. 222.
- [43] Piai, J. F. **Imobilização de sulfato de condroitina na superfície de polímeros eletrofiados para obtenção de substratos para a cultura de células.** Dissertação de Doutorado, Departamento de química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá - Paraná, 2012.
- [44] Clinical and Laboratory Standards Institute, *Performance standard for antimicrobial disk susceptibility tests.* 2009: Wayne, PA.
- [45] Pavia, D. L.; Lampman, G. M.; Kriz, G. S.; Vyvyan, J. R., **Introdução à espectroscopia.** 4<sup>a</sup> ed. 2010, São Paulo.
- [46] Garcia, A. **Estudo comparativo entre as técnicas de polimerização radical livre convencional e radical livre “viva” via raft para produção de poli(dimetilaminoetilmetacrilato) – pdmaema.** Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Química, Faculdade de engenharia química de lorena, Lorena - SP, 2005.
- [47] Castro, M. O. **Papel de polissacarídeos sulfatados na fertilização de ouriços-do-mar.** Dissertação de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

- [48] Richardson, J.C.; Dettmar, P. W.; Hampson, F.C.; Melia, C. D. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics** 57 (2004) 299-305.
- [49] Zhang, N.; Liu, M.; Shen, Y.; Chen, J.; Dai, L.; Gao, C. **Journal of Materials Science** 46 (2011) 1523-1534.
- [50] Patel, R.; Ahn, S. H.; Seo, J. A.; Kim, S. J.; Kim, J. H. **Journal of Nanoparticle Research** (2012)
- [51] Grant, D.; Long, W.F.; Williamson, F. B. **Biochem. J.** 244 (1987) 143-149.
- [52] Vasconcelos, C. L. **Obtenção de dispersões de complexos polieletrólitos à base de quitosana e poli(ácido metacrílico) e análise de adsorção de albumina bovina seca.** Dissertação de Doutorado, Departamento de química Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 2007.
- [53] Yao, D.; Guo, Y.; Chen, S.; Tang, J.; Chen, Y. **Polymer** 54 (2013) 3485-3491.
- [54] Vigliotta, G.; Mella, M.; Rega, D.; Izzo, L. **Biomacromolecules** 13 (2012) 833-841.
- [55] Lu, G.; Zuo, H.; Dong, W.; Wu, D.; Fu, R. **CHEM. RES. CHINESE UNIVERSITIES** 27 (2011) 1072-1077.
- [56] Shen, Z.; Wei, W.; Zhao, Y.; Ma, G.; Dobashi, T.; Maki, Y.; Su, Z.; Wan, J. **European journal of pharmaceutical sciences** 35 (2008) 271-282.
- [57] Reis, A. V.; Guilherme, M. R.; Rubira, A. F.; Muniz, E.C. **Journal of Colloid and Interface Science** 310 (2007) 128-135.
- [58] Ritger, P. L.; Peppas, N. A. **Journal of Controlled Release** 5 (1987) 23-36.