

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

**INFLUÊNCIA DE POLIELETRÓLITOS SOBRE ESTRUTURAS
FOSFOLIPÍDICAS E SUAS APLICAÇÕES**

Maria Ismenia Zulian Lionzo

Tese de Doutorado

Porto Alegre, julho de 2011.

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais

**INFLUÊNCIA DE POLIELETRÓLITOS SOBRE ESTRUTURAS
FOSFOLIPÍDICAS E SUAS APLICAÇÕES**

Maria Ismenia Zulian Lionzo

Tese realizada sob a orientação da Prof. Dra. Nádyá Pesce da Silveira e apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em atendimento aos requisitos parciais para a obtenção do título de Doutor em Ciências dos Materiais.

Porto Alegre

2011

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Nádyá Pesce da Silveira, pelo incentivo, confiança, apoio, orientação, oportunidade de crescimento profissional e amizade.

À Giulia de Carli Lorenzini, à Luciana Brangel e à MSc. Yasmine Miguel Serafini Micheletto pelo auxílio em diversos experimentos. Ao Joelson Tomedi pelas medidas de adesão celular.

À professora Dra. Naira Maria Balzaretto pelas oportunidades de participação na European School On Nanoscience and Nanotechnology e nas Mostras CNANO/UFRGS.

Ao corpo de professores do PGCIMAT.

Ao professor Dr. Dimitrios Samios e à professora Dra. Clara Ismeria Damiani Bica pelos ensinamentos, convivência e amizade.

À equipe do LNLS, em especial, ao Dr. Mateus Borba Cardoso pelas discussões sobre a técnica de SAXS, pela atenção dispensada e pela amizade.

Ao Dr. Omar Mertins pela colaboração em diversos trabalhos, apoio e amizade.

Ao Dr. Fernando Giacomelli e à Manoela Heineck pela amizade e atenção dispensada.

Aos colegas e amigos do LINDIM, Ana, Aline N., Angeloni, Bibiana, Denise, Diego, Fabrício, Guzzato, Inez, Keli, Miriam, Nizângela, Noor, Quelen, Ricardo e Simone pela convivência e intercâmbio de conhecimentos.

Aos colegas e amigos do Grupo de Biomacromoléculas, Andresa, Aline D., Cristiana, Daiana, Gabriela, Gisele, Giulia, Joelson, Luciana, Rafael, Renan, Rosane, Vanessa e Yasmine pelo convívio e troca de experiências.

À minha família, especialmente ao meu pai, Beno Nestor Lionzo por todo apoio.

Ao meu esposo, Maximiliano Segala, pela atenção, suporte, companheirismo e carinho presentes em todos os momentos.

Ao LNLS pelo fomento ao acesso e utilização da infraestrutura.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior e à Rede de Nanocosméticos pela bolsa e fomento à pesquisa.

LISTA DE TRABALHOS GERADOS A PARTIR DOS RESULTADOS DESCRITOS NA TESE

Capítulo de livro publicado:

LIONZO, M.I.Z.; DRESSLER, A. C.; MERTINS, O.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Chapter 8. Chitosan as stabilizer of natural based nanostructures. In: Beck, Ruy; Guterres, Silvia; Pohlmann, Adriana. (Org.). Nanocosmetics and Nanomedicines. New Approaches for Skin Care. 1 ed. Berlin: Springer-Verlag, 2011, p. 163-180.

Capítulo de livro a ser publicado:

LIONZO, M.I.Z; SILVEIRA, N. P. Polyelectrolyte composite nanoparticle. In: Centro de Nanociência e Nanotecnologia (CNCT-NANO).

Artigo publicado:

LIONZO, M.I.Z.; MERTINS, O.; POHLMANN, A. R.; SILVEIRA, N. P. Phospholipid/chitosan self-assemblies analyzed by SAXS and Light Scattering. American Institute of Physics Conference (AIP), v. 1092, p. 127-129, 2009.

Artigo em submissão ao Journal of Biomedical Nanotechnology:

LIONZO, M.I.Z, LORENZINI, G. C.; TOMEDI, J.; PRANKE, P., SILVEIRA, N. P. Effects of the composite nanovesicles on the physical properties and cellular adhesion of chitosan films.

Artigo em submissão ao Biomacromolecules:

LIONZO, M. I. Z.; MUNIZ, E. C.; SILVEIRA, N. P. The influence of chondroitin sulfate on composite multilamellar liposomes containing chitosan.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 FOSFOLIPÍDEOS.....	2
1.1.1 Histórico	2
1.1.2 Estrutura química e propriedades	2
1.1.3 Estruturas formadas a partir da associação de fosfolipídeos.....	6
1.2 POLIELETRÓLITOS.....	15
1.2.1 Aplicação tecnológica de polieletrólitos.....	19
1.2.2 Quitosana.....	21
1.2.3 Condroitina	23
1.3 OBJETIVO GERAL.....	26
1.3.1 Objetivos Específicos.....	26
1.4 REFERÊNCIAS.....	27
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS	33
2.1 ESPALHAMENTO DE LUZ.....	34
2.1.1 Espalhamento de luz estático.....	35
2.1.2 Espalhamento de luz dinâmico.....	35
2.2 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X EM BAIXOS ÂNGULOS	38
2.2.1 Sistemas diluídos não orientados	38
2.2.2 Sistemas periódicos.....	40
2.3 POTENCIAL ZETA	43
2.4 REFERÊNCIAS.....	47
3. AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM EMULSÕES CONTENDO FOSFATIDILCOLINA E QUITOSANA.....	48
3.1 INTRODUÇÃO.....	49
3.2 METODOLOGIA.....	51

3.2.1	Preparação das amostras compostas por quitosana/fosfatidilcolina/água.....	51
3.2.2	Caracterização por espalhamento de raios-X em baixos ângulos.....	52
3.2.3	Caracterização por espalhamento de luz.....	52
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
3.4	CONCLUSÕES	63
3.5	REFERÊNCIAS.....	64
4.	PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS MULTILAMELARES EM PRESENÇA DE QUITOSANA E REVESTIMENTO COM CONDROITINA	65
4.1	INTRODUÇÃO.....	66
4.2	METODOLOGIA.....	68
4.2.1	Preparação das amostras	68
4.2.2	Espalhamento de luz.....	69
4.2.3	Potencial ζ	70
4.2.4	Espalhamento de raios-X em baixos ângulos.....	70
4.2.5	Determinação do rendimento do complexo.....	71
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.4	CONCLUSÕES.....	88
4.5	REFERÊNCIAS.....	89
5.	APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS	91
5.1	INTRODUÇÃO.....	92
5.2	METODOLOGIA.....	94
5.2.1	Preparação das amostras	94
5.2.2	Análise viscosimétrica	95
5.2.3	Microscopia eletrônica de varredura.....	95
5.2.4	Ângulo de contato	96
5.2.5	Teste de inchamento	96

5.2.6 Teor de água.....	97
5.2.7 Calorimetria exploratória diferencial.....	97
5.2.8 Espectroscopia de reflexão total atenuada (FTIR-ATR)	98
5.2.9 Adesão celular	98
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
5.4 CONCLUSÕES	111
5.5 REFERÊNCIAS.....	112
6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	114
ANEXOS.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.1** Estrutura geral das duas principais classes de fosfolipídeos: glicerofosfolipídeos (a) e esfingolipídeos (b)..... 3
- Figura 1.2** Estruturas da 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina e da 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, os principais componentes da lecitina de soja, na forma anfotérica..... 5
- Figura 1.3** Representação esquemática da estrutura de uma micela reversa com as cadeias alquila desordenadas..... 7
- Figura 1.4** Representação esquemática da fase lamelar, um tipo de mesofase observada em organogéis formados por fosfolipídeos. 8
- Figura 1.5** Etapas da formação de lipossomas pela técnica de evaporação em fase reversa. 1. dispersão dos fosfolipídeos; 2. adição da fase aquosa; 3. fornecimento de energia e formação de micelas reversas; 4-5. evaporação do solvente orgânico e formação do organogel e 6. hidratação do filme lipídico em água e obtenção de lipossomas. Adaptado de Mertins, 2008..... 9
- Figura 1.6** Representação esquemática dos diversos tipos de lipossomas. As linhas representam a bicamada fosfolipídica (região lipofílica). As vesículas estão envolvidas por meio aquoso interna e externamente. Vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV), vesículas oligolamelares grandes (LOV) e vesículas oligolamelares gigantes (GOV)..... 10
- Figura 1.7** Uma membrana planar (a), dividida em discos circulares (b). Os discos podem reduzir a energia das bordas e o raio da curvatura torna-se R_2 (c). O fechamento do disco resulta em um lipossoma com raio R_3 (d). 12
- Figura 1.8** Esquema das propriedades locais (esquerda) e globais (direita) das bicamadas. Flutuações da bicamada em relação ao seu estado fundamental..... 14
- Figura 1.9** Esquema de um lipossoma multilamelar e os parâmetros estruturais distância de repetição d , espessura da camada de água d_w , espessura da

bicamada d_B , subdividida em espessura da região polar d_H e da região apolar d_C	15
Figura 1.10 Sistemas nanoparticulados formados por polieletrólitos com cargas opostas (A), por polieletrólitos envolvendo núcleo inorgânico, polimérico ou lipídico (B) e com tensoativos (C)......	19
Figura 1.11 Estruturas típicas de um lipossoma multilamelar (A), um lipossoma estabilizado com um polieletrólito de carga oposta interna e externamente (B) e estabilizado com um complexo de polieletrólitos externamente (C)......	20
Figura 1.12 Estrutura química da quitosana parcialmente desacetilada, um copolímero caracterizado pelo seu grau de desacetilação (GD)......	21
Figura 1.13 Estrutura química do sulfato de condroitina com o grupamento sulfato em C4 (tipo A) e C6 (tipo C).	23
Figura 2.1 Esquema demonstrando a geometria básica de um experimento de espalhamento de luz. Adaptado de Silveira e Giacomelli, 2008.	34
Figura 2.2 Distribuição da intensidade de luz espalhada a partir de uma amostra compostas por bicamadas esmélicas. Negligencia-se o índice de refração e k_o e k_I apresentam o mesmo comprimento.	35
Figura 2.3 Flutuação dos fótons detectados $A(t)$ ao longo do tempo em torno de seu valor médio que independe do tempo. O eixo do tempo é dividido em N espaços discretos (Δt) com $t=j\Delta t$, $\tau=n\Delta t$, com $j = 1,2,\dots,N$	36
Figura 2.4 Exemplo de uma função de correlação temporal (esquerda) e da distribuição do tempo de relaxação (direita) obtida com o programa REPES. ..	37
Figura 2.5 Esquema demonstrando a geometria básica de um experimento de espalhamento de raios-X em baixos ângulos.....	38
Figura 2.6 Ondas espalhadas a partir de partículas com diferentes dimensões em relação ao comprimento de onda do feixe.	39
Figura 2.7 Curvas típicas de espalhamento a partir de partículas de tamanhos variados.	39
Figura 2.8 Esquema demonstrando as flutuações na ordem lamelar (k) e o fator estrutura $S(q)$ característico.	42

Figura 2.9 Representação esquemática da dupla camada difusa de acordo com o modelo de Gouy-Chapman.	43
Figura 2.10 Representação esquemática da dupla camada de acordo com o modelo de Stern.	44
Figura 3.1 Posicionamento da cubeta em relação ao feixe incidente e espalhado. .	53
Figura 3.2 Distribuições dos tempos de relaxação para amostras contendo micelas reversas, após o primeiro minuto de injeção.	54
Figura 3.3 Picos de difração (SAXS) das fases lamelares e valores das distâncias de repetição (d), após o primeiro minuto de injeção. Detalhe apresentando o significado de d	56
Figura 3.4 Pseudo-diagramas apresentando as fases presentes nas amostras um minuto após sua preparação. Fosfatidilcolina (PC), acetato de etila (EA) e solução de quitosana (CH).	56
Figura 3.5 Mudanças nos picos de difração das amostras PC_6CH_{200} e PC_6CH_{400} ao longo do tempo de 13 minutos.	57
Figura 3.6 Distâncias de repetição das reflexões observadas para as amostras PC_6CH_{200} e PC_6CH_{400} em função do tempo. Valores de q obtidos a partir dos gráficos da Figura. 3.5.	58
Figura 3.7 Razões de intensidade azimutal das imagens 2-D das amostras e PC_6CH_{400} em função do tempo.	58
Figura 3.8 Razões de despolarização (I_{vh}/I_{vv}) das amostras ao longo do tempo. ..	59
Figura 3.9 Mudanças nos picos de difração da amostra $PC_{60}W_{400}$ em 15 minutos. 61	
Figura 3.10 Mudanças nos picos de difração da amostra $PC_{60}CH_{400}$ em 15 minutos.	60
Figura 3.11 Distribuições dos tempos de relaxação para a amostra $PC_{60}W_{400}$ ao longo de 15 minutos.	611
Figura 3.12 Distribuições dos tempos de relaxação para a amostra $PC_{60}CH_{400}$ ao longo de 15 minutos.	61

Figura 3.13 Algumas possíveis estruturas formadas pelas misturas de PC com água (a), (b), (c) e pelas misturas de PC com quitosana. (d), (e) e (f).....	62
Figura 4.1 Funções de autocorrelação das amostras Lip, Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3.....	72
Figura 4.2 Funções de autocorrelação das amostras Chit-10, Chit-CS-10, Chit-CS-20 e Chit-CS-30.	73
Figura 4.3 Distribuição dos tempos de relaxação normalizadas das amostras Lip, Chit-1, Chit-CS-1 e Chit-CS-10.....	74
Figura 4.4 Imagens 2-D do espalhamento de raios-X em baixos ângulos obtidos das amostras Chit-1 (a), Chit-CS-1 (b), Chit-CS-2 (c) e Chit-CS-3 (d).....	74
Figura 4.5 Médias dos diâmetros (painel superior) e índices de dispersão (painel inferior) para as amostras Lip, Chit e Chit-CS com concentrações variadas de polieletrólitos.....	75
Figura 4.6 Valores de potencial ζ para as amostras Lip, Chit e Chit-CS contendo concentrações variadas de polieletrólitos.	76
Figura 4.7 Esquema representando as amostras Lip, Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2, Chit-CS-3, Chit-10, Chit-CS-10, Chit-CS-20 e Chit-CS-30.	80
Figura 4.8 Perfil de difração das amostras Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3 (superior) e das amostras Chit-10, Chit-CS-10, Chit-CS-20 e Chit-CS-30 (inferior).	81
Figura 4.9 Intensidades de espalhamento normalizadas para as duas primeiras ordens de difração das amostras Chit-10 e concomitante ajuste à MCT ($\chi^2 < 2.0$). Os quadrados abertos são para o pico $h = 1$ e os círculos abertos para $h = 2$	85
Figura 4.10 Picos de Bragg normalizados ($h=1$) para Chit-1 e Chit-10 (gráfico superior) e Chit-CS-3 e Chit-CS-30 (grafico inferior) com os respectivos ajustes ao modelo ($\chi^2 < 3,0$). Os valores dos parâmetros de Caillé (η) estão apresentados.	85
Figura 4.11 Valores de intensidade absoluta de espalhamento com $I_{q \rightarrow 0}$ para as amostra Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3 (quadrados abertos) e módulo elástico B (círculos fechados).....	86

Figura 5.1 Valores de viscosidade em função do gradiente de cisalhamento dos pseudo-géis de quitosana (3,0%) contendo 5,0% de partículas Chit-CS-C; Lipossomas, água ou solução de sulfato de condroitina (CS) 0,4%.....	99
Figura 5.2 Coluna direita corresponde a imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície das amostras Filme CH (a), Filme 1 (c), Filme 2 (e) e Filme 3 (g) em aumento de 1800 x. A coluna da direita corresponde à secção lateral de cada uma das correspondentes amostras Filme CH (b), Filme 1 (d), Filme 2 (f) e Filme 3 (h) em aumento de 1800 x. A barra corresponde a 10 μm	101
Figura 5.3 Trabalho aparente de adesão (W_A^*) para etilenoglicol (\blacksquare) e glicerol (\blacktriangle) considerando o valor RMS dos Filmes CH, 1, 2 e 3.....	102
Figura 5.4 Percentual de inchamento (círculos fechados) em tampão PBS, 37 °C e percentual de perda de massa (quadrados abertos) do Filme CH (a) e Fimes 1 (b), 2 (c) e 3 (d). A flecha indica a tendência, após 48 horas de imersão, para a amostra com maior concentração de partículas.....	103
Figura 5.5 Graus de acetilação determinados para as amostras Filme CH, 1, 2 e 3 antes e após serem dessecados a 105 °C.....	105
Figura 5.6 Curvas de DSC (c) do filme CH e do Filme 3 (taxa de aquecimento de 10 °C/min). Flechas indicam a temperatura de perda de água.	106
Figura 5.7 Curvas de MDSC do Filme CH (a) e do Filme 3 (b) (taxa de aquecimento de 2 °C/min).....	107
Figura 5.8 Curvas de DSC para p Filme CH (linha sólida) e Filmes 1 (linha tracejada), Sample 2 (linha pontilhada) and Sample 3 (linha ponto-tracejada) (taxa de aquecimento 10 °C/min) indicando a transição vítrea (T_g).	108
Figura 5.9 Distribuição do número de células aderidas por campo (HPF) para os Filmes CH, 1, 2 e 3 após 6 horas de incubação.	109
Figura A.1 Determinação do raio de giro a partir da região de Guinier. Ponto intermediário é aquele em que $Rg \times q \ll 1$	119
Figura A.2 Áreas referentes às bandas de hidroxila (3450 cm^{-1}) e acetila (1665 cm^{-1}) dos espectros de infravermelho dos Filmes CH, 1, 2 e 3 antes e após a secagem	120

INDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Substituintes encontrados em glicerofosfolipídeos comuns e denominações.	4
Tabela 1.2 Nomes e designações para ácidos graxos comuns em membranas. A localização das ligações duplas na cadeia carbônica está indicada entre parênteses.	5
Tabela 1.3 Representação das formas autoassociadas de fosfolipídeos.	6
Tabela 1.4 Propriedades físico-químicas que influenciam a solubilidade de polieletrólitos.	18
Tabela 3.1 Nomenclatura e composição das amostras analisadas.	51
Tabela 4.1 Concentração em massa e em número de cargas ($\times 10^{18}$) de fosfatidilcolina, quitosana e condroitina em 100 mL de suspensão.	69
Tabela 4.2 Valores de densidade de cargas calculadas a partir dos dados de potencial ζ	77
Tabela 4.3 Resultados de SAXS mostrando a distância de repetição d ; a média do número de repetição estrutural dado pela largura à meia altura do pico ($FWMH$), N_{FWMH} e o parâmetro de Caillé para o primeiro pico, η_1	82
Tabela 5.1 Resultados da análise de variância da adesão celular.	109
Tabela 5.2 Teste de Tukey da adesão celular. Letras iguais indicam não haver diferença entre os valores com nível de significância de 5%.	110
Tabela A.1 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC_6W_{200} , ao longo de 15 minutos.	117
Tabela A.2 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC_6CH_{200} , ao longo de 7 minutos.	117
Tabela A.3 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC_6W_{400} . Foi possível determinar apenas para o primeiro minuto.	117

Tabela A.4	Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆CH₄₀₀, ao longo de 11 minutos.....	117
Tabela A.5	Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀W₂₀₀, ao longo de 15 minutos.	118
Tabela A.6	Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀CH₂₀₀, ao longo de 9 minutos.	118
Tabela A.7	Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀W₄₀₀, ao longo de 11 minutos.	118
Tabela A.8	Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀CH₄₀₀, ao longo de 11 minutos.	119

RESUMO

A presente tese descreve estudos sobre interações entre fosfolipídeos e polieletrólitos. As principais técnicas empregadas na investigação fundamental dos sistemas obtidos foram o espalhamento de luz, de raios-X em baixos ângulos e análises de potencial ζ . Os sistemas estudados foram empregados na produção de géis e filmes visando aplicação tecnológica e suas características foram avaliadas por técnicas complementares.

Inicialmente foram avaliadas emulsões em fase reversa de fosfatidilcolina em acetato de etila e às quais foi adicionado o polieletrólito quitosana. Estas emulsões foram caracterizadas por técnica de espalhamento de luz e de raios-X em baixos ângulos a fim de avaliar a influência da quitosana sobre o tamanho das estruturas formadas e a ocorrência de fases após sua preparação. Verificou-se que a quitosana, quando presente, tem a capacidade de agregar os fosfolipídeos e formar estruturas lamelares que evoluem ao longo do tempo.

Posteriormente, foram preparados lipossomas multilamelares contendo quitosana, revestidos por condroitina. A organização interna foi avaliada por espalhamento de raios-X em baixos ângulos cujos perfis foram ajustados a modelos que permitiram encontrar parâmetros estruturais. A interação entre os polieletrólitos na superfície das partículas foi avaliada pela análise da densidade de cargas. A quitosana demonstrou afetar a rigidez da bicamada e foi possível controlar a carga das partículas através de sua interação com a condroitina.

Por fim, a utilização dos lipossomas contendo quitosana revestidos por condroitina como modificadores das propriedades de pseudo-géis e filmes de quitosana foi atestada. A adição de partículas demonstrou aumentar a viscosidade dos pseudo-géis, sendo que as partículas permanecem íntegras durante o processo. Essa constatação foi feita mediante a secagem dos pseudo-géis e obtenção de filmes, os quais demonstraram a presença das partículas na sua superfície. As características internas dos filmes também foram afetadas pelas partículas, que serviram como barreira difusional. Os filmes foram testados como suportes para crescimento de células sendo que a modificação propiciada pela presença das partículas demonstrou ser um parâmetro crítico que necessita controle a fim de favorecer a adesão celular.

ABSTRACT

We investigated the interaction between phospholipids and polyelectrolytes aiming at technological applications such as cosmetics and biomedical devices. The main techniques used were light scattering, small angle X-rays scattering and ζ potential measurements.

In the first part of this study we prepared reverse phase emulsions of phosphatidylcholine in ethyl acetate with chitosan at the aqueous phase. Using light scattering and small angle X-ray scattering, we observed that chitosan was able to aggregate the phospholipids and to form lamellar structures which change at the first moments after the preparation.

Following, we prepared multilamellar liposomes with chitosan covered by chondroitin. The internal organization was evaluated by small angle X-ray scattering which profiles were fitted to theoretical models to provide structural parameters. The interaction between the polyelectrolytes at the surface was accompanied by density charge analysis. Internally, the chitosan affected the bilayer rigidity and the superficial charge was controlled by the interaction between the two polyelectrolytes.

Finally, the composite liposomes were applied as additives to pseudo-gels and films. These particles increased the viscosity of the pseudo-gels and its structure remained unaffected during the process. This found was demonstrated by the roughness surface observed at the films surface after drying the pseudo-gels added with particles. The internal properties of the films were also affected by the particles presence, acting as a diffusional barrier. The films were essayed as scaffolds for cell growth .The results showed that the change caused by the particles presence is a critical parameter which needs to be controlled in order to promote the cell adhesion.

1. INTRODUÇÃO

1.1 FOSFOLIPÍDEOS

1.1.1 Histórico

A presença de fósforo nos lipídeos extraídos de tecido cerebral foi descoberta em 1811 por Vauquelin. Posteriormente, diversos químicos extraíram substâncias similares deste mesmo tecido, às quais denominaram matéria branca ou ácido oleofosfórico. Mais tarde, outro químico francês, Gobley, conseguiu isolar da gema do ovo um lipídeo contendo fósforo que denominou lecitina (do grego *lecithos*, gema de ovo) que, atualmente, é obtida também a partir da soja e conhecida como fosfatidilcolina. Ele mostrou em 1850 que o ácido glicerofosfórico poderia ser obtido a partir da lecitina e em 1868, Strecker demonstrou a presença de colina na bile. A partir desses achados, a estrutura da lecitina foi proposta como sendo composta por ácido oléico, ácido margárico (mistura de ácidos palmítico e esteárico), ácido fosfoglicérico e colina.¹

A química de fosfolipídeos fez consideráveis progressos com Thudichum. Ele isolou e caracterizou muitas frações fosfolipídicas usando apenas sua razão nitrogênio/fósforo. Ele caracterizou a “cefalina” (atualmente fosfatidiletanolamina) distintamente da lecitina pela sua solubilidade. Isolou a etanolamina a partir de frações da cefalina, mas a considerou um produto de degradação da colina² e os fosfolipídeos de etanolamina foram descritos mais tarde.^{4,5} A constituição molecular da esfingomielina (do grego *sphingein* – ligar firmemente e *myelos* – medula) foi encontrada posteriormente, apresentando a esfingosina, a colina, o ácido fosfórico e um ácido graxo como componentes. A partir dessas descobertas, os fosfolipídeos foram considerados como sendo o “centro da vida e química da alma de todo bioplasma”.²

Após a identificação da lecitina, da cefalina e da esfingomielina foram isolados o ácido fosfatídico e o ácido acetal fosfatídico.^{5,6} Outras contribuições importantes foram o isolamento da fosfatidiletanolamina, da fosfatidilserina e do inositol (componentes da cefalina), do difosfoinositol e da cardiolipina (responsável pela antigenicidade das membranas).^{7,8}

1.1.2 Estrutura química e propriedades

Durante um longo tempo os fosfolipídeos foram separados pela sua diferença de solubilidade.⁹ Avanços nessa área decorreram da descoberta dos métodos de separação cromatográfica.^{10,11} A classificação dos fosfolipídeos tem sido feita dividindo-os em glicerofosfolipídeos e esfingofosfolipídeos (Figura 1.1).

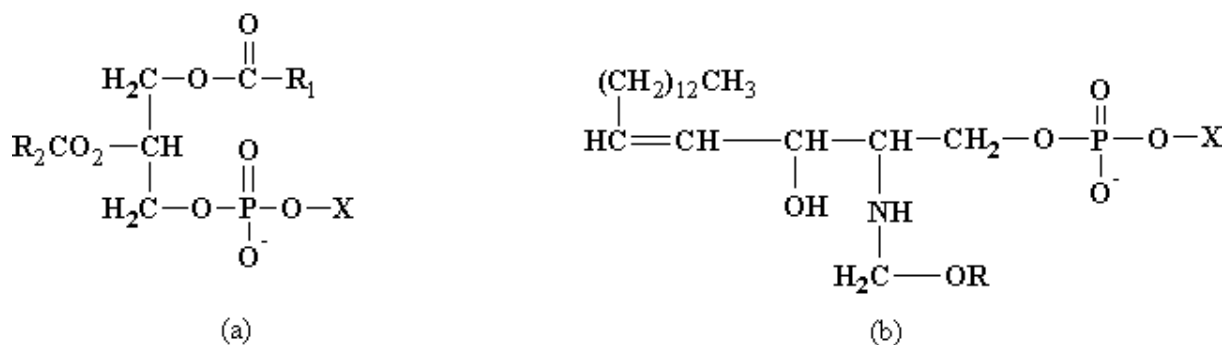


Figura 1.1 Estrutura geral das duas principais classes de fosfolipídeos: glicerofosfolipídeos (a) e esfingolipídeos (b).

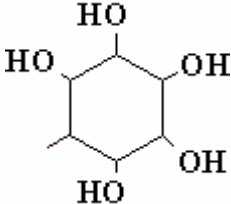
O termo glicerofosfolípido significa qualquer derivado do ácido *sn*-glicero-3-fosfórico que contenha resíduos, como por exemplo, *O*-acila ou *O*-alquila na porção glicerol e uma cabeça polar contendo uma base nitrogenada, um glicerol ou um inositol (Figura 1.1a). Nesta estrutura, R₁ e R₂ são cadeias carbônicas longas, que podem ser saturadas ou insaturadas. O ácido graxo forma uma ligação éster com os resíduos de álcool primário e secundário do glicerol. O símbolo X denota uma série de bases apresentadas na Tabela 1.1, como por exemplo, a colina ou a etanolamina que aparecem em uma ligação éster com o resíduo de ácido fosfórico.¹² Geralmente, a nomenclatura vulgarizada dos ácidos graxos considera o número de átomos de carbono do ácido e o número de insaturações separados por dois pontos, como pode ser visualizado na Tabela 1.2. Para esses ácidos todas as ligações duplas têm orientação *cis*. Na presente tese, os sistemas produzidos e estudados foram compostos, principalmente, por 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina e por 1-palmitoil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina extraídos da soja (Figura 1.2).

O termo esfingofosfolípido, por sua vez, refere-se aos lipídeos contendo fósforo e uma base de cadeia longa. Eles diferem dos glicerofosfolipídeos no grupamento hidrofóbico, que é uma ceramida. O grupo X é do mesmo tipo dos glicerofosfolipídeos, sendo o principal representante a esfingomielina que contém a colina em X.¹³ Os fosfolipídeos são anfotéricos e sua protonação ocorre em etapas. As cargas das formas ionizadas N-H⁺ e P-O⁻ são provenientes dos átomos de nitrogênio e fósforo. No caso da fosfatidilcolina, os dois valores de pK_a são 1,7 e 11,0.¹⁴

A força motriz para que os fosfolipídeos se autoassociem em meio aquoso provém da interação entre as cadeias alquila da cauda apolar. Isso se deve à minimização de energia do sistema através da diminuição do contato entre a cadeia alquila e a água. As cabeças polares, no entanto, podem apresentar forças repulsivas. O balanço dessas interações resulta na

organização dessas moléculas em bicamadas, vesículas ou micelas reversas.¹⁵

Tabela 1.1 Substituintes encontrados em glicerofosfolípeos comuns e denominações.

Substituinte em X	Denominação genérica	Denominação química
-H	Ácido fosfatídico	Ácido 1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfórico
$-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	Fosfatidilcolina	1,2 diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfocolina
$-\text{H}_2\text{C}-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	Fosfatidiletanolamina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoetanolamina
$-\text{H}_2\text{C}-\underset{\begin{array}{c} \\ \text{C}-\text{O}^- \\ \\ \text{O} \end{array}}{\text{CH}}-\text{NH}_3^+$	Fosfatidilserina	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoserina
$-\text{H}_2\text{C}-\underset{\begin{array}{c} \\ \text{OH} \end{array}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH}$	Fosfatidilglicerol	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoglicerol
	Fosfatidilinositol	1,2-diacil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfo-1'- <i>mio</i> -inositol

O formato da estrutura é dado pelo parâmetro de empacotamento $P = v/a_0l$, sendo v e l o volume e o comprimento da porção hidrofóbica, respectivamente, e a_0 a área ocupada pelo tensoativo, neste caso fosfolípeo, na interface. A área a_0 depende da área do grupamento polar e das interações que regem a formação da estrutura. O comprimento e o volume das cadeias alquila são obtidos através de:

$$\begin{aligned} l(nm) &= 0,15 + 0,1265m \\ v(nm) &= 0,0274 + 0,0269m \end{aligned} \quad (1.1)$$

Sendo m o número de carbonos da cadeia alquila.¹⁵ O valor de P é um valor indicativo do tipo de estrutura formada pela autoassociação das moléculas anfifílicas. Os cálculos aplicam-se principalmente a moléculas anfifílicas consistindo de uma cabeça polar e uma cauda apolar participando da formação do núcleo hidrofóbico. Para anfifílicos com duas cadeias carbônicas, os mesmos cálculos são válidos, porém o número de agregação - o número de moléculas necessárias para formar a estrutura - seria a metade.¹⁶

Tabela 1.2 Nomes e designações para ácidos graxos comuns em membranas. A localização das ligações duplas na cadeia carbônica está indicada entre parênteses.

Nome comum	Nome sistemático	Designação
Ácido mirístico	Ácido <i>n</i> -tetradecanóico	14:0
Ácido palmítico	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	16:0
Ácido palmitoléico	Ácido <i>n</i> -hexadecanóico	16:1(9)
Ácido esteárico	Ácido <i>n</i> -octadecanóico	18:0
Oléico	Ácido <i>n</i> -octadecanóico	18:1(9)
Linoleico	Ácido <i>n</i> -octadecanóico	18:2(9,12)
γ -Linolênico	Ácido <i>n</i> -octadecanóico	18:3(6,9,12)
α -Linolênico	Ácido <i>n</i> -octadecanóico	18:3(9,12,15)
Araquídico	Ácido <i>n</i> -eicosanóico	20:0
Araquidônico	Ácido <i>n</i> -eicosanóico	20:4(5,8,11,14)
Behênico	Ácido <i>n</i> -docosanóico	22:0
Lignocérico	Ácido <i>n</i> -tetracosanóico	24:0

Além disso, moléculas bicaudais tendem a formar, preferencialmente, micelas reversas, bicamadas planas ou bicamadas flexíveis (Tabela 1.3), dependendo da concentração da molécula anfifílica. Moléculas bicaudais que formam vesículas também podem formar micelas discóides ou cilíndricas quando o parâmetro $\frac{1}{2} < P < 1$. Essas micelas são energeticamente desfavoráveis e logo se convertem em vesículas ou lipossomas.¹⁵

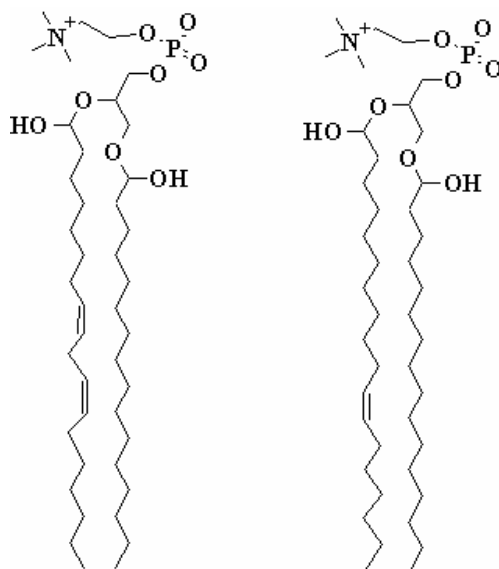


Figura 1.2 Estruturas da 1-palmitoil-2-linoleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina e da 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfatidilcolina, os principais componentes da lecitina de soja, na forma anfotérica.

Aplicando-se os cálculos para a fosfatidilcolina (quando há insaturação em uma das cadeias carbônicas) o parâmetro P indica a tendência de um formato de cilíndrico ($P=1,0$), levando a uma área ocupada por um tensoativo na interface de, aproximadamente, 0,61 a 0,80 nm², dependendo em que face da vesícula se encontra. Esse valor pode diferir entre autores, sendo que para alguns, uma molécula de fosfatidilcolina ocupa 68 a 70 Å².¹⁷

De uma forma geral, as características moleculares dos fosfolipídeos, tais como o tamanho, o grau de saturação das cadeias apolares e a natureza do grupamento polar implicarão na curvatura e formação de determinadas estruturas. No entanto, as propriedades do meio no qual estão dispersos, dentre elas a hidratação da bicamada e a presença de outros compostos misturados ao sistema afetarão a organização molecular de maneira específica.

Tabela 1.3 Representação das formas autoassociadas de fosfolipídeos.

Valor de P	Formato do fosfolipídeos	Estrutura autoassociada
0,5 – 1,0	Cone invertido	Bicamadas flexíveis e vesículas
~ 1,0	Cilíndrico	Bicamadas planas
> 1,0	Cone	Micelas reversas*

* Em sistemas predominantemente orgânicos.

Neste contexto, lembramos que um dos objetivos da presente tese é a avaliação das estruturas formadas pela combinação da fosfatidilcolina com o polieletrólito quitosana, em meio orgânico.

1.1.3 Estruturas formadas a partir da associação de fosfolipídeos

1.1.3.1 Micelas reversas

Como comentado anteriormente, os fosfolipídeos são moléculas anfifílicas ou anfipáticas, com duas regiões distintas na mesma molécula e distintas afinidades pelo meio líquido. Quando essas moléculas estão em baixa concentração, apresentam-se molecularmente dispersas. Ao passo que sua concentração é aumentada, tendem a localizar-se na interface da fase líquida, até saturá-la. Após, existe uma faixa de concentração (> concentração micelar crítica, CMC) na qual inicia-se o processo de agregação das moléculas sob a forma de estruturas coloidais denominadas micelas (Figura 1.3). A CMC pode ser determinada através de diversos métodos como, por exemplo, pela variação do índice de refração, pela avaliação da solubilidade de um corante, tensão superficial, dentre outros.¹⁸

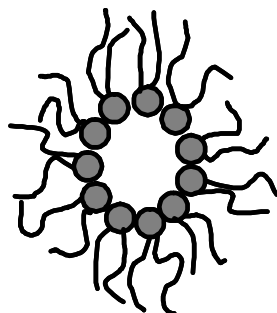


Figura 1.3 Representação esquemática da estrutura de uma micela reversa com as cadeias alquila desordenadas.

Uma explicação molecular para formação de micelas no interior do solvente pode ser feita pela termodinâmica. Devido à diminuição da entropia decorrente da autoassociação das moléculas, a formação de micelas não seria esperada. Porém, é preciso considerar também as contribuições das interações entre as moléculas do solvente. Quando há poucas moléculas de fosfolípido dispersas, é necessário que haja mudanças nas ligações entre as moléculas de solvente, que estão ao redor de cada molécula de soluto. Esse processo é exotérmico, sendo responsável por valores negativos na variação de entalpia. No entanto, quando a quantidade de espaços abertos dentro do solvente for grande, a mobilidade das moléculas do solvente será reduzida e a variação de entropia se tornará negativa. Neste ponto, a formação de *clusters* ou aglomerados das moléculas do soluto favorece a mobilidade do solvente, ocasionando um aumento líquido na entropia do sistema.^{19,20}

Investigações acerca da agregação de fosfolípidos, em especial, a fosfatidilcolina em solventes orgânicos têm sido conduzidas. Particularmente, a formação de micelas reversas permite a solubilização de compostos moleculares pequenos, bem como enzimas cataliticamente ativas. Micelas reversas podem ser encaradas como modelos termodinamicamente estáveis de estruturas lipídicas que, possivelmente, ocorrem em membranas biológicas.²¹

1.1.3.2 Organogéis

Se eliminarmos o solvente orgânico de uma dispersão de micelas reversas, novas estruturas podem ser formadas pela associação dos fosfolípidos. A fase lamelar (Figura 1.4) formada pode ser dispersa em meio aquoso produzindo estruturas secundárias como lipossomas.¹⁵ A ocorrência dessas mesofases em dispersões de fosfolípidos é amplamente documentada e deve-se às características liotrópicas e termotrópicas dessas moléculas.²² Como já comentado, os principais fatores que determinam a ocorrência de uma dada fase são

as interações eletrostáticas, a hidratação da cabeça polar, as repulsões estéricas e as conformações das cadeias alquila. No caso de fase lamelar, as forças que atuam entre duas membranas paralelas envolvem interações de longo alcance de van der Waals e interações de curto alcance de repulsão devido à hidratação, bem como forças eletrostáticas.²³

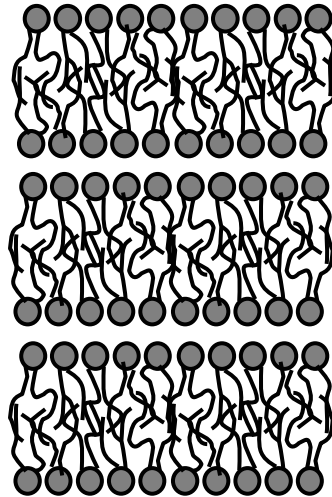


Figura 1.4 Representação esquemática da fase lamelar, um tipo de mesofase observada em organogéis formados por fosfolípidos.

A importância tecnológica das mesofases tem sido explorada, principalmente, mediante incorporação de substâncias ativas a serem estabilizadas no meio dispersante.^{25,26} Essas fases, também denominadas organogéis, apresentam a capacidade de incorporar substâncias com características físico-químicas diversas e são de fácil obtenção em meio aquoso ou orgânico. Os organogéis apresentam características específicas, tais como elevada viscosidade e anisotropia óptica.^{27,28} Além de informações sobre a mesofase, esses sistemas podem ser caracterizados quanto a cristalinidade e a temperatura de transições de fase.²⁵ Além disso, sistemas lamelares planares constituídos de bicamadas fosfolipídicas representam materiais que podem ser aplicados como veículos especiais para liberação tópica de fármacos (antitumorais, anti-inflamatórios, etc).²⁸ Algumas vantagens terapêuticas referem-se ao aumento da permeação de ativos, à capacidade de reposição de lipídeos cutâneos e à hidratação do estrato córneo.

1.1.3.3 Lipossomas

Além de suas diversas aplicações, os organogéis de fosfatidilcolina constituem uma das etapas de obtenção de lipossomas pelo método de evaporação em fase reversa (Figura 1.5).²⁹ As características do organogel intermediário podem ser alteradas mediante a adição de outros componentes com envolvimento nas características finais dos lipossomas.³⁰

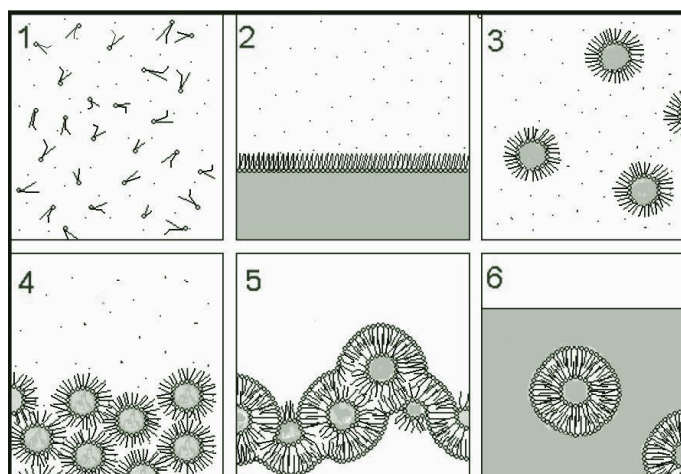


Figura 1.5 Etapas da formação de lipossomas pela técnica de evaporação em fase reversa. 1. dispersão dos fosfolípídeos; 2. adição da fase aquosa; 3. fornecimento de energia e formação de micelas reversas; 4-5. evaporação do solvente orgânico e formação do organogel e 6. hidratação do filme lipídico em água e obtenção de lipossomas.³¹ Adaptado de Mertins, 2008.

Em 1965, um estudo sobre a difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais, realizado por Banghan e colaboradores, deu o impulso necessário para que a comunidade científica despertasse para as potencialidades dos lipossomas. O uso de bicamadas fosfolipídicas como modelos de membranas biológicas na pesquisa básica ganhou aceitação trazendo avanços para o conhecimento de suas propriedades.^{32,33} Esse enfoque foi o motivo das primeiras pesquisas sobre lipossomas, considerando-se que eles podem servir como um protótipo de célula em termos de composição química, proteção do conteúdo e funcionalidade da superfície.³⁴ Os fosfolípídeos são os componentes lipídicos majoritários das membranas biológicas sendo a fosfatidilcolina e a fosfatidiletanolamina os principais representantes em células de mamíferos.¹² Devido às suas características especiais, essas moléculas desempenham papéis importantes na fisiologia celular. Por exemplo, a baixa CMC ($< 1 \mu\text{M}$) dos fosfolípídeos garante a integridade das bicamadas no meio biológico, preponderantemente aquoso. A presença de insaturação em uma das caudas apolares permite que as membranas estejam num estado fluido à temperatura fisiológica ($37 \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$), facilitando que moléculas atravessem a membrana e que proteínas difundam através dela.²⁰ A fosfatidilcolina apresenta tendência de formar fases lamelares em uma ampla faixa de condições, tais como temperatura e grau de hidratação. Essa fase lamelar líquido cristalina apresenta ordem de longo alcance combinada com desordem de curto alcance (que facilita os processos transcelulares). A

presença de outros lipídeos ou de proteínas pode levar à transição para fases hexagonal e cúbica bicontínua, as quais podem representar papéis importantes na dinâmica celular.^{35,36}

Em 1971, Gregory Gregoriadis, propôs a utilização de lipossomas como sistemas de transporte de fármacos. Esse e seus estudos subsequentes tornaram-no o pesquisador expoente no desenvolvimento da área.³⁷ Esse impulso levou ao surgimento de linhas de pesquisa com um enfoque tecnológico. Atualmente existem no mercado diversos produtos que utilizam essa tecnologia, principalmente, visando ao encapsulamento de ativos. Por exemplo, os medicamentos Caelyx[®] da Janssen-Cilag e AmBisome[®] da Astellas Pharma US, apresentam formulação lipossomal objetivando aumentar a atividade e diminuir efeitos tóxicos do antitumoral doxorubicina e do antifúngico anfotericina B, respectivamente.

Lipossoma é uma palavra de origem grega que significa corpo de gordura. Caracteriza-se por uma vesícula esférica com diâmetros que variam de 20 nm até dezenas de micrômetros, formada pelo arranjo concêntrico de uma ou mais bicamadas fosfolipídicas que revestem um núcleo aquoso.³⁸ Os diversos tipos de lipossomas estão representados na Figura 1.6.

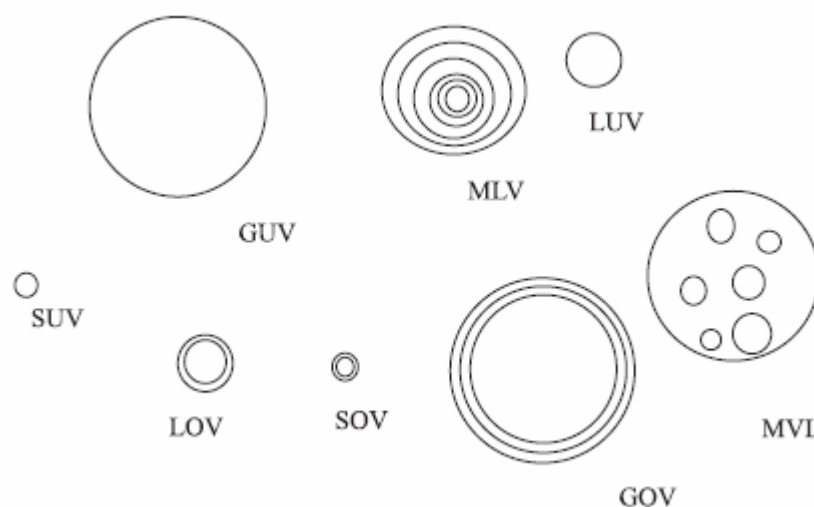


Figura 1.6 Representação esquemática dos diversos tipos de lipossomas. As linhas representam a bicamada fosfolipídica (região lipofílica). As vesículas estão envolvidas por meio aquoso interna e externamente. Vesículas multilamelares (MLV), vesículas unilamelares pequenas (SUV), vesículas unilamelares grandes (LUV), vesículas unilamelares gigantes (GUV), lipossomas multivesiculares (MVL), vesículas oligolamelares pequenas (SOV), vesículas oligolamelares grandes (LOV) e vesículas oligolamelares gigantes (GOV).⁴⁵

Lipossomas multilamelares (MLV – *multilamellar vesicles*), podem ser obtidos mediante a dispersão, em meio aquoso, de filmes fosfolipídicos de fase lamelar ordenada, como acontece com a fosfatidilcolina.^{39,40,41} O fornecimento de energia extra, sob a forma de agitação, ultrassom ou extrusão pode originar lipossomas unilamelares pequenos (SUV – *small unilamellar vesicles*). É possível obter também lipossomas com diversas bicamadas envolvendo um núcleo com solvente, como os lipossomas oligolamelares (OV – *oligolamellar vesicles*) pequenos ou grandes, os lipossomas multivesiculares (MVL – *multivesicular liposomes*), os lipossomas gigantes (GUV – *giant unilamellar vesicles*), cuja escolha dependerá das características do sistema que se deseja obter.³⁷

Os lipossomas unilamelares são mais apropriados para certos estudos, como de permeabilidade. Porém, a maior parte das técnicas de caracterização não pode ser realizada empregando-se membranas isoladas devido à pequena quantidade de matéria. No seu lugar, são utilizados lipossomas multilamelares, nos quais cada bicamada individual apresenta analogia com uma membrana. A correlação entre SUV e MLV é maior em vesículas cujas curvaturas são suficientemente grandes a ponto de gerar densidades de empacotamento similares em cada lado da bicamada.⁴² Porém, devido ao menor tamanho e maior curvatura das SUV, a composição dos lados da bicamada tende a ser diferente para adequar as densidades de empacotamento dos fosfolipídeos. Além disso, SUV e MLV diferem no volume aquoso interno e nas propriedades hidrodinâmicas (difusão, sedimentação).⁴³ Apesar dessas diferenças, um estudo envolvendo ressonância magnética nuclear (RMN), demonstrou haver pouca diferença entre os parâmetros de ordem de SUV e MLV.⁴⁴ A análise da ordem orientacional das cadeias acila das vesículas unilamelares e multilamelares demonstrou similaridade, permitindo a extrapolação das propriedades termodinâmicas nestes dois tipos de sistemas.

Além do tamanho da vesícula e do número de lamelas, estabeleceu-se uma classificação segundo a funcionalidade: lipossomas de primeira geração ou convencionais e lipossomas de segunda geração, com propriedades de superfície alterada. No segundo grupo enquadram-se os lipossomas furtivos, revestidos com polietilenoglicol (PEG), que apresentam atividade biológica diferenciada, levando um tempo maior para serem percebidos pelo o sistema imunológico. Além dessa atividade, verificou-se que a presença de polímeros na superfície aumenta sua estabilidade por impedimento estérico.⁴⁶ Com esse objetivo, outras estratégias foram desenvolvidas, como a utilização de mistura de surfactantes catiônicos e aniônicos, íons metálicos,⁴⁷ polipeptídeos com carga,⁴⁸ polímeros anfifílicos,^{49,50} etc.

A estabilidade dos lipossomas é um requisito crucial, já que se relaciona à habilidade em manter as moléculas encapsuladas e à manutenção da estrutura e da distribuição de tamanho durante um período de tempo hábil e por isso merece alguma atenção.^{45,51} Membranas fluidas, quando não submetidas a estresse, podem permanecer na forma de vesículas fechadas por um longo tempo. No entanto, podem romper-se quando submetidas a tensões geradoras de defeitos ou nanoporos superficiais,⁵² havendo tendência de retorno ao estado de organogel.¹⁵

A falta de estabilidade decorre da elevada energia livre que os lipossomas apresentam quando comparados com o estado agregado ou precipitado, requerendo, desta forma, o fornecimento de energia para sua produção, como por exemplo, através de ultrassom.⁴⁰ Em condições isotérmicas, a energia livre pode ser interpretada como o custo energético ou trabalho mínimo para formar a vesícula.

1.1.3.3.1 Formação e estabilidade de lipossomas

Para que se compreenda a estabilidade dos lipossomas, faz-se necessário apresentar alguns conceitos termodinâmicos, que podem apresentar diferentes níveis de complexidade. Uma forma pictórica de representação deste sistema é através de uma lamela ou membrana que pode ser tratada como um filme elástico (Figura 1.7a).

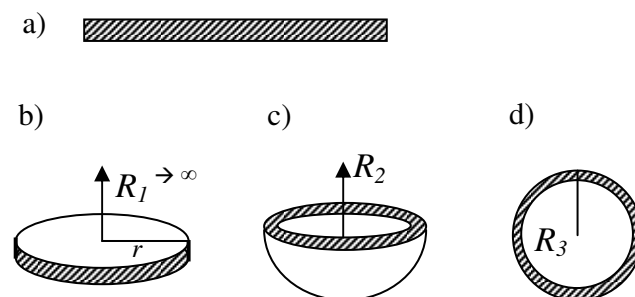


Figura 1.7 Uma membrana planar (a), dividida em discos circulares (b). Os discos podem reduzir a energia das bordas e o raio da curvatura torna-se R_2 (c). O fechamento do disco resulta em um lipossoma com raio R_3 (d).

Essa membrana planar é dividida em discos achatados de raio r . O custo energético por disco, para esse processo chama-se interação de borda (E_b) e origina-se da exposição desfavorável do material hidrofóbico à água.

$$E_b = \gamma \times 2\pi r \quad (1.2)$$

Sendo, γ a interação efetiva da borda na linha de torção. O disco pode reduzir a E_b curvando-se e a energia de interação de borda do disco decresce com o aumento do raio de curvatura (R), de acordo com:

$$E_b = \gamma \times 2\pi r (1 - (r^2 / 4R^2))^{1/2} \quad (1.3)$$

A penalidade energética para o processo de curvatura pode ser calculada usando a expressão de Helfrich para a energia de curvatura *elástica* (E_c) para bicamadas por unidade de área:

$$E_c = \frac{k_c}{2} (c_1 + c_2 + c_0)^2 + k_G (c_1 c_2) \quad (1.4)$$

Sendo k_c e k_G o módulo elástico de curvatura para a deformação cilíndrica e o módulo elástico de Gauss, respectivamente. A curvatura média da superfície é dada por $c_1 + c_2$, a curvatura Gaussiana por $c_1 c_2$ e a curvatura espontânea por c_0 . Para $c_1 = c_2 \equiv (1/R)$ e com $c_0 = 0$, a energia de curvatura total torna-se:

$$E_{curv,tot} = \left[\frac{2k_c}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} \right] \pi r^2 \quad (1.5)$$

Pode haver, estritamente, uma contribuição *inelástica* à energia de curvatura, mas essa contribuição somente torna-se significativa para pequenos valores de r e será, portanto, negligenciada. A expressão resultante para o excesso de energia por disco é:

$$E_{excesso} = \gamma 2\pi r \left(1 - \frac{r^2}{4R^2} \right)^{1/2} + \left[\frac{2k_c}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} \right] \pi r^2 \quad (1.6)$$

Observa-se que quando o lipossoma é formado ($r=2R$), a interação de borda desaparece e o excesso de energia resultante torna-se $8\pi k_c + 4\pi k_G$ independente do raio do lipossoma. Por outro lado, o sistema ganha entropia por cada lipossoma formado sendo que os lipossomas maiores são favorecidos entropicamente. A contribuição de energia de curvatura Gaussiana pode ser negligenciada nessa análise e, dessa forma, o excesso de energia total por lipossoma torna-se $8\pi k_c$. Para fosfolipídeos típicos, k_c é da ordem de 10-50 $k_B T$, ficando claro que os lipossomas são agregados metaestáveis. Salienta-se que as dispersões fosfolipídicas são cineticamente estáveis, o que significa que um longo tempo é requerido para que haja o colapso em uma fase lamelar. De uma maneira geral, pode-se considerar que os lipossomas são estruturas em *quasi-equilíbrio*.⁵³

Hernandez-Zapata e colaboradores (2009)⁵⁴ também demonstraram que a energia livre de formação de vesículas fosfolipídicas a partir de membranas planares depende da competição entre duas contribuições: (i) a energia de curvatura, dada pela teoria de Helfrich - que em última análise considera a área da membrana, o raio e o módulo de curvatura - que contribui para a formação da vesícula e (ii) a energia de borda a qual depende da tensão da margem e do comprimento da membrana planar, contribuindo para a permanência da membrana na forma planar. Foi determinado que há barreira para a formação de vesículas com raios de até 50 nm, porém, para vesículas maiores, a formação seria espontânea. Assim, na maior parte dos casos, a reversibilidade, ou seja, a abertura da vesícula é pouco provável, mesmo que a energia livre a favoreça. A abordagem apresentada é válida para lipossomas unilamelares. Para que possamos compreender as forças envolvidas na formação de lipossomas multilamelares, algumas considerações devem ser feitas.

A estabilidade da maioria dos lipossomas multilamelares tem sido interpretada em termos de flutuações das bicamadas em relação ao seu estado fundamental (Figura 1.8). A abordagem física para o estudo desses sistemas remete à teoria dos cristais líquidos. As bicamadas fosfolipídicas são consideradas como cristais líquidos esméticos onde u descreve o deslocamento do retículo. O vetor u é unidimensional e relaciona-se com o módulo elástico do material. Nesse tipo de sistema, a raiz quadrada do deslocamento é da ordem de décimos da periodicidade básica ($\sqrt{\langle u^2 \rangle} \cong 4 \text{ \AA}$) e a ordem unidimensional é de *quasi*-longo alcance.⁴²

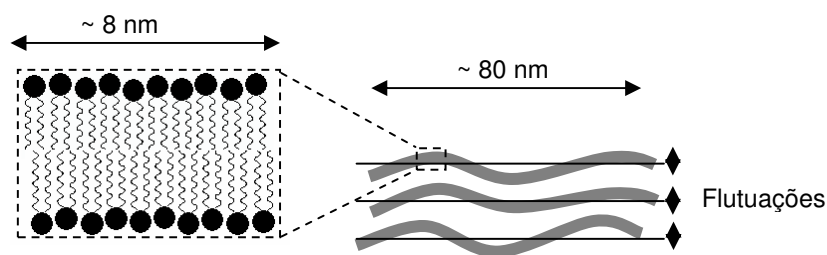


Figura 1.8 Esquema das propriedades locais (esquerda) e globais (direita) das bicamadas. Flutuações da bicamada em relação ao seu estado fundamental.

As flutuações são aumentadas quando um ponto crítico é alcançado através da variação de um parâmetro termodinâmico como a temperatura ou a composição do sistema. Helfrich propôs que flutuações fora do plano induzidas termicamente levam à repulsão entre as membranas por causa do impedimento estérico do sistema multilamelar. Aliás, essas repulsões estéricas, são as interações predominantes associadas com bicamadas

desencontradas de diversos tipos de fases. Essas interações tem sido calculadas para sistemas multilamelares usando a teoria elástica de Landau-de Gennes.⁵⁵

As bicamadas sofrem transições de fase relacionadas à fusão das cadeias carbônicas da bicamada lipídica levando a alterações na distância de repetição, d , que consiste na soma da espessura da bicamada lipídica mais o espaço aquoso entre as bicamadas (Figura 1.9).⁵⁶ A estabilidade dos lipossomas multilamelares pode ser alterada mediante a associação com outras moléculas, que podem alterar tais flutuações.

Além das características estruturais, moléculas adsorvidas aos lipossomas podem alterar suas propriedades superficiais, como a carga eletrostática. Este aspecto afeta a estabilidade dos sistemas coloidais modificando seu comportamento de agregação e floculação. Quanto maior a carga, em módulo, maior será a repulsão das partículas em solução e menor a probabilidade de agregação.

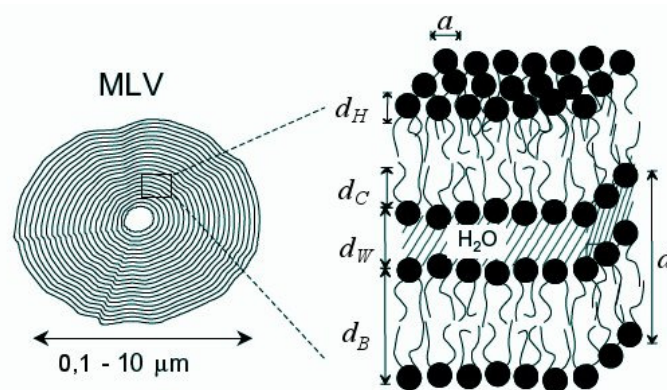


Figura 1.9 Esquema de um lipossoma multilamelar e os parâmetros estruturais distância de repetição d , espessura da camada de água d_W , espessura da bicamada d_B , subdividida em espessura da região polar d_H e da região apolar d_C .⁵⁷

Considerando os aspectos referentes à estabilidade de lipossomas, o segundo objetivo desta tese foi avaliar as propriedades estruturais e superficiais de lipossomas multilamelares após sua associação com polieletrólitos. Os polieletrólitos empregados para tal avaliação foram a quitosana e a condroitina, cujas propriedades serão abordadas no próximo tópico.

1.2 POLIELETRÓLITOS

Polieletrólitos são macromoléculas que apresentam muitos sítios ionizáveis (catiônicos, aniônicos ou anfotéricos) ao longo da cadeia.^{58,59} Podem ser classificados em naturais (DNA, alginato de sódio), naturais modificados (derivados da celulose e da quitina) e sintéticos (ácido poliestireno sulfônico). Exibem propriedades de relevante interesse prático, sendo

empregados industrialmente como espessantes, estabilizantes, floculantes, agentes de revestimento, aglutinantes, etc. Variam em termos de densidade de carga e acidez ou basicidade dos grupos funcionais.⁶⁰ O estudo de polieletrólitos em solução que será apresentado a seguir pode ser feito em maior grau de detalhamento e, para tal, sugere-se algumas referências.^{61,62}

A solubilidade dos polieletrólitos é governada pelas interações hidrofílicas e hidrofóbicas envolvendo as cadeias poliméricas, outras moléculas presentes em solução e o solvente.⁶³ O ordenamento e a conformação das cadeias de polieletrólitos em solução ocorrem em diferentes escalas. Uma forma de facilitar a compreensão dessas interações é desconsiderar os detalhes atômicos do solvente e do polímero. Assim, o solvente é substituído por um contínuo, com constante dielétrica ϵ e viscosidade η_0 , enquanto os contraíons são tratados explicitamente ou como um fundo. No primeiro caso, avalia-se a habilidade desses contraíons interagirem com os sítios ionizáveis das cadeias, estabelecendo interações eletrostáticas de longo alcance. Além dos aspectos moleculares, a conformação da cadeia pode ser assumida em diferentes regimes.⁶¹

Dessa forma, em soluções diluídas (abaixo de 10^{-5} M para polímeros de média massa molar ~ 150 kDa), livres de sais, os polieletrólitos apresentam uma cadeia estendida com regiões de repulsão eletrostática. As interações intracadeia predominam sobre as interações intercadeia. Nesse regime, consideram-se, principalmente, dois aspectos: o grau de polimerização e a fração de grupos ionizáveis ou a densidade de carga. Dentre os modelos empregados na análise de polieletrólitos em soluções diluídas, destacam-se: a) a teoria de Flory que desconsidera as interações de curto alcance e b) a teoria de escala que assume a separação de diferentes escalas de tamanho e o conceito de glóbulos formados por cadeias originando partículas eletrostáticas. Em um solvente *theta*, o tamanho da cadeia é determinado por um balanço entre a elasticidade e a repulsão eletrostática dos monômeros ionizados. Em um bom solvente, os polímeros estão em uma conformação de cadeia estendida. Enquanto que em um solvente pobre, apresentam uma estrutura de contas conectadas por um cordão. Essa estrutura é resultado da otimização eletrostática e das interações hidrofóbicas. A presença de sais, por sua vez, afeta tanto a conformação das cadeias quanto o comprimento de persistência eletrostático que seria a seção da cadeia contendo n ligações.

Em regime semidiluído (abaixo de 10^{-1} M para polímeros de média massa molar ~ 150 kDa), a concentração de polieletrólitos é tal que eles começam a se sobrepor (c^*) e a

principal escala a ser considerada é o comprimento de correlação ζ , que representa a média do tamanho do poro formado pelo entrelaçamento das cadeias poliméricas. Novamente, no caso de polieletrólitos, para o entendimento da conformação das cadeias também importam o grau de polimerização e a densidade de carga efetiva. As descrições para o regime semidiluído passam pelos modelos baseados na teoria de escala que tiveram algum sucesso ao racionalizar o comportamento estático e dinâmico de polieletrólitos sem a adição de sais. O trabalho teórico seminal foi proposto por de Gennes e teve contribuições de Odijk e, mais tarde, de Witten-Pincus. Esses consideram a importância do comprimento de persistência (que no regime semidiluído é afetado pelas flutuações das cadeias adjacentes). As cadeias poliméricas são imaginadas num confinamento dentro de um tubo virtual formado por restrições topológicas devido às cadeias adjacentes. Estas cadeias sofrem reptação, ou seja, deslizam para trás e para frente ao longo do tubo devido ao movimento browniano. O comprimento de persistência de Odijk é muito maior do que o comprimento de correlação em soluções de polieletrólitos. Neste modelo, a cadeia polimérica é forçada a se dobrar enquanto interage com as outras, levando à maior rigidez. Essa rigidez afetaria um parâmetro macroscópico, a viscosidade, proporcionalmente ao quadrado do comprimento da cadeia polimérica. Por outro lado, Dobrynin e colaboradores apresentam um ponto de vista um pouco diferente, no qual consideram a importância do comprimento de correlação e propõem que os polieletrólitos em regime semidiluído apresentariam maior flexibilidade e a viscosidade seria afetada proporcionalmente ao comprimento da cadeia polimérica. No entanto, resultados experimentais demonstraram que a melhor descrição da dependência do comprimento da cadeia sobre a viscosidade é uma função exponencial. Porém, não foi possível determinar se a função para todos os tamanhos de cadeia obedece a uma potência ou uma exponencial.⁶⁴

Se considerarmos a presença de sais nessas soluções, outros cenários são apresentados. Chatellier e Joanny (1996) reportam que há maior previsibilidade para o entendimento da conformação das cadeias de polieletrólitos em presença de concentrações moderadas de sal, pois nessas condições eles comportam-se como polímeros neutros.⁶⁵ Por outro lado, soluções de polieletrólitos sem sal são sistemas físicos de difícil compreensão por causa das forças eletrostáticas de longo alcance e do seu acoplamento com a conformação de poli-íons. Além disso, há muita diferença entre as conformações dos polieletrólitos em soluções diluídas e concentradas. De uma maneira geral, pode-se considerar que, em soluções livres de sal e em

altas concentrações de polieletrólitos, estes assumem a conformação de cadeia aleatória e que a pressão osmótica torna-se fortemente dependente desta concentração.⁶⁶

Em concentrações elevadas, os polieletrólitos formam hidrogéis viscosos, ou seja, redes de polímeros intumescidos ligados transversalmente em um líquido, sensíveis ao pH e que podem gerar estruturas tridimensionais.⁶⁷ Durante a década de 70, um grande avanço no conhecimento do comportamento de géis formados por polieletrólitos foi realizado por Tanaka através da descoberta do comportamento de transição de fase.⁶⁸ Foi constatado que a transição de cadeia estendida para glóbulo colapsado é descontínua, similar ao que ocorre numa transição de gás para líquido. Os estímulos responsáveis pela transição podem ser de diferentes origens. Existem, por exemplo, géis sensíveis à luz, nos quais o estímulo deve-se ao efeito de fotoionização. Alguns géis, como os termossensíveis, apresentam apelo na área de liberação de ativos farmacológicos, uma vez que locais inflamados tendem a apresentar temperatura superior a outros locais do corpo. Outros, por sua vez, são sensíveis à composição do solvente, à força iônica, ao pH e até mesmo ao campo elétrico. A Tabela 1.4 sumariza os diversos aspectos físico-químicos que influenciam as propriedades de polieletrólitos em solução.

Tabela 1.4 Propriedades físico-químicas que influenciam a solubilidade de polieletrólitos.

Tipo de interação	Propriedades
Interações intra e intermoleculares (polímero-polímero)	Peso molecular, grau de polimerização, comprimentos de persistência e de correlação, concentração, rigidez da cadeia, tipo de solvente, temperatura e composição.
Interações intermoleculares (polímero-solvente e/ou polímero-sal)	Constante dielétrica do solvente, pH, força iônica, presença de surfactante, estrutura química e densidade de carga dos contra-íons, estequiometria dos contra-íons, tipos de grupos ionizáveis, temperatura e composição do meio no qual o polímero está disperso.

Muitos esforços teóricos e experimentais têm sido feitos nas últimas décadas para entender a origem dos domínios presentes em soluções de polieletrólitos diluídas e

semidiluídas e dos fenômenos de ligações entre contraíons. Uma leitura mais atenta pode ser feita revisando-se alguns trabalhos.^{69,70,71}

1.2.1 Aplicação tecnológica de polieletrólitos

A aplicação mais usual dos polieletrólitos é como agentes de viscosidade em produtos alimentares, cosméticos e farmacêuticos. Porém, sua utilização em sistemas complexos como os denominados géis inteligentes - que sofrem alterações dependentes de um estímulo externo - representam um progresso na área de biomateriais.⁷² Além do emprego isolado desses polímeros, a formação de complexos com moléculas de carga oposta permite a utilização dos polieletrólitos em uma série de processos como a separação de proteínas ou a confecção de membranas de filtração e de resinas de troca para o tratamento de água. Da mesma forma, é possível empregar essas propriedades na obtenção de suportes para a imobilização de células e enzimas,⁶⁰ no desenvolvimento de produtos alimentícios avançados⁷³ ou ainda como materiais para encapsular fármacos visando liberação controlada.⁶⁰

Estes complexos podem ser utilizados na produção de sistemas particulados coloidais compósitos. A produção de partículas formadas por matrizes de polímeros aniônicos e catiônicos é uma estratégia bem sucedida (Figura 1.10 A). As forças que regem a atração dos polímeros de carga oposta são de natureza Coulômbica e intermolecular como a ligação de hidrogênio, van der Waals, hidrofóbica e de dipolos.⁷⁴ As interações eletrostáticas entre os grupos ionizáveis levam à formação de estruturas supramoleculares.⁷⁵ Adicionalmente, as partículas podem ser formadas pela associação dos polieletrólitos com estruturas pré-formadas, sendo adsorvidos à superfície de núcleos inorgânicos (ouro, sílica), poliméricos (polietilenimina), lipídicos (triglicerídeos, óleos saturados ou insaturados) ou tensoativos (emulsões, micelas e lipossomas), promovendo a estabilização estérica e eletrostática (Figura 1.10 B e C).⁶⁰

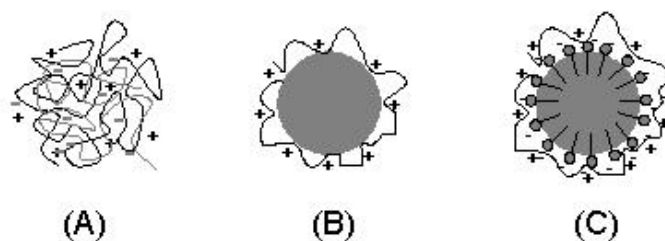


Figura 1.10 Sistemas nanoparticulados formados por polieletrólitos com cargas opostas (A), por polieletrólitos envolvendo núcleo inorgânico, polimérico ou lipídico (B) e com tensoativos (C).

As propriedades dos complexos envolvendo polieletrólitos também podem ser aplicadas na estabilização e modulação das características estruturais e de superfície de sistemas mais complexos, como os lipossomas multilamelares (Figura 1.11).^{76,77} Quando um polieletrólito é adsorvido sobre um lipossoma, a superfície deste é estabilizada eletrostaticamente. Além disso, quanto mais alta a carga, em valor absoluto, maior será a repulsão das partículas e, conseqüentemente, a estabilidade será aumentada.⁶⁰

Adicionalmente, o potencial elétrico da partícula desempenha um papel nos processos biofísico-químicos nas biointerfaces. É necessário controlar a carga das partículas a serem empregadas, especialmente aquelas envolvendo densidades catiônicas devido à forte interação que apresentam com os resíduos negativamente carregados, presentes na superfície celular. Estas interações são responsáveis pela bioadesão, mas podem comprometer a integridade das membranas celulares, potencialmente levando à formação de poros, rompimento das membranas e/ou citotoxicidade.⁷⁸

Além da aplicação em partículas, outra utilização tecnológica dos polieletrólitos na área biomédica é através da produção de filmes para serem empregados como curativos, sistemas de liberação de ativos ou como tecidos sintéticos.^{79,80,81} O uso de polieletrólitos como biomateriais deve-se à sua similaridade com as moléculas que formam a matriz extracelular (glucosaminoglicanas, proteínas, glicoproteínas) e à formação de complexos estáveis com estas moléculas.⁷⁹

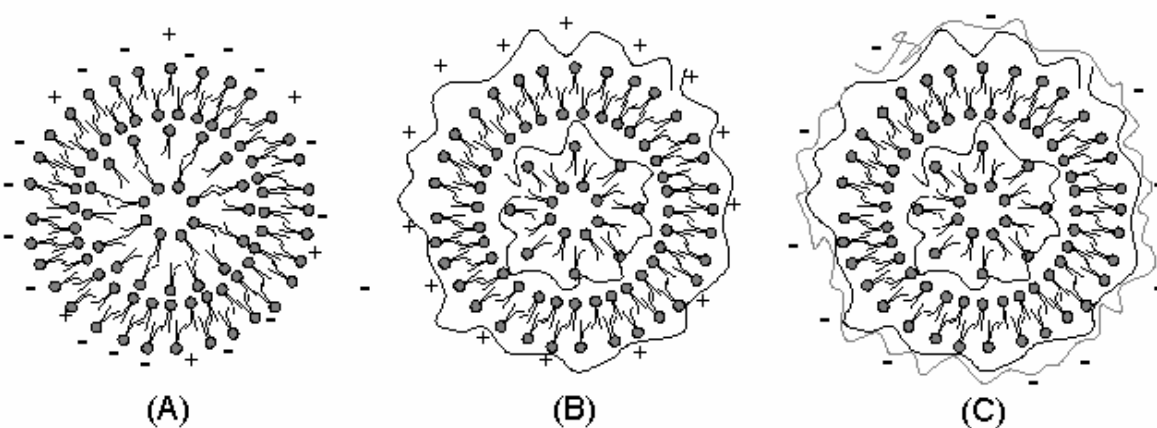


Figura 1.11 Estruturas típicas de um lipossoma multilamelar (A), um lipossoma estabilizado por um polieletrólito de carga oposta interna e externamente (B) e estabilizado por um complexo de polieletrólitos externamente (C).

O desenvolvimento de suportes, também denominados *scaffolds*, que funcionam como arcabouço para o crescimento celular, pode ser feito empregando-se polieletrólitos. Esses

suportes podem ser obtidos através da secagem e moldagem de géis hidrocoloidais. Os filmes oriundos podem ser aprimorados através da incorporação de elementos à matriz polimérica, permitindo a modulação das propriedades funcionais.⁸²

1.2.2 Quitosana

A quitosana (Figura 1.12) é um polissacarídeo *N*-desacetilado, derivado da quitina, um co-polímero aleatório da β -(1 \rightarrow 4)-D-glucosamina e da β -(1 \rightarrow 4)-*N*-acetil-D-glucosamina. Ele apresenta biodegradabilidade, biocompatibilidade e mucoadesividade. A quitosana é o único polímero catiônico natural modificado empregado como agente quelante e para remoção de proteínas.^{83,84}

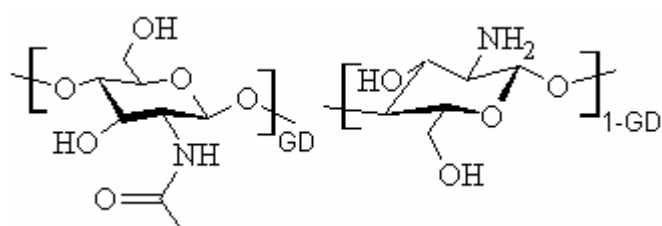


Figura 1.12 Estrutura química da quitosana parcialmente desacetilada, um co-polímero caracterizado pelo seu grau de desacetilação (GD).

As propriedades da quitosana variam em função do peso molecular, do índice de polidispersão e do grau de desacetilação. O peso molecular varia entre 30 e 900 kDa e o grau de desacetilação acima de 50% denota solubilidade em meio aquoso acidificado. Comercialmente é possível encontrar quitosana com grau de desacetilação entre 70% e 90%.⁸⁵ A densidade de carga ao longo da cadeia aumenta com o aumento do GD e a flexibilidade também é influenciada por esse parâmetro.⁸⁶ Uma limitação ao estudo e compreensão das propriedades de sistemas baseados em quitosana é separar os papéis do peso molecular e da distribuição dos resíduos de glucosamina e de *N*-acetilglucosamina, cuja variabilidade pode causar discrepância entre os resultados obtidos para diferentes amostras. Os resíduos *N*-acetilados desempenham um papel importante, induzindo a rigidez das cadeias poliméricas e aumentando o pK_a . O comprimento de persistência depende fracamente do GD e a quitosana é assumida como um polímero semirrígido.⁸⁴

A quitosana é solúvel somente em meio ácido, notadamente pH abaixo de 5,5.⁸⁵ Em soluções ácidas, os grupos amino estão protonados. Assim, a fração de grupos amino livres é um parâmetro chave para entender os mecanismos e controlar o processo de produção de materiais como ligantes de proteínas, metais e liberação de ativos.⁸⁷ A conformação em

solução depende, como já mencionado, do número de grupos amino acessíveis, ou seja, da distribuição dos resíduos que constituem as cadeias, do grau de acetilação/desacetilação, da massa molecular e de parâmetros externos como força iônica, pH, temperatura. Domard (1987) propôs o valor de $pK_a = 6,5$ para a quitosana e que o número de grupos ionizáveis seria independente do grau de desacetilação.⁸⁸ Outros autores, no entanto, expandiram o valor para faixas de 6,1 a 7,0 e observaram que o pK_a pode variar drasticamente, dependendo do grau de dissociação (α) e do GD. Tanto Sorlier (2001) quanto Wang (2006) determinaram as constantes de dissociação para a quitosana com diferentes massas moleculares e graus de desacetilação.^{89,90} Verificaram que para quitosanas com grau de desacetilação acima de 72%, a constante de dissociação dependeu apenas a quantidade total de grupos glucosamina. Além disso, observaram que quando α tendeu a zero, o pK_a aumentou linearmente com o grau de desacetilação. Ainda, para quitosana com média massa molecular (150 kDa) e em torno de 85% de desacetilação (características mesmas do polímero empregado neste trabalho) verificaram que, em pH 4,5 o valor de α foi próximo a zero e, em pH 5,5 o valor de α foi de 0,2.

Devido a todas as variáveis que influenciam na solubilização da quitosana, diversas abordagens têm sido feitas objetivando aumentar a sua solubilidade aquosa ao longo das faixas de pH, especialmente no pH fisiológico (pH 7,4 para sangue e fluidos). Algumas sínteses conduziram a estruturas como a *N*-succinilquitosana,⁹¹ *N*-carboximetilquitosana⁹² e *N*-carboxibutilquitosana.⁹³ Essas novas moléculas têm aplicação no campo biomédico por causa da sua solubilidade em condições fisiológicas. Esse polissacarídeo, sozinho ou combinado com outros materiais pode ser transformado em diversas formas físicas como hidrogéis,⁹⁴ filmes,⁹⁵ nanopartículas,⁹⁶ e fibras.⁹⁷

O uso de polieletrólitos de origem natural para produzir novos materiais é interessante devido ao baixo impacto ambiental. A quitosana é um bom exemplo dessa premissa por causa da sua origem. A quitina, fonte tradicionalmente comercializada de quitosana provém de cascas de camarão que são descartados após o processamento de produtos marinhos.⁹⁸ Devido à propriedade catiônica da quitosana, ela pode ser empregada como plataforma para formulação de biomateriais quando associada a estruturas aniônicas. No entanto, cabe lembrar que, sendo um material de origem biológica, apresenta variabilidade intrínseca, a qual deve ser considerada durante sua utilização.

Explorando as propriedades de polieletrólito da quitosana, diversos tipos de materiais compósitos têm sido produzidos, como por exemplo, nanoesferas de quitosana-Au,⁹⁹

nanopartículas de quitosana-Fe₃O₄¹⁰⁰ e membranas híbridas de sílica-quitosana.¹⁰¹ Também compósitos orgânicos, formados por partículas de quitosana e nanotubos de carbono,¹⁰² bem como complexos de quitosana-DNA^{103,104} e -RNA.^{103, 105} Tais materiais têm sido usados como aditivos na produção de plásticos, como matrizes para liberação de fármacos, biosensores, etc, cobrindo diversas áreas da biomedicina, alimentos e agricultura. Também podem ser encontradas algumas patentes que requerem a produção de nanopartículas feitas de quitosana associada com tripolifosfato polietilenoglicol,¹⁰⁶ visando aplicação em: a) liberação sustentada de ativos b) mucoadesividade,¹⁰⁷ com emprego em sistemas de liberação de fármacos e ativos cosméticos.^{106, 107}

1.2.3 Condroitina

A condroitina foi isolada a partir de tecido cartilaginoso em 1884, mas sua estrutura foi descrita por Levene em 1925. É uma glucosaminoglicana cuja estrutura apresenta uma cadeia polissacarídica linear com unidades dissacarídicas (uma hexosamina e um ácido hexurônico) e um éster sulfonato, apresentando grupos carregados negativamente que podem estar na forma de sais sódicos.^{74,108,109} A unidade de repetição da condroitina é composta pelo ácido 4-D-glucurônico e pela 3-*N*-acetil-D-galactosamina com ligações β1. O grupamento sulfato pode estar presente nas posições C4 ou C6 da unidade *N*-acetil-D-galactosamina, descrevendo, respectivamente os sulfatos de condroitina A e C, como pode ser visualizado na Figura 1.13.¹¹⁰ Essa glucosaminoglicana é um componente estrutural importante do tecido conectivo e cartilaginoso associado com proteínas como parte de uma proteoglicana.¹⁰⁹

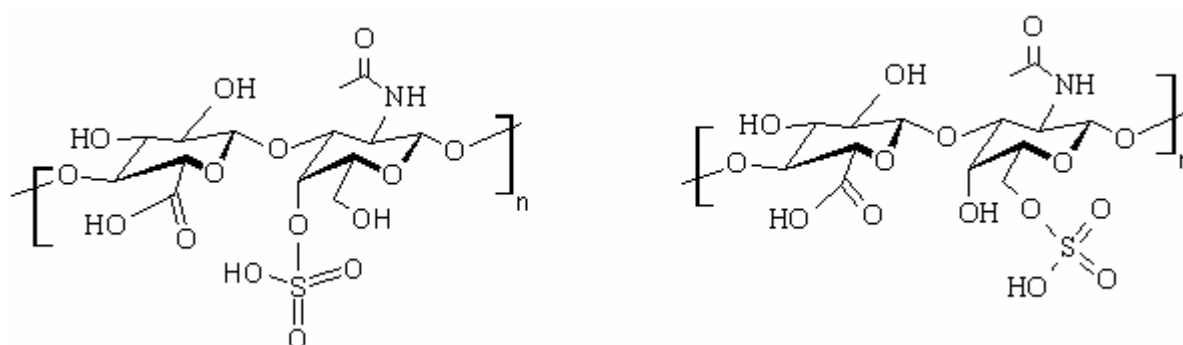


Figura 1.13 Estrutura química do sulfato de condroitina com o grupamento sulfato em C4 (tipo A) e C6 (tipo C).

Comercialmente, a condroitina é obtida a partir de muitas fontes, como por exemplo, de organismos marinhos, tubarão, cartilagem de baleia, suína ou bovina. Quando isolada de mamíferos pode apresentar pesos moleculares variando entre 10 e 50 kDa.¹⁰⁹ Apesar de alguns estudos demonstrarem que as formas com baixos pesos moleculares, abaixo de 15 kDa

apresentam absorção superior pelo trato gastrointestinal, é possível encontrar condroitina com pesos moleculares de até 100 kDa disponíveis comercialmente.¹¹¹

Na condroitina, os grupos ácido glicurônico, galactosamina, ácido carboxílico e ácido sulfônico estão em quantidades equimolares. A unidade básica apresenta massa molar de 456 g/mol contendo duas cargas negativas em pH 5,5 (pH de interesse para os estudos realizados neste trabalho) sendo que o pK_a dos grupamentos sulfônicos é 2,6 e dos grupamentos carboxílicos é 4,6.¹¹²

Apesar de alguns estudos controversos, a maioria deles mostra efeitos positivos do uso de condroitina no tratamento de condições patológicas das articulações, como osteoartrite. O uso desta glucosamina como suplemento nutricional pode garantir proteção ao tecido cartilaginoso e sinovial.¹¹³ Estudos clínicos demonstraram que a condroitina administrada oralmente diminuiu os sintomas de osteoartrite no joelho, melhorou a mobilidade e reduziu a dor após uso contínuo.¹¹⁴ Adicionalmente, a condroitina apresenta atividades anti-inflamatórias, de regulação do metabolismo condrocítico pela estimulação da síntese de colágeno e proteoglicanas, além da inibição da síntese de citocinas envolvidas na degradação da cartilagem.¹¹⁵ Por causa desses benefícios, também tem sido utilizada comercialmente para fins cosméticos, em cremes hidratantes. No International Nomenclature of Cosmetic Ingredients (INCI) é categorizada como agente antiestático e condicionante para produtos capilares.¹¹⁶

Produtos patenteados contendo condroitina incluem o Viscoat[®], uma solução viscoelástica usada no auxílio cirúrgico da extração de catarata e em implante de lentes intraoculares (Alcon, Duovisc[®]),¹¹⁷ o suporte para regeneração dérmica Integra[®], dispositivo formado por colágeno e condroitina sobre uma camada “epidérmica” de silicone, aprovado pela FDA como substituto da pele no tratamento de queimados.¹¹⁸

Existem dezenas de estudos envolvendo a combinação de condroitina com polímeros para serem empregados como biomateriais para engenharia de tecidos, principalmente nas formas de géis,¹¹⁹ filmes¹²⁰ e *scaffolds*.¹²¹ Esse material apresenta como vantagem a biocompatibilidade e a biodegradabilidade.¹⁰⁹ A produção de nanopartículas a partir de complexos polieletrólíticos pode ser feita a partir de soluções de polímeros de carga oposta (catiônicos e aniônicos). As partículas obtidas a partir dessa associação são consideradas estáveis.^{74,75}

Sistemas de liberação de fármacos de condroitina têm sido estudados objetivando, por exemplo, nanopartículas dendríticas polipeptídicas contendo o agente antimalárico artemeter.¹²² Ampliando o emprego da condroitina, Vercruysse et al. (2007) usaram-na como matriz para produção de nanopartículas de ouro, prata, paládio e ródio, as quais mostraram algumas novas características espectroscópicas na região UV-Vis.¹²³

1.3 OBJETIVO GERAL

- Preparar e avaliar as estruturas formadas pela associação entre a fosfatidilcolina e os polieletrólitos quitosana e condroitina a fim de empregá-las para promover a alteração das propriedades de géis e filmes visando aplicações cosméticas e biomédicas.

1.3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar através de técnicas de espalhamento de luz e de espalhamento de raios-X em baixos ângulos as estruturas formadas pela combinação da fosfatidilcolina com o polieletrólito quitosana, em meio orgânico.
- Investigar as propriedades estruturais e superficiais de lipossomas multilamelares após sua associação com quitosana e condroitina através de técnicas de espalhamento de luz, espalhamento de raios-X em baixos ângulos e medidas de potencial ζ .
- Desenvolver géis de quitosana contendo lipossomas multilamelares compósitos e avaliar o seu efeito sobre a viscosidade.
- Desenvolver filmes de quitosana contendo lipossomas multilamelares compósitos e caracterizá-los através de técnicas de inchamento, calorimetria exploratória diferencial, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia infravermelho e adesão celular.

1.4 REFERÊNCIAS

1. Gregory, W. *Handbook of Organic Chemistry*, 4 ed., Walton and Maberly, London, 1856, p. 282-283.
2. Thudichum, J. L. W. *Treatise on the chemical constitution of the brain*. Baillière, Tindall & Cox, London, 1884.
3. Baumann, A. *Biochem. Z.* **1913**, 54, 30-39.
4. Renall, M. H. *Biochem. Z.* **1913**, 55, 296-300.
5. Chibnall, A. C. *Biochem. J.* **1927**, 21, 233-246.
6. Feulgen, R. Z. *Physiol. Chem.* **1939**, 260, 217-245.
7. Folch, J. *J. Biol. Chem.* **1949**, 177, 497-505.
8. Pangborn, M.C. *J. Biol. Chem.* **1944**, 153, 343-348.
9. Folch, J. *J. Biol. Chem.* **1942**, 146, 35-44.
10. Thannhauser, S. J.; Setz, P. *J. Biol. Chem.* **1936**, 116, 527-531.
11. Wagner H.; Hoerhammer, L.; Wolff, P. *Biochem. Z.* **1961**, 334, 175-184.
12. Loura, L. M., Almeida, R. F. M. *Tópicos em Biofísica de Membranas*. Lidel, Lisboa, 2004, p. 9-11.
13. Hanahan, D. J. *A Guide to Phospholipid Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1997, p. 5-16.
14. Cevc, G. *Handbook of Phospholipids*. New York Marcel Dekker, 1993.
15. Zana, R. *Dynamics of surfactant self-assemblies: micellas, microemulsions, vesicles and lyotropic phases*. Taylor & Francys Group, Boca Raton, 2005.
16. Tanford, C. *J. Phys. Chem.* **1972**, 76, 21, 3020-3024.
17. Seeling, J.; Macdonald, P. M.; Scherer, P. G. Phospholipid headgroup as sensors of electric charges in membranes. *Biochemistry*, **1987**, 26(24), 7535-7541.
18. Sinko, P. J. *Martin: Físico-farmácia e ciências farmacêuticas*. 5. ed. Porto Alegre, Artmed, 2008.
19. Atkins P.; de Paula, J. *Físico-química biológica*. Rio de Janeiro: LCT, 2008.
20. Israelachvili, J. N. *Intermolecular and Surface Forces*. London, Academic Press, 1992.
21. Walde, P.; Giuliani, A. M.; Boicelli, C. A.; Luisi, P. L. *Chem. Phys. Lip.* **1990**, 53 (4), 265-288.
22. Fujiwara, F. Y.; Reeves, L. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, 98(22).
23. Tiddy, G. J. T. *Phys. Rep.* **1980** 57(1), 1-46.

24. Cavalcanti, L. P. *Estudo estrutural de membranas modelo usando radiação síncrotron*. Tese de doutorado, Unicamp, Campinas, 2001.
25. Müller-Goymann, C. C. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 58, 343-356.
26. Gupta, R.; Muralidhara, H. S.; Davis, H. T. *Langmuir*, **2001**, 17, 5176-5183.
27. Formariz, T.P.; Urban, M. C. C.; Silva, A. A.; Gremião, M. A. D.; Oliveira, A. G. *Braz. J. Pharm. Sci.* **2005**, 41 (3).
28. Kumar, R.; Katare, O. P. *AAPS PharmSci.* **2005**, 6 (2), 298-310.
29. Szoka, F.; Papahadjopoulos, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1978**, 78, 4194-4198.
30. Mertins, O.; Silveira, N. P.; Pohlmann, A. R.; Schröder, A. P.; Marques, C. M. *Biophys. J.* **2009**, 96, 2719-2726.
31. Mertins, O. *Estudos físico-químicos e estruturais de lipossomas compósitos de fosfatidilcolina e quitosana*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008, Tese de Doutorado.
32. Papahadjopoulos, D.; Bangham, A. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1996**, 126, 185-188.
33. Indiveri, C. *Chapter 5. Studying Amino Acid Transport Using Liposomes*. In: Weissig, V. *Liposomes Methods and Protocols. Biological Membranes Models*. Humana Press: New York, 2010, p. 55-68.
34. Santana, M. H. A.; Oliveira, M. C.; Gremião, M. P. *Lipossomas*. In: Duran, N.; Mattoso, L. H. C.; Morais, P. C. *Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. São Paulo: Artliber Editora, 2006.
35. Seddon, J. M.; Robins, J.; Gulik-Krzywicki; Delacroix H. *Chem. Chem.* **2000**, 2, 4485-4493.
36. Andersson, S.; Hyde, S. T.; Larsson, K.; Lidin, S. *Chem. Rev.* **1988**, 88, 221-242.
37. Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. *Quim. Nova* **2002**, 25 (6B) 1181-1185.
38. Taylor, K. M. P.; Morris, R. M. *Termochim. Acta* **1995** 248 (2) 289-301.
39. Lee, J-H.; Gustin, J. P.; Chen, T.; Payne, G. F.; Raghavan, S. R. *Langmuir* **2005**, 21, 26-33.
40. Lasic, D. D. *Biochem. J.* **1988**, 256 (1), 1-11.
41. Lasic, D. D. *Tibtech* **1998**, 16 207-321.
42. De Gennes, P. G.; Prost, J. *The Physics of Liquid Crystals*. 2 ed. Clarendon Press, Oxford, 1993.
43. Brunner, J.; Skrabal, P.; Hauser, H. *Biochim. Biophys. Acta.* **1976**, 455, 322-331.
44. Fenske, D. B.; Cullis, P. R. *Biophys. J.* **1993**, 64, 1482-1491.

45. Frézard, F. Liposomes: from biophysics to the desing of peptide vaccines. *Braz. J. Méd. Biol. Res.* **1999**, 32(2)181-189.
46. Lasic, D. D. *Applications of liposomes*. In: Lipowsky, R.; Sackmann, E. *Handbook of Biological Physics*. V. 1 Elsevier:New York, 1995.
47. Lindén, M. V.; Wiedmer, S. K.; Hakala, R. M. S.; Riekolla, M-L. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1051, 61-68.
48. Volodkin, D.; Ball, V.; Schaaf, P.; Voegel, J-C.; Mohwald, H. *Biochim. Biophys. Acta*, **2007**, 1768 (2) 280-290.
49. Garbuzenko, O.; Berenholz, Y.; Prieve, A. *Chem. Phys. Lipids*, **2005**, 135 (2), 117-129.
50. Rizos, A.; Tsikalas, I.; Tsatsakis, A. M.; Shtilman, M. I.; *J. Non-Cryst. Solids*, **2006**, 5055-5059.
51. Casals, E.; Galan, A. M.; Escolar, G.; Gallardo, M.; Estelrich, J. *Chem. Phys. Lipid.* **2003**, 125 (2), 139-146.
52. Evans, E.; Heinrich, V. *C. R. Physique*, **2003**, 4 (265), 274.
53. Johnsson, M. Sterically stabilised liposomes and related lipid aggregates. Uppsala University, Uppsala, 2001. Tese de doutorado.
54. Hernandez-Zapata, E.; Martinez-Balbuena, L.; Santamaría-Holek, I. *J. Biol. Phys.* **2009**, 35, 297-308.
55. Safinya, C.R.; Roux, D.; Smith, S.S.; Sinha, S.K.; Dimon, P.; Clark, N.A.; Bellocq, A.M. *Rev. Lett.* **1986**, 57(21), 2718-2721.
56. Zhang, R. Sun, W.; Tristram-Nagle, S.; Headrick, R. L.; Suter, R. M.; Nagle, J. F. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, 74 (14), 2832-2835.
57. Pabst, G. *Bioph. Rev. Lett.* **2006**, 1, 57-84.
58. Denuziere, A.; Ferrier, D.; Domard, A. *Carbohydr. Polym.* **1996**, 29,317-323.
59. Shen, Y.; Li, Q.; Tu, J.; Zhu, J, *Carbohydr. Polym.* **2009**, 77, 95-104.
60. Koetz, J.; Kosmella, S. *Polyelectrolytes and Nanoparticles*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2007.
61. Dobrynin, A. V.; Rubinstein, M. *Prog. Polym. Sci.* **2005**, 30, 1049-1118.
62. Harland, R. S.; Prud'homme, R. K. *Polyelectrolyte gels. Properties, preparation, and applications*. American Chemical Society, Washington, DC, 1992.
63. Popa-Nita, S.; Rochas, C.; David, L.; Domard, A. *Langmuir* **2009**, 25(11).
64. Krause, W. E.; Tan, J. S.; Colby, R. H. *J. Polym. Sci.: Part B: Polym. Phys.* **1999**, 37, 3429-3437.
65. Chatelier, X.; Joanny, J-F *J. Phys. II France* **1996**, 6, 1669-1686.

66. Wang L.; Bloomfield, V. A. *Macromolecules* **1990**, 23, 804-809.
67. Brannon-Peppas, L.; Peppas, N. A. *Chem. Eng. Sci.* **1991**, 46, 715-722.
68. Tanaka, T.; Fillmore, D.; Sun, S-T.; Nishio, I.; Swislow, G.; Sha, A. *Phys. Rev. Lett.* **1980**, 45, 1636-1639.
69. Hara, M. *Polyelectrolytes: Science and Technology*. Marcel Dekker: New York, 1993.
70. Radeva, T. *Physical Chemistry of Polyelectrolytes*, Marcel Dekker: New York, 2001.
71. Rinaudo, M.; Quemeneur, F.; Pépin-Donat, B. *Macromol. Symp.* **2009**, 278, 67–79.
72. Chaterji, S.; Kwon, I. K.; Park, K. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 1083-1122.
73. Goycolea, F. M.; Arguelles-Monal, W.; Peniche, C.; Higuera-Ciapara, I. In: Doxastakis, G.; Kiosseoglou, V. *Novel Macromolecules in Food Systems*, Elsevier:Thessaloniki, 2000, p. 287-300.
74. Piaí, J. F.; Rubira, A.F.; Muniz, E.C. *Acta Biomat.* **2009**, 5, 2601-2609.
75. Volpi, N. *Curr. Med. Chem.* **2005**, 4, 221–234.
76. Mertins, O.; Sebben, M.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. *Chem. Phys. Lipids* **2005**, 138, 29-37.
77. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*, **2008**; 9, 2237-2243.
78. Nel, A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasudaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nature Mater.* **2009**, 8, 543-557.
79. Kirker, K.R.; Luo, Y.; Harte Nielson, J. H.; Shelby, J.; Prestwich, G. D. *Biomaterials* **2002**, 23, 3661-3671.
80. Nair, L.S.; Laurencini, C.T. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 762–798.
81. Thein-Han, W.W.; Saikhun, J.; Pholpramroo, C.; Misra, R. D. K.; Kitiyanant, Y. *Acta Biomat.* **2009**, 5, 3453-3466.
82. Ma, Z.; Mao, Z.; Gao, C. *Colloids Surf B Biointerfaces* **2007**, 60, 137-157.
83. Ravi Kumar, N. M. V. *React. Funct. Polym.* **2000**, 46,1-27.
84. Rinaudo, M. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, 603-632.
85. Canella, K. M. N. C.; Garcia, R. B. *Quim Nova* **2001**, 24 (1), 13-17.
86. Nystrom, B.; Kjoniksen, A-L.; Iversen, C. *Adv. Colloid. Interface Sci.* **1999**, 79, 81-103.
87. Guzey, D.; McClements, D. J. *Food Hydrocolloid.* **2006**, 20, 124-131.
88. Domard, A. *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, 9(2), 98-104.
89. Sorlier, P.; Denuzière, A.; Viton, C.; Domard, A. *Biomacromolecules*, **2001**, 2(3), 765-772.
90. Wang, Q. Z.; Chen, X. G.; Liu, N.; Wang, S. X.; Liu, C. S.; Meng, X. H.; Liu, C. G. *Carbohydr. Polym.* **2006**, 65(2), 194-201.

91. Sashiwa, H.; Shigemasa, Y.; *Carbohydr. Polym.* **1999**, 39, 127-138.
92. Baumann, H.; Faust, V.; *Carbohydr. Res.* **2001**, 331, 43-57.
93. Muzzarelli, R.; Wecky, M.; Filippini, O.; Lough, C.; *Carbohydr. Polym.* **1989**, 11, 307-320.
94. Chenite, A.; Buschmann, M.; Wang, D.; Chaput, C.; Kandani, N. *Carbohydr. Polym.* **2001**, 46, 39-47.
95. Murray, C. A.; Dutcher, J. R. *Biomacromolecules* **2006**, 7, 3460-3465.
96. Wu, Y.; Yang, W.; Wang, C.; Hu, J.; Fu, S. *Int. J. Pharm.* **2005**, 295, 235-245.
97. Huang, X-J.; Ge, D.; Xu, Z-K. *Eur. Polym. J.* **2007**, 43, 3710-3718.
98. Teng, W. L.; Khor, E.; Tan, T. K.; Lim, L. Y.; Tan, S. C. *Carbohydr. Res.* **2001**, 332, 305-316.
99. Guo, R.; Zhang, L.; Zhu, Z.; Jiang, X. *Langmuir* **2008**, 24, 3459-3464.
100. Fan, C. L.; Li, W.; Zhao, S. J.; Chen, J.; Li, X. *Mater. Lett.* **2008**, 62 (20), 3518-3520.
- Gobley, M. *J. Pharm. Chim.* **1874**, 19, 346.
101. Wang, S.; Tan, Y.; Zhao, D.; Liu, G. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 1781-1787.
102. Baek, S-H.; Kim, B.; Suh, K-D. *Col. Surf. A* **2008**, 316, 292-296.
103. Roy, K.; Mao, H-K.; Huang, S-K.; Leong, K. W. *Nature Med.* **1999**, 5(4), 387-391.
104. Alatorre-Meda, M.; Taboada, P.; Sabin, J.; Krajewska, B.; Varela, L. M.; Rodriguez, J. R. *Col. Surf. A* **2009**, 339, 145-152.
105. Mao, S.; Sun, W.; Kissel, T. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, 62, 12-27.
106. Janes, K.; Fernandez, M. J. A.; Cesaba, N. 2006 PCT ES2006000123; (2006) WO2006/097558de and (2010)PI0608735-7.
107. Da Silva, C. F.; Martins, F.; Santana, M. H. A. 2008, PI0705072-OA2.
108. Chen, Y-L.; Lee, H. P.; Chan, H. Y.; Sung, L-Y.; Chen, H-C.; Hu, Y-C. *Biomaterials* **2007**, 28, 2294-2305.
109. Volpi N, *Chondroitin Sulfate: Structure, role and pharmacological activity*. Academic Press, San Diego, 2006.
110. Lamari, F. N., Karamanos, N. K. *Structure of Chondroitin Sulfate*. In: *Advances of Pharmacology* v. 53, 2006.
111. Adebowale, A. O.; Cox, D. S.; Liang, Z.; Eddington, N. D. *J. Am. Nutraceutical Assoc.* **2000**, 3, 37-44.
112. Larsson, B.; Nilsson, M.; Tjalve, H. *Carbohydr. Polym.* **1981**, 30, 2963-2970.
113. McAlindon, T. E.; LaValley, M. P.; Gulin, J. P.; Felson, D. T. *J.A.M.A.* **2000**, 283(11), 1469-1475.

114. Uebelhart, D.; Knols, R.; de Bruin, E. D.; Verbruggen, G.. *Treatment of Knee Osteoarthritis with Oral Chondroitin Sulfate*. In: *Advances of Pharmacology* v. 53, 2006.
115. Verbruggen, G. *Chondroitin Sulfate in the Management of Erosive Osteoarthritis of the Interphalangeal Finger Joints*. In: *Advances of Pharmacology* v. 53, 2006.
116. INCI, International Nomenclature of Cosmetics Ingredients, Annex First Update EU Inventory, 2000 http://ec.europa.eu/food/fs/sc/sccp/out123cm_en.pdf acessado em 15/05/2011.
117. Alcon, DuoVisc® Viscoelastic System, Alcon. http://ecatalog.alcon.com/PI/DuoVisc_us_en.pdf acessado em 15/05/2011.
118. Integra Lifescience, Integra Extremity Reconstruction. http://integralife.com/products/pdfs/634200525554852615_Neodermis_Timeline_Poster_ILS155.pdf acessado em 15/05/2011.
119. Wang, D-A.; Varghese, S.; Sharma, B.; Strehin, I.; Fermanian, S.; Gorham, J.; Fairbrother, D. H.; Cascio, B.; Elisseeff, J. H. *Nature Mater.* **2007**, 6, 385-392.
120. Yuan, N-Y.; Tsai, R-Y.; Ho, M-H.; Wang, D-M.; Lai, J-Y.; Hsieh, H-J. *Desal.* **2008**, 234, 166-174.
121. Chang, K-Y.; Cheng, L-W.; Ho, G-H.; Huang, Y-P.; Lee, Y-D. *Acta. Biomat.* **2009**, 5, 1937-1947.
122. Bhadra, D.; Bhadra, S.; Jain, N. K. *J. Drug. Deliv. Sci. Technol.* **2005**, 15(1), 65-73.
123. Vercruyse, K. P.; Williams, A.; Ivory, D.; Johnson, B.; Dixon, R. D.; Tran, M. T.; Moore, J. T. Technical Proceedings of the 2007 NSTI 2, 752-755. http://www.nsti.org/procs/Nanotech2007_v2/8/W78.117 acessado em 15/05/2011.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS DAS PRINCIPAIS TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

2.1 ESPALHAMENTO DE LUZ

O espalhamento de luz ocorre a partir de uma interação entre a radiação visível e a matéria. A radiação entra em contato com uma partícula pequena, quando comparada ao comprimento de onda da radiação e provoca polarizabilidade na direção do campo elétrico da onda incidente. Essa polarização oscila na mesma frequência da radiação incidente e espalha pequenas quantidades de radiação em todas as direções.¹

A radiação incidente apresenta um vetor de onda K_i paralelo à direção de propagação e um vetor de onda K_e da luz espalhada. As frequências dos dois vetores são muito semelhantes. A radiação espalhada é conhecida como espalhamento de Rayleigh, quando o tamanho da partícula é menor do que o comprimento de onda da luz λ_0 . A partir de K_i e K_e , obtém-se o vetor de espalhamento q , como pode ser observado na Figura 2.1.

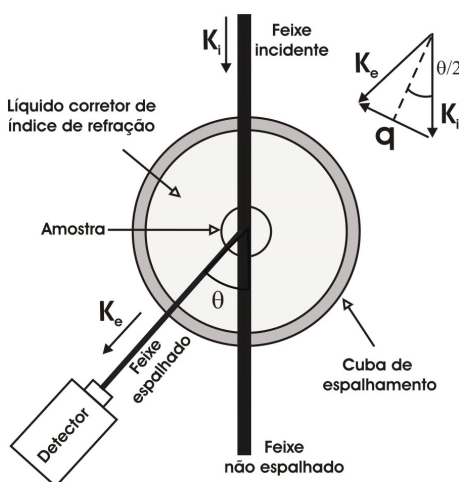


Figura 2.1 Esquema demonstrando a geometria básica de um experimento de espalhamento de luz. Adaptado de Silveira e Giacomelli, 2008.

O vetor de espalhamento é dependente da geometria, variando com o ângulo θ e com o índice de refração n_0 , segundo a equação:

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \text{sen}\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (2.1)$$

Quanto menor o valor de q menor a magnitude da estrutura observada e menor a resolução. O valor de q apresenta dimensão inversamente proporcional ao tamanho da partícula em observação.

2.1.1 Espalhamento de luz estático

Medidas de espalhamento de luz estático permitem a determinação do fluxo de fótons por área, em dado ângulo. Para a medida de flutuações em membranas, quando q está no plano das camadas (Figura 2.2), os modos são puramente modos de ondulação e a intensidade torna-se:

$$I_{q \rightarrow 0} = \varepsilon^2 \frac{k_B T}{B \lambda^2 q^2} \quad (2.2)$$

Sendo ε a constante dielétrica da água igual a 80, $k_B T$, sendo igual a 4×10^{-11} erg, λ o comprimento de onda da luz incidente 632,8 nm e B módulo elástico da camada.²

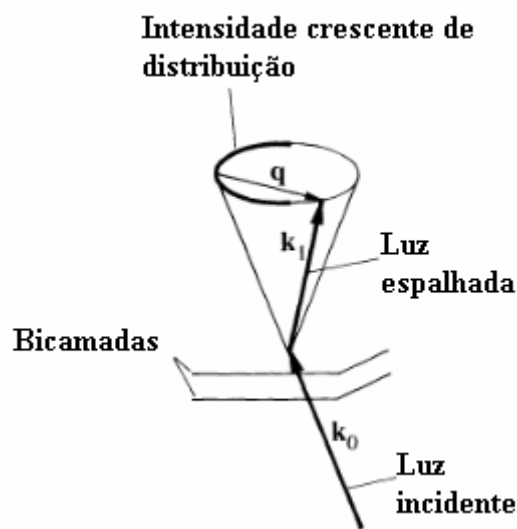


Figura 2.2 Distribuição da intensidade de luz espalhada a partir de uma amostra composta por bicamadas esméticas. Negligencia-se o índice de refração e k_0 e k_1 apresentam o mesmo comprimento.²

Dessa forma, é possível obter os valores de $I_{q \rightarrow 0}$ através de medidas simples de intensidade de luz espalhada em diversos ângulos.

2.1.2 Espalhamento de luz dinâmico

O espalhamento de luz dinâmico mede as flutuações temporais na intensidade de luz espalhada pelas partículas em movimento browniano.¹ O número de fótons que entra no detector, em função do tempo, depende da posição e do tamanho das partículas dispersas. A detecção desses fótons aparece como um ruído aparentemente aleatório (Figura 2.3).

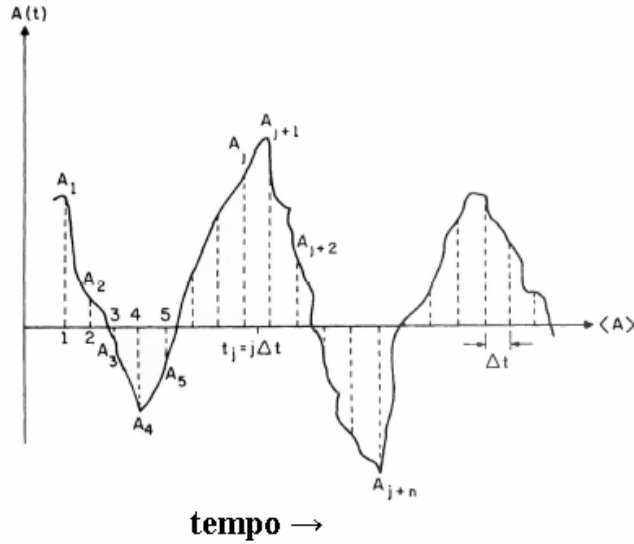


Figura 2.3 Flutuação dos fótons detectados $A(t)$ ao longo do tempo em torno de seu valor médio que independe do tempo. O eixo do tempo é dividido em N espaços discretos (Δt) com $t=j\Delta t$, $\tau=n\Delta t$, com $j = 1,2,\dots,N$.

O ruído $A(t)$ da Figura 2.3 em tempos diferentes t e $t + \tau$ podem ser diferentes $A(t) \neq A(t + \tau)$. Porém, quando o intervalo de tempo τ é diminuto em relação ao tempo das flutuações, o valor de $A(t + \tau)$ torna-se muito semelhante a $A(t)$. Ao passo que τ aumenta, a diferença entre $A(t + \tau)$ e $A(t)$ também aumentará. Assim, pode-se dizer que $A(t + \tau)$ está correlacionado com $A(t)$ em τ pequeno e que essa correlação vai se perdendo com o aumento de τ em relação ao período das flutuações. A medida da correlação entre uma mesma grandeza em tempos diferentes é denominada função de autocorrelação temporal.

Em medidas de correlação de fótons o parâmetro relevante que oscila no tempo, refletindo a dinâmica de sistemas fluidos é o campo elétrico espalhado. No entanto, o que é efetivamente medido é a intensidade da luz espalhada I e a função que se obtém é a seguinte:

$$g_2(t) = \lim_{T_{tot} \rightarrow \infty} \left[\frac{1}{T_{tot}} \int_0^{T_{tot}} I(t)I(t+\tau)dt \right] \quad (2.3)$$

O subscripto 2 na equação acima indica uma função de correlação de segunda ordem que envolve medidas de intensidade de luz proporcionais ao quadrado do campo elétrico e t_{tot} é o tempo total de experimento. Essa proporção está expressa pela relação de Siegert, sendo β um parâmetro instrumental relacionado ao número de modos espaciais coletados pelo detector:

$$g_2(t) = 1 + \beta |g_1(t)|^2 \quad (2.4)$$

Isso é válido para sistemas diluídos e sistemas ergódicos. Nestes casos, a função de autocorrelação do campo elétrico $g_1(t)$ relaciona-se com a distribuição $A(t)$ dos tempos de relaxação t pela transformada de Laplace:³

$$g_1(t) = \int A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \quad (2.5)$$

A fim de obter a distribuição dos tempos de relaxação $A(\tau)$ a partir das funções de autocorrelação das medidas de intensidades $g_2(t)$ pode-se utilizar o programa não-linear REPES de acordo com:

$$g_2(t) = 1 + \beta \left[\int A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau \right]^2 \quad (2.6)$$

A distribuição dos tempos de relaxação é obtida em um gráfico no qual o eixo τ é logaritimizado e as distribuições são representadas com iguais áreas $\pi(A)\tau$ versus τ (Figura 2.4).

A distribuição dos tempos de relaxação constitui-se de picos que correspondem a populações de partículas e, a partir de τ pode-se obter a taxa de decaimento da exponencial (Γ). O valor de Γ permite determinar o coeficiente de difusão D da partícula por meio de sua relação com o vetor de espalhamento q :

$$D = \frac{\Gamma}{q^2} \quad (2.7)$$

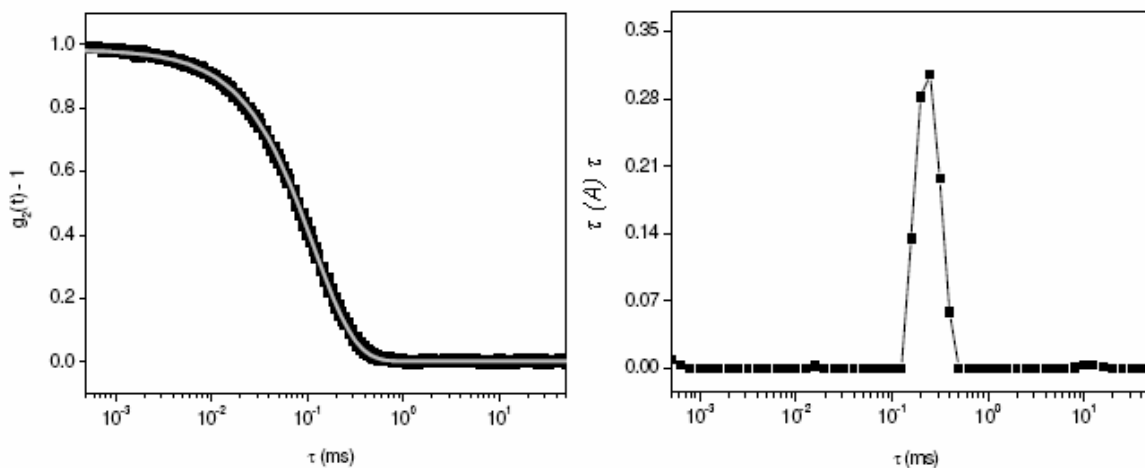


Figura 2.4 Exemplo de uma função de correlação temporal (esquerda) e da distribuição do tempo de relaxação (direita) obtida com o programa REPES.¹

Para, por fim, aplicar o valor de D na equação de Navier-Stokes, que permite a obtenção do raio hidrodinâmico R_h :

$$R_h = \frac{k_B T}{6\pi\eta D} \quad (2.8)$$

Sendo k_B a constante de Boltzmann e T a temperatura, para o ângulo de 90 graus é possível obter valores confiáveis de diâmetro da partícula de amostras monodispersas.

2.2 ESPALHAMENTO DE RAIOS-X EM BAIXOS ÂNGULOS

O espalhamento de raios-X em baixos ângulos, SAXS (*Small Angle X-ray Scattering*), é uma técnica empregada para estudar características estruturais de sistemas coloidais. As dimensões coloidais (entre dezenas e milhares de ângstrons) são extremamente grandes quando comparadas com o feixe de raios-X ($\text{CuK}\alpha$ 1,54 Å), o que faz com que a faixa angular do espalhamento observável seja extremamente pequena.

A Figura 2.5 apresenta a geometria clássica para um experimento de SAXS.

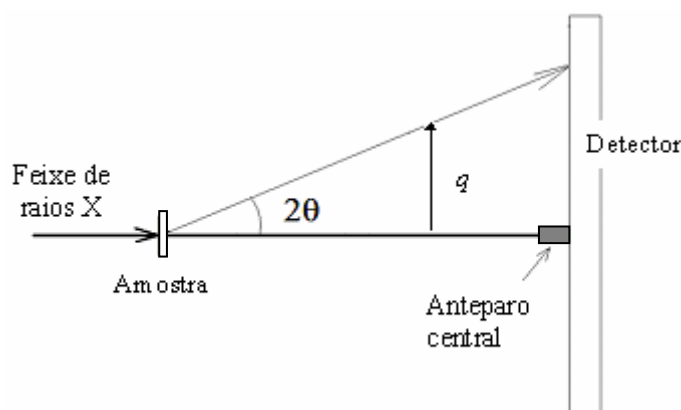


Figura 2.5 Esquema demonstrando a geometria básica de um experimento de espalhamento de raios-X em baixos ângulos.

Os raios-X espalhados decorrem da sua interação com os elétrons presentes na matéria. No caso de partículas coloidais, o espalhamento depende do número de partículas e do seu volume e, principalmente, do contraste de densidades eletrônicas entre as partículas e o solvente.³

2.2.1 Sistemas diluídos não orientados

O processo de espalhamento pode ser considerado como elétrons que ressonam na frequência de raios-X, passando através de objetos e emitindo ondas coerentes secundárias que interferem entre si. Isso pode ser sumarizado na Figura 2.6 que mostra uma partícula esférica, a partir da qual as ondas são espalhadas nos pontos indicados, para um ângulo 2θ há uma diferença de caminho $l\lambda$.

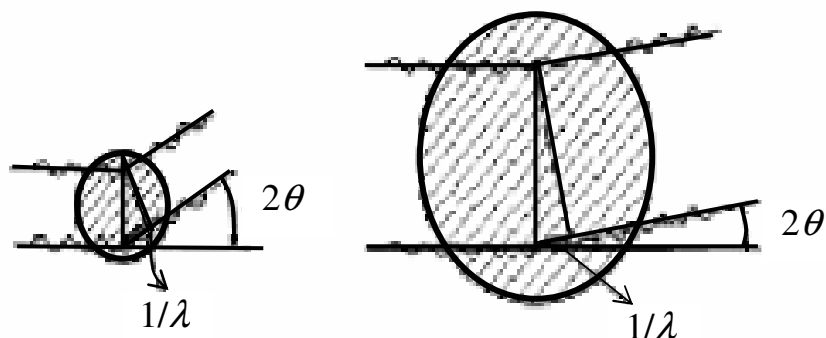


Figura 2.6 Ondas espalhadas a partir de partículas com diferentes dimensões em relação ao comprimento de onda do feixe.⁴

Se incluirmos o espalhamento a partir de todos os elétrons, a superposição das ondas com todas as possíveis fases levará a nenhum espalhamento na direção 2θ como resultado da interferência destrutiva. Porém, se considerarmos ângulos de espalhamento menores a diferença de fase torna-se menor e as ondas novamente irão se somar. O máximo de espalhamento nesse caso, será na direção de ângulo zero de espalhamento, onde todas as ondas estarão em fase.

Quantitativamente, a curva de espalhamento observada será como a curva 1 da Figura 2.7. Se aplicarmos a mesma idéia para uma partícula esférica maior, com o mesmo comprimento de onda, a diferença de caminho l/λ ainda ocorrerá em ângulos baixos resultando em uma curva mais estreita (curva 2, Figura 2.7).

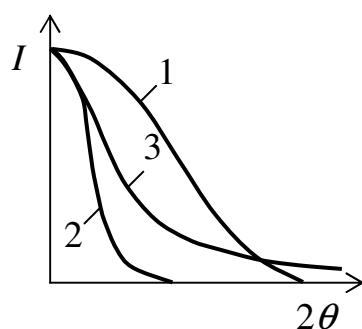


Figura 2.7 Curvas típicas de espalhamento a partir de partículas de tamanhos variados.⁵

A elevada intensidade na região central tende a uma curva mais alargada (curva 1) com o decréscimo do tamanho das partículas, sendo independente da estrutura interna, desde que esta seja homogênea. É possível também, determinar a curva de espalhamento para qualquer forma de partícula, cilíndrica, esférica, discóide, dentre outras. Uma das formas de calcularmos curvas de espalhamento envolve a função de distribuição de distâncias dos

elétrons $\rho(r)$, que é obtida a partir de considerações geométricas. A curva de espalhamento I é obtida a partir da $\rho(r)$ pela transformada de Fourier:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{\infty} \rho(r) \frac{\text{sen}qr}{qr} dr, q = \frac{4\pi \text{sen} \theta}{\lambda} \quad (2.9)$$

Esse embasamento do espalhamento de partículas foi postulado por Guinier em 1938. Para um sistema disperso homogeneamente, em soluções devidamente diluídas, a intensidade espalhada das partículas soma-se, ocorrendo aumento da intensidade.

É possível obter alguns parâmetros a partir de curvas experimentais, como o raio de giro, forma, massa, volume e, até mesmo a densidade eletrônica que nos permite entender como o sistema está estruturado intimamente. Pode-se determinar a função de distribuição de distâncias $\rho(r)$, que é acessada pela inversa de Fourier da curva de espalhamento. A $\rho(r)$ permite determinar a forma da partícula comparando-se com curvas de espalhamento teóricas. Além disso, a $\rho(r)$ permite deduzir o tamanho da partícula, no ponto onde a função tende a zero. Outros parâmetros interessantes surgem da variação do solvente no qual as partículas estão imersas. Com isso, é possível destacar algumas partes da partícula assim como omitir outras em decorrência da diferença ou da similaridade da densidade eletrônica entre partícula e solvente.

2.2.2 Sistemas periódicos

Além dos estudos realizados em sistemas diluídos e não orientados, contribuições importantes para a área de SAXS provêm dos estudos de difração de raios-X em sistemas condensados e orientados, em particular em lipídeos e membranas.^{6,7}

Se considerarmos partículas próximas umas das outras, a intensidade observada não será a soma das intensidades espalhadas pelas partículas individuais, uma vez que a interferência entra em jogo. Mesmo que as partículas estejam aleatoriamente orientadas, é possível calcular a intensidade espalhada. A difração de raios-X pela matéria resulta da combinação de dois fenômenos: (a) espalhamento por cada átomo individualmente e (b) interferência entre as ondas espalhadas por esses átomos. Essa interferência ocorre devido à coerência das ondas espalhadas com a onda incidente.⁴

Da mesma maneira, se tivermos estruturas ordenadas com repetição periódica, na ordem de 1 a 100 nm, tais estruturas também são passíveis de análise por SAXS. No entanto, o grau de ordem periódica em sistemas como membranas é pobre em relação aos cristais e deve ser

encarado como imperfeições. Em estruturas cristalinas, o interesse, neste contexto, é representado por uma distribuição de densidades de comprimento de espalhamento $\rho^*(r)$.

$$\rho^*(r) = \rho_u(r) \times z(r) \quad (2.10)$$

Sendo $\rho_u(r)$ a distribuição da densidade de comprimento de espalhamento de uma unidade de repetição da estrutura e $z(r)$ a função que descreve a ordem do arranjo de tais unidades. A intensidade espalhada é dada por:

$$I(q) = |S(q)|^2 |F(q)|^2 \quad (2.11)$$

Sendo $S(q)$ e $F(q)$ as transformadas de Fourier de $\rho_u(r)$ e $z(r)$, respectivamente. Se o retículo real representado por $z(r)$ é grande em extensão e livre de defeitos, o fator do retículo $|F(q)|^2$ também será um retículo no espaço recíproco. A intensidade espalhada é, então, observada como uma série de picos de Bragg, cuja intensidade integrada de cada pico é modulada de acordo com o fator estrutura $|S(q)|^2$.

Na prática os picos são alargados, e o fator $F(q)$ esmaece em maiores valores de q . Se houver variação no $I(q)$ nessa região, ela reflete a dependência de q em relação ao fator estrutura, $|S(q)|^2$, o que é um fato claro, especialmente quando a distribuição das densidades de comprimento de espalhamento $\rho_u(r)$ são tais que o próprio $|S(q)|^2$ apresenta picos.⁸

Dentro do contexto de biomoléculas, estudos de SAXS sobre a matéria condensada vem sendo conduzidos, a fim de relacionar as propriedades biológicas de membranas e proteínas. É possível analisar filmes fosfolipídicos orientados em função da temperatura a fim de avaliar transições de fase analisando-se o perfil de difração em comparação com perfis teóricos para fases lamelares, hexagonais, cúbicas, etc. Atualmente, interessantes abordagens vêm sendo feitas sobre aspectos relativos à rigidez da membrana.^{7,9}

O caminho trilhado até a chegada ao modelo atual de caracterização iniciou-se com a caracterização estrutural de membranas feita por Luzzati e colaboradores utilizando multicamadas de diacilfosfatidilcolinas em experimentos de SAXS e de espalhamento de nêutrons. No entanto, a grande dificuldade na obtenção de resultados exatos sobre a estrutura deve-se à desordem térmica (primeiro tipo de desordem) e à desordem no retículo cristalino (segundo tipo de desordem), o qual é, principalmente, dominante em fases líquido cristalinas, devido à sua característica líquida.⁹

Duas teorias foram desenvolvidas para modelar retículos relativos a fatores estrutura de membranas, ambos com limitações no longo alcance: a teoria paracristalina (PT), uma teoria

geral para desordens de primeiro e segundo tipos, desenvolvida por Hosemann e Bagchi e também por Guinier e a teoria de Caillé (CT), para cristais líquidos esméticos apenas. A principal diferença entre os dois modelos é que a PT descreve flutuações estocásticas de camadas planas unilamelares, enquanto que a CT também considera ondulações aplicando uma descrição Hamiltoniana oriunda da densidade de energia livre de uma bicamada lipídica, como proposta por De Gennes.^{5,10,11,12} A CT foi modificada em 1994 por Zhang, Suter e Nagle, originando a teoria modificada de Caillé (MCT), a fim de considerar o tamanho finito da lamela. Ambas teorias tem sido aplicadas satisfatoriamente para dados experimentais utilizando fonte de radiação síncrotron, no entanto a MCT tem se mostrado mais apropriada.¹³

A Figura 2.8 apresenta a flutuação de uma membrana na fase lamelar esmética A, causada por ondulações na bicamada. No detalhe, a forma particular dos picos de Bragg dados pela MCT. As flutuações de Caillé são um tipo característico de desordem de fase lamelar.

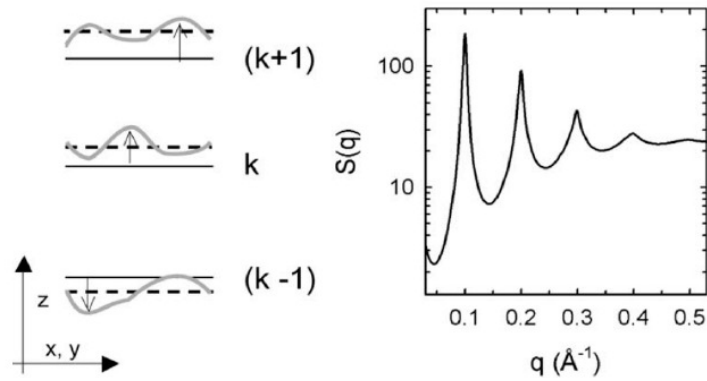


Figura 2.8 Esquema demonstrando as flutuações na ordem lamelar (k) e o fator estrutura $S(q)$ característico.⁷

O fator estrutura é dado por:

$$S(q, N, d, \eta_{MCT1}, \gamma) = N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N-k) \cos(kqd) e^{-\left(\frac{d}{2\pi}\right)^2 q^2 \eta_{MCT1} \gamma} (\pi k)^{-(d/2\pi)^2 q^2 \eta_{MCT1}} \quad (2.12)$$

Onde γ é a constante de Euler. O parâmetro de Caillé é dado por:

$$\eta_{MCT} = \pi k_B T / 2d^2 (BK_c)^{1/2} \quad (2.13)$$

Onde B é o módulo elástico e K_c é a rigidez da bicamada.⁷

2.3 POTENCIAL ZETA

As teorias que embasam as análises de potencial zeta ou potencial ζ têm como ponto inicial os estudos de Debye-Hückel, de 1923, os quais avaliaram interações eletrostáticas entre duas cargas pela presença de outros cátions e ânions em soluções.¹⁴ Mais tarde, em 1948, uma excelente contribuição para a compreensão da dupla camada elétrica foi feita por Verwey e Overbeek em seu livro, onde explicam a teoria DLVO (Deryagin-Landau-Verwey-Overbeek) para estabilização de sistemas coloidais carregados.¹⁵ A origem das cargas na superfície pode ser decorrente de processos de ionização, adsorção ou dissolução de íons. O estudo quantitativo da dupla camada é um tema bastante complexo e apresenta problemas não resolvidos, porém, uma simplificação para o estudo da parte difusa da dupla camada é o desenvolvido por Gouy (1910) e Chapman (1913).^{16,17} O modelo (Figura 2.9) considera:

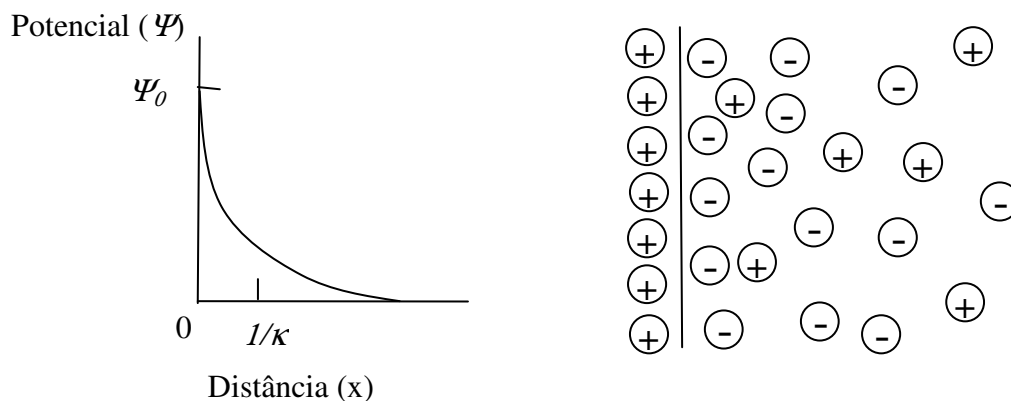


Figura 2.9 Representação esquemática da dupla camada difusa de acordo com o modelo de Gouy-Chapman.

i) a superfície plana, com extensão infinita e cargas distribuídas de maneira uniforme, *ii*) os íons da parte difusa da camada são encarados como cargas puntiformes distribuídas de acordo com a distribuição de Boltzmann; *iii*) o solvente é um contínuo de constante dielétrica ϵ ; *iv*) supõe-se um eletrólito isolado simétrico de carga z . O potencial elétrico ψ_0 , varia entre um ponto na superfície e a uma distância x da superfície ψ , como mostra a Figura 2.10. A densidade de carga total ρ em pontos de potencial ψ , é dada por:

$$\rho = -2ze n_0 \sinh \frac{ze\psi}{kT} \quad (2.14)$$

Sendo z o número de carga, e a carga elementar e n_0 a concentração na solução de cada espécie iônica. A abordagem de Gouy-Chapman quando em concentrações de eletrólitos elevadas apresenta algumas limitações por negligenciar as dimensões finitas dos íons. Stern,

em 1924, fazendo uma analogia à isoterma de adsorção de Langmuir, apresentou uma alteração no modelo, na qual dividiu a carga líquida em duas partes, a camada de íons adsorvidos à parede (monocamada molecular) com declínio linear e o espaço de cargas difusas, esta última, tal como na teoria de Gouy-Chapman.¹⁸ A densidade de carga superficial, neste caso, seria a soma das densidades em cada uma das partes, $\sigma = \sigma_1 + \sigma_2$.

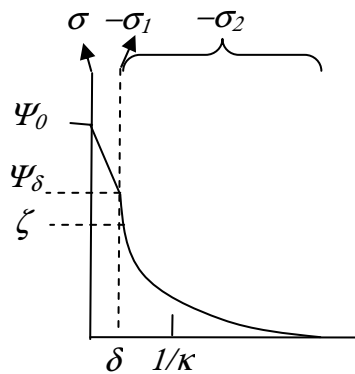


Figura 2.10 Representação esquemática da dupla camada de acordo com o modelo de Stern.

O potencial ζ , que é a medida experimental feita para analisar a estabilidade de colóides, depende da concentração de contraíons próximos à superfície, sendo um pouco menor, em módulo, do que o valor do potencial de Stern Ψ_δ . Porém, na prática, o potencial ζ e o potencial de Stern são considerados iguais. A medida do potencial ζ pode ser feita através de técnicas eletroforéticas, eletro-osmóticas, de potencial de corrente e de potencial de sedimentação. As medidas realizadas em equipamentos como Zetasizer[®] utilizam técnicas eletroforéticas e consideram como sendo de 3,04 nm a espessura da dupla camada elétrica para solução de eletrólitos 1:1 (10^{-2} M). Esta concentração não é considerada alta o suficiente para inviabilizar a utilização do modelo de Gouy-Chapman, uma vez que não satura a superfície das partículas coloidais dispersas. No entanto, cabe destacar que as medidas desse equipamento são baseadas no modelo de Stern.¹⁹

Andelman (2004), abordou o tema de interações eletrostáticas envolvidas no estudo da matéria mole e de materiais biológicos restringindo-se a uma aproximação de campo médio do problema da bicamada e ao uso da equação de Poisson-Boltzmann (PB) resolvida através de coordenadas esféricas. Essa abordagem torna mais simples a determinação da densidade de carga a partir de medidas de potencial ζ . Esse modelo, assim como o de Gouy-Chapman,

considera apenas interações Coulômbicas, sem interações dipolo-dipolo, cargas pontuais e o meio como um contínuo de constante dielétrica ϵ . Para esferas coloidais carregadas de raio a e carga Qe , a densidade de carga é $\sigma = Qe/4\pi a^2$.²⁰

A equação de PB linearizada em coordenadas esféricas é escrita como:

$$\nabla^2 \psi = \frac{d^2 \psi}{dr^2} + \frac{2d\psi}{rdr} = \lambda_D^{-2} \psi(r) \quad (2.15)$$

Essa linearização é justificada em concentrações de sal elevadas ou densidades de carga moderadas. Para uma esfera, o potencial e o campo elétrico tendem a zero no infinito, enquanto na superfície da esfera, onde $r=a$, a condição de contorno é:

$$\left. \frac{d\psi}{dr} \right|_{r=a} = -\frac{Qe}{\epsilon a^2} \quad (2.16)$$

$$\left. \frac{d\psi}{dr} \right|_{r=\infty} = 0 \quad (2.17)$$

A equação PB linearizada apresenta uma descrição de Debye-Hückel, ou seja, a interação entre pares de íons decai exponencialmente com a distância devido ao efeito de blindagem de todos os cátions e ânions que rodeiam o par iônico. Em coordenadas esféricas, $\exp(-\kappa_D r)/r$, sendo $\kappa_D = 1/\lambda_D$. Em potenciais eletrostáticos baixos $\Psi < |25 \text{ mV}|$, uma aproximação útil do comprimento de Debye, λ_D é $\lambda_D \sim n_0^{-1/2}$, sendo n_0 a força iônica, o qual, para o caso de uma solução de NaCl 10 mM, é igual a 10 Å. Associando esse pressuposto à condição de contorno, temos que:

$$\frac{e\psi(r)}{k_B T} = \frac{Ql_B}{1 + \kappa_D a} \frac{e^{-\kappa_D(r-a)}}{r} \quad (2.18)$$

Essa equação costuma ser corrigida para a determinação da carga *efetiva* da partícula Q_{eff} . No seio da solução, a solução não linear de PB terá um comportamento assintótico, mas com uma carga *efetiva* no lugar da carga nominal da esfera. Focando-se no caso de uma esfera carregada, b será o comprimento de Gouy-Chapman, igual a $b = 2a^2/l_B Q$. A correção da carga é encontrada por:

$$Q_{eff} = Q \left(1 - \frac{1}{4\kappa_D^2 b^2} + \dots \right) \quad (2.19)$$

O comprimento de Bjerrum l_B é igual a $l_B = e^2 / \epsilon k_B T$, que à temperatura de 300 K em água ($\epsilon=80$) é 7 Å. Assim, é possível obter a densidade de cargas dos colóides dispersos. Neste trabalho, esse tema, que é extremamente complexo está sendo apresentado de uma forma simplificada. Para um aprofundamento no assunto, recomendam-se algumas leituras.^{15,19,20}

2.4 REFERÊNCIAS

1. Silveira, N. P.; Giacomelli, F. C. *Espalhamento de luz aplicado à caracterização de polímeros e nanopartículas*. In: *Tópicos em Nanociência e Nanotecnologia. II Mostra CNANO UFRGS/2008*. Org. Pohlmann, A. R.; Petler, C. O.; Balzaretti, N. M.; Guterres, S. S. Porto Alegre, Editora UFRGS, 2008.
2. De Gennes, P. G.; Prost, J. *The Physics of Liquid Crystals*. Oxford: Clarendon Press, 1993, p. 360-373.
3. Stepanek, P.; Tuzar, Z.; Kadlec, P.; Kriz, J. *Macromolecules*, **2007**, 40, 2165-2171.
4. Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X ray Scattering*. São Paulo: Academic Press, 1982, p. 3-12.
5. Guinier, A. *X-Ray Diffraction*. In *Crystals, Imperfect Crystals and Amorphous Bodies*. New York: Dover Publications, Inc. 1994, p. 319-343.
6. Laggner, P. In: Glatter, O.; Kratky, O. *Small Angle X ray Scattering*. São Paulo: Academic Press, 1982, p. 329.
7. Pabst, G.; Rappolt, M.; Amenitsch, H.; Laggner, P. *Phys. Rev. E*. **2000**, 62(3), 4000-4009.
8. Roe, R.J. *Methods of X-ray and Scattering in Polymer Science*. Oxford: Oxford University Press, Inc. 2000, p. 193.
9. Luzzati, V. In: Chapman, D. *Biological Membranes* Academic: London, 1967, p. 71.
10. Hosemann, R.; Bagchi, S. N. *Direct Analysis of Diffraction by Matter*. North-Holland, Amsterdam, 1962.
11. Caillé, C. R. *Sciences Acad. Sci. B* **1972**, 274, 891.
12. De Gennes, P. G. *J. Phys. (Paris) Colloq.* **1969**, 30, C4-65.
13. Zhang, R.; Suter, R. M.; Nagle, J. F. *Phys. Rev. E*. **1994**, 50, 5047.
14. Debye, P.; Hückel, E. *Physik. Z.* **1923**, 24, 185.
15. Verwey, E. J.; Overbeek, J. TH. G. *Theory of the Stability of Liophobic Colloids*. Dover: New York, 1999 (republication).
16. Gouy, G. *J. physique*, **1910**, 4(9), 457.
17. Chapman, D. L. *Philos. Mag.* **1913**, 6 (25), 475.
18. Stern, O. *Z. Elektrochem.*, **1924**, 508.
19. Shaw, D. J. *Introdução à Química dos Colóides e de Superfícies*. São Paulo: Ed. Da USP, 1975.
20. Andelman, D. *Introduction to Electrostatics in Soft and Biological Matter*. http://star.tau.ac.il/~andelman/reprints/121_NATO_Edinburgh_elec_2005.pdf 22/05/11.

3. AVALIAÇÃO DAS ESTRUTURAS PRESENTES EM EMULSÕES CONTENDO FOSFATIDILCOLINA E QUITOSANA

3.1 INTRODUÇÃO

As interações entre polieletrólitos e tensoativos (no caso, fosfolipídeos) são devidas a forças eletrostáticas e a interações hidrofóbicas. Estas últimas ocorrem entre os segmentos não carregados do polieletrólito e as cadeias carbônicas apolares dos tensoativos. O estudo das interações entre polímeros e tensoativos é bem documentado e são encontrados, na literatura, trabalhos que avaliam a combinação de polímeros sintéticos, pseudo-naturais e naturais com tensoativos aniônicos, catiônicos ou anfotéricos. Dentre os polímeros avaliados estão, por exemplo, o poliestireno sulfonado,¹ o hidrocloreto de polilamina,¹ a maltodextrina com ligações cruzadas de epiclorigrina,¹ a quitosana,² a carboximetilcelulose sódica,³ o ácido hialurônico⁴ e o alginato de sódio⁴. Alguns destes estudos empregam marcadores fluorescentes nas dispersões, nas quais varia-se tanto a concentração de tensoativo quanto a quantidade de polieletrólito. Na maioria dos casos emprega-se meio aquoso para avaliar tais interações. Isso permite acompanhar a migração dos marcadores entre as regiões hidrofílicas e hidrofóbicas através da detecção da emissão de fluorescência. Essa informação é usada para determinar a concentração de agregação crítica (CAC), que ocorre quando há associação entre tensoativos e polímeros. Adicionalmente, a sequência de eventos que ocorrem quando são variadas as concentrações dos componentes é monitorada. O cenário desses eventos demonstra a ocorrência de pré-micelas, associadas aos centros carregados ao longo das cadeias polieletrólíticas, em concentrações de tensoativo abaixo da CMC. Em concentrações acima da CMC, no entanto, há formação de micelas livres na solução. Esses eventos são bem discutidos em diversas publicações e a confirmação de sua ocorrência dá-se através de medidas de condutividade elétrica, espalhamento de luz e espalhamento de raios-X em baixos ângulos.⁵

No presente trabalho foi realizado um estudo fundamental sobre sistemas emulsionados compostos por fosfatidilcolina (tensoativo anfotérico) e a quitosana (polieletrólito catiônico). Objetivou-se, com esse estudo, comparar a etapa inicial de preparação de lipossomas na ausência e na presença de quitosana, empregando-se a técnica de evaporação em fase reversa, cujo esquema pode ser visualizado na Figura 1.5.

Nesta etapa inicial, promove-se a dispersão da fosfatidilcolina em meio orgânico e a adição de uma fase aquosa. A seguir, com o fornecimento de energia, ocorre a

formação de uma emulsão de micelas reversas. As etapas subsequentes consistem na concentração das micelas para a formação de um organogel por evaporação do solvente orgânico e posterior dispersão em água para formação dos lipossomas. O organogel e os lipossomas na ausência e na presença de quitosana já foram estudados e caracterizados.⁶

A avaliação da etapa de dispersão e emulsificação é importante, pois acrescenta informações úteis para a pré-formulação e permite ampliar o conhecimento sobre o comportamento desses sistemas multicomponentes. Para tal, uma série de amostras foi preparada tendo como base a composição empregada anteriormente pelo grupo para preparação de lipossomas e quitossomas.⁶ A partir dessa composição, prepararam-se amostras contendo concentrações dez vezes menores e dez vezes maiores de fosfatidilcolina. As dispersões obtidas a partir dessas amostras, preparadas tanto na ausência quanto na presença de quitosana, foram caracterizadas através das técnicas de espalhamento de luz e de espalhamento de raios-X em baixos ângulos. Os resultados permitiram avaliar os tipos de estruturas formadas e sua estabilidade.

3.2 METODOLOGIA

3.2.1 Preparação das amostras compostas por quitosana/fosfatidilcolina/água

Foram preparadas misturas de dispersões de fosfatidilcolina (PC) em acetato de etila (EA) com solução tampão de quitosana (CH) ou água (W). A composição das amostras pode ser vista na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 Nomenclatura e composição das amostras analisadas.

Amostras	Fosfatidilcolina (mg)	Acetato de etila (mL)	Água (mL)	Solução de quitosana* (mL)
PC ₀₆ W ₄₀	0,60	0,96	0,04	-
PC ₀₆ CH ₄₀	0,60	0,96	-	0,04
PC ₀₆ W ₂₀₀	0,60	0,80	0,20	-
PC ₀₆ CH ₂₀₀	0,60	0,80	-	0,20
PC ₀₆ W ₄₀₀	0,60	0,60	0,40	-
PC ₀₆ CH ₄₀₀	0,60	0,60	-	0,40
PC ₆ W ₄₀	6,00	0,96	0,04	-
PC ₆ CH ₄₀	6,00	0,96	-	0,04
PC ₆ W ₂₀₀	6,00	0,80	0,20	-
PC ₆ CH ₂₀₀	6,00	0,80	-	0,20
PC ₆ W ₄₀₀	6,00	0,60	0,40	-
PC ₆ CH ₄₀₀	6,00	0,60	-	0,40
PC ₆₀ W ₄₀	60,0	0,96	0,04	-
PC ₆₀ CH ₄₀	60,0	0,96	-	0,04
PC ₆₀ W ₂₀₀	60,0	0,80	0,20	-
PC ₆₀ CH ₂₀₀	60,0	0,80	-	0,20
PC ₆₀ W ₄₀₀	60,0	0,60	0,40	-
PC ₆₀ CH ₄₀₀	60,0	0,60	-	0,40

* 0,1% (m/v)

Os fosfolídeos utilizados foram oriundos da L- α fosfatidilcolina de soja da Avanti Polar Lipids Inc. (Alabaster, USA). A composição de ácidos graxos foi de 17% de ácido palmítico (16:0), 6% de ácido esteárico (18:0), 13% de ácido oléico (18:1), 59% de ácido linoléico (18:2) e 5% de ácido linolênico (18:3). A quantidade de ácido fosfatídico foi de, aproximadamente, 5%. O conteúdo de água determinado por titulação de Karl Fisher foi de 0,6%. Foi empregada quitosana de média massa molar ($1,5 \times 10^5 \text{ g.mol}^{-1}$), com cerca de 75-85% de desacetilação, adquirida de Aldrich

(Milwaukee, USA) e acetato de etila adquirido de Merck (Darmstadt, Germany). Foi preparada uma solução de quitosana (0,1% m/v) em tampão acetato (0,1 M e pH 4,5) e a solução resultante foi filtrada através de membrana de 0,8 μm . Alíquotas dessa solução foram adicionadas às dispersões de fosfatidilcolina e foram emulsionadas sob agitação em vórtex durante 1 minuto, velocidade de 1500 rpm. Para fins de comparação, foram preparadas emulsões cuja fase aquosa foi composta apenas por água. As amostras foram submetidas à agitação durante 1 minuto antes das análises. Os dados foram coletados minuto a minuto, durante os 15 minutos posteriores à preparação das amostras.

3.2.2 Caracterização por espalhamento de raios-X em baixos ângulos

As amostras foram injetadas entre duas lâminas de mica com 1 mm de espaço livre e avaliadas por espalhamento de raios-X em baixos ângulos, *Small-Angle X-rays Scattering* (SAXS) na linha de luz D11A-SAXS1 no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, LNLS (Campinas, Brasil). O comprimento de onda do feixe é $\lambda = 1,488 \text{ \AA}$ e a distância amostra-detector marCCD foi de 2009,84 mm. Todas as medidas foram conduzidas a 20 °C. O fundo e o espalhamento do solvente foram subtraídos de todas as curvas. Os gráficos de intensidade I versus vetor de espalhamento q foram obtidos utilizando o programa livre do European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), FIT2D.⁷ A intensidade espalhada $I(q)$ em função da abscissa experimental q foi usada para inferir sobre a distância entre os espalhadores e sobre a organização de cada sistema. O arranjo instrumental foi feito para medidas na faixa de q entre 0,1 e 1,6 nm^{-1} . A lei de Bragg foi usada para encontrar a distância de repetição d :

$$q = n(2\pi / d) \quad (3.1)$$

sendo $n = 1, 2, 3, 4$, etc. Os perfis foram examinados de acordo com o ajuste às fases lamelar, cúbica ou hexagonal.

3.2.3 Caracterização por espalhamento de luz

As amostras foram injetadas em uma cubeta de quartzo de 1 mm de profundidade e 10 mm de largura posicionada a 45 graus em relação ao laser incidente e a fotomultiplicadora foi posicionada a 90 graus em relação ao laser incidente (Figura 3.1).

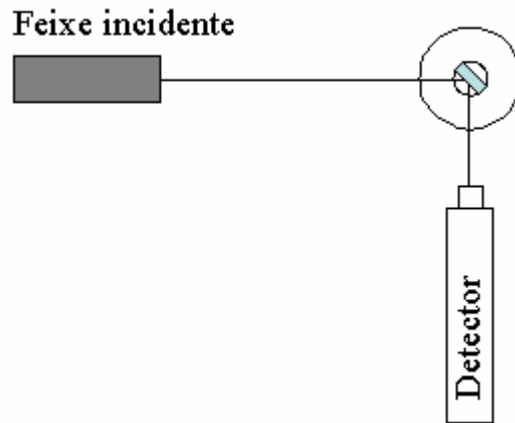


Figura 3.1 Posicionamento da cubeta em relação ao feixe incidente e espalhado.

As análises foram feitas dessa forma a fim de resguardar o máximo de similaridade com as medidas do experimento de SAXS, uma vez que o cisalhamento causado durante a injeção das amostras levou à anisotropia observada nos perfis de difração. Os ensaios foram feitos em um conjunto instrumental Brookhaven composto por um goniômetro BI-200M, um correlador digital BI-9000AT e um sistema de detecção BI986. Um laser de He-Ne Spectra Physics (modelo 127, $\lambda = 632,8$ nm) foi utilizado. O espalhamento de luz dinâmico foi medido pela intensidade das funções de autocorrelação em função do tempo. Os dados foram tratados no *software* Gendist usando o algoritmo REPES.⁸ As medidas de espalhamento de luz estático foram obtidas pela contagem total da luz espalhada a 90 graus.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Logo após a preparação das amostras, a inspeção visual demonstrou separação de fases nas amostras $PC_{06}W_{200}$, $PC_{06}CH_{200}$, $PC_{06}W_{400}$, $PC_{06}CH_{400}$, PC_6W_{400} . No caso dessas amostras, a quantidade de fosfolípídeo foi inferior à necessária para estabilizar a emulsão.

As amostras $PC_{06}W_{40}$, $PC_{06}CH_{40}$, PC_6W_{40} , PC_6CH_{40} , PC_6W_{200} , PC_6CH_{200} , $PC_{60}W_{40}$, $PC_{60}CH_{40}$, $PC_{60}W_{200}$, e $PC_{60}CH_{200}$ apresentaram aglomerados micelares, cujos raios hidrodinâmicos da principal população situaram-se em torno de 200 nm. A Figura 3.2 apresenta as distribuições dos tempos de relaxação para estas amostras.

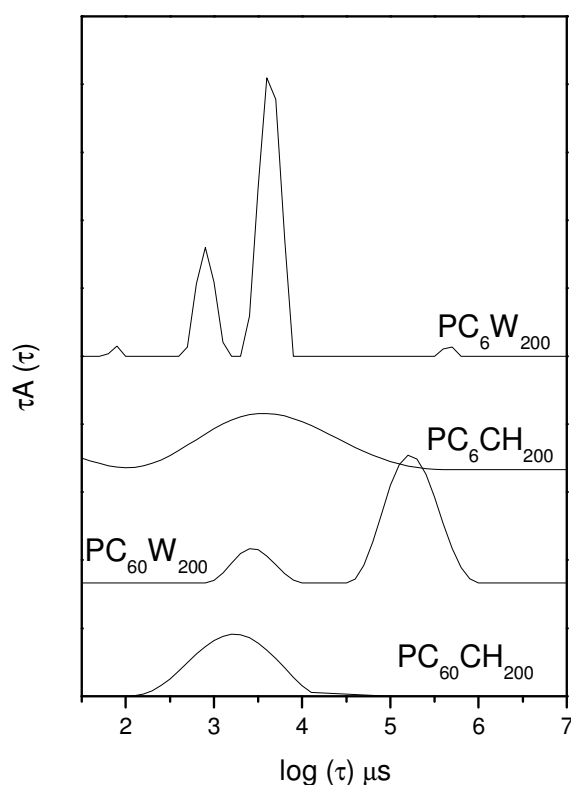


Figura 3.2 Distribuições dos tempos de relaxação para amostras contendo micelas reversas, após o primeiro minuto de injeção.

A amostra PC_6W_{200} apresentou duas distribuições de tempo de relaxação, mantendo-se assim até 15 minutos. Porém, ao longo do tempo houve diminuição da intensidade relativa à população responsável pelo modo rápido, pois os valores da razão entre os picos $P_{(lento)}/P_{(rápido)}$ variaram de 3,6 até 1,1 ao final dos 15 minutos (valores sumarizados nas Tabelas A1 a A6, no Anexo). Isso indica formação de agregados a partir da associação das partículas menores. A amostra $PC_{60}W_{200}$ apresentou uma clara separação entre os modos rápido e lento, indicando a ocorrência de agregados grandes.

Nessa amostra, analisando-se os valores de intensidade dos picos ao longo do tempo, verifica-se que o modo rápido praticamente desapareceu enquanto que a intensidade relativa ao modo lento cresceu ao longo 15 minutos. As amostras contendo quitosana PC_6CH_{200} e $PC_{60}CH_{200}$ apresentaram uma distribuição de tempos de relaxação larga que pôde ser detectada até 7 e 9 minutos de análise, respectivamente.

A análise das amostras PC_6CH_{200} , PC_6CH_{400} , $PC_{60}W_{400}$ e $PC_{60}CH_{400}$ por medidas de SAXS demonstrou a presença de fase lamelar. Essas lamelas ocorreram sob a forma de microgéis de tamanhos variados (0,6 – 1,0 μm), observados por espalhamento de luz.

A diferença dessas amostras foi pontuada pela presença de quitosana, apesar da grande quantidade de fosfolipídeos (6 e 60 mg/mL). Nas formulações contendo o polieletrólito, este demonstrou capacidade de agregar os fosfolipídeos em uma estrutura lamelar. Observa-se, pela análise das posições dos picos de difração (Figura. 3.3), que as bicamadas fosfolipídicas contendo quitosana nas regiões polares apresentaram valor de distância de repetição levemente maior (4,8 – 5,0 nm) do que aquelas contendo água (4,6 nm). Isto evidencia a presença do polímero nas regiões polares das bicamadas, levando ao distanciamento entre as regiões espalhadoras.

Os valores de distância de repetição obtidos nas amostras contendo lamelas não corresponderam aos valores esperados, ou seja, o dobro do tamanho da molécula de fosfolipídeo. Em amostras de lipossomas multilamelares, observou-se uma distância da ordem de 6,3 nm que corresponde, de fato, a duas moléculas de fosfolipídeo. A diferença observada deve-se ao tipo de solvente no qual a fosfatidilcolina está dispersa. No caso dos lipossomas, o meio é aquoso e as cadeias apolares permaneceram numa conformação mais rígida, por outro lado, no caso das amostras analisadas, o solvente foi o acetato de etila, que dissolveu as regiões apolares levando à maior interpenetração das cadeias apolares e reduzindo, assim, o tamanho da lamela. As densidades de comprimento de espalhamento, ou densidades eletrônicas do solvente apolar e das cadeias carbônicas são, praticamente, idênticas ($8 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$), assim como entre as cabeças polares e a água ($9 \cdot 10^{-6} \text{ \AA}^{-2}$). Na presença de quitosana houve uma variação nesse valor, uma vez que o polímero tem densidade de comprimento de espalhamento diferente ($1 \cdot 10^{-5} \text{ \AA}^{-2}$), levando a maiores intensidades de espalhamento. Além disso, comparando-se os padrões de intensidade das amostras $PC_{60}W_{400}$ e $PC_{60}CH_{400}$ mostraram que a presença da quitosana levou a um pico mais intenso também indicando maior número de estruturas organizadas. O pico foi ligeiramente mais largo do que aquele onde

estiveram presentes apenas os fosfolípídeos e água, em decorrência das flutuações devidas à presença do polication nas regiões lamelares.

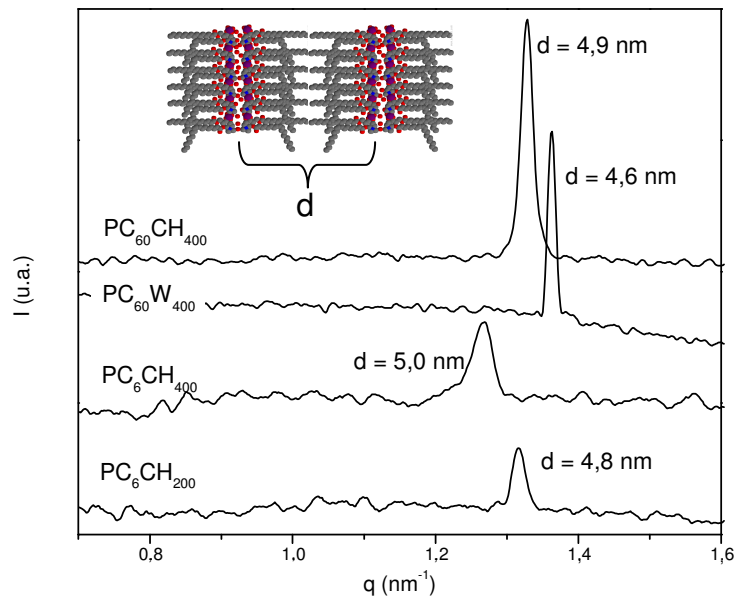


Figura 3.3 Picos de difração (SAXS) das fases lamelares e valores das distâncias de repetição (d), após o primeiro minuto de injeção. Detalhe apresentando o significado de d .

O pseudo-diagrama de fases apresentado na Figura. 3.4 sumariza os resultados expostos acima, representando uma fotografia dos sistemas no momento após a preparação das amostras.

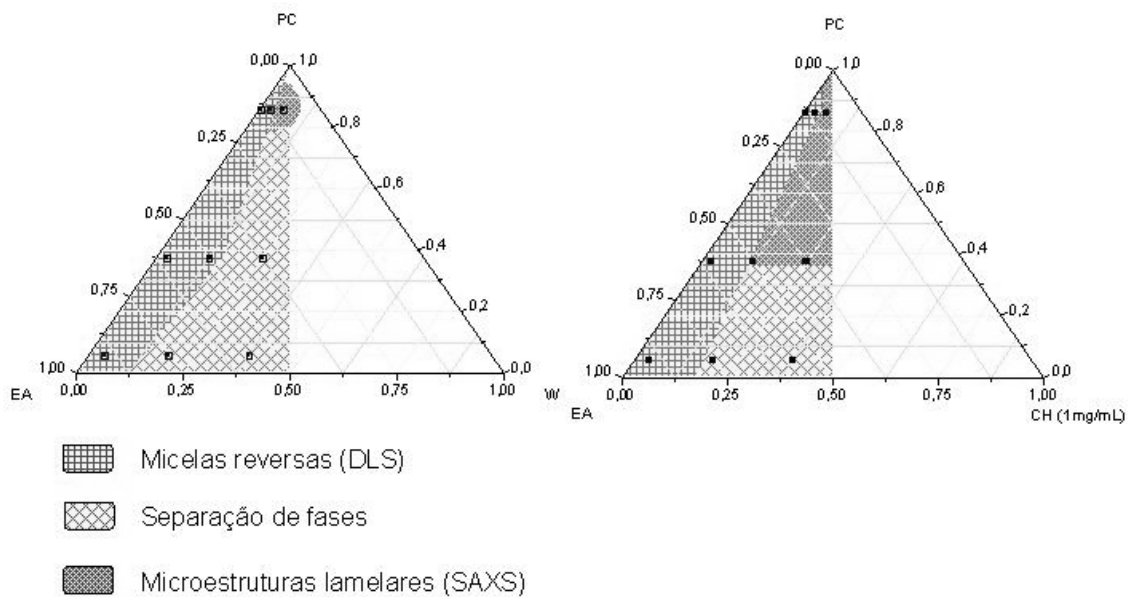


Figura 3.4 Pseudo-diagramas apresentando as fases presentes nas amostras um minuto após sua preparação. Fosfatidilcolina (PC), acetato de etila (EA) e solução de quitosana (CH).

Nota-se que a principal diferença entre os dois diagramas é a região lamelar que nas amostras contendo quitosana é maior. Salienta-se que esse diagrama evidencia apenas as fases observadas nas amostras no primeiro momento de preparação, não constituindo um diagrama de fases no equilíbrio.

A análise subsequente diz respeito à mudança das amostras PC_6CH_{200} , PC_6CH_{400} , $PC_{60}W_{400}$ e $PC_{60}CH_{400}$ (Figuras 3.5 a 3.13), durante os 15 minutos após a preparação, indicando a dinâmica dos sistemas.

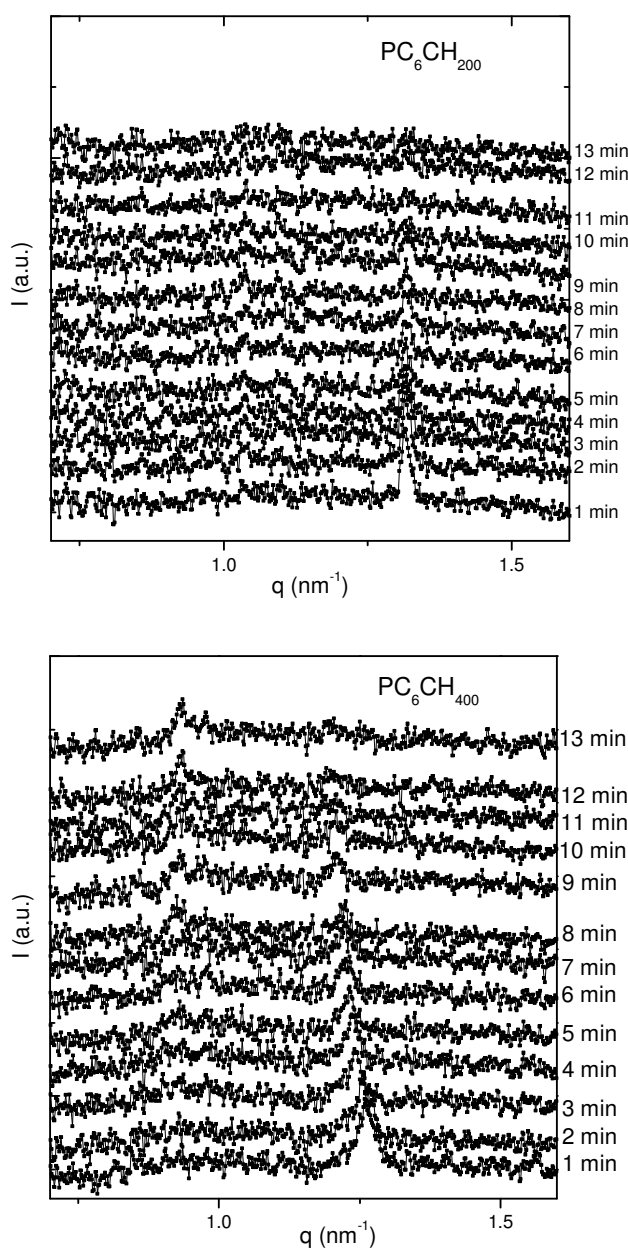


Figura 3.5 Mudanças nos picos de difração das amostras PC_6CH_{200} e PC_6CH_{400} ao longo do tempo de 13 minutos.

No conjunto de amostras apresentado na (PC_6CH_{200} e PC_6CH_{400}), nas quais as concentrações de polímero são diferentes, observam-se pequenos picos de difração, indicando presença de lamelas. Com o passar do tempo, na amostra onde a concentração de polímero é maior, observou-se mudança no perfil, sendo que após 8 minutos, um pico em menores valores de q começa a ser observado, indicando mudança do tipo de fase observada.

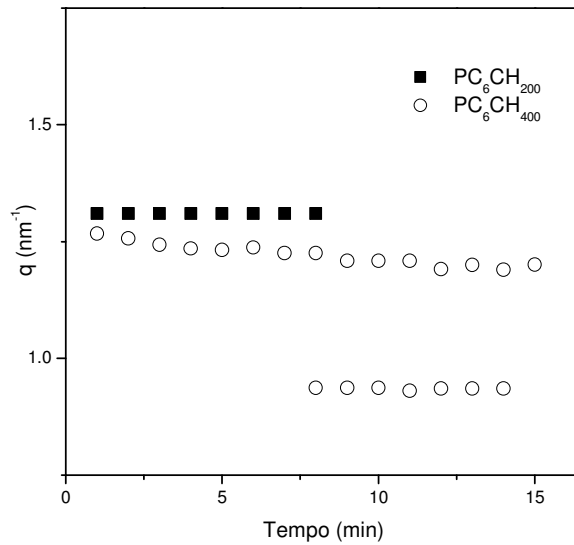


Figura 3.6 Distâncias de repetição das reflexões observadas para as amostras PC_6CH_{200} e PC_6CH_{400} em função do tempo. Valores de q obtidos a partir dos gráficos da Figura. 3.5.

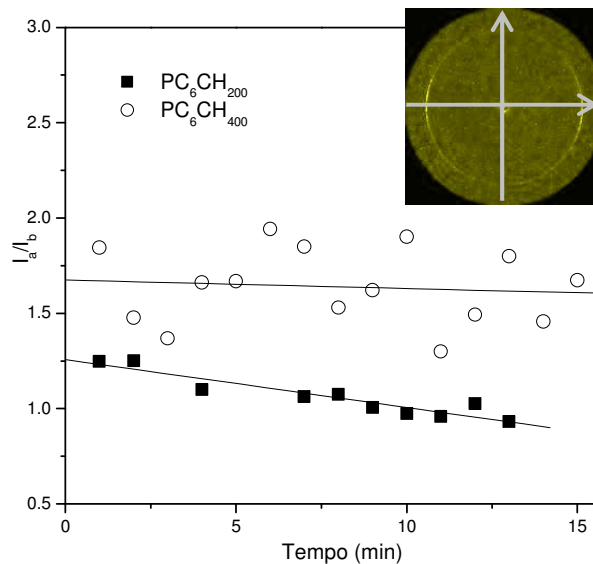


Figura 3.7 Razões de intensidade azimutal das imagens 2-D das amostras e PC_6CH_{400} em função do tempo.

Medidas de espalhamento estático também foram conduzidas e permitiram avaliar a variação na razão de despolarização ao longo do tempo. O gráfico I_{vh}/I_{vv} (Figura. 3.8) que indicou a tendência das estruturas em solução migrarem para uma forma alongada (anisotrópica) ao longo do tempo.

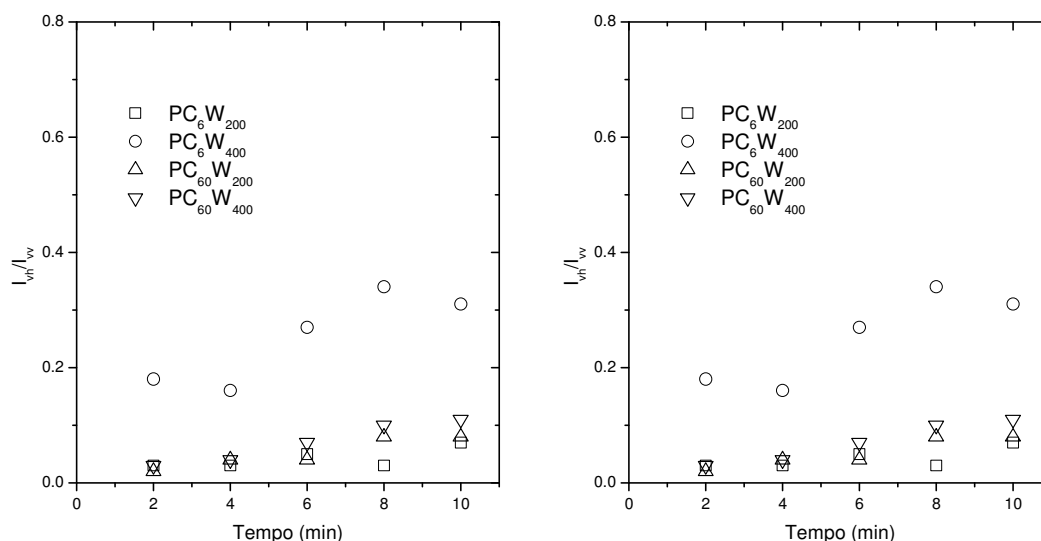


Figura 3.8 Razões de despolarização (I_{vh}/I_{vv}) das amostras ao longo do tempo.

Apesar do emprego de uma cubeta com caminho óptico de 1 mm, similarmente àquela utilizada nos experimentos de SAXS, a ocorrência de estruturas alongadas neste caso não esteve, necessariamente, relacionada a um cisalhamento da amostra. Neste caso, essa mudança na razão de despolarização deveu-se à transição de estrutura micelar, como já foi observado por Weiss e colaboradores (2005), no entanto observando a dinâmica de formação de vesículas por SAXS a partir de micelas em escalas de tempo de milissegundos.¹⁰

Nos resultados de intensidade de espalhamento de raios-X em baixos ângulos (Figuras. 3.9 e 3.10) são apresentados os perfis de amostras PC₆₀W₄₀₀ e PC₆₀CH₄₀₀. Observou-se um aumento na intensidade em baixos ângulos e espalhamento de fundo difuso na amostra PC₆₀W₄₀₀. Comparando-se os dois perfis, observa-se que, ao longo do tempo, houve persistência no pico de difração na amostra PC₆₀CH₄₀₀, enquanto que o mesmo desapareceu após os primeiros minutos, na amostra PC₆₀W₄₀₀ na qual o polímero está ausente, indicando menor estabilidade. Ajustando-se as intensidades em ângulos baixos a uma reta na região de Guinier ($R_g \times q \ll 1$), a inclinação forneceu valores de raio de giro ~ 2 nm, que condiriam com micelas de tamanhos diminutos (Anexo, Figura A1).

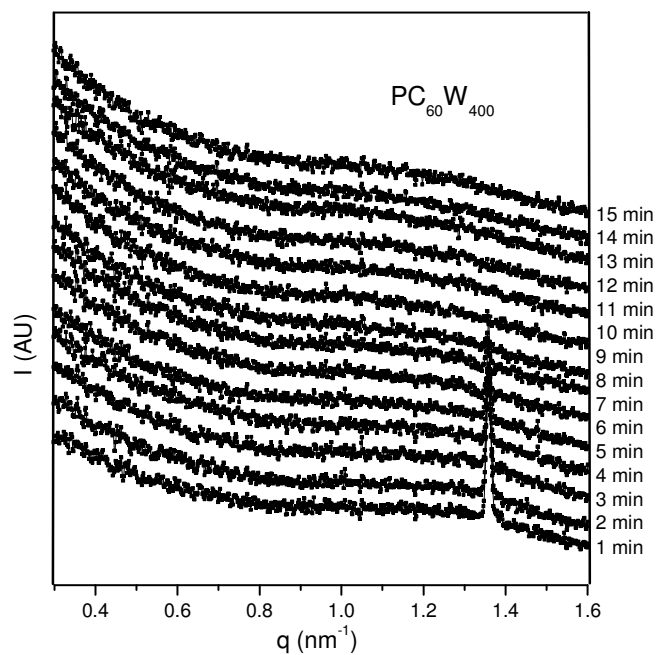


Figura 3.9 Mudanças nos picos de difração da amostra $PC_{60}W_{400}$ em 15 minutos.

Para essas mesmas amostras ($PC_{60}W_{400}$ e $PC_{60}CH_{400}$) os resultados de espalhamento de luz dinâmico (Figura 3.11 e 3.12) apontaram para a presença de estruturas de diferentes tamanhos, que modificam-se de forma distinta nas amostras.

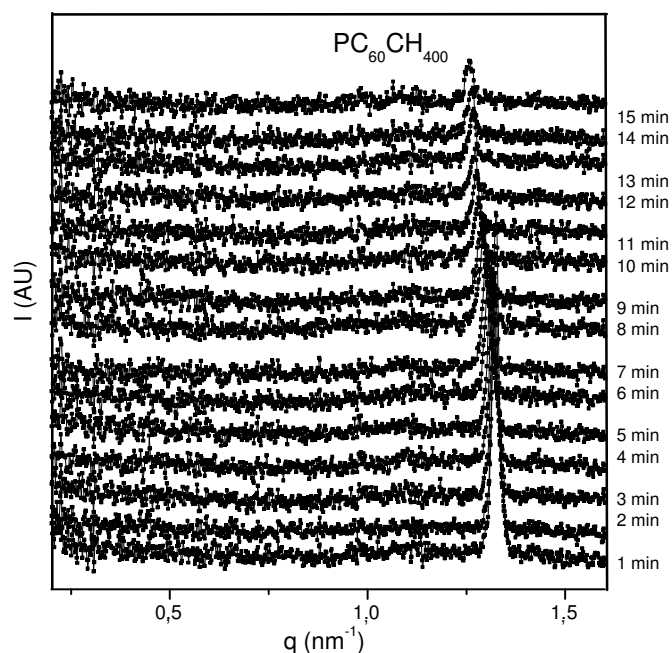


Figura 3.10 Mudanças nos picos de difração da amostra $PC_{60}CH_{400}$ em 15 minutos.

Nas amostras em que a quitosana está presente, houve maior organização e evidenciou-se um aumento gradativo de tamanho das partículas, pois o modo lento desloca-se para tempos maiores. Por outro lado, sem o polímero o sistema tendeu a ser

mais heterogêneo. A partir das análises das diferentes amostras verificou-se a ocorrência de estruturas lamelares de diversos tamanhos e que apresentaram bastante variação ao longo dos 15 minutos de análise.

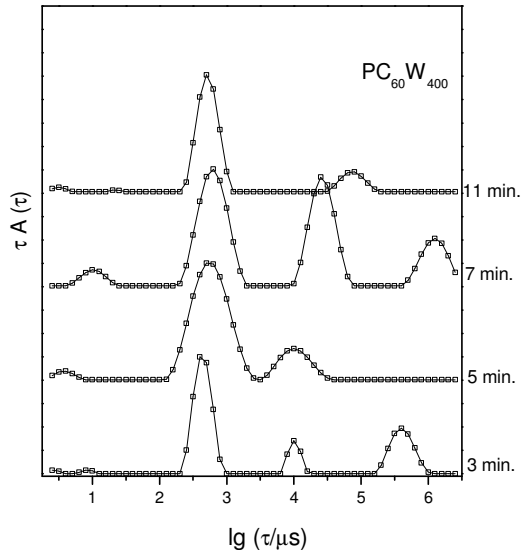


Figura 3.11 Distribuições dos tempos de relaxação para a amostra $PC_{60}W_{400}$ ao longo de 15 minutos.

A importância da determinação dessas estruturas decorre do seu impacto sobre a preparação dos quitossomas. Dessa forma, a modulação da concentração dos componentes nas emulsões reversas pode afetar as características finais destes sistemas compósitos.

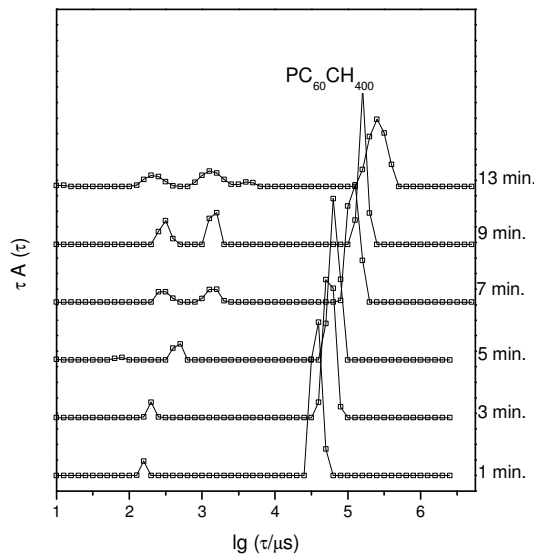


Figura 3.12 Distribuições dos tempos de relaxação para a amostra $PC_{60}CH_{400}$ ao longo de 15 minutos.

Dependendo do tipo de estrutura previamente formada, após a evaporação do solvente, o empacotamento dos fosfolípídeos e a distribuição da quitosana ao longo das lamelas serão distintos. O conhecimento acerca dessas diferenças permite controlar, modificar ou adequar as propriedades dos sistemas.

A Figura 3.13 apresenta um esquema de algumas prováveis estruturas formadas pela combinação de fosfatidilcolina em fase orgânica após emulsificação com água ou solução de quitosana.

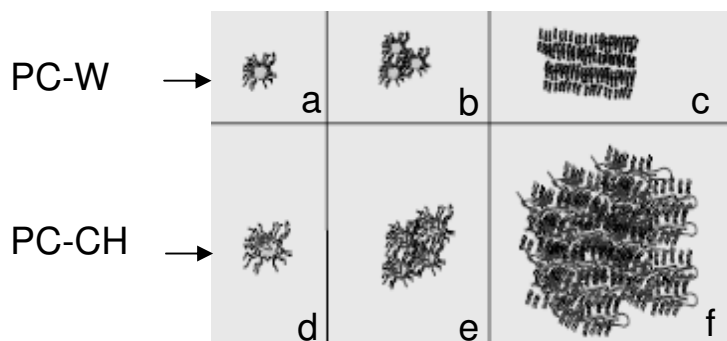


Figura 3.13 Algumas possíveis estruturas formadas pelas misturas de PC com água (a), (b), (c) e pelas misturas de PC com quitosana. (d), (e) e (f).

Dentre as diferentes estruturas observadas nas amostras na ausência (PC-W) e na presença de quitosana (PC-CH), destacam-se as micelas reversas de diversos tamanhos (Figura 3.13 a e d). Apesar da figura representar apenas micelas reversas pequenas, foram observadas micelas de tamanhos até poucas centenas de nanômetros. Além das micelas individuais, também foram observados agregados micelares (Figura 3.13 b e e) e agregados lamelares (Figura 3.13 c e f) sendo que a presença de quitosana levou à estruturas maiores e mais estáveis.

3.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados de espalhamento de luz e de raios-X verificou-se que a presença de quitosana em regime de baixa concentração de fosfolípídeo, sua quantidade não é suficiente para cobrir a superfície das gotículas da emulsão e mesmo em presença de quitosana, não há formação de fase lamelar.

Para regimes intermediários de concentração de fosfolípídeo, observaram-se transições entre estruturas micelares ao longo do tempo. A presença do polieletrólito propiciou a ocorrência de fases diferentes daquelas observadas pelo arranjo dos fosfolípídeos sozinhos. A formação de lamelas somente foi observada em concentrações altas de quitosana.

Em regimes de alta concentração de fosfolípídeo em solvente orgânico, foi observada a ocorrência de estrutura lamelar mesmo na ausência de quitosana. Além disso, de uma maneira geral, a presença de quitosana conduziu à formação preferencial de estruturas lamelares e à manutenção dessa estrutura ao longo do tempo. Além disso, observou-se a capacidade da quitosana em estabilizar as estruturas compostas por fosfolípídeos.

Com os resultados da caracterização da primeira etapa da preparação dos quitossomas (etapa de formação de micelas reversas) pelo método de emulsificação em fase reversa, avaliando-se diferentes concentrações dos componentes, o estudo de todas as etapas do processo foi complementado.

O impacto desse estudo sobre as características dos lipossomas ou quitossomas obtidos a partir de dispersões em diferentes regimes de concentração de fosfolípídeo, água ou solução de quitosana pode ser previsto. Dessa forma, em regimes de baixas concentrações, tanto de fosfolípídeo quanto de quitosana, menos estruturas lamelares são formadas, levando a um menor número de lamelas por lipossoma ou quitossoma formado. A presença de estruturas lamelares com maior estabilidade nas amostras contendo altas concentrações de fosfolípídeos e quitosana, notadamente a amostra PC₆₀CH₄₀₀, é um indício de que os quitossomas formados a partir dessas dispersões apresentem número de bicamadas superior.

3.5 REFERÊNCIAS

1. Troutier, S-L.; Ladavière, C. *Adv. Colloid. Interfac.* **2007**, 133, p. 1-21.
2. Gerelli, Y.; Barbieri, S.; Di Bari, M. T.; Deriu, A.; Cantu, L.; Brocca, P.; Sonvico, F.; Colombo, R.; May, R.; Motta, S. *Langmuir* **2008**, 24, 11378-11384.
3. Neumann, M. G.; Schmitt, C. C.; Iamazaki, E. T. *Carbohydr. Res.* **2003**, 338, 1109-1113.
4. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*, **2008**; 9, 2237-2243.
5. Martins, R. M.; Becker, C. M.; Samios, D.; Bica, C. I. D. *Macromol. Symp.* **2006**, 245-246, 287-296.
6. Mertins, O.; Lionzo, M. I. Z.; Micheletto, Y. M. S.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. *Mat. Sci. Eng. C.* **2009**, 29, 463-469.
7. Hammersley, A. P. *Fit 2D: An Introduction and Overview*. ESRF Internal Report, ESRF 97HA02T, Grenoble, 1997.
8. Jakes, J. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1995**, 60, 1781.
9. Bernardes, J. S.; Norrman, J.; Piculell, L.; Loh, W. J. *Phys. Chem.* **2006**, 23433.
10. Weiss, T. M.; Narayanan, T.; Wolf, C.; Gradzielski, M., Panine, P.; Finet, S.; Helsby, W. I. *Phys. Ver. Lett.* **2005**, 94(3), 038303.

**4. PREPARAÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE
LIPOSSOMAS MULTILAMELARES
EM PRESENÇA DE QUITOSANA E
REVESTIMENTO COM
CONDROITINA**

4.1 INTRODUÇÃO

Além dos estudos fundamentais que avaliam a associação entre polieletrólitos e fosfolipídeos, o desenvolvimento de nanopartículas a partir desses componentes apresenta implicações científicas e tecnológicas.¹ Na área de alimentos, por exemplo, tais sistemas podem ser empregados como estabilizantes,² na área farmacêutica como encapsulantes de substâncias ativas visando liberação controlada e produção de vacinas.³ Além disso, podem ser utilizados como reatores em nanoescala,⁴ no desenvolvimento de biosensores,⁵ etc.

Os sistemas compósitos polieletrólito-fosfolipídeo podem ser desenhados de diferentes maneiras, como por exemplo, mediante a formação de núcleos poliméricos revestidos por bicamadas fosfolipídicas. Essa estratégia foi empregada para estabilizar, controlar a morfologia e favorecer a reprodutibilidade de membranas depositadas.⁶ Com esse conceito, a empresa Biovector[®] Therapeutics desenvolveu lipossomas de núcleo sólido, constituídos de um núcleo de polissacarídeo modificado, revestido com fosfolipídeos combinando o co-transporte de substâncias hidrofílicas no núcleo com substâncias hidrofóbicas na região interna das membranas lamelares. Essas nanopartículas foram avaliadas como carreadores peptídicos em ensaios biológicos e os resultados demonstraram êxito.⁷

Outra maneira de produzir sistemas compósitos é mediante a preparação de um núcleo fosfolipídico revestido por polieletrólitos. Essa metodologia vem sendo utilizada na obtenção de quitossomas, ou seja, lipossomas na presença de quitosana.⁸ A preparação dos quitossomas é feita através da técnica de emulsificação e evaporação em fase reversa, que permite, de forma reprodutível, a deposição de quitosana entre as bicamadas fosfolipídicas. Foi verificado que, mesmo em quantidades pequenas, a quitosana promove a estabilização da estrutura lamelar por interações eletrostáticas.⁹ O efeito da presença de quitosana nas regiões internas e externas de lipossomas multilamelares denota forte afinidade entre os grupamentos fosfato dos fosfolipídeos e o grupo amino da quitosana.¹⁰ O emprego de polieletrólitos associados a lipossomas tem como objetivo aprimorar a estabilidade, as características físico-químicas e superficiais podendo adaptar o carreador a diferentes ambientes químicos ou direcioná-lo para um sítio específico, quando desenvolvidos para fins terapêuticos.

No presente capítulo, será apresentada a avaliação do impacto de diferentes quantidades de polieletrólitos sobre o tamanho, a carga superficial e a rigidez das bicamadas de lipossomas multilamelares. Para esse fim, foram desenvolvidos novos lipossomas compósitos contendo quitosana e condroitina. A utilização de um segundo polieletrólito, no caso a condroitina, no

revestimento foi empregado com o intuito de modular a carga superficial mantendo a estabilidade conferida pela quitosana. É sabido que o potencial elétrico da partícula tem um papel importante nos processos biofísicoquímicos das biointerfaces. Dessa forma, é necessário controlar as cargas de partículas a serem empregadas para fins biomédicos, especialmente quando estão envolvidas densidades catiônicas, devido à forte interação com os resíduos de cargas negativas da superfície das células.¹¹ A escolha da condroitina foi baseada nas suas características, uma vez que apresenta funções sulfato e ácido carboxílico que interagem eletrostaticamente com a quitosana formando complexos estáveis em meio aquoso, reduzindo as cargas positivas e mantendo a estabilidade promovida pela quitosana.^{12,13}

A avaliação dos lipossomas compósitos envolveu a aplicação da Teoria de Caillé Modificada sobre as intensidades dos picos de Bragg obtidos nos experimentos de espalhamento de raios-X. Valores de potencial ζ foram utilizados para determinar a densidade de carga e quantidade de polieletrólitos adsorvidos. Experimentos de espalhamento de luz foram realizados para encontrar parâmetros complementares à análise estrutural, bem como para a determinar o tamanho das partículas.

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Preparação das amostras

A fosfatidilcolina (PC), a quitosana (CH) e o acetato de etila empregados na preparação das amostras tiveram suas características apresentadas no item 3.2.1. O sulfato de condroitina (CS) de massa molar de $2,2 \times 10^4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ utilizado foi uma doação de Solabia (lote OP0841/08). Todas as amostras preparadas foram diluídas utilizando-se água purificada Milli-Q (condutividade $< 18,4 \mu\text{S}$). Todos os produtos e reagentes foram utilizados como recebidos, sem purificação prévia.

Quitossomas (Chit) modificados com condroitina (Chit-CS) foram preparados pela técnica de emulsificação e evaporação em fase reversa.⁸ Duas soluções de quitosana (1 mg/mL e 10 mg/mL) foram preparadas e deixadas em repouso para hidratação do polímero durante 24 horas em tampão acetato (pH 4,5). Posteriormente foram filtradas através de membrana 8 μm de porosidade. Alíquotas de 400 μL de cada solução foram adicionadas a 5 mL de dispersões de fosfatidilcolina em acetato de etila (1,2% m/V). Cada mistura foi submetida a banho de ultrassom durante 5 minutos e a seguir o solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida. O organogel precipitado foi disperso em água purificada sob agitação vigorosa, rendendo duas séries de amostras, Chit-1 e Chit-10, referidas como série de baixa e de alta concentração de polieletrólitos, respectivamente. Nesse ínterim, a condroitina (0,5 mg/mL e 5 mg/mL) foi dispersa em água purificada e filtrada (poro 8 μm). As amostras Chit-CS-1 e Chit-CS-10 foram preparadas pela adição de 0,3 mL das soluções de 0,5 mg/mL e 5 mg/mL de condroitina gotejados sobre 3 mL de Chit-1 e Chit-10, sob agitação (1200 rpm). As amostras Chit-CS-2 e Chit-CS-20 foram obtidas a partir de 2,0 mL de Chit-CS-1 e Chit-CS-10, adicionadas de mais 0,2 mL de cada solução de condroitina. Finalmente, as amostras Chit-CS-3 e Chit-CS-30 foram produzidas a partir de 1,0 mL de Chit-CS-1 e Chit-CS-10, mais 0,1 mL de cada solução de condroitina. A composição quantitativa das amostras pode ser vista na Tabela 4.1. Os números de cargas da fosfatidilcolina ($n^{\text{PC}^{\text{a}}}$), da quitosana ($n^{\text{CH}^{\text{b}}}$) e da condroitina ($n^{\text{CS}^{\text{c}}}$), em 100 mL de suspensão, também estão contemplados na Tabela 4.1.

O número de cargas foi calculado com base na concentração, na massa molar, no número de resíduos carregados, no grau de dissociação e no grau de acetilação (este para quitosana apenas) de cada componente no pH final das suspensões (5,5). Lipossomas sem polieletrólitos foram preparados e usados como referência em alguns experimentos. As

amostras foram preparadas acima da temperatura da principal transição de fase dos fosfolípidos majoritários, que se situa a temperaturas menores do que $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$.^{14,15}

Tabela 4.1 Concentração em massa e em número de cargas ($\times 10^{18}$) de fosfatidilcolina, quitosana e condroitina em 100 mL de suspensão.

Amostra	PC (% m/V)	$n^{\text{PC}^{\text{a}}}$	CH (% m/V)	$n^{\text{CH}^{\text{b}}}$	CS (% m/V)	$n^{\text{CS}^{\text{c}}}$
Chit-1	1,2	950	0,0008	1,7	-	-
Chit-CS-1	1,2	950	0,0008	1,7	0,0004	1
Chit-CS-2	1,2	950	0,0008	1,7	0,0008	2
Chit-CS-3	1,2	950	0,0008	1,7	0,0012	3
Chit-10	1,2	950	0,008	17	-	-
Chit-CS10	1,2	950	0,008	17	0,004	10
Chit-CS-20	1,2	950	0,008	17	0,008	20
Chit-CS-30	1,2	950	0,008	17	0,012	30

^a é o número de cargas negativas dos grupamentos fosfato. ^b é o número de cargas positivas dos grupos D-glicosamina. ^c é o número de cargas negativas dos grupos sulfato e ácido carboxílico.

As amostras foram preparadas em triplicata e caracterizadas logo após sua preparação, salvo aquelas amostras empregadas nas medidas de espalhamento de luz estático, que foram analisadas após sua preparação e durante o mês subsequente à sua preparação.

4.2.2 Espalhamento de luz

As medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS) foram feitas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ no equipamento Brookhaven Instruments (goniômetro BI-200M e correlador digital BI-9000AT) com laser de He-Ne ($\lambda = 632,8\text{ nm}$) como fonte de luz. A célula contendo a amostra permaneceu imersa em um líquido de ajuste do índice de refração, decalina (decahidronaftaleno) (Aldrich), e o volume de espalhamento foi reduzido por uma abertura de $0,4\text{ mm}$ antes da sua detecção pela fotomultiplicadora que foi disposta a 90 graus em relação ao feixe de luz incidente na amostra. As funções de correlação foram obtidas até que a linha de base estivesse ajustada a uma teórica. A maioria das amostras necessitou de 1 minuto de aquisição. Para a realização das medidas, as amostras foram diluídas ($2\% \text{ v/v}$) em uma solução de NaCl 10 mM e filtradas através de membranas de $0,45\text{ }\mu\text{m}$.

As medidas de espalhamento de luz estático (SLS) foram realizadas nos ângulos de $35, 45, 55, 60, 75, 90, 105, 120, 135$ e 145 graus com abertura de 1 mm e filtro de 633 nm . Os

valores de intensidade absoluta (I) foram determinados experimentalmente e os valores de q foram determinados empregando-se a seguinte relação:

$$q = \frac{4\pi \text{sen} \theta}{2} \quad (4.1)$$

Sendo θ , o ângulo da medida. Posteriormente, os valores de módulo elástico B foram obtidos aplicando-se a equação:

$$I_{q \rightarrow 0} = \varepsilon^2 \frac{k_B T}{B \lambda^2 q^2} \quad (4.2)$$

Sendo ε a constante dielétrica da água igual a 80, $k_B T$ a constante de Boltzmann multiplicada pela temperatura igual a 4×10^{-11} erg e λ o comprimento de onda da luz incidente 632,8 nm.

4.2.3 Potencial ζ

As medidas de potencial ζ das partículas foram conduzidas em um Zetasizer Nano série Nano-Zs, Malvern Instruments, modelo ZEN3500 com luz coerente He-Ne 632,8 nm e 4,0 mV como fonte. As amostras foram diluídas (0,2% v/v) em uma solução de NaCl 10 mM. As medidas foram feitas em triplicata, a 20 °C.

4.2.4 Espalhamento de raios-X em baixos ângulos

Os experimentos foram conduzidos no LNLS com $\lambda = 1,48 \text{ \AA}$, na linha de SAXS2 com distância amostra-detector de 1505,64 mm. Todas as medidas foram conduzidas a 20 °C. O espalhamento em baixos ângulos foi adquirido para vetores de espalhamento q ($q = 4\pi/\lambda \text{ sen} (\theta/2)$; $2\theta =$ ângulo de espalhamento) na faixa de 0,1 a 2,2 nm^{-1} . A redução dos dados foi realizada usando o programa FIT2D.¹⁶ Após atenuação e correção da intensidade, o background e o solvente foram descontados. Para a construção de cada curva, ao menos 3 diferentes aquisições experimentais foram empregadas. Os picos de Bragg foram ajustados pelo modelo da Teoria de Caillé Modificada (TCM)¹⁷ usando o programa livre SASFit, desenvolvido por J. Kohlbrecher e I. Bressler.¹⁸ A fórmula pela TCM para o fator estrutura $S(q)$ é:

$$S_{MCT}(q) = N + 2 \sum_{k=1}^{N-1} (N-k) \cos(kqd) \exp\{-(d/2\pi)^2 q^2 \times \eta[\gamma + \ln(\pi k)]\} \quad (4.3)$$

Sendo N o número de bicamadas, d a distância de repetição, k o parâmetro indicativo de desordem ou posições intervenientes e γ a constante de Euler. O parâmetro de Caillé η_{MCT} é dado por:

$$\eta_{MCT} = \pi k_B T / 2d^2 (BK_c)^{1/2} \quad (4.4)$$

Sendo B o módulo elástico e K_c a rigidez. O resultado do ajuste do pico ao modelo fornece os valores de η_{MCT} .¹⁹

4.2.5 Determinação do rendimento do complexo

A determinação do rendimento do complexo ($C\%$) foi feita pela precipitação de complexos com diferentes razões condroitina/quitosana (ρ) a fim de determinar a quantidade de polieletrólito envolvida na formação do complexo. ρ é a razão entre número total de sítios sulfato e carboxilato e o número de resíduos de glicosamina presentes nas soluções. Depois da mistura de soluções dos dois polieletrólitos de cargas opostas sob agitação, o precipitado foi centrifugado, separado do sobrenadante, levado à secura e pesado. O rendimento de massa do complexo foi obtido pela diferença entre a massa inicial de cada polieletrólito empregada para preparar as soluções e a massa do precipitado seco.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os experimentos de espalhamento de luz dinâmico são amplamente usados para determinar tamanhos de partícula na escala nanométrica em dispersões diluídas. Informações adicionais podem ser obtidas pela análise das funções de autocorrelação temporal e pelas distribuições dos tempos de relaxação obtidas a partir da análise destas funções. As Figuras 4.1 e 4.2 apresentam as funções de autocorrelação das diferentes amostras. Houve similaridade entre as funções, no entanto, as distribuições dos tempos de relaxação (Figura 4.3), permitiram observar algumas pequenas diferenças entre as amostras.

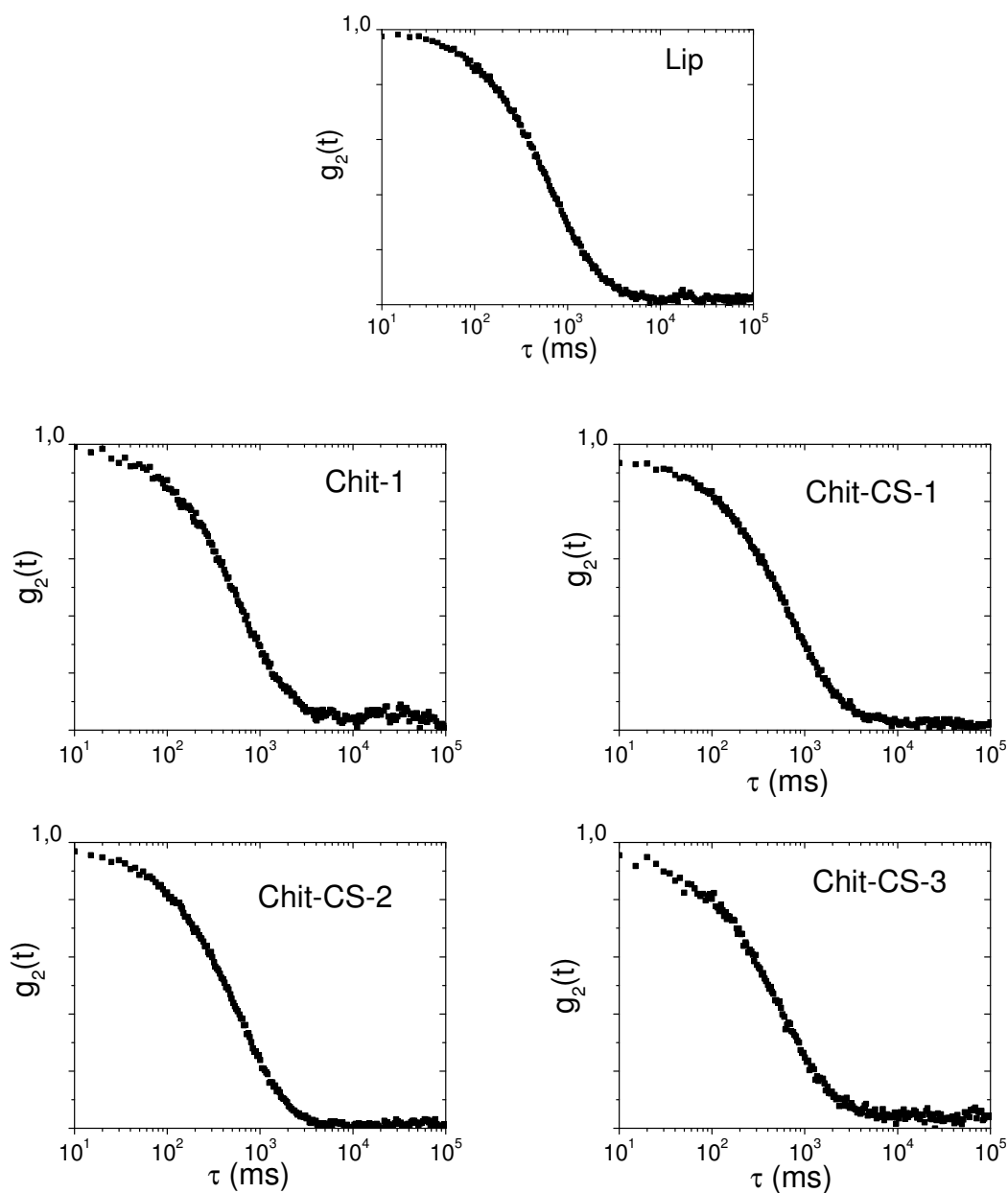


Figura 4.1 Funções de autocorrelação das amostras Lip, Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3.

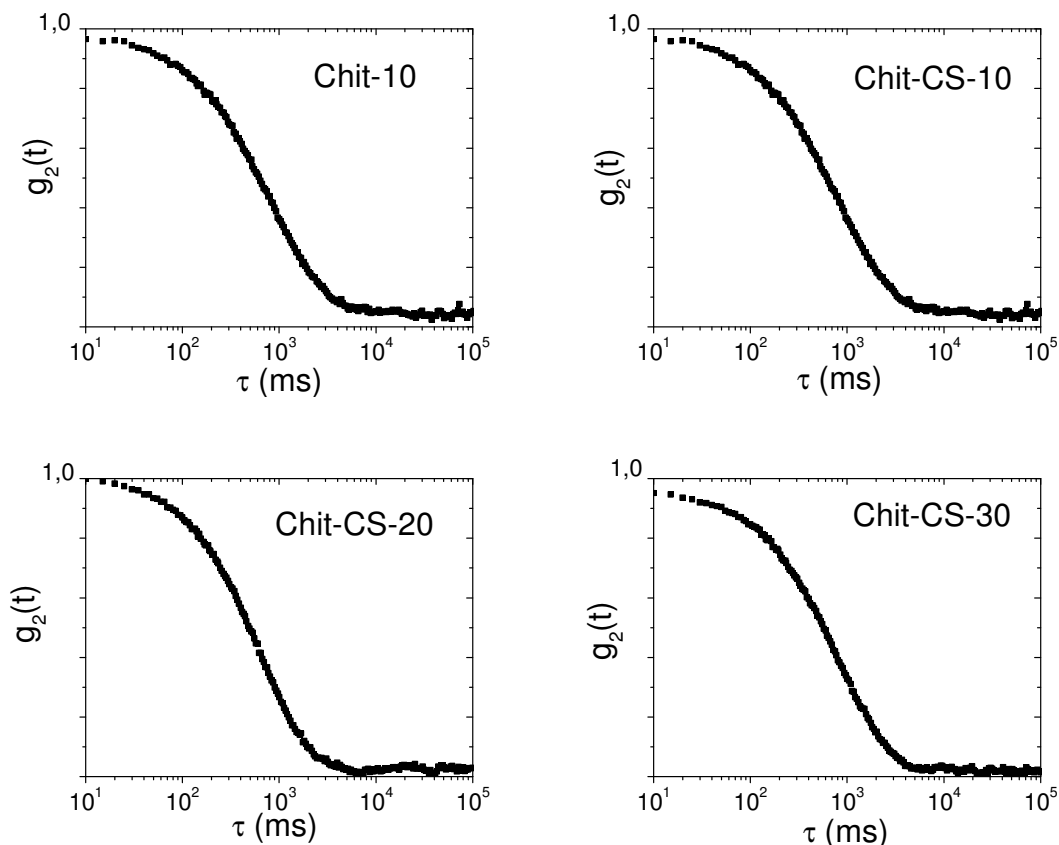


Figura 4.2 Funções de autocorrelação das amostras Chit-10, Chit-CS-10, Chit-CS-20 e Chit-CS-30.

Uma única distribuição foi observada para as amostras de lipossomas (Lip) enquanto que para as amostras contendo polieletrólitos, uma segunda distribuição pôde ser notada representando a ocorrência de outro processo dinâmico individual, num modo rápido. Esta segunda distribuição representa uma contribuição de partículas menores, na faixa de 50 a 150 nm de diâmetro. Comparando estes dados de espalhamento com os dados de espalhamento de raios-X em baixos ângulos (Figura 4.4), foi possível encontrar a segunda população de partículas também nestas análises. Em regiões de baixo q houve um aumento na intensidade de espalhamento e isso foi mais evidente com o incremento da quantidade de polieletrólito nas amostras. Tais achados evidenciam a presença de pequenos agregados.

Uma investigação paralela para determinar a origem dos pequenos agregados foi realizada utilizando-se os dados de espalhamento de luz. Levantou-se a hipótese de que esses pequenos agregados pudessem ter se formado pela associação entre cadeias de quitosana e condroitina presentes na solução. Essa hipótese foi confirmada da seguinte maneira. Ensaios de espalhamento foram realizados com amostras obtidas pela combinação de soluções diluídas de quitosana e condroitina nas mesmas proporções daquelas empregadas na obtenção

das amostras Chit-CS. Os diâmetros encontrados para esses agregados situaram-se em torno de 100 nm, concordando com a faixa de tamanhos do modo rápido.

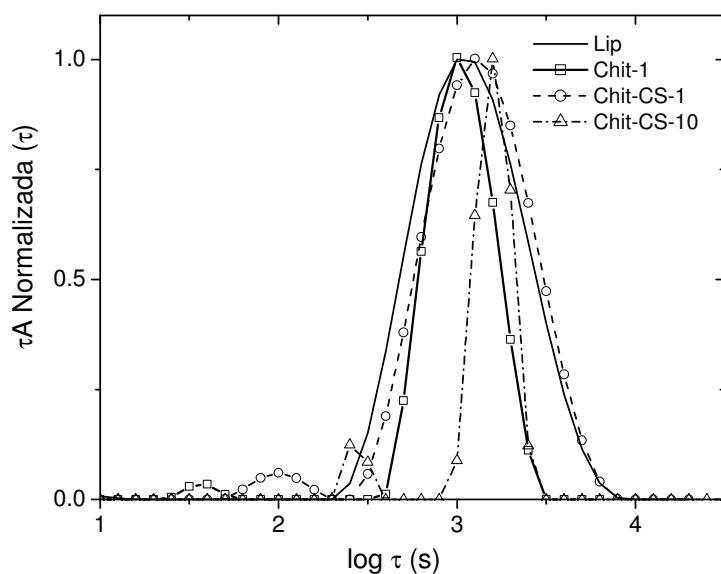


Figura 4.3 Distribuição dos tempos de relaxação normalizados das amostras Lip, Chit-1, Chit-CS-1 e Chit-CS-10.

No entanto, a quantidade relativa desses pequenos agregados permanecia desconhecida. Para determinar o percentual de pequenos agregados, os dados de espalhamento de luz obtidos da análise das amostras originais foram submetidos a outro tratamento. Geralmente a distribuição de tamanhos é obtida gratificando a intensidade relativa da luz espalhada. Entretanto, esse procedimento pode superestimar a contribuição da população secundária devido a diferenças nos índices de refração apresentados pelos agregados em comparação com aqueles apresentados pelas partículas Chit-CS.

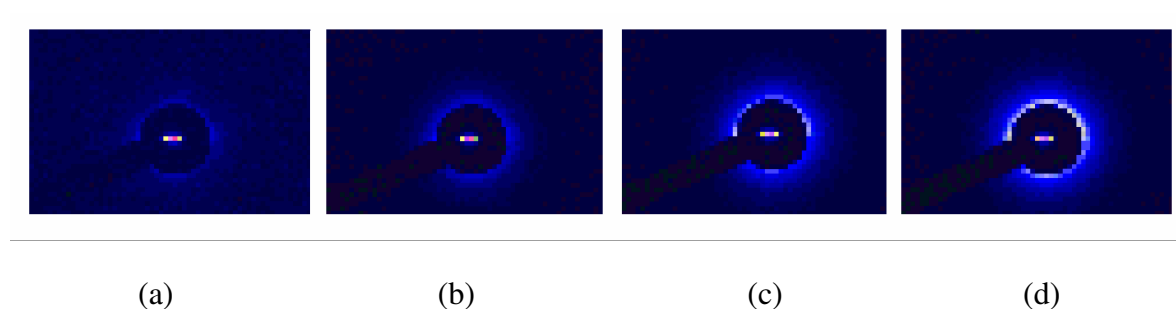


Figura 4.4 Imagens 2-D do espalhamento de raios-X em baixos ângulos obtidos das amostras Chit-1 (a), Chit-CS-1 (b), Chit-CS-2 (c) e Chit-CS-3 (d).

Quando mais de uma distribuição está presente, o índice de refração pode ser usado como parâmetro de entrada para converter a distribuição pela intensidade em uma distribuição

por volume e número de partículas. Os valores de índice de refração n_D ²² obtidos da literatura foram 1,420 para lipossomas, 1,675 para quitosana e 1,339 para condroitina.^{20,21,22} Mudando-se o valor do índice de refração como parâmetro de entrada usado para o ajuste das funções obtidas, verificou-se o mesmo perfil de distribuição. Isso significa que, quantitativamente, a população de pequenos agregados não foi relevante. Notadamente, se compararmos as áreas sob a curva das distribuições dos tempos de relaxação dos dois modos, lento e rápido, o modo rápido representou escassos 3% da amostra Chit-CS-1. Para a amostra Chit-CS-10 o percentual alcançou valores próximos a 10%. Discussões adicionais sobre os agregados serão feitas a seguir, quando forem apresentados os resultados de potencial ζ .

Ainda a respeito dos resultados de espalhamento de luz, a amostra Lip apresentou diâmetro de partícula em torno de 190 ± 2 nm, como pode ser observado na Figura 4.5, painel superior.

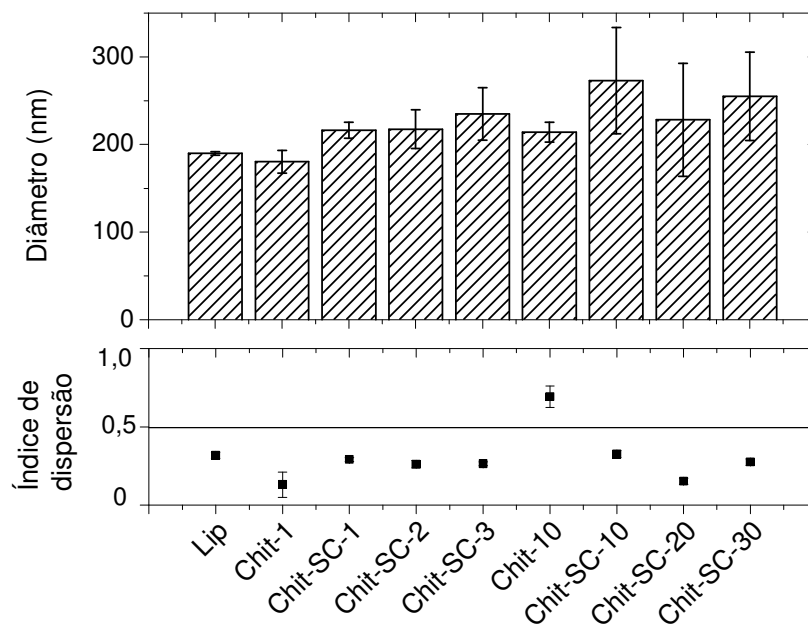


Figura 4.5 Médias dos diâmetros (painel superior) e índices de dispersão (painel inferior) para as amostras Lip, Chit e Chit-CS com concentrações variadas de polieletrólitos.

A amostra Chit-1 apresentou tamanhos similares, em torno de 180 ± 13 nm. Observou-se tendência de aumento no tamanho e no desvio padrão dos tamanhos das partículas conforme houve adição de maior quantidade de polieletrólito. As amostras Chit-CS-1 e Chit-CS-3 apresentaram diâmetros entre 216 ± 13 nm e 235 ± 30 nm, respectivamente. Apesar dos desvios padrão elevados para algumas amostras, a maioria dos índices de dispersão esteve abaixo de

0,3 (Figura 4.5, painel inferior). A análise de variância (ANOVA) dos diâmetros demonstrou que $F_{\text{calc}} = 0,050$ e $F_{\text{tab}}(2,18); 5\% = 0,051$, dessa forma, não havendo diferença significativa entre os diâmetros.

Na Figura 4.6 estão apresentados os valores de potencial ζ , para as amostras. O potencial ζ , depende do número de moléculas fixadas na superfície, permitindo a determinação da densidade de carga das moléculas ligadas.²³ Os valores negativos de potencial ζ apresentados pela amostra Lip (-45 mV) eram esperados e foram devidos aos 5% de ácido fosfatídico e alguns grupos carboxílicos resultantes da oxidação parcial dos lipídeos.

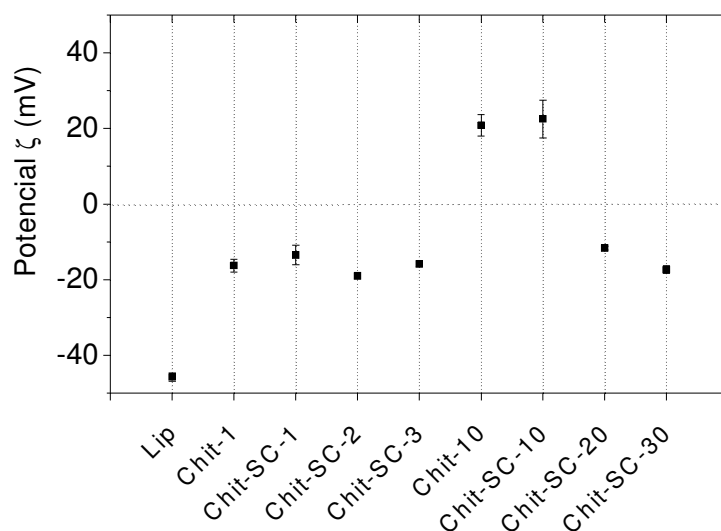


Figura 4.6 Valores de potencial ζ para as amostras Lip, Chit e Chit-CS contendo concentrações variadas de polieletrólitos.

Apesar da característica zwitteriônica da fosfatidilcolina em valores de pH entre 1,7 e 11, no pH das suspensões (pH 5,5), as cargas negativas foram mais pronunciadas. Alguns resultados similares são encontrados na literatura para lipossomas de fosfatidilcolina.^{24,25} Este valor altamente negativo nas amostras de lipossomas é importante, pois garante uma interação ainda maior com a quitosana a ser adicionada na obtenção dos quitossomas.

Considerando que cada molécula de fosfolipídeo ocupa cerca de 68 \AA^2 da superfície do lipossoma, a densidade de cargas total para a fosfatidilcolina em 100 mL de suspensão de lipossomas foi cerca de $0,95 \times 10^{21}$, considerando-se todas as moléculas, como apresentado na Tabela 4.1. Este é um valor teórico, entretanto, com base nas medidas de potencial ζ , a

densidade de carga da amostra Lip, empregando-se a equação $\sigma = Qe/4\pi a^2$, apresentou valor de 0,11 cargas negativas por molécula de fosfolípídeo. Os valores de densidade de carga para todas as amostras estão apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Valores de densidade de cargas calculadas a partir dos dados de potencial ζ .

Amostra	$\sigma 10^{-4} \text{Å}^{-2}$ (sinal)
Lip	16 (-)
Chit-1	7 (-)
Chit-CS-1	6 (-)
Chit-CS-2	8 (-)
Chit-CS-3	7 (-)
Chit-10	9 (+)
Chit-CS-10	9 (+)
Chit-CS-20	5 (-)
Chit-CS-30	7 (-)

A adição de polieletrólitos em concentrações baixas apresentou um leve efeito sobre os valores de potencial ζ . A quitosana na amostra Chit-1, levou a valores menos negativos de carga (-16 mV). Assim, parte da quitosana neutralizou as cargas negativas dos fosfolípídeos nos quitossomas. Considerando a concentração, o peso molecular (150 kDa), o número de grupos glicosamina (80% de desacetilação) e a constante de dissociação ($\alpha=0,2$) da quitosana em pH 5,5 a determinação da densidade de cargas na amostra Chit-1 conduziu ao valor de $1,7 \times 10^{18}$ cargas positivas por 100 mL de suspensão. Se compararmos com a densidade de cargas da amostra Lip, houve neutralização de 56% das cargas negativas dos fosfolípídeos presentes interna e externamente, uma vez que a quitosana é adicionada durante a preparação dos quitossomas. Na superfície de cada lipossoma de 200 nm, o número calculado de moléculas de fosfolípídeos foi de, aproximadamente, $7,4 \times 10^5$ moléculas, correspondendo a $4,5 \times 10^4$ cargas negativas. Se todas as cadeias de quitosana estiverem interagindo com os fosfolípídeos, $1,3 \times 10^4$ cargas positivas de quitosana seriam necessárias para reduzir a carga superficial de -45 mV (Lip) para -16 mV (Chit-1).

Porém, essa interação não é equimolar e as cadeias de quitosana na superfície podem estar dispostas como laços, cujas voltas expõem as cargas positivas e contribuem para a redução dos valores de potencial ζ . Notadamente, a quitosana está distribuída interna e externamente nas amostras de Chit, diferentemente da condroitina que está presente apenas na superfície. Toda a quitosana presente na amostra Chit-1 acredita-se estar ligada à estrutura

multilamelar do quitossoma devido às seguintes razões: *i*) a técnica aplicada para preparar os quitossomas garante um íntimo contato entre a quitosana e os fosfolipídeos, *ii*) o número de cargas negativas (sítios para a ligação da quitosana) provenientes dos fosfolipídeos é muito superior ao número de cargas positivas da quitosana, *iii*) o pH das suspensões (5,5) não favorece a dissolução da quitosana, *v*) em trabalhos prévios²⁶ foi verificado que a ligação de quitosana contendo um marcador fluorescente à superfície de lipossomas gigantes ao longo de 10 dias demonstrou que o polímero permanece fixo na superfície ao longo daquele tempo e *vi*) os valores de potencial ζ mostraram que a quitosana neutralizou algumas cargas negativas dos fosfolipídeos, reduzindo os valores de potencial ζ . Para causar tal alteração, todas as cargas positivas da quitosana precisariam estar envolvidas.

A subsequente adição de quantidades crescentes de condroitina às amostras Chit-1, como verificado para as amostras Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3 mostrou pouco ou nenhum efeito sobre os valores de potencial ζ . A quantidade de quitosana disponível (os laços das cadeias de quitosana na superfície) para ligação com a condroitina foi muito pequena para promover uma modificação nos valores de potencial ζ . Provavelmente, a maior parte da condroitina adicionada estivesse presente em solução e não associada. Além disso, após a adição de condroitina, algumas cadeias de quitosana podem ter sido destacadas da superfície devido a interações preferenciais com a condroitina, o que justificaria a existência de pequenos agregados. Os dados de espalhamento de luz, comentados anteriormente, mostraram que a quantidade desses agregados foi de cerca de 3% do total de partículas na suspensão.

O emprego de quitosana em maiores concentrações conduziu a valores de potencial ζ positivos nas amostras Chit-10 e Chit-CS-10. A quantidade de quitosana nestas amostras foi capaz de diminuir as cargas negativas dos fosfolipídeos, bem como fornecer uma densidade de cargas de 9×10^{-4} cargas positivas por \AA^2 . Houve, assim, um excesso de quitosana adsorvido na interface das partículas após o alcance da saturação da superfície fosfolipídica. A primeira alíquota de condroitina (Chit-CS-10) não foi suficiente para causar mudança na densidade de cargas, que permaneceu na mesma ordem de grandeza. Essa quantidade de condroitina interagiu apenas a quitosana adsorvida superficialmente ao quitossoma. (i.e., as cadeias de quitosana formadoras dos pequenos agregados observados pelas técnicas de espalhamento previamente mencionadas e que corresponderiam a 10% das partículas presentes na amostra), escassamente afetando as cargas na superfície dos quitossomas. No entanto, a adição das segunda e terceira alíquotas de condroitina (Chit-CS-20 e Chit-CS-30) causou reversão das cargas para valores negativos. A mudança no potencial ζ demonstrou que

a quantidade de condroitina na superfície foi capaz de neutralizar as cargas positivas da quitosana (adsorvida mais ou menos superficialmente), bem como de prover cargas suficientes para reverter a carga superficial para valores negativos. Provavelmente, a segunda alíquota de condroitina adicionada tenha sido suficiente para saturar a superfície dos lipossomas compósitos Chit-CS-20, uma vez que a terceira alíquota não causou mudança nos valores de potencial ζ na superfície dos lipossomas compósitos Chit-CS-30. Resultados comparáveis foram encontrados na literatura empregando-se quitosana alquilada (polieletrólito positivo) e ácido hialurônico (polieletrólito negativo) para decorar lipossomas empregando técnica de incubação.²⁷ Mesmo existindo algumas diferenças na preparação das amostras e nas razões de polieletrólito empregadas para o revestimento, os mesmos efeitos (eletrostáticos) parecem ser responsáveis pelas mudanças na carga superficial das partículas em ambos trabalhos.

Combinando-se os resultados obtidos pelas análise de potencial ζ com o valor de rendimento do complexo, as quantidades aproximadas de condroitina fixa na superfície das partículas das amostras Chit-CS-10 e Chit-CS-20 puderam ser estimadas. O rendimento em massa do complexo $C\%$ obtido a partir das soluções preparadas com razões condroitina/quitosana $\rho = 0,5, 1,0$ e $2,0$ foram $95\%, 93\%$ e 87% , respectivamente. Este estudo mostrou que, aumentando-se a razão de condroitina/quitosana de $0,5$ para $2,0$, o $C\%$ sofreu redução. Provavelmente, durante a formação do complexo, algumas cargas positivas da quitosana tenham sido escondidas no interior do agregado, tornando-se indisponíveis para a formação do complexo com a condroitina, cujo excesso deve ter permanecido em solução. A razão condroitina/quitosana nas amostras Chit-CS-2, Chit-CS-3, Chit-CS-20 e Chit-CS-30 foi, certamente, maior do que $2,0$ indicando a provável existência de cadeias livres de condroitina em solução, como foi proposto anteriormente. Além disso, parte da quitosana na superfície das partículas não poderia estar disponível para a interação com a condroitina, uma vez que, estaria distribuída nas camadas internas e mesmo as cadeias de quitosana na superfície estariam parcialmente envolvidas em interações com fosfolipídeos. Dessa forma, baseando-se no número de cargas, no tamanho das partículas, no número de unidades estruturais N , na densidade de cargas e pelo rendimento provável do complexo, a quantidade de condroitina ligada à superfície foi estimada em $\sim 1,6 \times 10^{17}$ cadeias por 100 mL de suspensão de Chit-CS-20 e $\sim 1,8 \times 10^{17}$ cadeias por 100 mL de suspensão da amostra Chit-CS-30. A quantidade não ligada poderia estar sob a forma de cadeias livres ou formando os pequenos agregados. (Figura 4.7).

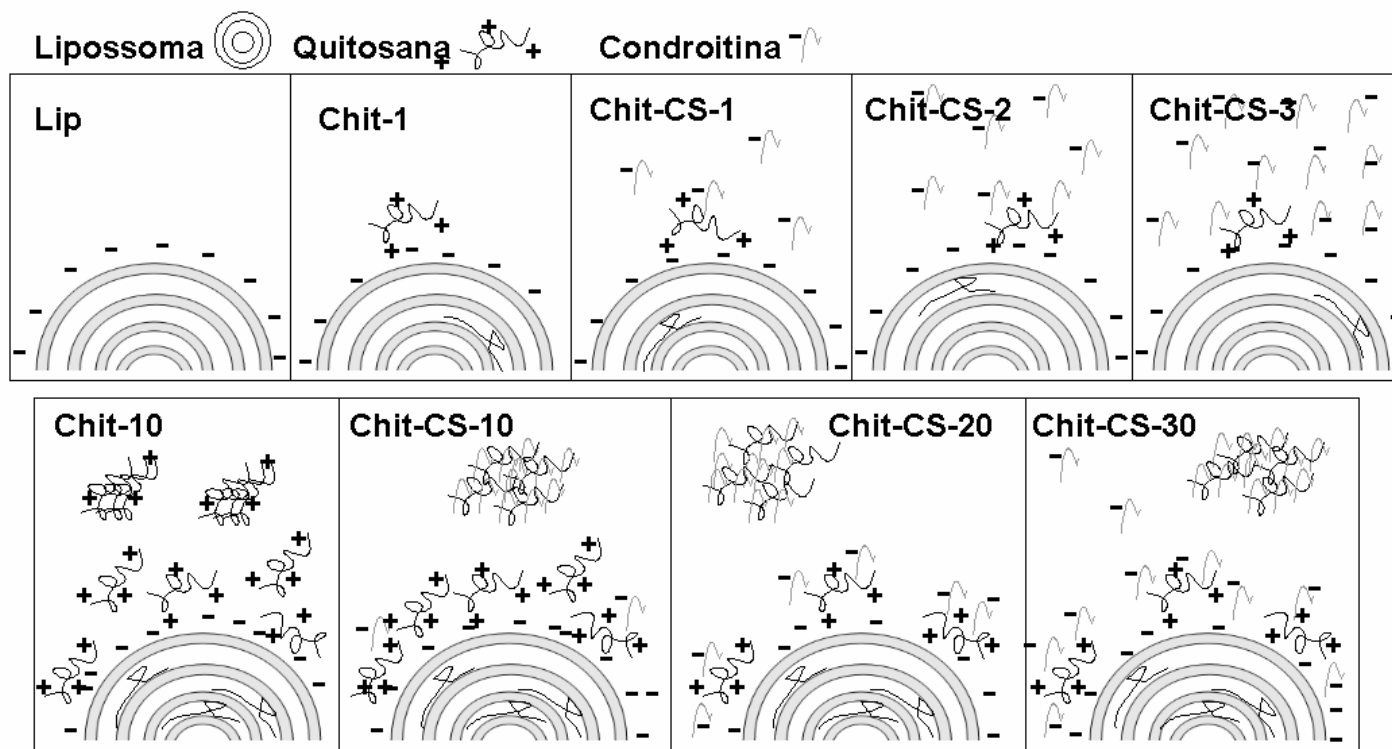


Figura 4.7 Esquema representando as amostras Lip, Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2, Chit-CS-3, Chit-10, Chit-CS-10, Chit-CS-20 e Chit-CS-30.

No que se refere aos resultados obtidos a partir dos experimentos de SAXS, os perfis para todas as amostras mostraram a ocorrência de duas ordens de difração, como é o padrão usual para amostras de lipossomas multilamelares (Figura 4.8).

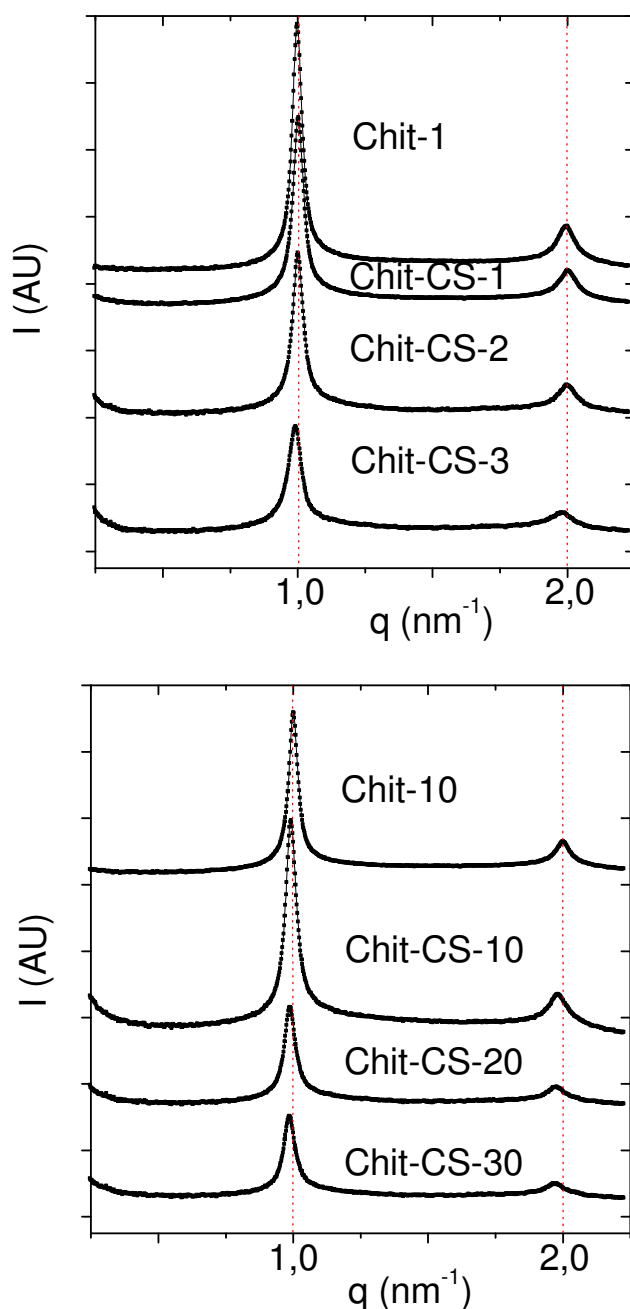


Figura 4.8 Perfil de difração das amostras Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3 (superior) e das amostras Chit-10, Chit-CS-10, Chit-CS-20 e Chit-CS-30 (inferior).

Em trabalhos prévios do grupo, foram realizados estudos envolvendo comparações entre lipossomas e quitossomas para determinar o número de unidades estruturais N_{FWMH} .^{8,9} Para determinar esse parâmetro, a largura à meia altura (*FWMH*, *Full Width at Half Maximum*) do primeiro pico de correlação é relacionada à posição do pico através da equação

$FWMH = 2\pi / Nd$.²⁸ A ocorrência de estruturas multilamelares foi verificada pela presença dos picos de difração de Bragg nos perfis de SAXS. O valor de N_{FWMH} , apresentado na Tabela 4.3, para a amostra de lipossomas foi de $N_{FWMH}=8$, obtido da literatura⁹ nas mesmas condições do experimento realizado para as outras amostras. Comparando-se com as amostras contendo quitosana, observa-se que os lipossomas (sem polieletrólitos) apresentaram lamelas em menor número.

Tabela 4.3 Resultados de SAXS mostrando a distância de repetição d ; a média do número de repetição estrutural dado pela largura à meia altura do pico ($FWMH$), N_{FWMH} e o parâmetro de Caillé para o primeiro pico, η_1 .

Amostra	d	N_{FWMH}	η_1
Lip	6,50 ⁹	8 ⁹	<0,200 ²⁴
Chit-1	6,26	23	440
Chit-CS-1	6,26	18	0,286
Chit-CS-2	6,27	21	0,348
Chit-CS-3	6,33	17	0,441
Chit-10	6,27	26	0,317
Chit-CS10	6,32	20	0,284
Chit-CS-20	6,35	20	0,280
Chit-CS-30	6,37	20	0,320

Isso é uma evidência de que a presença dos polieletrólitos não impediu a formação de domínios multilamelares orientados. Entretanto, estruturas unilamelares foram também observadas devido à presença de uma curva alargada com baixa intensidade entre os dois picos (Figura 4.8). Ajustando-se os perfis a uma função Lorentziana, com três picos (valores de $q = 1,0; 1,5$ e $2,0$), foi possível encontrar a proporção de estruturas unilamelares, que corresponderam a, no máximo, 40% das estruturas presentes. Foi observado maior percentual de lipossomas unilamelares nas amostras contendo as concentrações mais baixas de polieletrólitos, notadamente, a amostra Chit-1. Isso confirma a tendência verificada anteriormente (Capítulo 3) de formação preferencial de estruturas multilamelares em presença de altas concentrações de polieletrólito.

Quando lipossomas multilamelares (compósitos ou não) são analisados por um feixe de raios-X altamente convergente, como os de fonte de luz síncrotron, observa-se que a

intensidade espalhada a partir das bicamadas relaciona-se com a modulação da densidade eletrônica. O padrão de difração observado apresenta picos de Bragg com até duas ordens de difração e algum espalhamento difuso. De fato, a análise em ângulos maiores (*Wide Angle X-Rays Scattering*, WAXS) realizada para essas amostras não demonstrou a ocorrência de outras intensidades relevantes (dados não apresentados).

De posse do padrão de difração, a análise dos perfis de espalhamento foi baseada na contribuição majoritária do fator estrutura $S(q)$. Parâmetros estruturais como espessura da membrana, foram usados para comparar o efeito da quitosana e da condroitina nas amostras Chit-CS. Os valores estão apresentados na Tabela 4.3. A posição do primeiro pico expressa como valor de distância de repetição d demonstrou mudança sutil devido à variação da concentração de quitosana. Comparando-se amostras com concentrações baixas e altas de quitosana, observou-se que, conforme as concentrações foram aumentadas, houve um discreto aumento na distância de repetição d . Isso pode ser devido à localização da quitosana, associada com as regiões polares das bicamadas fosfolipídicas.

Para avaliar o efeito da quitosana no interior da estrutura multilamelar, os valores de largura a meia altura do primeiro pico de Bragg das diferentes amostras foram calculados e comparados. As amostras Chit-1 e Chit-10 apresentaram valores de N_{FWMH} entre 23 e 26 (Tabela 4.3). Estes valores foram elevados quando comparamos com os diâmetros dessas partículas apresentados na figura 4.6. Essa discrepância decorre do fato de os experimentos de SAXS terem sido realizados sem filtração prévia das amostras, permitindo a presença de partículas maiores do que aquelas medidas por espalhamento de luz. Isso não consiste em um problema já que as informações sobre a estrutura lamelar não são afetadas pelos tamanhos das partículas, uma vez que o fator estrutura relaciona-se com o número de unidades estruturais.

Comparando-se os valores de N_{FWMH} , antes e depois da adição de condroitina, verifica-se que houve uma redução de $20\% \pm 2,8$. Essa redução fora inesperada pois a condroitina estaria supostamente interagindo apenas com a superfície das partículas. Entretanto, devido à forte interação entre a quitosana e a condroitina, algumas partes da bicamada podem ter sofrido algum tipo de deslocamento, que explicaria o achatamento dos picos pelo aumento da quantidade de condroitina. A fim de buscar o máximo de informação a partir do fator estrutura, foram aplicados ajustes dos perfis (picos de Bragg) que permitiram inferir sobre parâmetros estruturais. O fator estrutura é considerado como uma função de correlação de pares que considera deslocamentos do retículo a partir de um estado fundamental ou um ponto no espaço. Assim, se tivéssemos uma situação onde não houvesse flutuações entre as

bicamadas (lamelas), obteríamos um perfil de difração com picos de Bragg de igual magnitude. Porém, na situação real, temos flutuações oriundas de oscilação térmica ou, como no caso dos sistemas estudados, pela presença de fase aquosa de composição diversa que fazem com que a ordem de longo alcance se perca. Nestes casos, a função estrutura leva a uma série de picos cujas intensidades decaem exponencialmente, governadas pelo parâmetro de Caillé. Dessa forma, a Teoria de Caillé Modificada foi usada para analisar a estrutura multilamelar das amostras Chit e Chit-CS objetivando-se encontrar informações sobre as flutuações causadas pela presença de quitosana nos espaços interlamelares, bem como pelo revestimento com condroitina. O parâmetro de Caillé η_l relaciona-se com constantes elásticas da estrutura lamelar.^{19,29,30} Os valores de η_l relatados para bicamadas fosfolipídicas variam entre 0,1 e 1,0 e quanto menor o valor, maior a rigidez da bicamada e, para lipossomas multilamelares compostos por fosfatidilcolina, os valores variam entre 0 e 0,200.^{29,31} A Tabela 4.3 apresenta os valores de η_l para as amostras, que variaram entre 0,200 (menor valor) e 0,441 (maior valor) para Lip e Chit-CS-3, respectivamente.

O parâmetro de Caillé indicou uma estrutura lamelar mais rígida quando a quitosana esteve presente. A presença de condroitina mostrou forte influência nas amostras com baixa concentração de polieletrólitos, demonstrando redução de 0,440 para 0,286 após a primeira alíquota de condroitina adicionada. Entretanto, houve um efeito peculiar da condroitina sobre os valores de η_l nas amostras com baixa e alta concentração de polieletrólitos. Após os dois primeiros incrementos de condroitina, houve redução nos valores de η_l . Porém, após a terceira adição, os valores foram similares aos valores iniciais, sem a adição de condroitina, efeito este que permanece sem uma justificativa coerente.

A Figura 4.9 compara o pico de primeira ordem das amostras Chit-1 e Chit-10 com as amostras Chit-CS-3 e Chit-CS-30. Como pode ser visto, os picos tiveram um bom ajuste ao modelo de Caillé Modificado. Comparando-se as amostras com baixas e altas concentrações de quitosana, os valores de η_l foram diferentes, a despeito da presença de condroitina. A quitosana localizada na separação entre as lamelas aumentou a rigidez, o que justifica a estabilidade superior e a manutenção da estrutura dos quitossomas.^{26,32}

A Figura 4.10 apresenta os picos de primeira e segunda ordem para Chit-10 e os respectivos ajustes matemáticos. O parâmetro de Caillé para h_2 , $\eta_{h_2} = 0,650$ foi duas vezes maior do que o relativo ao primeiro pico $\eta_{h_1} = 0,317$.

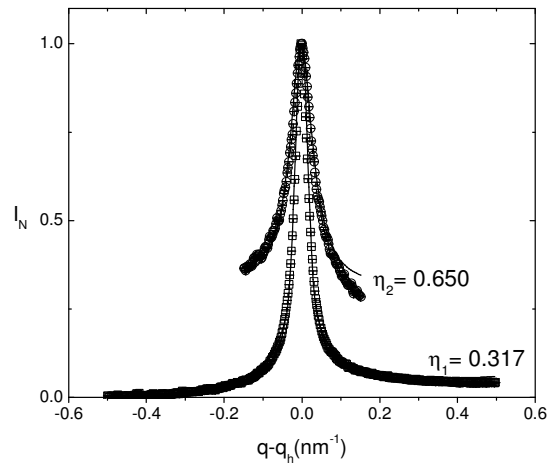


Figura 4.9 Intensidades de espalhamento normalizadas para as duas primeiras ordens de difração das amostras Chit-10 e concomitante ajuste à MCT ($\chi^2 < 2.0$). Os quadrados abertos são para o pico $h = 1$ e os círculos abertos para $h = 2$.

Teoricamente,³⁰ o parâmetro de Caillé escala com h^2 para estruturas multilamelares, entretanto, a presença de quitosana levou a desvios da aproximação harmônica, o que não é uma razão para desconsiderar a aplicação da teoria.²⁹ De maneira geral, a condroitina demonstrou influência secundária sobre os valores do parâmetro de Caillé.

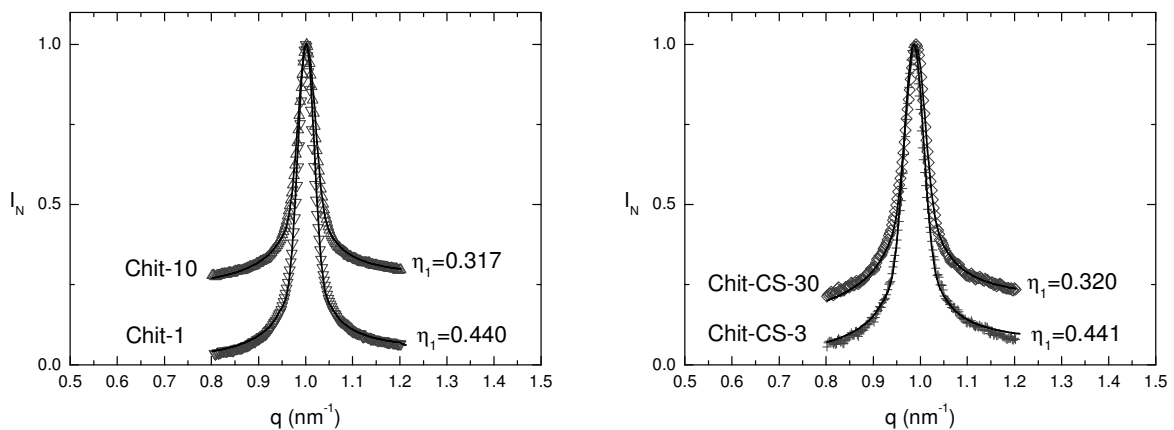


Figura 4.10 Picos de Bragg normalizados ($h=1$) para Chit-1 e Chit-10 (gráfico superior) e Chit-CS-3 e Chit-CS-30 (gráfico inferior) com os respectivos ajustes ao modelo ($\chi^2 < 3,0$). Os valores dos parâmetros de Caillé (η) estão apresentados.

Para descobrir a maneira pela qual a quitosana estaria aumentando a rigidez da membrana, interpretações adicionais dos valores de distância de repetição foram feitas. Para tal, levou-se em conta que a variação na distância de repetição d , poderia ser atribuída ou à uma variação no espaço aquoso, d_{H_2O} ou na camada lipídica, d_B . O parâmetro de Caillé para o primeiro pico de correlação foi interpretado usando-se a relação $\eta_1(d) = 1,33(1 - \delta d)^2$ para

estimar a espessura da bicamada δ , que seria a distância entre duas moléculas fosfolipídicas posicionadas cauda com cauda, sem considerar o espaço aquoso.³⁰ As amostras Chit-CS-2 e Chit-CS-20 foram escolhidas para realizar essa análise uma vez que elas representam amostras intermediárias. As espessuras da bicamada calculadas foram $\delta_{Chit-CS-2} = 3,06$ nm e $\delta_{Chit-CS-20} = 3,44$ nm.

Considerando que a fração aquosa ϕ_{aq} , usada para preparar ambas amostras foi a mesma, faz sentido que o aumento na distância seja devido à um aumento da separação entre as cadeias fosfolipídicas. Levando-se isso em conta, o aumento na espessura da membrana observado nas amostras contendo quitosana em concentração elevada parece estar relacionado à forte interação da quitosana com as regiões polares da bicamada fosfolipídica, apresentando nenhum efeito sobre as regiões apolares. Novamente, essa análise demonstrou um efeito secundário da condroitina sobre os parâmetros estruturais.

Para a determinação do módulo elástico B , as amostras foram analisadas por espalhamento de luz estático e os valores de intensidade absoluta foram graficados contra os valores de q . O valor de $I_{q \rightarrow 0}$ foi utilizado na equação 4.2, conduzindo aos dados apresentados na Figura 4.11. Os valores de B variaram de $5,5 \times 10^{12}$ erg/cm³ até $2,0 \times 10^{12}$ erg/cm³, denotando redução do módulo elástico com o aumento de condroitina nas amostras. Esse resultado fora esperado já que a presença dos polieletrólitos limitaria as flutuações da bicamada fosfolipídica.

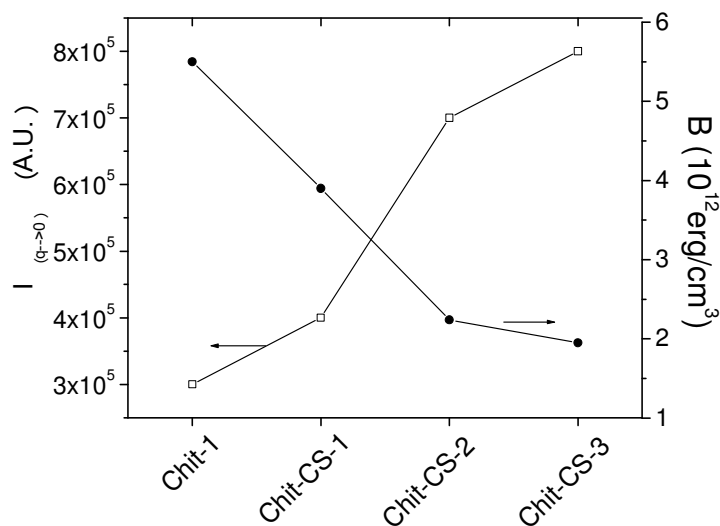


Figura 4.11 Valores de intensidade absoluta de espalhamento com $I_{q \rightarrow 0}$ para as amostra Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3 (quadrados abertos) e módulo elástico B (círculos fechados).

A partir dos resultados do módulo elástico foi possível calcular o parâmetro de rigidez, K_c proposto pela MCT na equação 4.4. Os valores de K_c , obtidos para as amostras Chit-1, Chit-CS-1, Chit-CS-2 e Chit-CS-3, foram $2,6 \times 10^{-14}$; $8,1 \times 10^{-14}$; $9,4 \times 10^{-14}$ e $6,5 \times 10^{-14}$ erg, respectivamente. O valor do parâmetro de rigidez também foi determinado para a amostra Chit-10 e resultou em 13×10^{-14} erg. Para membranas constituídas apenas por fosfolipídeos ou tensoativos, o parâmetro de rigidez resulta da ação combinada de duas contribuições, a primeira relacionada com o tamanho da cabeça polar da molécula formadora da bicamada e a segunda decorrente da interação entre as moléculas da bicamada.³³

Os valores obtidos para K_c foram diferentes daqueles encontrados na literatura, porém foram comparáveis, sendo que houve, obviamente, diferenças oriundas da presença dos polieletrólitos. Para bicamadas de fosfatidilcolina, em presença de dextrana ou polivinilpirrolidona, os valores ficam em torno de 35×10^{-14} erg e para bicamadas fosfolipídicas contendo colesterol o valor encontra-se em torno de 100×10^{-14} erg.^{34,35} Empregando-se tensoativos aniônicos, os valores variam de 3,2 a 8×10^{-14} erg.³³ Notadamente, o efeito da quitosana causou um efeito pronunciado nos valores de K_c , aumentando de $2,6 \times 10^{-14}$ na amostra Chit-1 para 13×10^{-14} na amostra Chit-10. Apesar da suposição inicial de que a presença do polímero pudesse causar um aumento nas flutuações das bicamadas, devido à hidratação das regiões polares, pôde-se constatar o contrário, ou seja, o aumento na rigidez.

4.4 CONCLUSÕES

Lipossomas multilamelares compósitos baseados nas interações entre condroitina e quitosana foram desenvolvidos. A associação de condroitina e quitosana levou a interações superficiais entre esses dois polieletrólitos, definindo a carga superficial das partículas. Como visto pelos resultados do potencial ζ , foi possível modular a carga de valores positivos a negativos dependendo da concentração de polieletrólito empregada. Essa interação também levou a variações nos tamanhos de partícula. As amostras apresentaram aumento nos tamanhos médios de 180 nm a 250 nm dependendo da concentração de polieletrólito empregada. Além disso, através das análises por espalhamento de raios-X em baixos ângulos, foi observado que a presença da quitosana induziu a mudanças na rigidez lamelar dos lipossomas compósitos, enquanto que a condroitina mostrou pequena influência sobre esse parâmetro.

Apesar da composição complexa dos lipossomas multilamelares compósitos, foi possível obter parâmetros estruturais aplicando-se a Teoria de Caillé Modificada sobre os perfis de difração. A análise resultante permitiu inferir o tipo de interação que conduz ao aumento da rigidez da bicamada fosfolipídica. Foi evidenciado que interações entre a quitosana e as regiões polares foram responsáveis pela maior rigidez das estruturas lamelares nas amostras contendo altas concentrações de quitosana. Esses resultados, em conjunto com análises de espalhamento de luz, possibilitaram encontrar o módulo elástico e, subseqüentemente, os valores dos parâmetros de rigidez que comprovaram o aumento da rigidez da bicamada promovido, principalmente, pela presença de quitosana.

4.5 REFERÊNCIAS

1. Brandão, M. Self-Assembly and Self-Organization of Surfactants in Agriculture. In: Somasundara, P.; Hubbard, A. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*. 2 ed. Taylor & Francis, 2006.
2. Al Attar, H. A.; Monkman, A. *J. Phys. Chem. B* **2007**, 111, 12418-12426.
3. Marón, L. B.; Covas, C. P.; Silveira, N. P.; Pohlmann, A.; Mertins, O.; Tatsuo, L. N.; Santana, O. A. B.; Moro, A. M.; Takata, C. S.; Araujo, P. S.; Costa, M. H. B. *J. Liposome Res.* **2007**, 17 (3-4), 155-163.
4. Shchukin, D.; Sukhorukov, G. B. M. *Adv. Mater.* **2004**, 8, 6713-682.
5. Sant'Anna, V.; Malheiros, P.; Brandelli, A. *J. Food. Res.* **2011**, 44(1), 326-330.
6. Troutier, A-L.; Delair, T.; Pichot, C.; Ladavière, C. *Langmuir* **2005**, 21, 1305-1313.
7. Leaf, H. Inventor; Univ. Tennessee Res. Corp. Solid core liposomes. European Patent EP 0277776 (A2), 28/01/1988.
8. Mertins, O.; Sebben, M; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. *Chem. Phys Lip.* **2005**, 138, 29-37.
9. Mertins, O.; Cardoso, M. B.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. *J. Nanosci. Nanotechnol.* **2006**, 6, 2425-2431.
10. Henriksen, I.; Smistad, G; Karlsen, J. *Int. J. Pharm.* **1994**, 101, 227-236.
11. Nel; A. E.; Madler, L.; Velegol, D.; Xia, T.; Hoek, E. M. V.; Somasudaran, P.; Klaessig, F.; Castranova, V.; Thompson, M. *Nature Mater* **2009**, 8, 543-557.
12. Denuzière, A.; Ferrier, D.; Domard, A. *Carbohydr. Polym.* **1996**, 29, 317-323.
13. Rinaudo, M.; Quemeneur, F.; Pépin-Donat, B. *Macromol. Symp.* **2009**, 278, 67-79.
14. Ceppi, P.; Colombo, S.; Francolini, M.; Raimondo, F.; Borgese, N.; Masserini, M. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **2005**, 102, 16269-16274.
15. Coolbear, K. P.; Berde, C. B.; Keough, K. M. W. *Biochemistry* **1983**, 22, 1466-1473.
16. Hammersley, A. P. *Fit 2D: An Introduction and Overview*. ESRF Internal Report, ESRF 97HA02T, Grenoble, 1997.
17. Zhang, R.; Tristram-Nagle, S.; Sun, W.; Headrick, R. L.; Irving, T. C.; Suter, R. M.; Nagle, J. F. *Biophys. J.* **1996**, 70, 349-357.
18. Kohlbrecher J. SASfit: A program for fitting simple structural models to small angle scattering data. <http://kur.web.psi.ch/sans1/SANSSoft/sasfit.html> Accessed in 20/03/2011.
19. Pabst, G.; Koschuch, R.; Pozo-Navas, B.; Rappolt, M.; Lohner, K.; Laggner, P. *J. Appl. Cryst.* **2003**, 36, 1378-1388.

20. Adrhammar, M.; Lincoln, P. Nordén, B. *PNAS*, **2002**, 99, 15313-15317.
21. Musale, D. A.; Kumar, A; Pleizier .G. *J. Membr. Sci.* **1999**, 154, 163-173.
22. Dowson, D.; Priest, M.; Dalmaz, G.; Lubrecht, A.A. Proceedings of the 31st Leeds-Lyon Symposium on Tribology held at Trinity and All Saints College, In: Briscoe BJ Tribology and Interface Engineering Series, Leeds: Elsevier, 2004.
23. Matos, C.; Castro, B.; Gameiro, P.; Lima, J. L. F. Reis S. *Langmuir* **2004**, 20, 369-377
24. Guo, J.; Ping, Q.; Jiang, G.; Huang, L.; Tong, Y. *Int. J. Pharm.* **2003**, 260, 167-173.
25. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Maret, G.; Pépin-Donat, B. *Soft Matter*. **2010**, 6, 4471-4481.
26. Mertins, O.; Lionzo, M. I. Z.; Micheletto, Y. M. S.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N.P. *Mat. Sci. Eng. C*. **2009**, 29, 463-469.
27. Quemeneur, F.; Rinaudo, M.; Pépin-Donat, B. *Biomacromolecules*, **2008**; 9, 2237-2243.
28. Bowstra, J. A.; Gooris, G. S.; Bras, W.; Talsma, H. *Chem. Phys. Lip.* **1993**, 64, 83-98.
29. Zhang, R.; Sun, W.; Tristram-Nagle, S.; Headrick, R. L.; Suter, R. M.; Nagle, J.F. *Phys. Rev. Lett.* **1995**, 74, 2832-2835.
30. Bates, F. S.; Cohen, R. E.; Berney, C. V. *Macromolecules*, **1982**, 15, 589-592.
31. Safinya, C. R.; Roux, D.; Smith, S.S.; Sinha, S. K.; Dimon, P.; Clark, N.A.; Bellocq, A.M. *Rev. Let.* **1986**, 57, 2718-2721.
32. Mertins, O.; Silveira, N. P.; Pohlmann, A. R.; Schröder, A. P.; Marques C.M. *Biophys. J.* **2009**, 96, 2719-2726.
33. Kurtisovski, E.; Taulier, N.; Ober, R.; Waks, M.; Urbach, W. *Phys. Rev. Lett.* **2007**, 98, 258103.
34. Pabst, G. *Biophys. Rev. Lett.* **2006**, 1(1),57-84.
35. Gracià, R. S.; Bezlyepkina, N.; Knorr, R. L.; Lipowski, R.; Dimova, R. *Soft Matter* **2010**, 6, 1472-1482.

5. APLICAÇÕES TECNOLÓGICAS DOS SISTEMAS DESENVOLVIDOS

5.1 INTRODUÇÃO

A associação entre quitosana e os lipossomas compósitos pode ser utilizada para produzir materiais com propriedades diferenciadas. Dessa forma, no presente capítulo serão apresentados os resultados obtidos a partir da caracterização de dispersões viscosas (pseudo-géis) e de filmes de quitosana contendo lipossomas compósitos.

Os géis são considerados semi-sólidos formados por redes tridimensionais muito empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos e medicamentos.¹ A manipulação das propriedades desses fluidos é importante para obter características sensoriais e de textura desejadas.² O uso da quitosana para produzir formulações farmacêuticas baseia-se em estudos que demonstram a capacidade deste material em acelerar o processo de regeneração e pela sua ação antimicrobiana. Além disso, o pH das dispersões - levemente ácido - é adequado para a pele, considerando seu manto hidrolipídico ácido. As propriedades das dispersões obtidas a partir da quitosana podem ser modificadas mediante a adição de nanoestruturas e o efeito causado depende do tipo de interação entre a superfície da partícula e as moléculas do hidrocolóide.³ Considerando que as cadeias da quitosana são catiônicas em meio acidificado, a adição de partículas aniônicas, supostamente influenciaria o fluxo da matriz polimérica. Com o intuito de verificar tal efeito, dispersões viscosas de quitosana foram preparadas e caracterizadas por viscosimetria.

Além da aplicação na área cosmética, a associação de diferentes tipos de biomateriais pode trazer aplicações novas e interessantes para dispositivos clássicos. Dessa forma, filmes baseados em polímeros biodegradáveis vem sendo desenvolvidos para serem aplicados como curativos, na engenharia de tecidos e em sistemas de liberação de ativos.^{4,5,6,7} Pesquisas têm sido feitas nesta área com o intuito de alterar propriedades mecânicas, ópticas e interfaciais de filmes visando aplicações biomédicas. Blendas e compósitos de diferentes materiais biodegradáveis como o poli(hidróxibutirato) (PHB), gelatina, ácido hialurônico e ácido oléico, constituem alguns exemplos do desenvolvimento de suportes para dispositivos terapêuticos e crescimento celular.^{8,9,10} Entre os materiais empregados para preparar filmes biodegradáveis, os polissacarídeos e os glicosaminoglicanas são interessantes devido à sua similaridade com os componentes da matriz extracelular, que serve como suporte para o desenvolvimento das células nos tecidos. A quitosana é um polissacarídeo que apresenta excelentes propriedades como base formadora de filme, com aplicações diversas.¹⁰ O sulfato de condroitina, por sua vez, é uma glicosaminoglicana cujos grupamentos ácido carboxílico e

sulfato interagem fortemente com os grupamentos amino presentes na quitosana, formando um complexo estável.¹¹

Filmes de quitosana com diferentes graus de desacetilação tem sido preparados e usados como suporte para semeadura de células.^{12,13} Foram conseguidos estabilidade frente à degradação prolongada e adesão celular aumentada quando a quitosana empregada apresentou graus de desacetilação próximos a 100%. Mesmo permitindo a adesão celular, os filmes constituídos de quitosana pura apresentam-se quebradiços, o que é inadequado para o uso biomédico.¹⁴ A modulação dessas propriedades pode ser feita através da adição de nanoestruturas na matriz do filme.^{15,16}

Neste capítulo, propomos modificar as propriedades internas e superficiais de filmes de quitosana, através da adição de lipossomas compósitos apresentados no capítulo anterior, visando empregá-los como suportes para o crescimento de células. Para tanto, os lipossomas compósitos foram adicionados a dispersões viscosas de quitosana que foram posteriormente submetidas à secagem, originando os filmes que foram, a seguir, caracterizados em comparação com filmes feitos apenas de quitosana.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Preparação das amostras

A fosfatidilcolina (PC), a quitosana (CH) e o acetato de etila empregados na preparação das amostras tiveram suas características apresentadas no item 3.2.1. O sulfato de condroitina (CS) teve suas características apresentadas no item 4.2.1. Todas as amostras preparadas foram diluídas utilizando-se água purificada Milli-Q (condutividade < 18,4 μ S). Todos os produtos e reagentes foram utilizados como recebidos, sem purificação prévia.

5.2.1.1 Lipossomas compósitos

Quitossomas modificados com condroitina (Chit-CS) foram preparados pela técnica de emulsificação e evaporação em fase reversa.¹⁷ A quitosana (1 mg/mL) foi hidratada durante 24 horas em tampão acetato (pH 4,5) e filtrada através de poro de 8 μ m. Três diferentes quantidades desta solução (600, 900 e 1200 μ L) foram adicionados a 5 mL de três dispersões distintas de fosfatidilcolina em acetato de etila (1,0; 1,3 e 1,5% m/V). Cada mistura foi submetida ao banho de ultrassom durante 5 minutos. O solvente orgânico foi evaporado sob pressão reduzida. O organogel precipitado foi disperso em água purificada sob agitação vigorosa, fornecendo três formulações de quitossomas. Adicionalmente, uma solução aquosa de condroitina (0,4% m/V) foi preparada e filtrada (poro 8 μ m). Alíquotas dessa solução (1200; 1800 e 2400 μ L) foram gotejadas lentamente sobre cada uma das respectivas dispersões de quitossomas preparadas anteriormente sob agitação magnética (1200 rpm) a fim de promover um revestimento a superfície dos quitossomas com condroitina. Estas três amostras foram denominadas Chit-CS-A, Chit-CS-B e Chit-CS-C. As partículas foram avaliadas por espalhamento de luz e apresentaram tamanhos entre 200 e 250 nm e valores de potencial zeta negativos (-20 mV).

5.2.1.2 Dispersões viscosas

Dispersões viscosas (pseudo-géis) foram obtidas pela dispersão de quitosana (3,0% m/V) em tampão acetato (pH 4,5). Após 24 horas de hidratação do polímero, o pH foi, novamente, ajustado com ácido acético para 4,5. Após homogeneização, o gel foi centrifugado a 4000 rpm durante 1 hora para separar algumas fibras insolúveis. O sobrenadante foi separado e misturado com 5,0% de partículas Chit-CS-C sob agitação magnética (1200 rpm) por 5 minutos. Adicionalmente, foram preparadas, para fins de comparação, três outras dispersões viscosas de quitosana (3,0% m/V) às quais foram

adicionados 5,0% de água; 5,0% de lipossomas e 5,0% de solução de sulfato de condroitina (0,4% m/V).

5.2.1.3 Filmes

Uma dispersão de quitosana (3 % m/V), hidratada durante 24 horas em tampão acetato (pH 4,5), foi centrifugada durante 1 hora a 4000 rpm (1702 g) para separação de algumas fibras insolúveis. A seguir, porções de 10 mL da fração límpida foram separadas e misturadas, sob agitação magnética, com 2,5 mL de cada uma das três formulações Chit-CS-A; Chit-CS-B e Chit-CS-C (item 5.2.1.1). Essas misturas foram vertidas em placas de Petri plásticas e submetidas à secagem sob pressão reduzida à temperatura ambiente, fornecendo amostras denominadas, respectivamente, Filme 1, Filme 2 e Filme 3. Filmes de quitosana sem partículas foram preparados e usados como referência e denominados Filmes CH. Os filmes apresentaram alta solubilidade em água (15-24%) devido à acidez remanescente após a evaporação da água. Dessa forma, uma etapa de neutralização foi realizada, fornecendo a estabilidade necessária ao filme. Para tal, cada filme foi pesado, neutralizado em NaOH 0,1 M durante 25 minutos, lavado com água purificada e secado. Durante a neutralização e secagem, os filmes foram fixados entre dois anéis de etileno-acetato de vinila para prevenir o encolhimento. A massa dos filmes preparados esteve entre 190 e 280 mg. Cada amostra foi preparada em triplicata.

5.2.2 Análise viscosimétrica

Os géis foram caracterizados por viscosimetria a 25 °C em um viscosímetro Brookfield LVDV-II+ Pro empregando porta amostras SS-Adapter e *spindle* SC4-31. Os dados foram capturados pelo *software* RHEOCALC32. As rotações escolhidas foram 20, 40, 60, 80, 100, 120 e 140 rpm, a fim de prover valores de torque entre 10 e 90%. As taxas de cisalhamento empregadas foram 6,8; 13,6; 20,4; 27,2; 34; 40,8 e 47,6 s⁻¹.

5.2.3 Microscopia eletrônica de varredura

Os filmes foram examinados empregando microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Jeol Scanning Microscope, JSM-5800, Tokyo, Japan) no Centro de Microscopia - UFRGS. As amostras foram analisadas após recobrimento com carbono e ouro (Jeol Jee 4B SVG-IN, Tokyo, Japan). A distribuição das partículas no filme foi avaliada antes e após fratura de amostras congeladas em nitrogênio líquido. Os aumentos empregados foram de 1800, 10000 e 20000 vezes com tensão de 10 kV. As imagens foram processadas empregando o aplicativo livre Gwyddion desenvolvido por D. Necas e P. Klapetek (<http://gwyddion.net/>) que usa a

interpolação para obter perfis da superfície. Os valores de RMS (*root mean square*, que significa valor quadrático médio) da rugosidade foram calculados a partir de perfis da superfície obtidos pelas linhas transversais de, pelo menos, três imagens de cada filme. O valor de RMS serviu como indicativo da rugosidade da superfície.

5.2.4 Ângulo de contato

O ângulo de contato entre solventes hidrofílicos e a superfície dos filmes foi determinado usando água, glicerol e etilenoglicol. As imagens da gota foram registradas usando um microscópio digital com câmera (QX5) e o ângulo de contato foi calculado a partir das imagens usando o *software* Surftens 3.0.

O trabalho aparente de adesão por unidade de área (W^*_A) foi calculado a partir da equação de Young, levando-se em consideração a tensão superficial γ^{lv} do líquido e o ângulo de contato θ^{ls} entre a superfície e o líquido:

$$W^*_A = \gamma^{lv} (1 + \cos \theta^{ls}) \quad (5.1)$$

Este ajuste foi feito levando-se em conta as diferenças entre as viscosidades dos líquidos empregados. O trabalho de adesão foi designado como ‘aparente’ pois a determinação do ângulo de contato não foi conduzida no equilíbrio, ou seja, no vácuo.

5.2.5 Teste de inchamento

Para avaliar o inchamento dos filmes, o percentual de hidratação foi determinado. Porções de 1 cm² de cada filme foram cortadas e mantidas em dessecador durante 24 horas. As peças secas foram pesadas e imersas em frascos individuais contendo tampão fosfato (PBS, pH 7,4) a 37 °C ± 0,5 °C. Os tempos de imersão foram os seguintes 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90 minutos e 48 horas. Após cada tempo, o excesso de umidade da superfície foi removido com um papel de filtro e os filmes foram pesados em uma microbalança Cahn C-35. O percentual de hidratação foi calculado usando a seguinte equação:

$$\%hidratação = \frac{W_t - W_0}{W_0} \times 100 \quad (5.2)$$

Sendo W_0 o peso seco, antes da hidratação e W_t o peso após imersão no tampão. As porções foram colocadas em dessecador e pesadas novamente para determinar a perda de massa causada pela imersão. A equação abaixo foi usada para calcular a perda de massa:

$$\% \text{ perda de massa} = \frac{W_0 - W}{W_0} \times 100 \quad (5.3)$$

Sendo W_0 a massa seca antes da imersão e W a massa após a imersão e secagem. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada filme.

5.2.6 Teor de água

Peças de $1,0 \text{ cm}^2$ dos filmes foram identificadas individualmente e pesadas em uma microbalança Cahn C-35, a cerca de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa do ar de 60%. Os filmes foram secados a $105 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas, objetivando remover a água presente. Os filmes secos foram deixados em um dessecador até alcançarem a temperatura ambiente e foram, novamente, pesados. O teor de umidade foi calculado através de:

$$\% \text{ Água} = \frac{M - m}{m} \times 100 \quad (5.4)$$

Sendo M o peso sob condições ambiente e m o peso do filme dessecado. Após a determinação do teor de água, os filmes foram submetidos a condições ambientais ($20 \text{ }^\circ\text{C}$ e umidade relativa de 60%) durante 24 horas e após foram pesados novamente. A umidade reabsorvida foi calculada através de:

$$\% \text{ Re absorção} = \frac{m' - m}{m} \times 100 \quad (5.5)$$

Sendo m' a massa do filme após 24 horas exposto a condições ambientais.

5.2.7 Calorimetria exploratória diferencial

As propriedades térmicas foram avaliadas em um calorímetro DSC Q20 (TA Instruments). Nitrogênio ultrapuro foi usado como gás de purga numa taxa de 50 mL/min . Análises convencionais de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) foram realizadas a fim de investigar o efeito da umidade. Cerca de $5,0 \text{ mg}$ de cada filme foram exatamente pesados e colocados dentro de porta-amostras de alumínio. As amostras foram aquecidas de 20 a $200 \text{ }^\circ\text{C}$ e a taxa de aquecimento foi de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$. Análises moduladas (MDSC) foram realizadas e o sinal reverso foi usado para comparar as transições vítreas das amostras. Cerca de 10 mg de amostra foram aquecidos até $160 \text{ }^\circ\text{C}$ a uma taxa de $10 \text{ }^\circ\text{C/min}$ em modo convencional e, a

partir de 80 °C até 170 °C, a taxa de aquecimento foi alterada para 2 °C/min, com período de modulação de 60 segundos e amplitude de modulação de 0,318 °C.¹⁸

5.2.8 Espectroscopia de reflexão total atenuada (FTIR-ATR)

Os filmes foram analisados em espectrômetro no infravermelho com transformada de Fourier e reflexão total atenuada (FTIR-ATR), modelo Alpha-P (Brucker). Os espectros foram obtidos no modo transmitância no intervalo de 4000 a 600 cm^{-1} . Foram acumuladas 32 varreduras para cada espectro, com resolução de 4 cm^{-1} .

O grau de acetilação foi calculado pelas razões entre as áreas dos picos referentes ao grupamento acetila (A_{1665}) e hidroxila (A_{3450}) de acordo com a seguinte fórmula:¹⁹

$$GA = (A_{1665} / A_{3450}) \times 100\% / 1,33 \quad (5.6)$$

5.2.9 Adesão celular

Os filmes foram cortados em peças de 1 cm^2 . Cada lado das peças foi esterilizado pela exposição à radiação UVC, durante 1 hora, selados em placas de Petri e armazenados em dessecador. A adesão celular foi medida pela incubação das peças em poços de 1,5 cm de diâmetro com 104 células-tronco mesenquimais suspensas em meio de cultura. Após 6 horas de incubação a 37 °C, as peças foram lavadas duas vezes com tampão PBS para remover as células que não aderiram. As amostras foram fixadas como *p*-formaldeído e DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). As imagens foram tomadas em campo de alto aumento (HPF) em aumento de 400 vezes, sendo que 9 porções de cada filme foram amostradas. Cada análise foi realizada empregando-se triplicada de amostra.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de viscosidade demonstraram que todos os pseudo-géis apresentaram comportamento pseudo-plástico (Figura 5.1). A adição de lipossomas elevou levemente a viscosidade pseudo-gel em relação à adição de água ou solução de condroitina que apenas demonstraram o efeito da diluição. Os lipossomas apresentam carga superficial negativa, em torno de -40 mV. Este valor negativo pode ter sido responsável pelo aumento da viscosidade, dos géis contendo lipossomas, no entanto, seria esperado um aumento maior do que aquele provocado pelas partículas Chit-CS-C, já que os lipossomas apresentam potencial ζ mais negativo do que as partículas Chit-CS-C (~ -20 mV). Provavelmente essa diferença no efeito seja decorrente da forte interação entre os fosfolipídeos dos lipossomas e a quitosana da matriz do pseudo-gel, que se encontra circundando-os. A estrutura lamelar dos lipossomas pode ter sido destruída, ficando os fosfolipídeos dispersos entre as cadeias poliméricas.

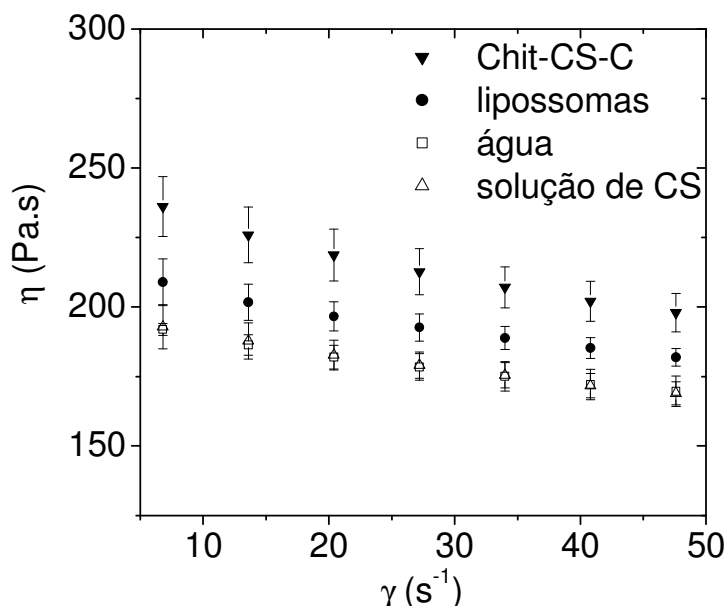


Figura 5.1 Valores de viscosidade em função do gradiente de cisalhamento dos pseudo-géis de quitosana (3,0%) contendo 5,0% de partículas Chit-CS-C; Lipossomas, água ou solução de sulfato de condroitina (CS) 0,4%.

O uso de partículas compósitas, como é o caso dos quitossomas revestidos por condroitina (Chit-CS-C), pode ter conferido estabilidade superior à partícula. A adição dos Chit-CS-C levou a valores de viscosidade maiores dos géis aos quais foram adicionados. A habilidade da condroitina presente na superfície em interagir com as cadeias da quitosana pode ter sido responsável pelo efeito. No entanto, a simples adição de uma solução de sulfato de condroitina ao pseudo-gel de quitosana não demonstrou efeito sobre a viscosidade quando

comparada com a adição de água. Esse resultado mostra como a associação de sistemas nanoparticulados compósitos, pode causar efeitos diferenciados, uma vez que oferece uma área de interação maior entre os componentes.

Os resultados de caracterização por microscopia eletrônica dos filmes obtidos a partir da secagem de pseudo-géis de quitosana estão apresentados na Figura 5.2 e possibilitam a observação das superfícies e das regiões internas. A superfície dos Filmes CH apresentou-se lisa (Figura 5.2d) enquanto que nos filmes contendo partículas (Filmes 1, 2 e 3) mostrou-se rugosa devido à presença de agregados na superfície (Figura 5.2 a-c).

A adição de partículas tornou a superfície mais rugosa como também foi demonstrado pelos valores de RMS obtidos da análise bidimensional das imagens com 1800 vezes de aumento. O Filme CH apresentou RMS de $22,7 \pm 4,2$ nm e os Filmes 1, 2 e 3 apresentaram, respectivamente, $38,0 \pm 14$ nm, $47,6 \pm 5,1$ nm and $57,4 \pm 4,8$ nm. Assim, quanto mais partículas foram adicionadas, mais rugosa tornou-se a superfície dos filmes. Foi possível observar a estrutura das partículas imergindo da matriz do filme (Figura 5.2a). Algumas imagens revelaram uma estrutura porosa causada pelo colapso de algumas partículas durante o processo de secagem. Uma textura similar foi verificada nos filmes CH contendo microdomínios lipídicos, explicados pelo efeito de cremagem durante o processo de secagem.⁹ A Figura 5.2 e-h apresenta as secções laterais dos filmes mostrando a estrutura porosa interna nos Filmes 1, 2 e 3, diferente da superfície lisa observada para o Filme CH. As propriedades superficiais, como a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade têm um papel importante na funcionalidade dos filmes que são projetados para emprego como biomateriais. A porosidade é outra propriedade do biomaterial que precisa ser controlada, pois ela pode ser usada para modular a taxa de fluxo de umidade e a difusão de biomoléculas dentro do material.

Medidas de ângulo de contato foram propostas para fornecer algum indício sobre a hidrofiliabilidade dos filmes, no entanto, como veremos, a rugosidade pode estar afetando tal interpretação. Inicialmente, a água foi o solvente escolhido para fazer as análises, porém os filmes sofreram inchamento, impedindo a determinação correta dos ângulos. Apesar do procedimento de neutralização realizado, a água difundiu através da superfície causando inchamento, fato este que foi melhor avaliado através da realização de testes de inchamento (resultados apresentados a seguir). Dessa forma, a fim de proceder com as medidas de ângulo de contato, a água foi substituída por solventes polares, como o glicerol e o etilenoglicol. Devido a diferenças de viscosidade entre esses solventes, a tensão superficial de cada solvente

foi levada em consideração para calcular o trabalho aparente de adesão (W_a^*). A rugosidade dos filmes (valores de RMS) também foi considerada para o melhor ajuste.

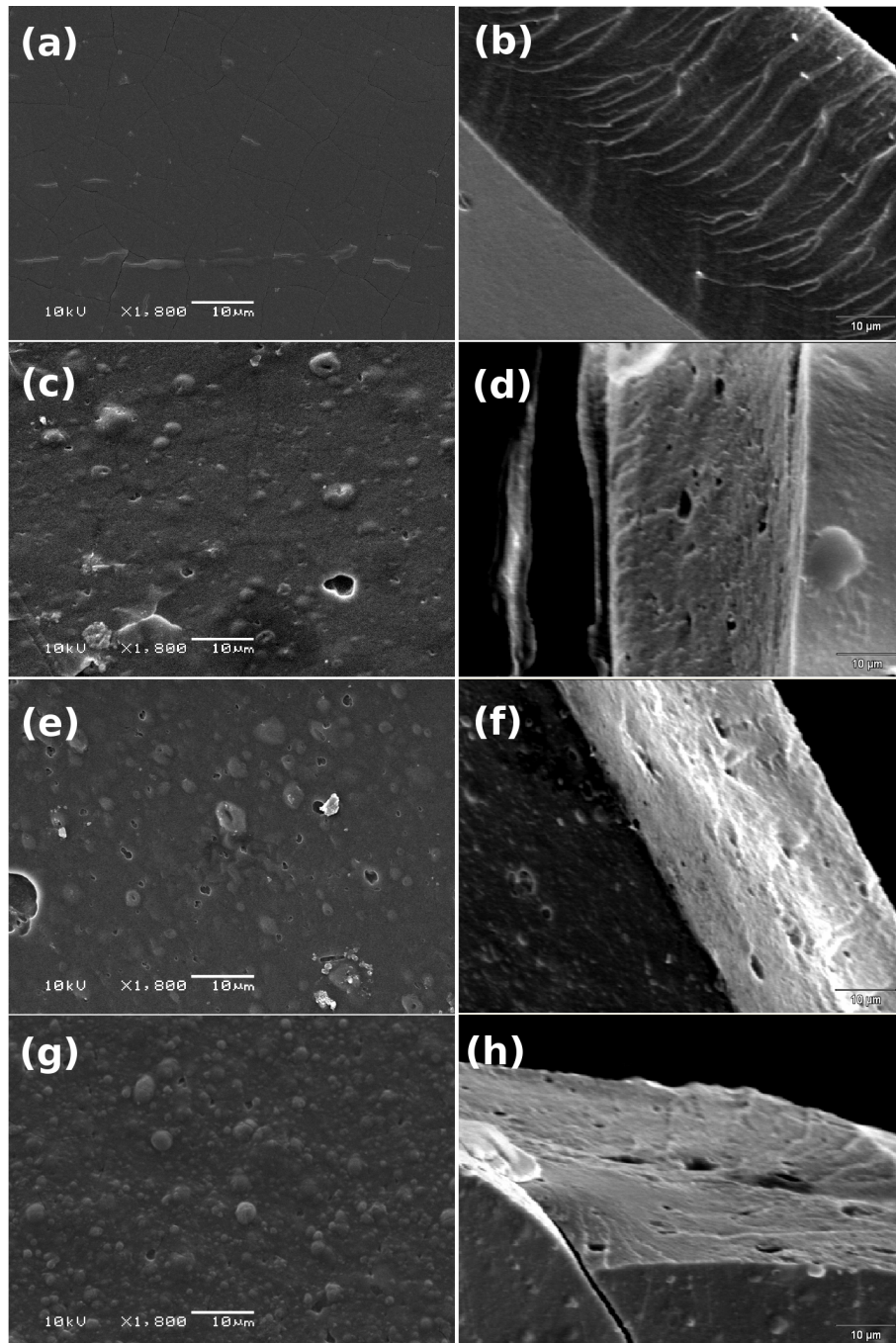


Figura 5.2 A coluna direita corresponde a imagens de microscopia eletrônica de varredura mostrando a superfície das amostras Filme CH (a), Filme 1 (c), Filme 2 (e) e Filme 3 (g) em aumento de 1800 x. A coluna da direita corresponde à secção lateral de cada uma das correspondentes amostras Filme CH (b), Filme 1 (d), Filme 2 (f) e Filme 3 (h) em aumento de 1800 x. A barra corresponde a 10 µm.

Assim, devido a fortes diferenças topográficas, a relação direta entre as medidas de ângulo de contato e a hidrofiliicidade não foi possível. Por outro lado, informações acerca da energia superficial puderam ser estimadas. A Figura 5.3 mostra que, independentemente dos solventes utilizados nas medidas, o valor de W_a^* aumentou com a presença das partículas nos filmes. Isto significa que quanto mais partículas foram adicionadas, maior foi a energia superficial resultando em uma superfície mais interativa, o que pode ser uma vantagem para a adesão celular.²⁰ De uma forma geral, pode-se concluir a partir dos resultados que o principal responsável pelos valores de ângulo de contato foi a presença dos lipossomas compósitos como um todo e não houve relação direta com a presença de condroitina, como mostrado por alguns autores.²¹ A rugosidade do material é uma propriedade interfacial que necessita ser bem controlada. Em alguns processos de adesão entre o implante e o tecido, os atributos de rugosidade da superfície apresentam relação complexa, sendo que uma superfície muito lisa ou com rugosidade pequena pode ser ineficaz e a efetividade da adesão pode depender da presença de irregularidades mais profundas.²²

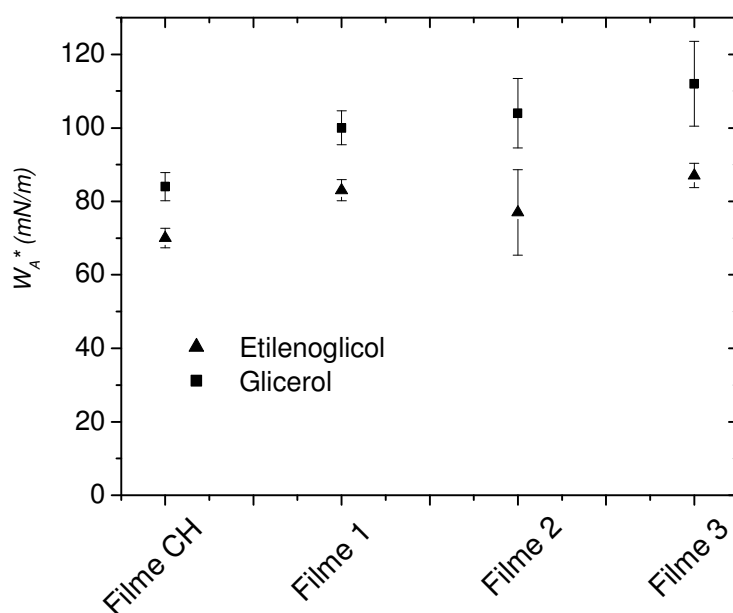


Figura 5.3 Trabalho aparente de adesão (W_A^*) para etilenoglicol (■) e glicerol (▲) considerando o valor RMS dos Filmes CH, 1, 2 e 3.

A fim de determinar a capacidade de absorção e retenção de água dos Filmes CH e Filmes 1, 2 e 3, testes de inchamento foram realizados empregando-se diferentes tempos de imersão (5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 90 minutos e 48 horas). Os resultados (Figura 5.4)

indicaram que todos os filmes atingiram o máximo de inchamento na primeira hora de imersão.

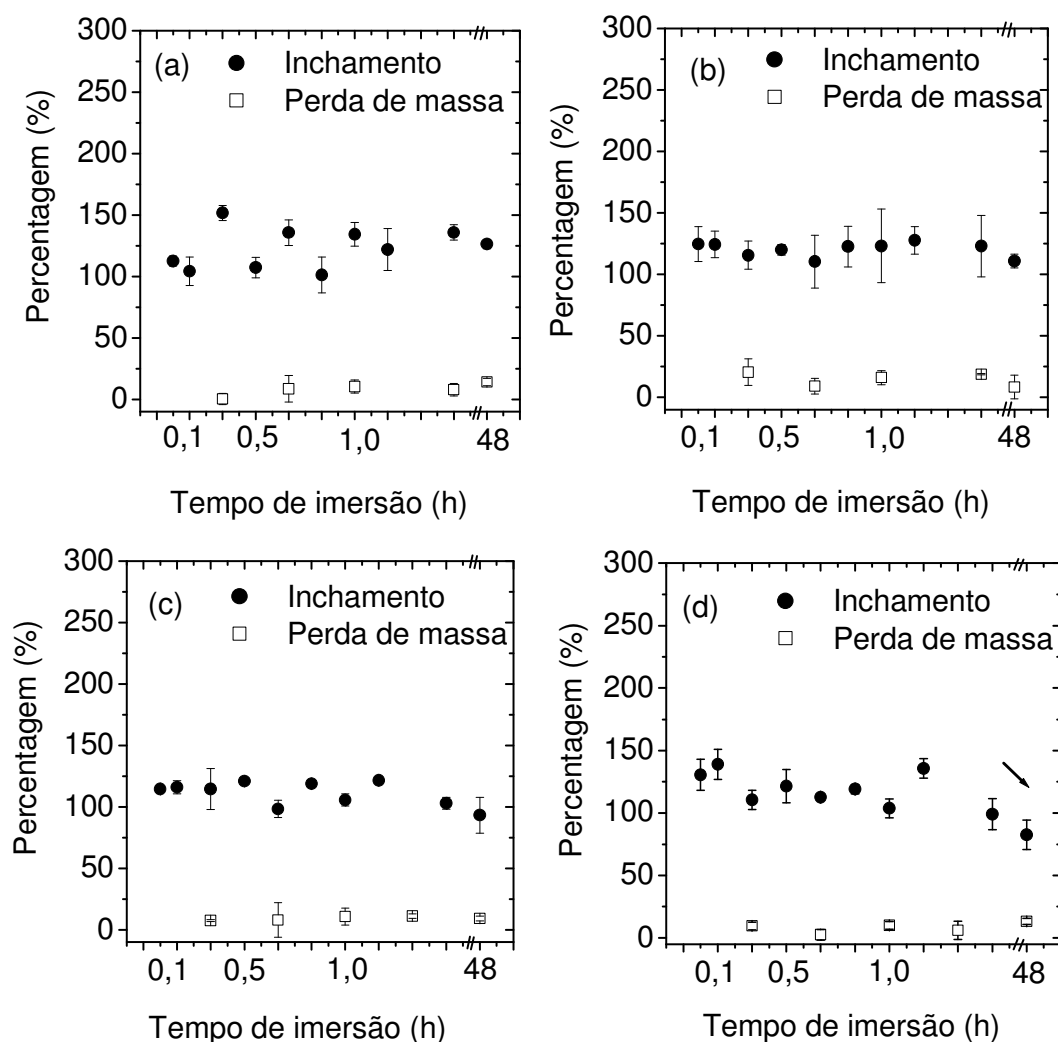


Figura 5.4 Percentual de inchamento (círculos fechados) em tampão PBS, 37 °C e percentual de perda de massa (quadrados abertos) do Filme CH (a) e Filmes 1 (b), 2 (c) e 3 (d). A flecha indica a tendência, após 48 horas de imersão, para a amostra com maior concentração de partículas.

Após transcorrido esse tempo, houve manutenção do conteúdo de água, denotando o estabelecimento do equilíbrio. O Filme CH teve o maior percentual de inchamento (entre 100 e 150%). Os Filmes 1, 2 e 3 apresentaram no máximo 130% de inchamento. Os filmes contendo partículas denotaram capacidade de inchamento menor e após 48 horas essa diferença foi pronunciada. O Filme CH manteve o percentual de hidratação, enquanto que as amostras contendo partículas mostraram redução no inchamento (Figura 5.4d, flecha indicativa). A fim de verificar se houve perda de massa nesse período de imersão, as amostras

foram secadas, pesadas novamente e comparadas com os valores de massa inicial. Como pode ser visto na Figura 5.4 (quadrados abertos), a perda de massa permaneceu constante, em torno de 10% para todas as amostras, indicando a integridade dos filmes ao longo dos ensaios. As partículas compostas por fosfatidilcolina, quitosana e condroitina impregnadas no filme podem ter agido como barreira à difusão de água no interior da matriz. Alguns resultados similares foram encontrados para filmes de quitosana contendo ácido oléico como aditivo.⁹ Contudo, a porosidade dos Filmes 1, 2 e 3 observado pelas imagens de microscopia pode ter sido responsável pelos valores de inchamento superiores em tempos iniciais. Essa característica pode ser útil para a modulação da penetração de água no interior dos filmes. A prevenção da perda de fluidos é uma propriedade importante para um material pretendido para utilização como pele artificial ou como implante.²³ Dessa forma, a redução da permeabilidade causada pelos lipossomas compósitos nos filmes de quitosana representa uma vantagem em tempos prolongados de utilização.

Resultados complementares sobre a caracterização dos filmes em relação à absorção de água puderam ser obtidos mediante a determinação da umidade. O Filme CH apresentou $3,92 \pm 0,58\%$ de umidade e $0,44 \pm 0,40\%$ de reabsorção de água nas primeiras 24 horas após ser submetido ao processo de secagem até peso constante. Por outro lado, os Filmes 1, 2 e 3 apresentaram, respectivamente, $3,36 \pm 0,36\%$, $2,08 \pm 0,71\%$ e $1,88 \pm 0,24\%$ de umidade e $0,49 \pm 0,51\%$, $0,70 \pm 0,50\%$ e $0,04 \pm 0,1\%$ de reabsorção de água após a secagem. De uma maneira geral, a umidade e a reabsorção de água diminuíram com o aumento da quantidade de partículas nos filmes, uma vez mais, demonstrando que a difusão de água através dos filmes contendo lipossomas compósitos foi menor do que nos filmes constituídos apenas por quitosana.

Para estimar possíveis mudanças na superfície durante o processo de secagem os filmes foram avaliados pela técnica espectroscópica de infravermelho com reflexão total atenuada antes e após a secagem. A remoção da água a partir da matriz foi reversível uma vez que o espectro apresentou apenas uma pequena alteração nos graus de desacetilação da quitosana antes a após a secagem (Figura 5.5).

Os valores do grau de acetilação (GA) determinados para os filmes de quitosana antes do aquecimento a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ permaneceram em torno de 75-80%. O Filme CH apresentou valor de acetilação maior do que os Filmes 1, 2 e 3. Após a secagem, houve uma leve redução no GA para o Filme CH enquanto que para os Filmes 1, 2 e 3, houve um pequeno aumento.

Apesar da sutil alteração nos valores, não se descarta uma possível interação entre as partículas e a quitosana com o aquecimento (Figura A3, Anexo).

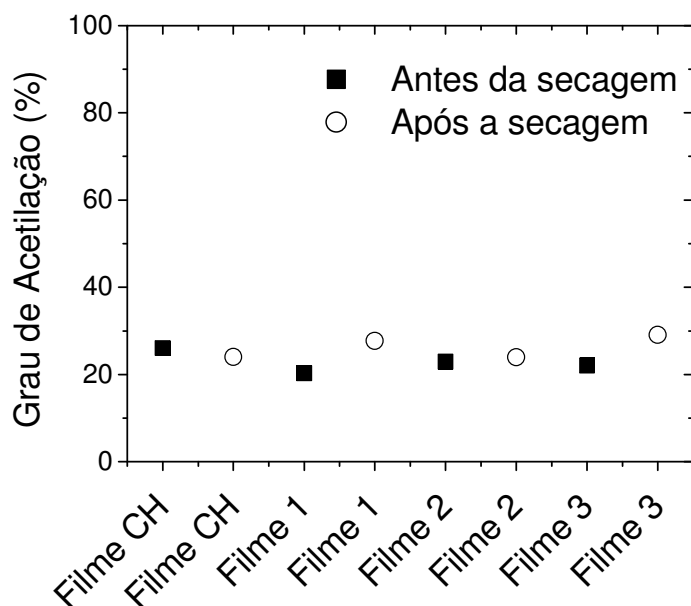


Figura 5.5 Graus de acetilação determinados para as amostras Filme CH, 1, 2 e 3 antes e após serem dessecados a 105 °C.

Toffey e colaboradores²⁴ demonstraram que poderia ocorrer aumento no grau de desacetilação da quitosana em filmes submetidos a aquecimento em temperaturas acima de 100 °C e que, nesses casos, a remoção de água seria irreversível e haveria formação de quitina a partir de quitosana, especialmente na presença de acetato derivado do tampão empregado na preparação das matrizes de quitosana.

A fim de obter informações sobre a interação entre as partículas e a matriz do filme, análises térmicas foram conduzidas. Todas as amostras foram analisadas e a diferença mais significativa nos resultados foi entre o Filme CH e o Filme 3. Os Filmes 1, 2 e 3 mostraram comportamento térmico similar. A Figura 5.6 apresenta os termogramas dos Filmes CH e 3 cujos perfis demonstram um pico alargado entre 90 °C e 160 °C.

O mínimo em 110 °C, observado para o Filme CH, foi decorrente da perda de água e foi similar aos valores encontrados para a matéria-prima quitosana.^{14,25} No Filme 3, o mesmo pico largo de perda de água pôde ser observado, com o mínimo deslocado para temperaturas maiores. Este fato pode indicar que mais calor foi necessário para dessorver a água a partir do Filme 3 do que do Filme CH. Provavelmente, a água no interior dos lipossomas compósitos estivesse interagindo com as regiões hidrofílicas dos fosfolipídeos e com os grupamentos sulfato e ácido carboxílico da condroitina. Os picos endotérmicos relatados na literatura para

as matérias-primas quitosana e condroitina denotam pouca diferença entre os valores.²⁶ Apesar da quantidade pequena de condroitina presente nos filmes, a presença de um ombro na transição principal do Filme 3 poderia ter ocorrido pela interação da água de forma específica com os dois tipos de polímero. No entanto, as principais diferenças entre os Filmes CH e 3 devem ser atribuídas à presença de partículas neste último.

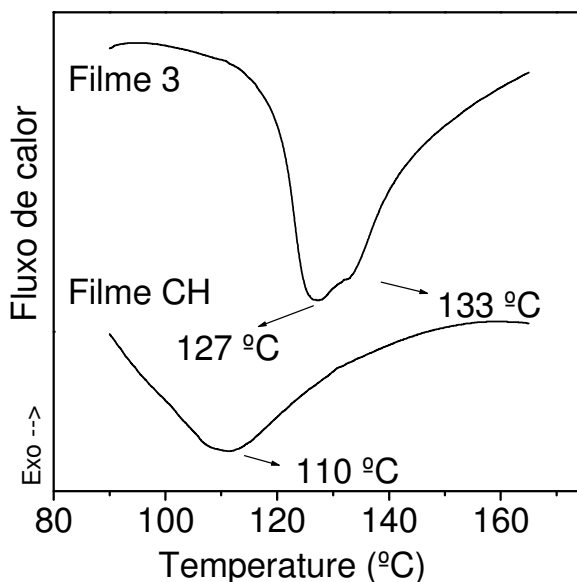


Figura 5.6 Curvas de DSC (c) do filme CH e do Filme 3 (taxa de aquecimento de 10 °C/min). Flechas indicam a temperatura de perda de água.

MDSC foi empregada para investigar transições que possam ter ocorrido abaixo dos eventos de perda de água. Esta técnica aplica uma taxa de aquecimento linear concomitante com um aquecimento sinusoidal (modulado) para prover o fluxo total de calor e o componente reversível deste. O sinal reversível é utilizado para quantificar a transição vítrea T_g e permite calcular as entalpias de transição pela integração dos picos nas curvas de capacidade calorífica reversível $Rev C_p$.¹⁸ Os Filmes CH e 3 foram analisados na segunda corrida, após a dessorção de água. A Figura 5.7a mostra os pontos de inflexão dos picos nas curvas de $Rev C_p$ que correspondem à T_g dos filmes de quitosana.

A quitosana é um polímero semicristalino o que explica a ocorrência de uma pequena transição. A T_g da quitosana ocorreu em, aproximadamente, 147,2 °C para o Filme CH e 149,2 °C para o Filme 3 (Figura 5.7b), o que demonstrou a presença de domínios de quitosana e a ausência de miscibilidade entre a quitosana e as partículas. As entalpias para essas transições foram calculadas como 0,018 J/g para o Filme CH e 0,0198 J/g para o Filme 3. As transições encontradas estão em concordância com resultados da literatura.¹⁸

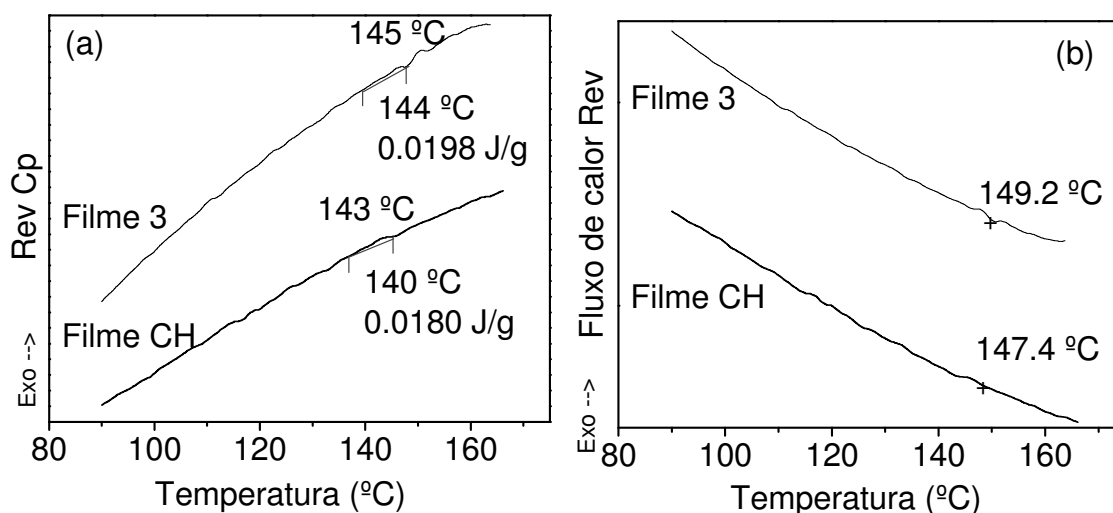


Figura 5.7 Curvas de MDSC do Filme CH (a) e do Filme 3 (b) (taxa de aquecimento de 2 °C/min).

No entanto, o valor de T_g para a quitosana permanece controverso. Para alguns autores,²⁷ ela pode estar na faixa entre -23 e 67 °C, sendo que a água pode servir como plastificante do material. Dessa forma, analisando-se a transição observada no primeiro aquecimento (DSC convencional) é possível considerar que o Filme CH apresentou uma T_g em, aproximadamente, 45 °C, como pode ser observado na Figura 5.8 (linha sólida). Nos termogramas dos Filmes 1, 2 e 3 esta transição não foi observada, o que pode indicar, diversamente, a miscibilidade e que as partículas estariam atuando como plastificantes dos filmes. Acreditamos que a T_g em 45 °C seja mais coerente pois os valores de entalpia para a transição a 147 °C foi muito pequena para ser considerada, mesmo tendo sido encontrado valor semelhante na literatura.

Comparando-se as propriedades físicas dos filmes, a adição dos lipossomas compósitos teve influência positiva sobre a maleabilidade dos filmes de quitosana, tornando-os mais flexíveis. Isto foi observado durante o manuseio dos filmes e foi confirmado pelo desaparecimento da T_g da quitosana pela adição dos lipossomas compósitos. O aumento da flexibilidade é uma importante melhoria para a aplicação de tais filmes como curativos ou implantes, devido à variação na topografia dos locais de aplicação.

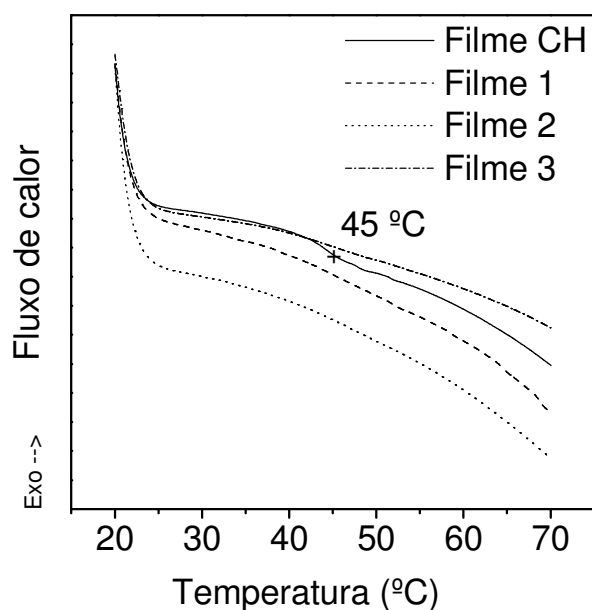


Figura 5.8 Curvas de DSC para p Filme CH (linha sólida) e Filmes 1 (linha tracejada), Sample 2 (linha pontilhada) and Sample 3 (linha ponto-tracejada) (taxa de aquecimento 10 °C/min) indicando a transição vítrea (T_g).

A adesão de células sobre a superfície de filmes depende das características como molhabilidade, hidrofiliicidade/hidrofobicidade, química da superfície e do interior, carga superficial e distribuição da carga superficial, rugosidade e rigidez.²⁸ O impacto das propriedades dos filmes sobre a adesão celular foi verificado pela contagem do número de células-tronco mesenquimais aderidas a cada filme após 6 horas de incubação. A Figura 5.9 mostra a distribuição do número de células aderidas em cada campo de contagem (aumento de 400 vezes) de uma amostra de 1 cm² de filme e a Tabela 5.1 apresenta os resultados da análise estatística.

Para todas as amostras, o número de células aderidas apresentou grande variabilidade (outliers representados pelos asteriscos). Isso ocorreu pois algumas regiões dos filmes apresentaram elevado número de células em relação a outras. Verificou-se que o número total de células aderidas foi maior no Filmes CH e no Filme 2. Este último apresentou pequena diferença na quantidade de partículas adicionadas em relação aos Filmes 1 e 3, porém, o efeito sobre a adesão celular foi diferenciado. O Filme 2 apresentou superfície com poros e protruções e rugosidade intermediária, que podem ter facilitado a adesão das células. Porém, em relação ao Filme CH, cuja superfície apresentou-se lisa, a quantidade de células aderidas foi similar. Esse resultado indica que a rugosidade é uma característica secundária e que a adesão ocorra especialmente em função do tipo de material de suporte.

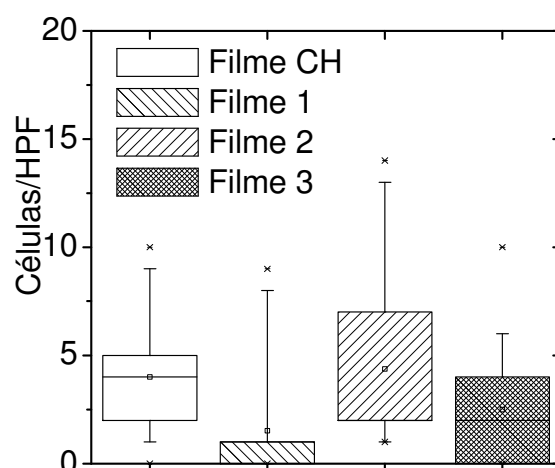


Figura 5.9 Distribuição do número de células aderidas por campo (HPF) para os Filmes CH, 1, 2 e 3 após 6 horas de incubação.

A rugosidade apresentada pelos filmes contendo partículas não influenciou a capacidade de adesão celular pois o Filme 1 e o Filme 3 cujas rugosidades foram maiores, apresentaram adesão inferior àquela propiciada pelo Filme CH. Portanto, a fim de verificar as razões para os resultados de adesão obtidos, novas amostras e parâmetros necessitam serem avaliados, como por exemplo, as propriedades mecânicas que podem estar afetando a interação das células com os filmes.

A análise estatística dos resultados está apresentada nas Tabelas 5.1 e 5.2. Na análise de variância, observou-se que o valor de F calculado foi maior do que o valor de $F_{(3,26)5\%}$ tabelado, indicando que as médias diferem entre si.

Tabela 5.1 Resultados da análise de variância da adesão celular.

Causas da variação	GL	Soma dos quadrados	Quadrados médios	F calculado	F tabelado
Tratamentos	4-1=3	917,9	306	38,44**	0,12
Resíduo	4x(27-1)=104	827,8	7,96		
Total	4x26=107				

** Significado ao nível de 5% de probabilidade.

A seguir, aplicou-se o teste de Tukey para comparação das médias. A diferença mínima significativa encontrada, com 5% de nível de significância e amplitude total estudentizada de 3,69 para 4 tratamentos e 104 graus de liberdade do resíduo, foi de 2,0. Na Tabela 5.2 estão

representadas as médias de adesão celular seguidas de letras que, quando iguais, demonstram que não houve diferença entre as médias.

Tabela 5.2 Teste de Tukey da adesão celular. Letras iguais indicam não haver diferença entre os valores com nível de significância de 5%.

Amostra	Média de células aderidas por campo de alto aumento
Filme CH	4,0 ^a
Filme 1	1,5 ^b
Filme 2	4,4 ^a
Filme 3	2,5 ^{a,b}

Existem estudos na literatura que demonstram haver crescimento e viabilidade celular em filmes de quitosana, especialmente aqueles cujo grau de desacetilação da quitosana é alto.^{12,13} Os autores relacionam essa propriedade à hidrofobização da superfície, que ocorre com o aumento do grau de acetilação e que levaria a uma redução na adesão. Não foi possível comparar os trabalhos em termos de número de células aderidas, pois os métodos de contagem são diferenciados e não apresentam detalhamento. Gupta e colaboradores (2007)¹⁵ testaram crescimento de queratinócitos em suporte plástico ou em suporte revestido por seda ou colágeno e verificaram pequena diferença. No entanto, a presença de rugosidade foi um fator positivo que permitiu o alinhamento das células na direção do padrão impresso no material.

Analisando-se os resultados da caracterização das propriedades físicas em conjunto com os resultados de adesão celular, observou-se que o Filme 2 foi o melhor dispositivo. A adição de uma quantidade intermediária de lipossomas compósitos no filme de quitosana melhorou a flexibilidade, reduziu o conteúdo de água bem como a permeação de água através do filme, aumentando a durabilidade do mesmo. Apesar da influência complexa da rugosidade, ela apresentou efeito sobre a adesão celular, que foi superior nesta amostra em relação àquela apresentada no Filme CH.

5.4 CONCLUSÕES

Foi possível preparar géis e filmes de quitosana contendo lipossomas compósitos. A presença de partículas negativamente carregadas em dispersões viscosas de quitosana causou incremento na viscosidade e denotou interação entre a quitosana e a superfície das partículas revestidas por condroitina. A interação entre a matriz do pseudo-gel e as partículas adicionadas pode ser empregada para a manipulação das propriedades reológicas de bases para uso farmacêutico ou cosmético. Os principais resultados da caracterização dos filmes de quitosana demonstraram que a presença das partículas afetou a superfície dos filmes, conferindo rugosidade e porosidade, em função da quantidade de partículas adicionada. As propriedades internas foram afetadas pela presença das partículas, que atuaram como barreira à difusão de água. Apesar da maior presença de poros observados nos filmes contendo partículas, o inchamento e a umidade destas amostras foram menores do que o filme contendo apenas quitosana. A análise térmica mostrou que mais energia foi requerida para vaporização da água dos filmes contendo partículas. Foram observadas duas transições similares à T_g da quitosana, uma a 45 °C e outra a 147 °C. Considerando que a T_g a 45 °C seja a mais correta, verifica-se que as partículas agiram como plastificantes da quitosana. A presença de partículas na superfície dos filmes foi um fator secundário para a adesão celular, já que houve adesão tanto no filme sem partículas, quanto no filme contendo partículas em quantidade intermediária. Os resultados em conjunto demonstram que os filmes de quitosana contendo lipossomas compósitos são suportes adequados para o crescimento celular devido à viabilidade de adesão das células, à estabilidade frente ao meio aquoso e às possibilidades de modulação das propriedades internas e superficiais.

5.5 REFERÊNCIAS

1. Wortel, V. A. L.; Verboom, C.; Wiechers, J. W.; Taelman, M-C.; Leonard, S.; Tadros, T. *Cosmet. Toiletries* **2005**, 120(4):57-66.
2. Boussens, J-L. L.; Vevey, H. L.; Aarau, P. S.; Brent, J-L. V. *Cosmetic preparation containing chitosan*. US Patent: 5057542, 1991.
3. Chen, Y-L.; Lee, H.; Chan, H-Y.; Sung, L-Y.; Chen, H-C.; Hu, Y-C. *Biomaterials* **2007**, 28, 2294-2305.
4. Kirker, K.R.; Luo, Y.; Harte, J. H.; Nielson, J. Shelby, G.. D. *Biomaterials*. **2002**, 23, 3661-3671.
5. Nair, L. S.; Laurencini, C.T. *Prog. Polym. Sci.* **2007**, 32, 762–798.
6. Thein-Han, W.W.; Saikhun, J.; Pholpramroo, C., Misra, R.D.K.; Kitiyanant, Y. *Acta Biomat.* **2009**, 5, 3453-3466.
7. Rodrigues, L.B.; Leite, H.F.; Yoshida, M.I.; Saliba, J.B.; Cunha Junior, A.S.; Faraco, A.A.G. *I. J. Pharm.* **2009**, 368, 1-6.
8. Cao, W.; Wang, A.; Jing, D.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* **2005**, 16 (11), 1379–1394.
9. Vargas, M.; Albors, A.; Chiralt, A.; González-Martínez, C. *Food. Hyd.* **2009**, 23 536-547.
10. Rinaudo, M. *Prog. Polym. Sci.* **2006**, 31, 603–632.
11. Denuzière, A.; Ferrier, D.; Domard. A. *Carbohydr. Polym.* **1996**, 29, 317-323.
12. Freier, T.; Koh, H. S.; Kazazian, K.; Shoichet, M. S. *Biomaterials* **2005**, 26, 5872-5878.
13. Lim, S. M.; Song, D. K.; Cho, K. J.; Oh, S. H.; Lee-Yoon, D. S.; Bae, E. H.; Lee, J. H In: Ibrahim, F.; Abu Osman, N. A.; Usman, J.; Kadri, N. A. Biomed 06, IFMBE Proceedings, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 15, 94-97, 2007.
14. Dhanikula, A. B.; Panchagnula, R. *AAPS J.* **2004**, 6 (3) 1-12.
15. Gupta, M. K.; Khokhar, S. K.; Phillips, D. M.; Sowards, L. A.; Drummy, L. F.; Kadakia, M. P.; Naik, R. R. *Langmuir.* **2007**, 23, 1315-1319.
16. Kommireddy, D. S.; Sriram, S. M.; Lvov Y. M.; Mills, D. K. *Biomaterials.* **2006** 27, 4296-4300.
17. Mertins, O.; Sebben, M; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. *Chem. Phys Lip.* **2005**, 138, 29-37.
18. Argin-Soysal, S.; Kofinas, P.; Lo, Y. M. *Food Hydrocolloid.* **2009**, 23, 202-209.
19. Murray, C. A.; Dutcher, J. R. *Biomacromolecules.* **2006**, 7, 3460-3465.

20. Packhman, D.E. *Int. J. Adhesion and Adhesives*. **1996**, 16, 121-128.
21. Yuan, N-Y.; Tsai, R-T.; Ho, M-W.; Wang, D-M.; Lai, J-Y., Hsieh, H-J. *Desalination*. **2008**, 234, 166-174.
22. Park, J. B.; Bronzino, J. D. *Biomaterials Principles and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 2000, p 225-227.
23. Park, J. B.; Bronzino, J. D. *Biomaterials Principles and Applications*. CRC Press, Boca Raton, 2000, p 164-171.
24. Toffey, A.; Samaranyake, G.; Frazier, C. E.; Glasser, W. G.. *J. Appl. Polym. Sci.* **1996**, 60, 75-85.
25. Kittur, F. S.; Harish Prashanth, K. V.; Udaya Sankar, K.; Tharanathan R. N. *Carbohydr. Polym.* **2002**, 49, 185-193.
26. Fajardo, A. R.; Piai, J. F.; Rubira, A. F.; Muniz, E. C. *Carbohydr. Polym.* **2010**, 80, 934-943.
27. Neto, C. G. T.; Giacometti, J. A.; Job, A. E.; Ferreira, F. C.; Fonseca, J. L. C.; Pereira, M. R. *Carbohydr. Polym.* **2005**, 62, 97-103.
28. Zhao, F.; Grayson, W. L.; Ma, T.; Bunnell, B.; Lu, W. W. *Biomaterials*. **2006**, 27, 1859-1867.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Como proposto nos objetivos gerais desta tese, foi possível avaliar as diversas estruturas formadas pela combinação da fosfatidilcolina com o polieletrólito quitosana, em meio orgânico, através de técnicas de espalhamento de luz e de espalhamento de raios-X em baixos ângulos. A presença de quitosana afetou o tipo de estrutura formada nas emulsões em fase reversa levando à formação preferencial de estruturas lamelares em maior número e mais estáveis do que quando os fosfolipídeos foram dispersos sozinhos. Durante o tempo em que essas emulsões foram analisadas, diferentes estruturas puderam ser observadas através da análise por SAXS. Os tamanhos das estruturas formadas puderam ser acompanhados através das distribuições do tempo de relaxação, pela análise dos modos rápido e lento. Essa análise forneceu dados complementares sobre a etapa inicial da obtenção de quitossomas, em relação à obtenção de lipossomas.

Como perspectiva para uma avaliação mais profunda dessas estruturas, propõe-se a análise dos agregados formados pela separação das fases após o sistema atingir o equilíbrio. A análise por SAXS destes agregados pode permitir uma interessante análise das fases formadas pelos fosfolipídeos em presença de quitosana. Outras técnicas, como microDSC e microscopia óptica também podem auxiliar na caracterização destas fases. Além disso, dispersões de tensoativos aniônicos em meio aquoso com concentrações variadas de quitosana podem trazer informações sobre a hidratação das cabeças polares na presença de quitosana empregando-se técnicas como espalhamento de luz.

Além dos estudos fundamentais, foram preparados e caracterizados lipossomas multilamelares compósitos contendo quitosana associada às regiões aquosas e condroitina na superfície. A análise do potencial ζ permitiu avaliar a associação dos polímeros na superfície dos lipossomas compósitos. No entanto, a quantificação do polímero não adsorvido à superfície, mediante estudos de diálise ou ultra filtração-centrifugação, estão sendo previstos como uma forma de confrontar com os dados obtidos pelas medidas de potencial ζ .

As propriedades estruturais dos lipossomas multilamelares compósitos foram estudadas combinando-se técnicas de espalhamento de raios-X e de luz e aplicando-se modelos clássicos propostos para líquidos cristalinos esmétricos. Foi possível obter parâmetros estruturais aplicando-se a Teoria de Caillé Modificada sobre os perfis de difração. Foi verificado que as interações entre a quitosana e as regiões polares dos fosfolipídeos foram responsáveis pela maior rigidez das estruturas lamelares nas amostras contendo altas concentrações de quitosana. A causa dessa rigidez foi atribuída à diminuição das flutuações nas bicamadas. Mesmo tendo sido observado esse efeito, houve redução na intensidade da segunda ordem de

difração dos perfis analisados por SAXS. A presença da quitosana nos espaços interlamelares levou à perda da ordem de longo alcance, pois não há como garantir sua distribuição homogênea em todas as bicamadas. O efeito positivo da presença da quitosana sobre a organização do sistema decorreu, principalmente, da indução à formação de estruturas lamelares, que levaram a uma maior intensidade dos picos. No entanto, também foi observada redução na ordem de difração causada pelo incremento da concentração de condroitina nas amostras, apesar de seu efeito aparentemente superficial. Isso aponta para a necessidade de realização de novas medidas com amostras contendo quantidades discretas de polieletrólitos numa faixa menor de concentração, especialmente, minimizando-se a quantidade de condroitina utilizada, a fim de compreender melhor o seu efeito demonstrado pelos perfis de difração.

ANEXOS

Tabela A.1 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆W₂₀₀, ao longo de 15 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razão P1/P2
1	0,79	0,22	-	3,6
3	4,7	1,0	-	4,7
5	0,9	0,32	-	2,8
7	0,85	0,15	-	5,7
9	1,74	-	-	-
11	1,37	-	-	-
13	0,64	0,53	-	1,2
15	0,55	0,5	-	1,1

Tabela A.2 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆CH₂₀₀, ao longo de 7 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razão P1/P2
3	1,2	0,08	-	15
7	1,2	0,09	-	13

Tabela A.3 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆W₄₀₀. Foi possível determinar apenas para o primeiro minuto.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razão P1/P2
1	1,2	0,13	-	9,2

Tabela A.4 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆CH₄₀₀, ao longo de 11 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razao P1/P2
1	1,0	-	-	-
7	1,1	0,4	0,04	2,7
11	3,3	0,08	-	41

Tabela A.5 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀W₂₀₀, ao longo de 15 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razao P1/P2
1	0,86	0,14	-	6,1
5	1,3	0,05	-	26
7	1,2	0,1	-	12
9	1,3	0,1	-	13
11	1,2	-	-	-
13	1,3	-	-	-
15	2,8	0,05	-	56

Tabela A.6 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀CH₂₀₀, ao longo de 9 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razao P1/P2
5	0,5	-	-	-
9	0,97	0,07	-	14

Tabela A.7 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀W₄₀₀, ao longo de 11 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razao P1/P2
3	0,74	0,36	0,1	2,1
5	1,0	0,1	-	10
7	0,4	0,3	0,15	1,33
11	1,0	0,18	-	5,6

Tabela A.8 Valores de intensidades relativas as distribuições dos tempos de relaxação da amostra PC₆₀CH₄₀₀, ao longo de 11 minutos.

Tempos de relaxação	Pico 1 (maior)	Pico 2	Pico 3	Razao P1/P2
1	2,3	0,03	-	77
3	2,4	0,04	-	60
5	1,2	0,7	-	1,7
7	1,1	0,21	0,13	5,2
9	1,9	0,7	0,5	2,7
11	0,66	0,26	0,13	2,4
13	0,9	0,21	0,13	4,3

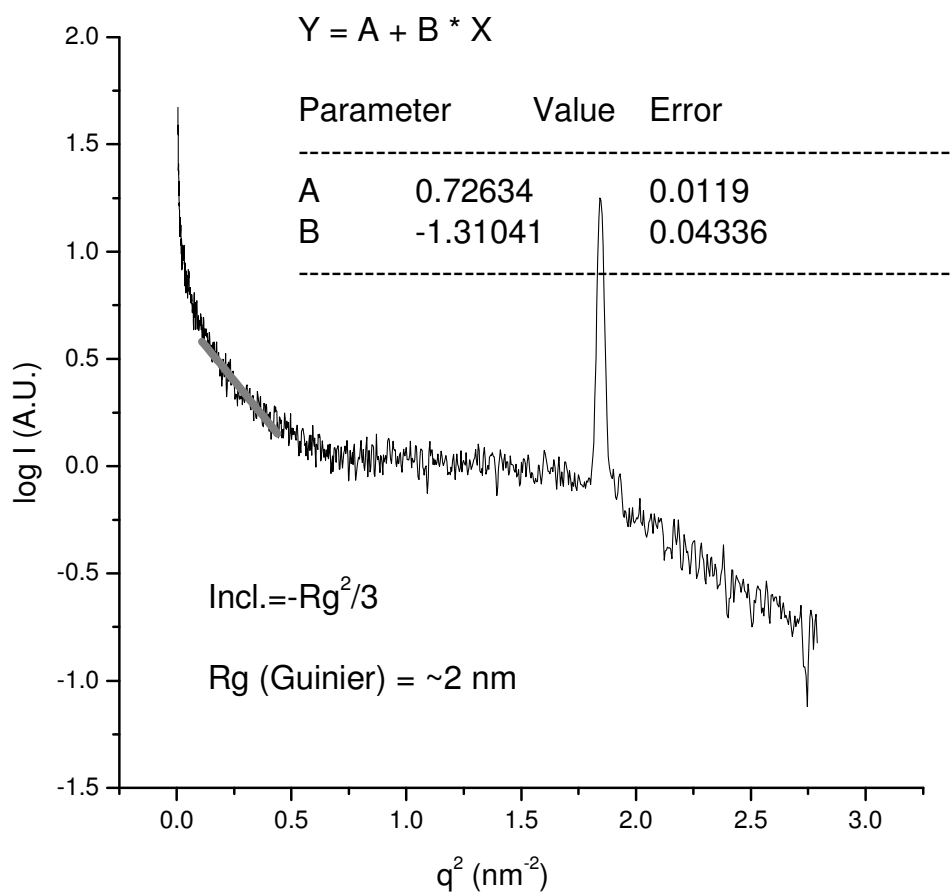


Figura A.1 Determinação do raio de giro a partir da região de Guinier. Ponto intermediário é aquele em que $Rg \times q \ll 1$.

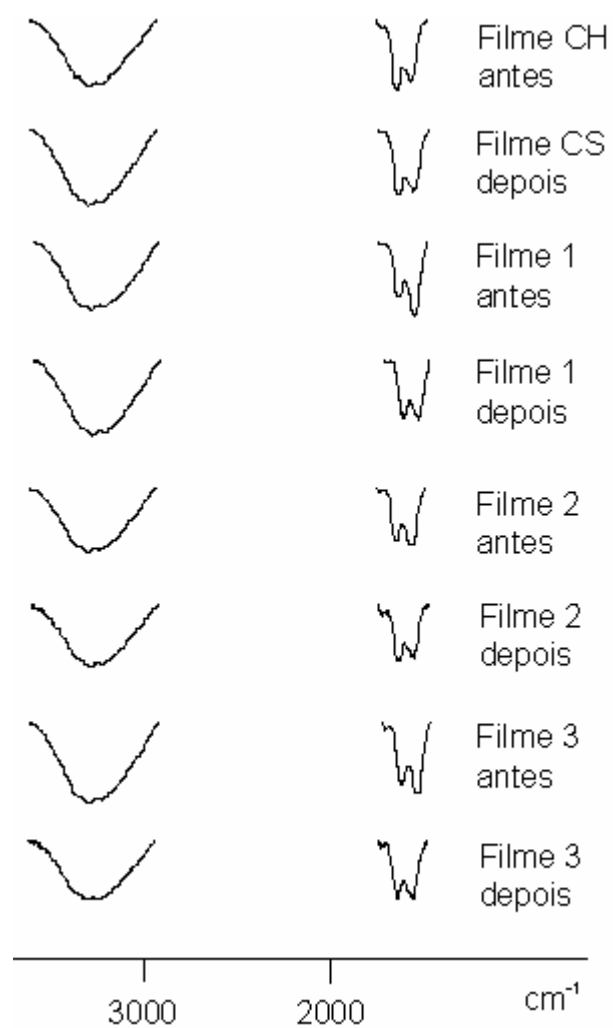


Figura A.2 Áreas referentes às bandas de hidroxila (3450 cm^{-1}) e acetila (1665 cm^{-1}) dos espectros de infravermelho dos Filmes CH, 1, 2 e 3 antes e após a secagem.