

Síntese e caracterização da O-Carboximetilquitosana como alternativa ao uso do Ácido Hialurônico

Synthesis and characterization of O-Carboxymethylchitosan as an alternative to the use of Hyaluronic Acid

Síntesis y caracterización de O-Carboximetilquitosano como alternativa al uso de Ácido Hialurónico

Recebido: 04/03/2022 | Revisado: 14/03/2022 | Aceito: 22/03/2022 | Publicado: 29/03/2022

Taynah Pereira Galdino

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4177-6430>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: taynahgaldino01@gmail.com

Lucas Cordeiro de Oliveira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0853-3472>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: lucascordeiro@gmail.com

Eunice Paloma Nascimento Lima

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9125-0018>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: eunice.lima@certbio.ufcg.edu.br

Raid Ícaro Rached Farias

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8442-692X>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: raidicaro@gmail.com

Raquel Albino de Jesus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3015-2665>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: raquel.jesus@ee.ufcg.edu.br

Suelyn Fabiana Acirole Moraes de Queiroz

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4751-5979>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: suelyn.acirole@certbio.ufcg.edu.br

Antonio Carlos de Queiroz Santos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4056-4113>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: antoniocarlos_queiroz@hotmail.com

Marcus Vinícius Lia Fook

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8566-920X>
Universidade Federal de Campina Grande, Brasil
E-mail: viniciusliafook@yahoo.com.br

Resumo

O ácido Hialurônico (AH) tem sido um componente importante em diversos campos, como preenchimento dérmico, engenharia de tecidos, tratamento da região vascular e cartilaginosa, tendo sua aplicação limitada pois o uso em excesso pode promover a redução da adesão celular, devido à presença de cargas negativas, característico deste material. Para solucionar esta limitação, pode ser empregado um material catiônico e aniônico, tal como a O-Carboximetilquitosana (O-CMQ), que possui uma estrutura química similar e propriedades análogas ao AH. Portanto, esse trabalho teve como objetivo a determinação das condições de síntese e caracterização da O-Carboximetilquitosana (O-CMQ), e avaliação da aplicação como alternativa ao ácido hialurônico. A partir da quitosana produzida e caracterizada foi realizada a síntese da O-CMQ nas proporções 1:1, 1:2 e 1,5:2 (m/v), seguindo das caracterizações através de Análise Visual, Microscopia Óptica (MO), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Potencial Hidrogeniônico (pH) e Condutivimetria, Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC). Concluiu-se que a metodologia de síntese foi eficiente para a produção da O-Carboximetilquitosana com diferentes propriedades. A comparação com o ácido hialurônico confirmou as semelhanças químicas, físicas e biológicas, entre as amostras, sendo promissoras para a aplicação como substituto a esse material.

Palavras-chave: O-Carboximetilquitosana; Ácido Hialurônico; Biomaterial.

Abstract

Hyaluronic acid (HA) has been an important component in several fields, such as dermal filling, tissue engineering, treatment of the vascular and cartilaginous region, and its application is limited because its excessive use can promote a reduction in cell adhesion, due to its presence of negative charges, characteristic of this material. To solve this limitation, a cationic and anionic material can be used, such as O-Carboxymethylchitosan (O-CMQ), which has a similar chemical structure and similar properties to HA. Therefore, this work aimed to determine the conditions for the synthesis and characterization of O-Carboxymethylchitosan (O-CMQ), and to evaluate its application as an alternative to hyaluronic acid. From the chitosan produced and characterized, the synthesis of O-CMQ was carried out in the proportions 1:1, 1:2 and 1.5:2 (m/v), followed by the characterizations through Visual Analysis, Optical Microscopy (OM), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Hydrogen Potential (pH) and Conductivity, Thermogravimetry Analysis (TGA) and Differential Scanning Calorimetry (DSC). It was concluded that the synthesis methodology was efficient for the production of O-Carboxymethylchitosan with different properties. The comparison with hyaluronic acid confirmed the chemical, physical and biological similarities between the samples, being promising for application as a substitute for this material.

Keywords: O-Carboxymethyl Chitosan; Hyaluronic acid; Biomaterial.

Resumen

El ácido hialurónico (HA) ha sido un componente importante en varios campos, como el relleno dérmico, la ingeniería de tejidos, el tratamiento de la región vascular y cartilaginosa, y su aplicación es limitada porque el uso excesivo puede promover la reducción de la adhesión celular, debido a la presencia de cargas negativas, propias de este material. Para solucionar esta limitación, se puede utilizar un material catiónico y aniónico, como el O-Carboximetilquitosano (O-CMQ), que tiene una estructura química similar y propiedades similares al HA. Por tanto, este trabajo tuvo como objetivo determinar las condiciones de síntesis y caracterización del O-Carboximetilquitosano (O-CMQ), y evaluar su aplicación como alternativa al ácido hialurónico. A partir del quitosano producido y caracterizado, se realizó la síntesis de O-CMQ en las proporciones 1:1, 1:2 y 1.5:2 (m/v), seguido de las caracterizaciones por Análisis Visual, Microscopía Óptica (OM), Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR), Potencial de Hidrógeno (pH) y Conductividad, Análisis Termogravimétrico (TGA) y Calorimetría Exploratoria Diferencial (DSC). Se concluyó que la metodología de síntesis fue eficiente para la producción de O-Carboximetilquitosano con diferentes propiedades. La comparación con el ácido hialurónico confirmó las similitudes químicas, físicas y biológicas entre las muestras, siendo prometedora su aplicación como sustituto de este material.

Palabras clave: O-carboximetilquitosano; Ácido hialurónico; Biomaterial.

1. Introdução

O uso de biomateriais remonta aos primórdios das necessidades humanas, entretanto, apenas em 1986 surgiu a necessidade de definir um biomaterial, que ao longo dos anos e avanço tecnológico essa definição foi sendo aprimorada (Baust & Baust, 2006). Portanto, podemos definir biomateriais como materiais projetados para assumir uma forma que possa direcionar, por meio de interações com os sistemas vivos, o curso de qualquer procedimento terapêutico ou de diagnóstico, e podem ser divididos em sintéticos, naturais e semi sintéticos, e classificados quando a sua resposta química e biológica (Ghasemi-Mobarakeh, et al., 2019).

Se tratando de sua composição química eles podem ser classificados como biomateriais metálicos que são muito utilizados como implantes dentários e articulações, biocerâmicos utilizados na ortopedia e odontologia, biopolímeros usados em revestimentos, enchimentos, adesivos, regeneração de pele, troca de articulações e implementação de fármacos no organismo e os biocompósitos, unindo outras classes, sendo desenvolvidos para uma finalidade específica, abrangendo diversos tipos de aplicações biomédicas (Gutierrez et al., 2006; Williams, Cahn & Bever, 1990; Dantas, et al., 2016). Quanto a resposta biológica, os materiais podem ser biotolerados, que são ligeiramente aceitos pelo tecido receptor, como o aço inoxidável, bioinertes, que em contato direto com o tecido receptor não causa reações adversas ao organismo, como as ligas de titânio, bioativos, que corroboram para a ligação química com o tecido ósseo, como a hidroxiapatita e os reabsorvíveis que são substituídos gradativamente pelos tecidos e vagarosamente degradáveis, como a quitosana (Silva, 2012).

A quitosana é um polissacarídeo de origem natural derivado da quitina. A quitina pode ser encontrada em insetos, carapaça de crustáceos, parede celular de fungos, entre outros, sendo o segundo polissacarídeo mais abundante da natureza, constituído por uma estrutura linear semelhante à das fibras da celulose, sendo essa estrutura do tipo β -(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-

deoxi-D-glucosamina (GlcNAc) (Dallan, 2005). A quitina é isolada do exoesqueleto de crustáceos a partir de processos químicos envolvendo a remoção da camada mineral e proteica. Para a obtenção da quitosana, é realizada uma reação de desacetilação, rompendo as ligações N-acetil da quitina e formando um grupo amino livre, gerando a β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-deoxi-Dglucosamina (GlcN) (Azevedo et al., 2007).

A quitosana não é considerada um polímero uniforme, sendo um grupo de polímeros parcialmente desacetilados, em que, acima de 50% unidades desacetiladas, é considerado quitosana, sendo possível determinar a porcentagem de unidades de quitina que sofreram o processo de desacetilação através do cálculo do Grau de Desacetilação (GD). Assim, é necessário rigoroso controle das condições da síntese, pois esse processo afeta diretamente as propriedades físico-químicas e biológicas como a cristalinidade, biodegradação, solubilidade e mucoadesividade (López-Chávez et al., 2005; Santos, 2006; São Pedro et al., 2009).

As propriedades da quitosana envolvem biocompatibilidade, biodegradabilidade, alta densidade de cargas quando em solução, semicristalinidade, atoxicidade, cicatrizante, biomimeticidade, capacidade de aderir a metais pesados, floculante, bactericida, fungicida, entre outras. Assim, Através de modificações químicas e estruturais é possível obter derivados de quitosana, como a N,O-Carboximetilquitosana, N-Carboximetilquitosana, Sulfoetil quitosana, quitosana entrecruzada, sais de quitosana, O-Carboximetilquitosana, entre outros (Santiago, 2016; Sashiwa, 2004; Fonseca-Santos & Chorilli, 2017).

A existência de grupos funcionais na quitosana permite sua modificação química. Um dos processos que permite essas modificações é o processo de carboximetilação, que origina compostos carboximetilados da quitosana. Tal processo é responsável por ampliar as aplicações desse material na área biomédica e farmacêutica, pois, adquire a capacidade de solubilização em meios neutros ou básicos (Sashiwa, 2004; Fonseca-Santos & Chorilli, 2017). Dentre esses subprodutos da quitosana, temos a A carboximetilquitosana (CMQ), que é um polieletrólito com cargas positivas e negativas que possui propriedades físico-químicas e biológicas preservadas em amplo intervalo de pH, que é obtida através da reação de carboximetilação da quitosana, com o objetivo de aumentar a solubilidade desse material (Ladeira, 2020).

A CMQ, em comparação a outros derivados solúveis em água da quitosana, é amplamente estudada por seu caráter anfótero e amplas aplicações. É um biomaterial polimérico, com estrutura molecular similar à do ácido hialurônico, e aos glicosaminoglicanos presentes na cartilagem articular, além de apresentar propriedades como a solubilidade em meio fisiológico, biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, ausência de alergenicidade, boa capacidade de formação de películas, fibras e hidrogéis (Farag & Mohamed, 2013; Zhao *et al.*, 2011). Dependendo das condições de síntese, a reação de Carboximetilação ocorre especialmente ou nas hidroxilas ou na metade dos grupos NH₂, com um grupo amino primário (-NH₂) ou uma amina secundária, podendo ser obtida três tipos de CMQ: O-carboximetilquitosana (O-CMQ), N-carboximetilquitosana (N-CMQ) e N,O-carboximetilquitosana (N,O-CMQ) (Shariatinia, 2018).

As aplicações da CMQ são as mais variadas, devido a sua gama de propriedades, como: a solubilidade e a capacidade de interagir com substâncias permite a aplicação da indústria farmacêutica como entregador de fármaco, pelo aumento da solubilidade em sistemas fisiológicos. A biocompatibilidade permite a avaliação de parâmetros hematológicos e histopatológicos, a compatibilidade com partículas magnéticas fornece a possibilidade de aplicação como marcador biológico, liberação controlada de fármacos e substâncias antitumorais. A capacidade de reticulação proporciona a formação de hidrogéis, que na área da agricultura podem inibir o crescimento de bactérias e fungos em alimentos (Silva, 2011). Além disso, podemos citar a atividade antibacteriana, atoxicidade, o estímulo ao crescimento de fibroblastos *in vitro* e *in vivo* e a ação, na forma de hidrogel, da atividade da lisozima extracelular presente nos fibroblastos cutâneos, influenciando o aumento da produção de colágeno na pele, bem como a similaridade estrutural com o ácido Hialurônico que, em conjunto com a atoxicidade fornece a possibilidade de aplicação na área biomédica, atuando na prevenção de adesões pós-cirúrgicas devido a ação antibacteriana (Mogonasu & Grumezescu, 2014).

O ácido hialurônico (AH) é um biopolímero de ocorrência natural que possui várias funções dentro do corpo, é um material versátil com propriedades exclusivas (Dovedytis, 2020). É não tóxico, não imunogênico, biocompatível e biodegradável, tem excelente viscoelasticidade, alta capacidade de retenção de umidade, alta biocompatibilidade e propriedades higroscópicas (Ali, 2020). Este polímero encontra-se naturalmente no corpo humano por toda a matriz extracelular, cartilagem articular, medula óssea em tecidos e fluidos corporais. É encontrado também em concentrações relativamente altas no fluido vítreo, tecidos conjuntivos, articulações, pele, cordão umbilical, líquido sinovial e cristas de galo (Gupta *et al.*, 2019).

O AH possui elevada versatilidade, sendo um componente importante em diversos campos, como preenchimento dérmico, engenharia de tecidos e em tratamentos de câncer, tratamento da região vascular, cartilagem, osso e pele, além de possuir efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e analgésico, sendo essas duas últimas propriedades responsáveis pela normalização da fluidez e da viscoelasticidade do líquido sinovial, e também para a ativação da regeneração tecidual na cartilagem afetada, além de restaurar o equilíbrio funcional da articulação, sendo recomendado para o tratamento clínico da osteoartrite (Dovedytis, 2020; Gupta *et al.*, 2019; Moreland, 2003).

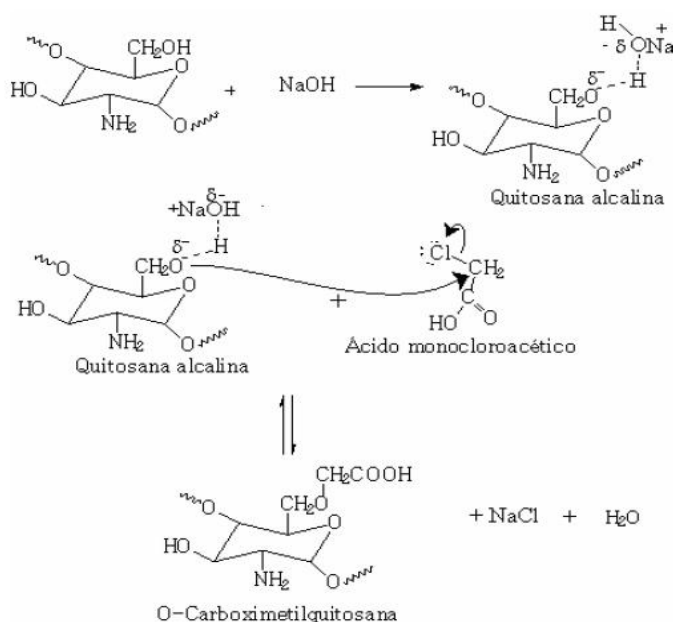
Contudo, o ácido hialurônico é utilizado em baixas quantidades, pois, o excesso da inserção desse material pode promover a redução da adesão celular, devido a presença de cargas negativas, característico deste material. Para solucionar esta limitação, pode ser empregado um material catiônico e aniônico, tal como a O-Carboximetilquitosana (O-CMQ) (Correia, 2011). Para isto, se faz necessário uma padronização da metodologia de obtenção da O-carboximetilquitosana, visto que, diferentes metodologias promovem diferentes graus de substituição da O-CMQ, conseqüentemente, diferentes propriedades.

2. Metodologia

Síntese da O-Carboximetilquitosana

Para a síntese da O-Carboximetilquitosana, adaptou-se a metodologia de Chen & Park, (2003), sendo realizada em etapas: a ativação das hidroxilas, carboximetilação, interrupção da reação, lavagem e secagem. A reação de síntese, está exibida na Figura 1.

Figura 1 - Reação de síntese da O-Carboximetilquitosana.



Fonte: BRESOLIN (2009).

Ativação das hidroxilas

A ativação das hidroxilas ocorre por meio de uma reação alcalina, em que, adiciona-se 18 mL de álcool isopropílico a 2 g quitosana, mantendo sob agitação por 30 minutos. Prepara-se uma solução com 1 g de NaOH, dissolvido em 2 mL de água ultrapura, e acrescenta-se na solução de quitosana, mantendo sob agitação por 24 horas, obtendo a quitosana alcalina.

Carboximetilação

O processo de carboximetilação consiste na remoção do H⁺ presente na hidroxila mais externa e adição do grupo funcional ácido carboxílico (- COOH), como visto na Figura 4. Inicialmente, prepara-se uma solução de ácido monocloracético, em que se dissolve 1,5 g em 4 mL de álcool isopropílico, e adiciona-se na solução de quitosana alcalina, permanecendo sob agitação por 24 horas.

Interrupção da reação, Lavagem e Secagem

Nesta etapa, adiciona-se 30 mL de etanol absoluto, afim de interromper a reação de carboximetilação da quitosana. Em seguida, o material obtido é filtrado, e lavado com 950 mL de etanol à 80%, e posteriormente, 50 mL de etanol absoluto, afim de neutralizar a carboximetilquitosana. Após a neutralização, o material é levado a estufa por 12 horas à 60°C, obtendo assim, a O-Carboximetilquitosana 1:1.

Otimização da obtenção da O-Carboximetilquitosana

Afim de determinar a melhor proporção massa/volume para a síntese da O-Carboximetilquitosana, realizou-se o processo de obtenção conforme descrito anteriormente, e em seguida realizou-se dois experimentos. O primeiro duplicou-se o volume de todos os reagentes, mantendo fixa a quantidade inicial da quitosana, obtendo a O-CMQ 1:2, e o segundo experimento consistiu em utilizar 3 gramas de quitosana para o volume duplicado dos reagentes, obtendo a O-CMQ 1,5:2.

3. Resultados e Discussão

A metodologia proposta para a preparação das amostras se mostrou eficiente para a produção da O-Carboximetilquitosana. Durante o processo de síntese, a etapa de ativação das hidroxilas apresentou maior dificuldade na O-CMQ 1:1, pois, o volume de solvente intumescce a amostra, porém, por não ser em grande quantidade, dificulta a homogeneização, deixando material preso na parede do bécker.

A etapa de carboximetilação, torna a solução carboximetilada leitosa, indicando que o processo de introdução do grupamento carboxílico está ocorrendo. Todas as amostras apresentaram-se esbranquiçada, porém, a amostra de O-CMQ 1:2 se apresentou mais branca que as demais, indicando maior eficiência nesta etapa. As demais etapas se apresentam similares para todas as amostras, indicando que, as etapas mais influentes para o processo de carboximetilação da quitosana são as etapas iniciais.

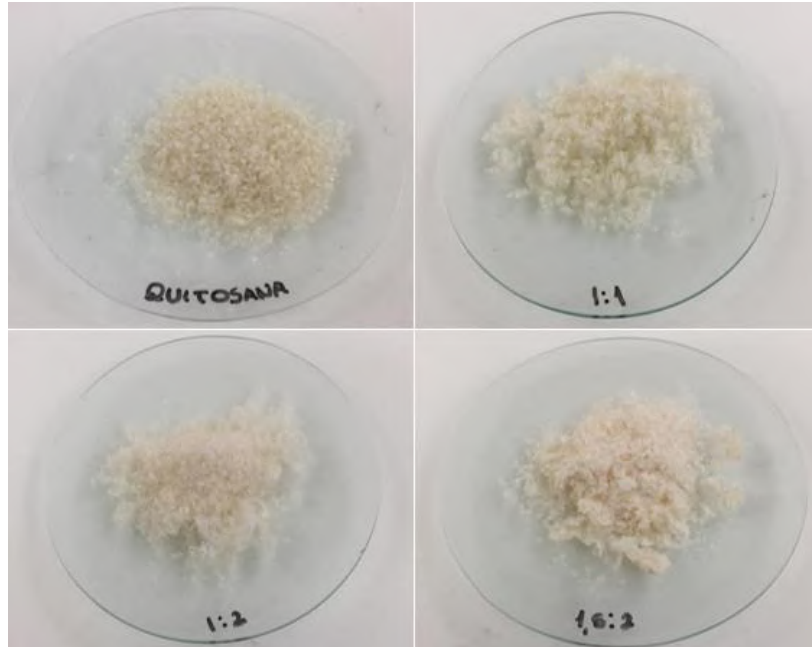
Análise visual

A quitosana utilizada como matéria prima, bem como as O-CMQ sintetizadas nas condições 1:1, 1:2 e 1,5:2 foram fotografadas na sua forma de pó, como exibido na Figura 2. Nota-se que a quitosana se apresenta na forma de flocos, na cor bege claro, com tamanho de partícula variados, estando de acordo com os resultados esperados.

As O-CMQ's sintetizadas a partir da quitosana, produzida no Laboratório de Análise de Desenvolvimento do Nordeste – CERTBIO, apresenta diferenças visuais de tamanho de partícula e coloração, no qual, as O-CMQ's são mais

esbranquiçadas, porém, nota-se que a proporção de 1:2 apresentou mais branca que as demais, provavelmente, devido o maior volume de reagente e a proporção menor de matéria prima auxiliou na perda da coloração bege da quitosana.

Figura 2 - Fotografia dos pós de quitosana e O-CMQ (1:1, 1:2 e 1,5:2).

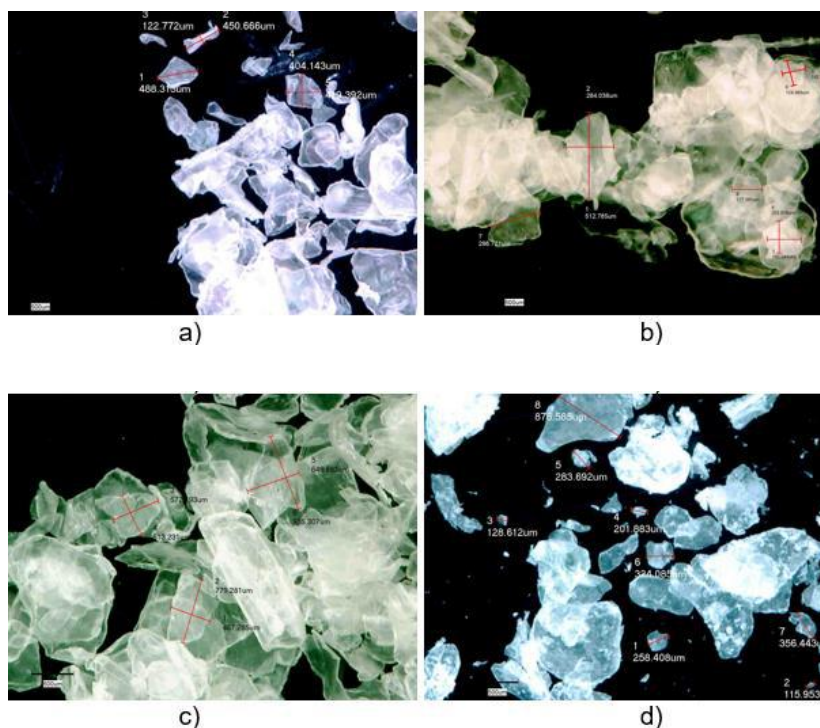


Fonte: Autores.

Microscopia ótica (MO)

A quitosana e a O-CMQ na forma de pó foram avaliadas utilizando a técnica de microscopia ótica, afim de determinar as características morfológicas das amostras, como a forma e o tamanho das partículas, sendo exibidas na Figura 3.

Figura 3 - Imagens das micrografias com magnificação de 50x da a) quitosana, b) O-CMQ 1:1, c) O-CMQ 1:2 e d) O-CMQ 1,5:2.



Fonte: Autores.

Com as imagens de microscopia foi possível verificar que todas as amostras possuem a forma de placas irregulares, com tamanhos irregulares, corroborando com os resultados obtidos na análise visual. Como observado por autores que produziram o-carboximetilquitosana-nlauril, e notou as partículas irregulares e superfícies rugosas (Largura, 2009).

A partir dessa técnica, foi possível calcular o tamanho de algumas partículas, afim de obter a média do tamanho de partículas de cada material, conforme exibido na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados individuais e média dos tamanhos de partícula (μm) da quitosana e O-carboximetilquitosana.

Amostra	1	2	3	Média
Quitosana	404,14	450,67	419,39	424,733
O-CMQ 1:1	192,54	284,04	293,98	256,853
O-CMQ 1:2	487,28	513,23	572,93	524,48
O-CMQ 1,5:2	283,69	356,44	324,08	321,403

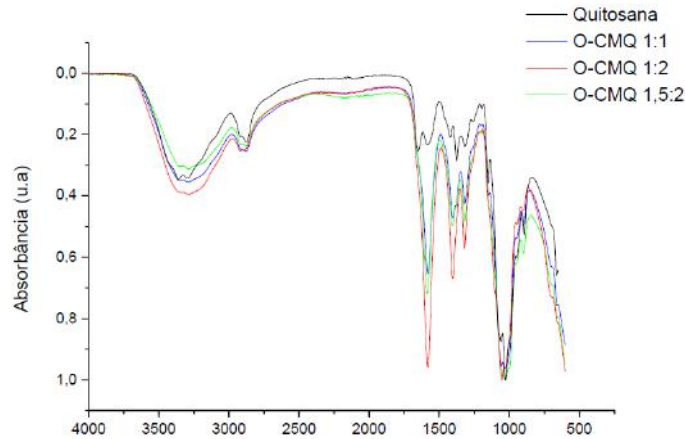
Fonte: Autores.

Confirmando os resultados visuais, observou-se a grande variação nos tamanhos das partículas individualmente. A quitosana apresentou uma média de tamanho de partícula de 424,733 μm , sendo superior à média verificada na O-CMQ 1:1 e O-CMQ 1,5:2. Porém, a O-CMQ 1:2 apresentou uma média de tamanho de partícula superior as demais, possivelmente devido a uma aglomeração das partículas no processo de síntese.

Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A quitosana e a O-CMQ na proporção 1:1, 1:2 e 1,5:2, na sua forma de pó, foram analisadas pela espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, na região de 4000 cm^{-1} a 650 cm^{-1} e seus espectros estão exibidos na Figura 4.

Figura 4 - Imagens das micrografias com magnificação de 50x da a) quitosana, b) O-CMQ 1:1, c) O-CMQ 1:2 e d) O-CMQ 1,5:2.

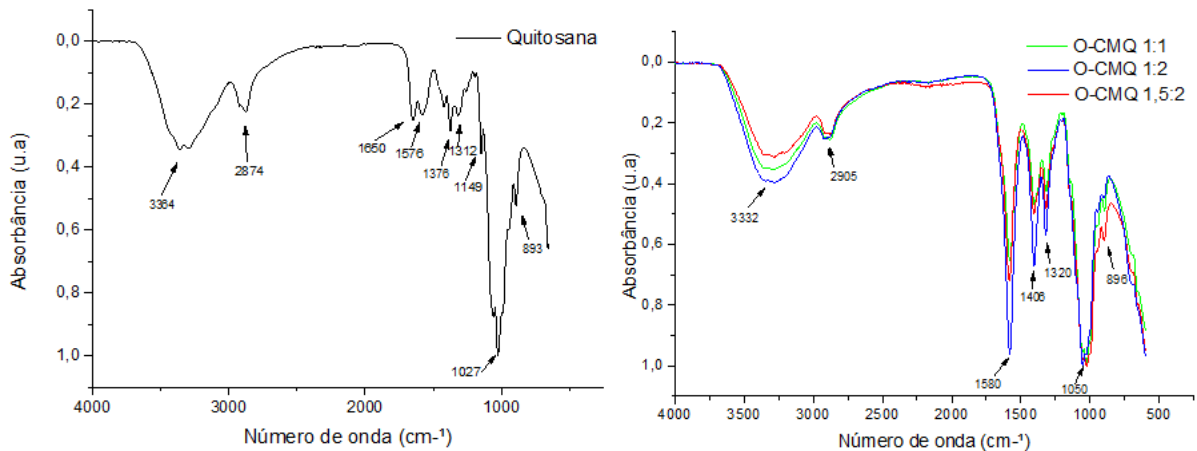


Fonte: Autores.

Os espectros analisados se mantem semelhantes aos encontrados na literatura. As amostras de O-CMQ apresentam comportamento semelhante entre elas, porém, com intensidades diferentes, indicando que o material possui as mesmas características, com diferentes quantidades de agrupamentos. Os espectros de O-CMQ se diferem da quitosana, principalmente na região entre 1750 a 1100 cm^{-1} , indicando que, o processo de síntese foi eficiente, porém, necessita-se da identificação dos picos característicos para a melhor compreensão do material.

Os picos característicos dos materiais foram identificados e comparados com a literatura, permitindo assim, a melhor compreensão do processo de síntese, conforme exibido na Figura 5 e Tabela 2.

Figura 5 - Espectros de FTIR do pó de quitosana e da O-CMQ 1:1, 1:2 e 1,5:2, com a identificação dos picos.



Fonte: Autores.

Tabela 2 - Comparação entre o número de onda das bandas de vibração encontradas na literatura e os números de onda observados experimentalmente (Flamingo, 2016).

Bandas de vibração	Número de onda (cm ⁻¹)	
	Literatura	Observado quitosana
Deformação axial de -OH e -NH	3600-3000	3364
Deformação axial de -CH	2895-2720	2874
Deformação axial de -C=O	1655	1650
Deformação angular de -NH	1550	1576
Deformação angular de -CH	1378	1376
Deformação axial de -CN	1320	1320
Deformação angular de -OH	1155	1149
Deformação angular de -CO-	1070	1027
Flexão fora do plano de -CH	834	893

Fonte: Autores.

Ao observar os espectros das O-CMQs em comparação com a quitosana, nota-se que algumas bandas se mantêm similares, como a deformação axial de -OH e -NH, deformação axial em -CH, e deformação angular de -CO- observadas em 3332, 2905 e 1050 cm⁻¹, respectivamente. As bandas observadas em 1580 e 1415 cm⁻¹, são características da carboximetilquitosana, correspondendo as deformações axiais simétricas e assimétricas de -COO⁻, respectivamente, o que indica que houve a carboximetilação da quitosana, corroborando com os resultados observados por Chen e Park (2003).

Potencial Hidrogeniônico (pH) e Condutividade

O pH e a condutividade foram medidos através da imersão direta dos eletrodos nas soluções. O pH corresponde ao potencial hidrogeniônico de uma solução, ou seja, determina a concentração de íons de hidrogênio na solução. Já a condutividade varia de acordo com a concentração das substâncias ionizadas dissolvidas na água, temperatura, mobilidade dos íons, dentre outras variáveis. Na Tabela 3 observa-se os resultados de pH e condutividade das soluções de O-CMQ e da água ultrapura.

Tabela 3 - Resultados de pH e condutividade da água ultrapura e soluções de O-CMQ.

	Condutividade			pH		
	1	2	3	1	2	3
Água ultrapura	1,33	1,32	1,27	6,12	6,32	6,19
O-CMQ 1:1	460	463	468,7	8,3	8,03	8,4
O-CMQ 1:2	808,1	835,8	847,4	9,06	9,1	9,16
O-CMQ 1,5:2	703,1	691,4	691,7	9,03	9,02	9,01

Fonte: Autores.

Nota-se que as O-Carboximetilquitosanas possuem pH mais alcalino que da água, e condutividade superior. O pH e condutividade da O-CMQ 1:1 é consideravelmente inferior que as demais proporções, isso pode ser explicado devido as frações insolúveis presentes nessa solução, aproximando os valores aos da água ultrapura. Enquanto a O-CMQ 1:2 e 1,5:2 possuem resultados próximos, indicando que os compostos solubilizaram de forma ideal.

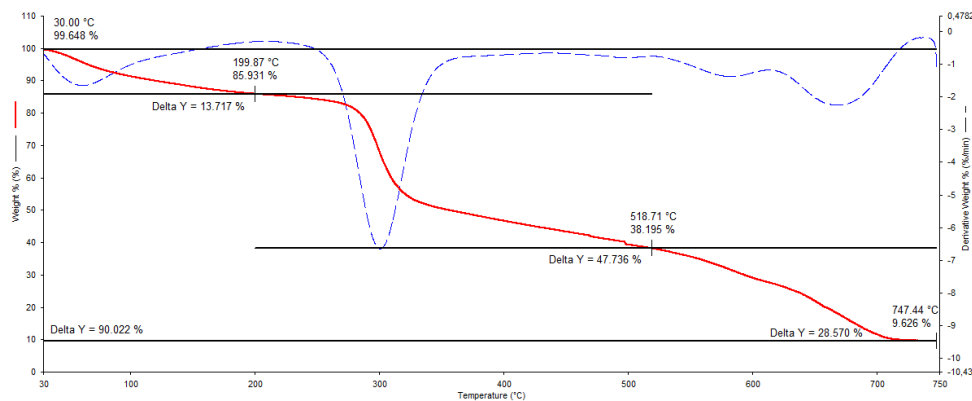
Foi estudado a prevenção de aderências pericárdias com o uso da carboximetilquitosana verificou o pH de 8,9 desse composto, sendo compatível com os resultados obtidos nesse experimento (Daroz, 2008).

Análise Termogravimétrica (TGA)

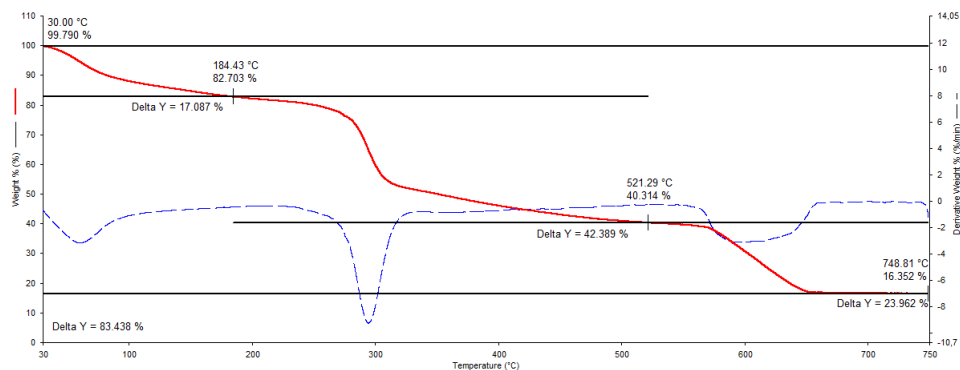
A análise termogravimétrica é uma técnica utilizada para medir uma propriedade da amostra quando ela é submetida a variação de temperatura ao longo de um determinado tempo. As amostras de O-CMQ (1:1, 1:2 e 1,5:2) foram submetidas ao aquecimento com uma razão de 10°C/min até atingir 750°C, sob atmosfera de nitrogênio, afim de verificar sua variação de massa em função da razão de aquecimento.

A termogravimetria foi utilizada para verificar a estabilidade térmica das amostras na forma de pó, e a derivada foi empregada para visualizar os intervalos de temperatura que ocorrem os eventos térmicos, no qual, o ponto de inflexão da curva corresponde a temperatura que a reação ocorre mais rapidamente, como exibido na Figura 6.

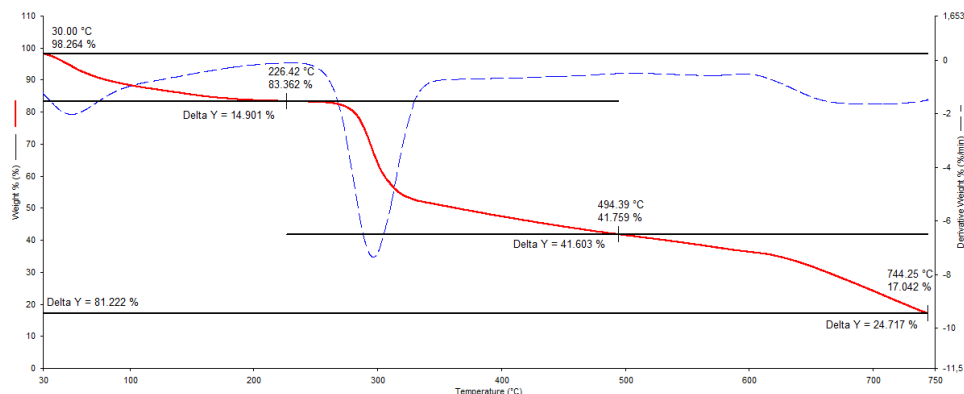
Figura 6 - Curvas TG/DTG das amostras de O-CMQ na proporção de a) 1:1, b) 1:2 e c) 1,5:2, sob atmosfera de nitrogênio, razão de aquecimento de 10°C/min e suporte de alumina.



(a)



(b)



(c)

Fonte: Autores.

A análise termogravimétrica das amostras de O-CMQ se mostraram similares para todas as amostras, indicando três ocorrências de perda de massa. Afim de melhorar a visualização da correlação entre as perdas de massa das amostras analisadas, a Tabela 4 foi construída e preenchida com os dados obtidos na análise de TGA referente a variação de massa e a temperatura de início e fim da ocorrência desse efeito.

Tabela 4 - Temperatura de início e fim da ocorrência das perdas de massa, e a massa observada para as amostras de O-CMQ 1:1, 1:2 e 1,5:2.

Amostra	Fim da 1º perda		Fim da 2º perda		Fim da 3º perda		$\Delta W_{total}(\%)$	
	T (°C)	T (°C)	Wt (%)	T (°C)	Wt (%)	T (°C)		Wt (%)
O-CMQ 1:1	30,0	199,87	85,94	518,71	38,19	747,44	9,27	90,02
O-CMQ 1:2	30,0	184,43	82,70	521,29	40,31	748,81	16,35	83,44
O-CMQ 1,5:2	30,0	226,42	83,36	494,39	41,76	744,25	17,042	81,22

Fonte: Autores.

As amostras de O-CMQ possuíram três ocorrências de perda de massa, sendo iniciadas em 30°C e terminadas entre 199 e 226,42°C, possuindo perda máxima em torno de 55°C, como observado na DTG. Essa perda está associada à perda de água fortemente ligada a estrutura, perdendo em média 15,235%. As amostras absorvem uma quantidade maior de água devido a presença dos grupos carboxílicos, que são hidrofílicos.

A segunda ocorrência acontece em temperaturas até 518,71 °C, com o máximo em torno de 290 °C, perdendo em média 43,69% é atribuída a degradação da cadeia polimérica nos grupos carboxílicos e unidades glucosaminas, e a terceira perda foi atribuída a carbonização do material.

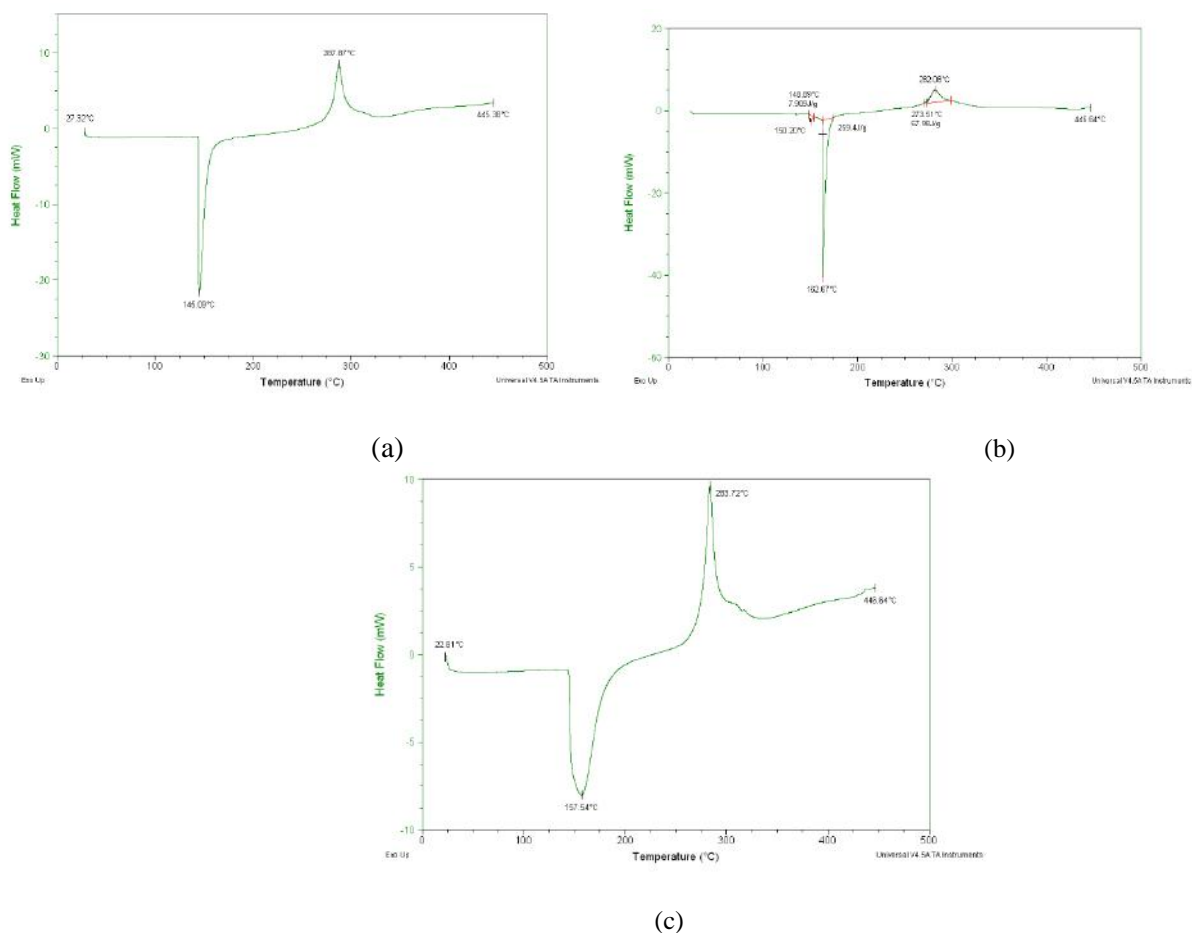
Autores sintetizaram a carboximetilquitosana obtida com um processo similar a obtenção da carboximetilcelulose, e verificou a curva termogravimétrica desse material. Foi observado duas ocorrências de perda de massa, a primeira perdeu cerca de 13% em massa, resultado similar ao obtido. A segunda perda, relacionada a decomposição, ocorreu em torno de 280 °C, corroborando com os dados obtidos nas O-CMQs. O autor relata que a quitosana possui temperatura de decomposição em torno de 330°C, e as amostras carboximetiladas possuem um deslocamento no pico de decomposição, para temperaturas mais baixas, indicando que, quanto maior o grau de substituição, maior o deslocamento do pico da decomposição (Lamas, 2008).

Observa-se que a amostra de O-CMQ 1,5:2 foi aquela que apresentou menor temperatura de fim de decomposição, e menor temperatura média, indicando o maior grau de substituição.

Calorimetria diferencial exploratória (DSC)

A Calorimetria diferencial exploratória verificou os eventos térmicos presentes na O-CMQ (1:1, 1:2 e 1,5:2), afim de verificar a temperatura de degradação das amostras, consequentemente, identificar a que possui maior estabilidade, como observado na Figura 7.

Figura 7 - Curvas DSC das amostras de O-CMQ na proporção de a) 1:1, b) 1:2 e c) 1,5:2, sob atmosfera de nitrogênio, razão de aquecimento de 10°C/min e cadinho de alumina.



Fonte: Autores.

As análises do DSC de O-CMQ foram similares para todas as amostras, em que, foi possível observar dois eventos térmicos. O primeiro pico endotérmico é responsável pela perda de água fortemente ligada a estrutura, em torno de 160 °C, sendo causado pela água ligada a estrutura pelos grupos hidrofílicos. O segundo evento térmico, se mostra através de um pico exotérmico, associado a decomposição dos grupos carboxílicos presentes cadeia polimérica, que ocorreram em 287,87 °C, 282,08 °C e 283,72 °C, para as amostras de O-CMQ 1:1, 1:2 e 1,5:2, respectivamente.

O pico exotérmico é seguido de um ombro em torno de 300 °C. Em que, foi reportado na literatura que um pico em 300 °C está relacionado a decomposição da glucosamina, presentes na quitosana (Jiang, 2010).

A amostra de O-CMQ 1:1 foi aquela que apresentou uma temperatura de perda de água inferior, indicando que essa

amostra possui menor grau de substituição, pois, os maiores graus de substituição tornam a amostra mais hidrofílica. Já a temperatura de decomposição se apresentou superior, indicando maior estabilidade térmica da amostra, se aproximando da estabilidade da quitosana, indicando que a amostra foi menos carboximetilada que as demais.

4. Considerações Finais

A partir dos resultados visuais, morfológicos, espectroscópicos e de solubilidade, conclui-se que foi possível obter a O-carboximetilquitosana a partir da quitosana produzida pela desacetilação da quitina. Com base nesses resultados, corroborando com os resultados de pH, condutividade, termogravimetria e calorimetria diferencial exploratória, determinou-se que a O-CMQ 1,5:2 e 1:2 são as mais adequadas para a formulação do hidrogel para a posterior comparação com o ácido hialurônico.

Propostas futuras: Produzir hidrogéis de O-Carboximetilquitosana e avaliar suas propriedades químicas, físicas e biológicas em comparação com o ácido hialurônico comercial.

Referências

- Ali, P. (2020). Degree-based topological indices and polynomials of hyaluronic acid-curcumin conjugates. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 28(9), 1093-1100.
- Azevedo, V., Chaves, S., Bezerra, D., Lia Fook, M. & Costa, A. (2007). Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. *Revista eletrônica de Materiais e processos*. 2(3), 27-34.
- Baust, J. G. & Baust, J. M. (2006). *Avanços na biopreservação*. CRC Press.
- Bresolin, José Roberto (2009). Avaliação de o-carboximetilquitosana como excipiente de comprimidos matriciais contendo diltiazem.
- Chen, X. G. & Park, H. J. (2003). Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to preparation conditions. *Carbohydrate Polymers*. 53(4), 355-359.
- Correia, Clara R. (2011). Chitosan scaffolds containing hyaluronic acid for cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 17(7), 717-730.
- Dallan, P. R. M. (2005). Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele.
- Dantas, M. J. L., Fidélis, T. B., Carrodeguas, R. G. & Fook, M. V. L. (2016). Obtenção e caracterização de esferas de quitosana/hidroxiapatita gerada in situ. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. 11(1), 18-24.
- Daroz, L. R. D. (2008). Prevenção de aderências pericárdicas pós-operatórias com uso de carboximetilquitosana termoeestéril. *Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery*. 23(4), 480-487.
- Dovedytis, M., Liu, Z. J. & Bartlett, S. (2020). Hyaluronic acid and its biomedical applications: A review. *Engineered Regeneration*, 1, 102-113.
- Farag, R. K. & Mohameed R. R. (2013). Synthesis and Characterization of Carboxymethyl Chitosan Nanogels for Swelling Studies and Antimicrobial Activity. *Molecules*. (18), 190-203.
- Fiamingo, A. (2016). Propriedades físico-químicas e mecânicas de membranas porosas de carboximetilquitosana e hidrogéis de quitosana para aplicação em engenharia de tecidos. 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Fonseca, S. B. & Chorilli, M. (2017). An overview of carboxymethyl derivatives of chitosan: Their use as biomaterials and drug delivery systems. *Materials Science and Engineering*. (77), 1349-1362.
- Ghasemi, M. L. (2019). Key terminology in biomaterials and biocompatibility. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, 10, 45-50.
- Gupta, R. C. (2019). Hyaluronic acid: molecular mechanisms and therapeutic trajectory. *Frontiers in veterinary Science*. 6, 192.
- Gutierrez, M., Lopes, M. A., Hussain, N. S., Cabral, A. T., Almeida, L. & Santos, J. D. (2006). Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de Medicina*. 19(4), 153-162.
- Jiang, Mingyan. (2010). Preparation and characterization of water-soluble chitosan derivative by Michael addition reaction. *International journal of biological macromolecules*. 47(5), 696-699.
- Ladeira, N. M. B. (2020). "Preparação e caracterização de hidrogéis à base de quitosana com potenciais aplicações na agricultura".
- Lamas, J. C. Carboximetilquitosanas: preparação, caracterização e aplicação como agentes de estabilização de suspensões aquosas de alumina. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Largura, M. C. T. (2009). Síntese e caracterização da O-carboximetilquitosana-n-lauril e utilização como polímero anfífilica em comprimidos de triancinolona.

- López, C. E., Martínez, M. J. M., Oviedo, R. R., Guzmán, J., Ramírez, S. J. & Marín, C. J. (2005). Molecular modeling and simulation of ion-conductivity in chitosan membranes. *Polymer*. 46(18), 7519-7527.
- Mogosanu, G.D. & Grumenescu, A.M. (2014). Natural and Synthetic Polymers for wound and burns dressing. *International Journal of Pharmaceutics*. 463, 127-136.
- Moreland, L. W. (2003). Intra-articular hyaluronan (hyaluronic acid) and hylans for the treatment of osteoarthritis: mechanisms of action. *Arthritis Res Ther*. 5(2), 1-14.
- Santiago, F. H. B. A quitosana e suas aplicações: uma análise exploratória de dados bibliográficos. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- Santos, C. S. P., Veleirinho, B., Delgadillo, I. & Silva, J.A.L. (2006). Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*. 42.
- São Pedro, A., Cabral, A. E., Ferreira, D., Sarmiento, B. (2009). Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care? *Carbohydrate polymers*. 76(4), 501-508.
- Sashiwa, H. & Aiba, S. (2004). Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science*. 29(9), 887-908.
- Shariatnia, Z. (2018). Pharmaceutical applications of chitosan. *Advances in colloid and interface science*, 263, 131-194.
- Silva, D. S. Estudos físico-químicos de O-carboximetilação de quitosana. (2011). 102f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Interunidades em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade Estadual de São Paulo, São Carlos, 2011.
- Silva, L. A. J da. Obtenção e Caracterização de Scaffolds de Hidroxiapatita utilizando Amido de milho como Agente Porogênico. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica). Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2012.
- Williams, D. F., Cahn, R.W. & Bever, M. B. (1990). *Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials*. Pergamon Press.
- Zhao, D., Huang, J., Hu, S., Mao, J. & Mei, L. (2011). Biochemical activities of N,O- carboxymethyl chitosan from squid cartilage. *Carbohydrate Polymers*, 85(4), 832 – 837.