



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

THALITA MYDORI MISSANO

**QUITOSANA FOSFORILADA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E SEU
POTENCIAL USO COMO BIOMATERIAL**

CAMPINAS

2024

THALITA MYDORI MISSANO

**QUITOSANA FOSFORILADA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E SEU POTENCIAL
USO COMO BIOMATERIAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Físico-Química.

Orientador: Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Thalita Mydori Missano e orientada pelo Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran.

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

M691q Missano, Thalita Mydori, 1991-
Quitosana fosforilada : síntese, caracterização e seu potencial uso como biomaterial / Thalita Mydori Missano. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador(es): Celso Aparecido Bertran.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Química.

1. Quitosana fosforilada. 2. Biomateriais. 3. Biopolímeros. I. Bertran, Celso Aparecido, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Química. III. Título.

Informações complementares

Título em outro idioma: Phosphorylated chitosan : synthesis, characterization and its potential use as a biomaterial

Palavras-chave em inglês:

Phosphorylated chitosan

Biomaterials

Biopolymers

Área de concentração: Físico-Química

Titulação: Mestra em Química na área de Físico-Química

Banca examinadora:

Celso Aparecido Bertran [Orientador]

Edvaldo Sabadini

Marisa Masumi Beppu

Data de defesa: 12-12-2024

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0009-0003-3759-1174>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7149541185313358>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Celso Aparecido Bertran (Orientador)

Prof. Dr. Edvaldo Sabadini (Instituto de Química - Unicamp)

Profa. Dra. Marisa Masumi Beppu (Faculdade de Engenharia Química - Unicamp)

A Ata da defesa assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **Thalita Mydori Missano**, aprovada pela Comissão Julgadora em 12 de dezembro de 2024.

Para a minha família, meu refúgio e minha inspiração: Neide, Eduardo, Anderson, Dudu e, especialmente, a você, Kalil, meu maior incentivador. A vocês, dedico esta conquista com toda a minha gratidão. Sem o amor, apoio e paciência de cada um eu não teria asas para voar.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neide e Eduardo, por me proporcionarem um lar repleto de amor e pela liberdade para escolher meu caminho. Obrigada por todas as noites de espera e por cada abraço de acolhimento ao final do dia.

Aos meus irmãos, Anderson e Dudu, pelo companheirismo, ouvidos atentos, corações compreensivos e por serem meu refúgio em qualquer situação.

Ao Kalil, meu maior incentivador, pela infinita paciência e compreensão, por me ajudar a superar os obstáculos e sempre acreditar em mim. Obrigada pelo cuidado e carinho.

Ao Professor Dr. Celso Aparecido Bertran, meu orientador, amigo e um exemplo de ser humano. Agradeço por ter me acolhido em seu grupo, por todos os momentos de aprendizado, pelas conversas inspiradoras além da química e por ter acreditado no meu potencial. Sou grata por todos os ensinamentos e por ter me mostrado a beleza em aprender e ensinar.

A todos os meus amigos do taiko, em especial Ayumi, Natália, Rafa Nako, Huehara, Mayumi, Kaori, Nakamatsus e Moryas, por me proporcionarem momentos de alegria e descontração. À Rafa, por ser minha amiga de outras vidas, por sua torcida e orgulho. Às minhas amigas Larissa, Fernanda e Suiany, por sempre estarem ao meu lado. Vocês me fazem sentir parte de algo muito especial e tornam minha vida mais leve e feliz.

Aos amigos que fiz através do FMILab Taís, Lucas e André, agradeço por terem sido meus companheiros de jornada. Vocês tornaram a experiência no laboratório mais divertida.

Aos amigos do Laboratório de Ensino que me acompanham há anos por me apoiarem e torcerem por mim. Aos funcionários do Instituto de Química das salas de aparelhos, secretaria de pós-graduação, oficinas, biblioteca, zeladoria, ensino, setor financeiro, setor de compras, almoxarifado, limpeza e tantos outros que contribuíram durante este período.

Ao Instituto de Química e à Unicamp pela oportunidade e disponibilidade de recursos e infraestrutura que possibilitaram a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Quitosana é o único polissacarídeo catiônico encontrado na natureza proveniente de biomassa, o qual apresenta propriedades que a caracterizam como biomaterial de grande interesse. Porém, sua solubilidade é um dos principais limitantes para suas aplicações, uma vez que é insolúvel em pH acima de 6. A modificação da quitosana através da fosforilação é uma alternativa para aumentar sua solubilidade em água e ampliar seu uso como biomaterial.

Este trabalho aborda a fosforilação das hidroxilas da quitosana, com a proteção do grupo amino, com a finalidade de preservar as características catiônicas da quitosana, alterando sua solubilidade sem que o material deixe de ser pH-responsivo.

Nesta dissertação, a quitosana fosforilada foi caracterizada por RMN, FTIR, XPS e os pKa dos grupos reativos, determinantes para o comportamento como polieletrólito, foram determinados.

Como consequência da fosforilação, a solubilidade do biopolímero mudou drasticamente, sendo solúvel em pH acima de 7,00 e parcialmente solúvel em pH abaixo de 2,80.

O grupo amino, presente na quitosana fosforilada, permitiu explorar outras modificações, podendo ser reticulado pelas mesmas rotas utilizadas para quitosana não modificadas. A reticulação química, com EDC, NHS e ácido tartárico, associada à gelificação ionotrópica, resultou em um gel estável e transparente, o qual foi convertido em um material com poros interligados (*scaffold*), com reduzido intumescimento quando exposto à meios de cultura celular típicos.

Essa estabilidade, associada à bioatividade e não toxicidade da quitosana, assim como, a presença de fosfato e cálcio, mostraram em testes de citotoxicidade e citocompatibilidade em culturas de fibroblastos (NIH 3T3), um comportamento promissor deste novo biopolímero para o reparo de danos na pele e no tecido ósseo.

ABSTRACT

Chitosan is the only cationic polysaccharide derived from biomass found in nature, known for properties that make it a biomaterial of significant interest. However, its solubility is a primary limitation for its applications, as it is insoluble at pH above 6. The phosphorylation modification of chitosan is an alternative approach to enhance its water solubility and expand its use as a biomaterial.

This work discusses the phosphorylation of chitosan's hydroxyl groups, with protection of the amino group, aim is to preserve the cationic characteristics of chitosan, altering its solubility without compromising its pH-responsiveness.

In this dissertation, phosphorylated chitosan was characterized using NMR, FTIR, XPS, and the pKa of the reactive groups crucial for its behavior as a polyelectrolyte were determined.

As a result of phosphorylation, the solubility of the biopolymer changed drastically, becoming soluble at pH above 7.00 and partially soluble at pH below 2.80.

The amino group in phosphorylated chitosan allowed for further modifications and could be crosslinked using the same routes applicable to unmodified chitosan. Chemical crosslinking, using EDC, NHS, and tartaric acid, combined with ionotropic gelation, resulted in a stable and transparent gel. This gel was transformed into an interconnected porous material (scaffold), exhibiting minimal swelling when exposed to typical cell culture media.

This stability, coupled with the bioactivity and non-toxicity of chitosan, as well as the presence of phosphate and calcium, demonstrated promising behavior in cytotoxicity and cytocompatibility tests with fibroblast cultures (NIH 3T3), making this new biopolymer a potential candidate for repairing skin and bone tissue damage.

Lista de Figuras

FIGURA 1: ESTRUTURA DA CELULOSE E DA QUITINA.....	20
FIGURA 2: PROCESSO DE OBTENÇÃO DA QUITINA.	21
FIGURA 3: REAÇÃO DE DESACETILAÇÃO DA QUITINA RESULTANDO EM QUITOSANA.	22
FIGURA 4: APLICAÇÕES DA QUITOSANA EM FUNÇÃO DA MASSA MOLAR E GRAU DE DESACETILAÇÃO. (IMAGEM RETIRADA DA REFERÊNCIA 7)	22
FIGURA 5: FORMAÇÃO DOS COMPLEXOS POLIELETRÓLITOS (PEC).....	23
FIGURA 6: POSSIBILIDADES DE FUNCIONALIZAÇÃO DA QUITOSANA.	24
FIGURA 7: DERIVATIZAÇÕES DA QUITOSANA. (FONTE: O AUTOR)	25
FIGURA 8: REAÇÕES DE FOSFORILAÇÃO DA QUITOSANA.....	27
FIGURA 9: REAÇÃO DE FOSFORILAÇÃO DA QUITOSANA COM PROTEÇÃO DO GRUPO AMINO.....	29
FIGURA 10: REAÇÃO DE FOSFORILAÇÃO COM PROTEÇÃO DO GRUPO AMINO.	32
FIGURA 11: FOTO COMPARATIVA DA QUITOSANA E P-QUITOSANA.	33
FIGURA 12: ESPECTROS DE FTIR DA QUITOSANA NÃO MODIFICADA E DA P- QUITOSANA.....	33
FIGURA 13: COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN ^{13}C , OBTIDOS EM ESTADO SÓLIDO, PARA A QUITOSANA E P-QUITOSANA.	35
FIGURA 14: ESPECTRO DE RMN ^{31}P PARA P-QUITOSANA.	36
FIGURA 15: ESTRUTURAS DE FOSFATOS TETRAÉDRICOS QUE PODEM EXISTIR EM FOSFATOS VÍTREOS.	37
FIGURA 16: CURVA DE TITULAÇÃO DA P-QUITOSANA PARA DETERMINAÇÃO DOS PKA. OS PONTOS EM ROSA E AZUL CORRESPONDEM ÀS EQUIVALÊNCIAS DA TITULAÇÃO E INDICAM A INFLEXÃO DE CADA CURVA.	38
FIGURA 17: FOTOS DO EXPERIMENTO PARA A VERIFICAÇÃO DA SOLUBILIDADE DA P-QUITOSANA EM DIFERENTES PH.	39
FIGURA 18: EQUILÍBRIOS ENTRE AS ESPÉCIES CARREGADAS DA P-QUITOSANA EM FUNÇÃO DO PH.	40
FIGURA 19: GEL FORMADO PELA SOLUBILIZAÇÃO DE P-QUITOSANA A 15% EM TAMPÃO PH 7,30.	40
FIGURA 20: CROMATOGRAMA POR EXCLUSÃO DE TAMANHO A) P-QUITOSANA; B) QUITOSANA.....	41
FIGURA 21: ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA) PARA P-QUITOSANA APÓS REAÇÃO COM ÍONS CÁLCIO.	42
FIGURA 22: TIPOS DE RETICULAÇÕES DA QUITOSANA.....	46

FIGURA 23: REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DA QUITOSANA UTILIZANDO GLUTARALDEÍDO.....	47
FIGURA 24: REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DA QUITOSANA COM DIÁCIDO CARBOXÍLICO, UTILIZANDO EDC E NHS COMO ATIVADORES DA REAÇÃO.....	48
FIGURA 25: PROCESSO ISISA DE CONGELAMENTO DO HIDROGEL.....	50
FIGURA 26: ETAPAS PARA OBTENÇÃO DOS MATERIAIS PROVENIENTES DA P-QUITOSANA.....	51
FIGURA 27: ARRANJO EXPERIMENTAL UTILIZADO PARA A PREPARAÇÃO DO CILINDRO DE GEL DE RET-P-QUINCA PELA RETICULAÇÃO IONOTRÓPICA DA RET-P-QUIN. A FOTO MOSTRA UM CONJUNTO DE SERINGAS ADAPTADAS, POSSIBILITANDO PREPARAR VÁRIOS CILINDROS DE GEL SIMULTANEAMENTE.....	53
FIGURA 28: REAÇÃO DE RETICULAÇÃO DA P-QUITOSANA COM FORMAÇÃO DO RET-P-QUIN.....	56
FIGURA 29: FORMAÇÃO DO RETICULANTE E REAÇÃO DE RETICULAÇÃO.....	57
FIGURA 30: FOTOGRAFIA DEMONSTRANDO AS CARACTERÍSTICAS VISCOELÁSTICAS DO MATERIAL RET-P-QUIN.....	57
FIGURA 31: CILINDRO DE GEL DE RET-P-QUINCA RESULTANTE DA GELEIFICAÇÃO IONOTRÓPICA DE RET-P-QUIN.....	58
FIGURA 32: SCAFFOLD DE RET-P-QUINCA.....	59
FIGURA 33: MICROGRAFIAS OBTIDAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) DOS MATERIAIS: A) SCAFFOLD DE QUITOSANA; B) SCAFFOLD DE RET-P-QUINCA.....	59
FIGURA 34: ESPECTRO DE RMN ^{31}P DA RET-P-QUINCA.....	60
FIGURA 35: COMPARAÇÃO ENTRE OS ESPECTROS DE RMN ^{13}C DA P-QUITOSANA E DO SCAFFOLD DE RET-P-QUINCA OBTIDOS EM ESTADO SÓLIDO.....	61
FIGURA 36: ESPECTRO FOTOELETRÔNICO DE RAO X DE ALTA RESOLUÇÃO DO ELÉTRON $\text{C}_{1\text{S}}$: A) QUITOSANA; B) P-QUITOSANA; C) RET-P-QUINCA.....	64
FIGURA 37: ESPECTRO FOTOELETRÔNICO DE RAO X DE ALTA RESOLUÇÃO DO ELÉTRON $\text{N}_{1\text{S}}$: A) QUITOSANA; B) P-QUITOSANA; C) RET-P-QUINCA.....	66
FIGURA 38: ESPECTRO FOTOELETRÔNICO DE RAO X DE ALTA RESOLUÇÃO DO ELÉTRON $\text{O}_{1\text{S}}$: A) QUITOSANA; B) P-QUITOSANA; C) RET-P-QUINCA.....	68
FIGURA 39: ESPECTRO FOTOELETRÔNICO DE RAO X DE ALTA RESOLUÇÃO DO ELÉTRON $\text{P}_{2\text{P}}$: A) P-QUITOSANA; B) RET-P-QUINCA.....	69
FIGURA 40: ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE IN VITRO. (A) CONTATO DIRETO, (B) DIFUSÃO EM ÁGAR E (C) ENSAIOS BASEADOS EM EXTRATO.....	74
FIGURA 41: REAÇÃO DO TESTE DE MTT.....	74

FIGURA 42: ILUSTRAÇÃO DA HIDRÓLISE DA CALCEÍNA-AM PELAS ENZIMAS ESTERASE EM CÉLULAS VIVAS.....	75
FIGURA 43: TESTE DE ESTABILIDADE DOS (A) SCAFFOLDS DE QUITOSANA E (B) RET-P-QUINCA EM MEIO DE CULTURA. IMAGEM A ESQUERDA: SCAFFOLDS SEM MEIO DE CULTURA. IMAGEM À DIREITA: SCAFFOLDS APÓS 24H NO MEIO DE CULTURA.....	80
FIGURA 44: VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS NIH 3T3 NA PRESENÇA DO EXTRATO DE RET-P-QUINCA POR 24H DETERMINADA PELO ENSAIO MTT. OS PONTOS NO GRÁFICO REPRESENTAM AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS.	81
FIGURA 45: VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS NIH 3T3 NA PRESENÇA DO EXTRATO DE RET-P-QUINCA POR 24H DETERMINADA POR CALCEÍNA-AM. OS PONTOS NO GRÁFICO REPRESENTAM AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS.	82
FIGURA 46: VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS NIH 3T3 NA PRESENÇA DO EXTRATO DE RET-P-QUINCA POR 24H DETERMINADA PELA MARCAÇÃO COM HOECHST E PI. OS PONTOS NO GRÁFICO REPRESENTAM AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DE TRÊS EXPERIMENTOS.....	83
FIGURA 47: ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE DO P-QUINCA EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIOS 3T3 DETERMINADA ATRAVÉS DO USO DOS FLUORÓFOROS HOECHST (CANAL DAPI), CALCEÍNA (CANAL GFP), IODETO DE PROPÍDIO (CANAL PI) PARA CONTROLE E PARA 24 HORA DE EXPOSIÇÃO AO EXTRATO DO SCAFFOLD DE RET-P-QUINCA. OS DADOS FORAM NORMALIZADOS CONSIDERANDO O CONTROLE COMO 100% (CONTROLE FOI PLOTADO SEGUNDO O DESVIO PADARÃO).....	84
FIGURA 48: ANÁLISE DA BIOCOMPATIBILIDADE DO SCAFFOLD DE RET-P-QUINCA EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS 3T3 EM DIFERENTES INTERVALOS DE TEMPO (24 H, 72 H E 120 H). O CONJUNTO DE 3 IMAGENS, PARA CADA INTERVALO DE TEMPO, INDICAM AS TRIPLICATAS REALIZADAS.....	85

Lista de Tabelas

TABELA 1: ROTAS PARA A DERIVATIZAÇÃO DE QUITOSANA E SUAS PROPRIEDADES.	26
TABELA 2: ATRIBUIÇÃO DOS PICOS OBSERVADOS NOS ESPECTROS DE FTIR PARA A QUITOSANA E P-QUITOSANA.	34
TABELA 3: ATRIBUIÇÕES DAS DECONVOLUÇÕES PARA O ESPECTRO DE XPS DA QUITOSANA, P-QUITOSANA E RET-P-QUINCA.	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

P-Quitosana: Quitosana fosforilada

RET-P-QuiN: Quitosana fosforilada e reticulada

RET-P-QuiNCa: Quitosana fosforilada, reticulada e gelificada com cálcio

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

MAS-RMN: *Magnetic Angle Spinning - Nuclear Magnetic Resonance*

SEC-HPLC: *Size Exclusion Chromatography - High Performance Liquid Chromatography*

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

XPS: *X-ray Photoelectron Spectroscopy*

EDC: Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida

NHS: N-Hidroxisuccinamida

TGA: Análise Termogravimétrica

MTT: (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

Sumário

OBJETIVOS	17
1.1 Objetivo Geral	17
1.2 Objetivos Específicos	17
CAPÍTULO 01: SÍNTESE DA P-QUITOSANA	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. METODOLOGIA	29
2.1 Fosforilação da Quitosana com proteção do grupo amino	29
2.2 Caracterização da P-Quitossana	30
2.2.1 Espectroscopia no Infravermelho FTIR	30
2.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: MAS-RMN ¹³ C e ³¹ P	30
2.2.3 Determinação dos pKa dos grupos ionizáveis da P-Quitossana e sua solubilidade em função do pH	30
2.2.4 Avaliação da integridade da cadeia polimérica da P-Quitossana por Cromatografia Líquida por Exclusão de Tamanho – SEC-HPLC	30
2.2.5 Determinação do grau de fosforilação	31
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
3.1 Fosforilação da Quitossana com proteção do grupo amino	32
3.2 Caracterização da P-Quitossana	33
3.2.1 Espectroscopia no Infravermelho FTIR	33
3.2.2 Espectro de RMN ¹³ C e ³¹ P para P-Quitossana	34
3.2.3 Determinação dos pKa dos grupos ionizáveis da P-Quitossana	37
3.2.4 Determinação da solubilidade da P-Quitossana em função do pH	38
3.2.5 Cromatografia Líquida por exclusão de tamanho – SEC-HPLC	41
3.2.6 Determinação do grau de fosforilação da P-Quitossana	41
4. CONCLUSÃO	43
CAPÍTULO 02: EXPLORANDO A P-QUITOSANA	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. METODOLOGIA	52
2.1 Reticulação da P-Quitossana utilizando EDC, NHS e Ácido Tartárico	52
2.2 Gelificação Ionotrópica da RET-P-QuiN com íons Ca ²⁺	52
2.3 Obtenção do scaffold	53
2.4 Caracterização dos scaffolds de RET-P-QuiNCa	54
2.4.1 Caracterização dos scaffolds de RET-P-QuiNCa e de Quitossana por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	54
2.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: MAS-RMN ¹³ C e ³¹ P do Scaffold de RET-P-QuiNCa	54

2.4.3 Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS)	54
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
3.1 Reticulação da P-Quitosa com Ácido Tartárico	56
3.2 Geleificação Ionotrópica da RET-P-QuiN	58
3.3 Caracterização do scaffold de RET-P-QuiNCa	59
3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	59
3.3.2 Espectro de RMN ¹³ C e ³¹ P para scaffold de RET-P-QuiNCa	60
3.4 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X (XPS)	61
4. CONCLUSÃO	71
CAPÍTULO 03: SCAFFOLD DE RET-P-QuiNCa: UM AMBIENTE PROMISSOR PARA CÉLULAS E NOVAS PERSPECTIVAS	72
1. INTRODUÇÃO	73
2. METODOLOGIA	77
2.1 Teste de estabilidade do scaffold de RET-P-QuiNCa	77
2.2 Teste de Citotoxicidade do extrato do scaffold de RET-P-QuiNCa	77
2.2.1 Preparação do extrato do scaffold de RET-P-QuiNCa e adição à cultura de fibroblastos NIH 3T3.	77
2.2.2 Teste de citotoxicidade do extrato de scaffold de RET-P-QuiNCa via MTT	78
2.2.2 Teste de citotoxicidade do extrato de scaffold de RET-P-QuiNCa via Ensaio Calceína-AM	78
2.2.3 Análise das células marcadas com Calceína/PI/Hoechst	78
2.3 Teste de Citocompatibilidade das células no scaffold de RET-P-QuiNCa	79
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	80
3.1 Teste de estabilidade do scaffold de RET-P-QuiNCa em meio de cultura DMEM	80
3.2 Teste de citotoxicidade: Efeito do extrato de scaffold RET-P-QuiNCa sobre culturas de fibroblastos NIH 3T3	81
3.2.1 Teste de Citotoxicidade do extrato do scaffold de RET-P-QuiNCa pelo ensaio MTT	81
3.2.2 Teste de citotoxicidade do extrato de scaffold de RET-P-QuiNCa via Ensaio Calceína-AM	82
3.2.3 Análise das células marcadas com Calceína/PI/Hoechst	83
2.3 Teste de Citocompatibilidade das células no scaffold de RET-P-QuiNCa	84
4. CONCLUSÃO	88
CONCLUSÃO GERAL DO PROJETO E PERSPECTIVAS FUTURAS	89
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Modificar o biopolímero quitosana com grupos fosfatos, preservando o grupo amino e explorar as propriedades da quitosana fosforilada: gelificação ionotrópica, reticulação, formação de *scaffolds* e comportamento como biomaterial.

1.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar e caracterizar a P-Quitosana: quitosana quimicamente modificada com grupos fosfatos, preservando o grupo amino;
- Explorar a reticulação química da P-Quitosana através do grupo amino;
- Explorar a gelificação ionotrópica da P-Quitosana através dos grupos fosfatos com íons cálcio;
- Obter géis e *scaffolds* a partir da P-Quitosana;
- Avaliar a bioatividade e a capacidade de estimular o crescimento celular nos *scaffolds* gerados a partir de P-Quitosana reticulada e gelificada ionotropicamente.

CAPÍTULO 01

SÍNTESE DA P-QUITOSANA

1. INTRODUÇÃO

- **Quitina e Quitosana através do tempo**

Com o grande crescimento industrial e a preocupação com o esgotamento de recursos naturais e o empobrecimento ambiental, em 1972 a ONU (Organização das Nações Unidas) criou o conceito de sustentabilidade, promovendo a emergência gradual de um movimento ambientalista no mundo todo.¹

Como a maioria dos polímeros comerciais daquela época eram matérias primas derivadas de petróleo, houve um interesse crescente no desenvolvimento de alternativas naturais, renováveis e de baixo custo, para obter rotas mais seguras e ecológicas.²

Com este foco, muitos pesquisadores passaram a estudar materiais não tratáveis, que eram descartados pelas indústrias, como fontes de polímeros. Entre estes materiais, os resíduos originados dos processamentos de frutos do mar ganharam destaque devido a 50% de sua massa ser constituída de quitina, impulsionando os usos deste polímero e principalmente de seu derivado, a quitosana.³

O início do século XXI, foi considerado a “*Golden Era*” para as pesquisas envolvendo quitina e quitosana. Neste período desenvolveram-se métodos para a recuperação da quitina de fontes marinhas, derivatização química da quitina e quitosana e exploração das suas propriedades e aplicações.⁴ Entre 1970 e 2021, foram publicados 1809 artigos envolvendo quitina e 5968 artigos sobre quitosana, tornando-a o terceiro biopolímero de maior interesse da comunidade acadêmica.⁴

Estes estudos geraram um conhecimento sólido sobre as estruturas e propriedades destes polímeros, permitindo também, a modificação de suas características para a geração de novos compostos com alto potencial de aplicações.²

• Quitina

A quitina é um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza.⁵ Foi primeiramente isolada de um fungo em 1811, mas só recebeu o nome de Quitina em 1923 quando foi isolada de um besouro.⁵

Com a produção anual de 10^{11} toneladas na natureza, a quitina é considerada a principal fonte de biomassa, porém os resíduos de quitina gerados no mar provenientes de animais marinhos, acabam resultando no seu acúmulo como resíduo de biomassa e sua reciclagem é extremamente importante.⁶

Atualmente, crustáceos marinhos (principalmente camarões, caranguejos e lagostas) são as principais fonte de extração comercial de quitina, devido ao baixo custo e elevada disponibilidade.⁷ Além dos crustáceos marinhos, a quitina está presente em fungos, cogumelos, insetos, leveduras e outros crustáceos terrestres.⁷

A quitina apresenta uma similaridade estrutural com a celulose, o biopolímero mais abundante do planeta. A Figura 1 mostra esta semelhança, onde a diferença está no carbono C2, onde há um grupo acetamida na quitina e um grupo hidroxil na celulose.⁵

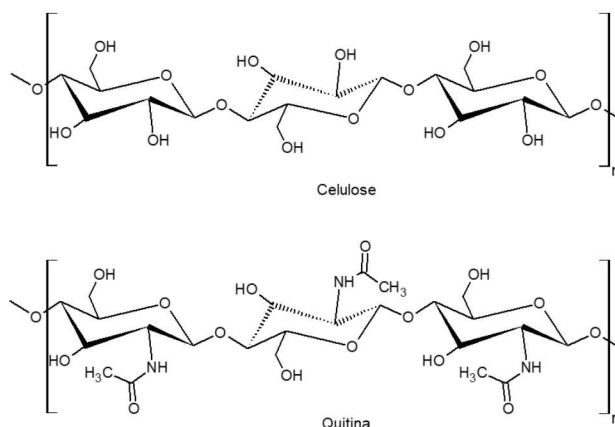


Figura 1: Estrutura da Celulose e da Quitina.

A quitina é geralmente representada como um polissacarídeo linear, composto por unidades de N-acetil-D-glucosamina interconectadas por ligações glicosídicas $\beta(1 \rightarrow 4)$ e pode ser dividida em três grupos (α , β e γ) de acordo com sua morfologia, que varia com o tipo de arranjo, tamanho de cela unitária e grau de hidratação.^{3,5,8}

A diversidade de resíduos marinhos, gera uma diferença significativa na sua composição.^{3,7} No geral, o processo de extração da quitina pode ser resumido em 3 etapas, conforme ilustra a Figura 2.

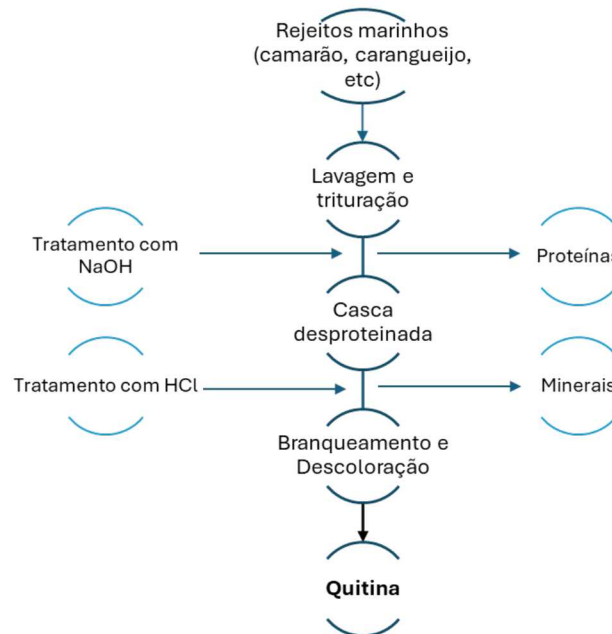


Figura 2: Processo de obtenção da Quitina.

A quitina pode sofrer desacetilação sob ação de soluções de NaOH. O produto da desacetilação é a quitosana, que possui diversas características que permitem sua aplicação em diversas áreas, como biomédicas e farmacêuticas, devido sua propriedade antitumoral, hemostática, analgésica, antioxidante e antimicrobiana.^{8,9,10,11,12,13}

- **Quitosana**

A quitosana é um biopolímero, composto por macromoléculas de D-Glucosamina e N-acetil-D-glucosamina, obtido a partir da hidrólise do grupo acetil da quitina utilizando soluções de NaOH (Figura 3). Este processo, chamado desacetilação, pode ocorrer em meios homogêneos ou heterogêneos, resultando em um grau de desacetilação entre 30 a 90%.^{7,14}

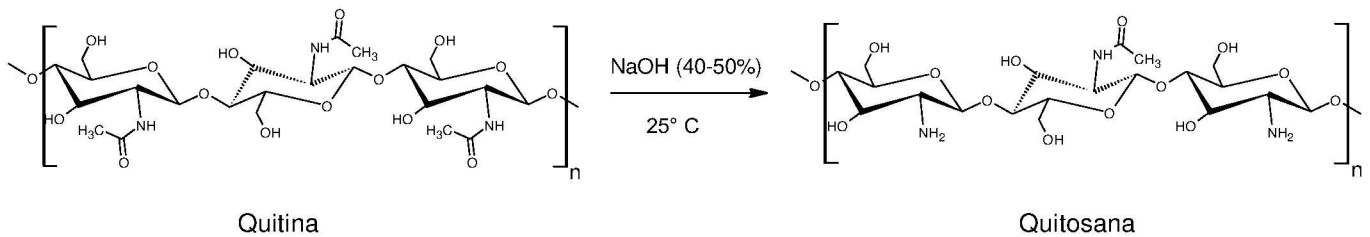


Figura 3: Reação de desacetilação da Quitina resultando em Quitosana.

O grau de desacetilação e a massa molar da Quitosana dependem da fonte de quitina e do processo de desacetilação. Esses parâmetros influenciam significativamente nas propriedades da quitosana e consequentemente sua área de aplicação.^{7,14}

A Figura 4 ilustra algumas aplicações da Quitosana em função do grau de desacetilação e massa molar.

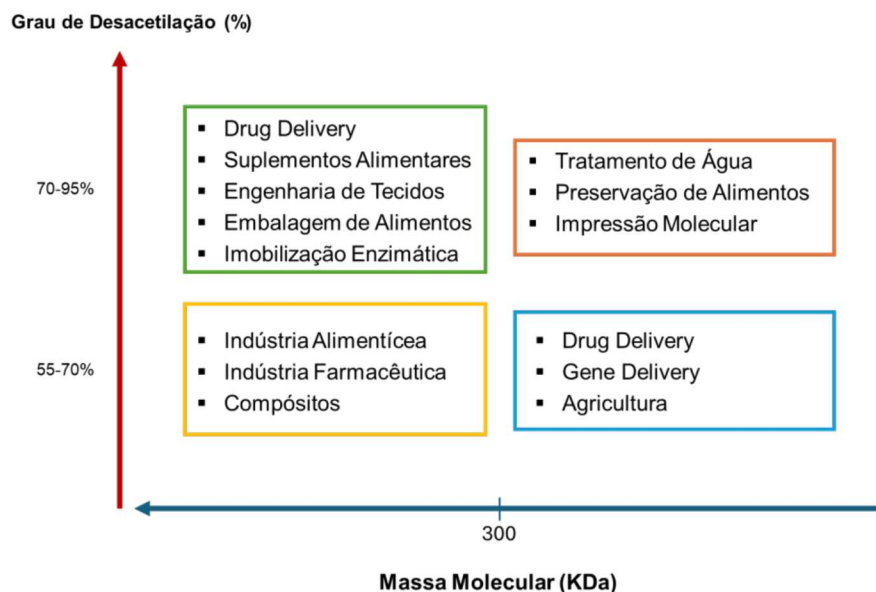


Figura 4: Aplicações da Quitosana em função da massa molar e grau de desacetilação. (Imagem retirada da referência 7)

A quitosana apresenta uma estrutura linear bem organizada, é biocompatível, biodegradável, suscetível a ações enzimáticas e apresenta baixa toxicidade. Além disso, possui excelentes propriedades para formação de filmes e é facilmente convertida para N-acetil-glucosamina.¹⁴

Um diferencial da quitosana em relação a outros biopolímeros, provenientes de biomassa, é a sua característica catiônica. O grupo amino livre, nos

monômeros de D-Glucosamina, pode sofrer protonação em soluções ácidas, sendo responsável pela sua solubilidade em pH abaixo de 6,5.^{14,15} A presença de carga na cadeia do polímero faz dela um material polieletrólito.

Polímeros que possuem carga, positiva ou negativa, são chamados de polieletrólitos.¹⁶ Essa característica polieletrólítica influencia sua solubilidade, viscosidade de soluções e atividade biológica.¹⁷

A protonação do grupo amino atribui uma alta densidade de carga à quitosana, sendo capaz de formar estruturas multicamadas ou complexos eletrostáticos pela combinação com cargas negativas de outros polímeros ou íons metálicos, chamados de Complexos Polieletrólitos (PEC).^{16,17} A Figura 5 mostra a formação dos PECs.

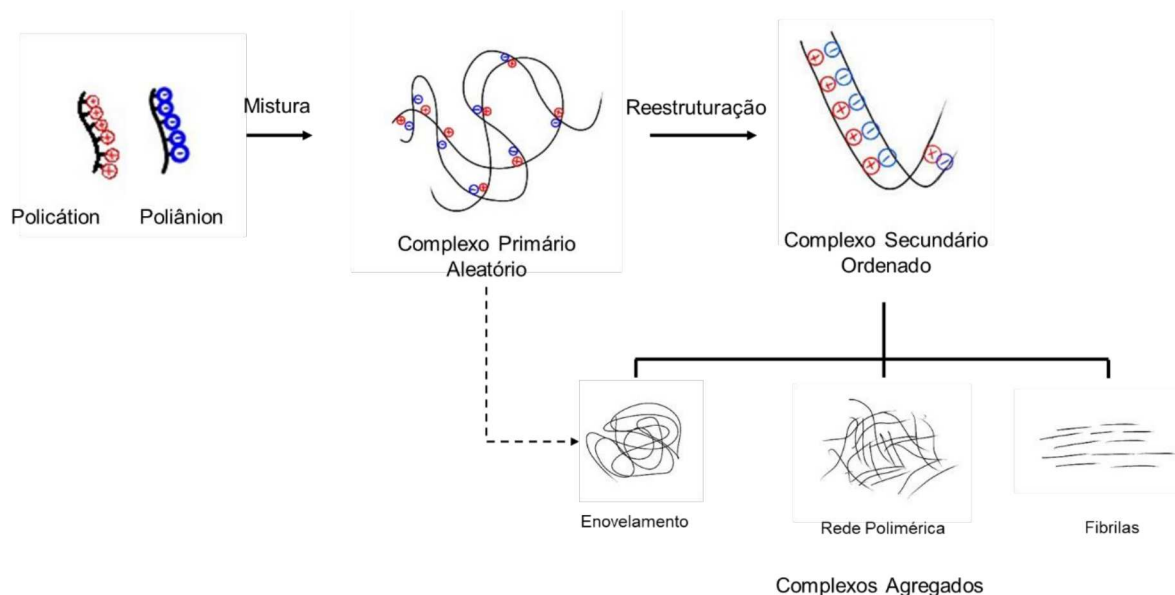


Figura 5: Formação dos Complexos Polieletrólitos (PEC).

Os PECs têm sido explorados devido seu alto potencial de aplicação. Eles podem ser utilizados como membranas, revestimentos, isolamento de proteínas, microcápsulas para drug delivery, entre muitos outros.¹⁶

As aplicações dos PECs são baseadas nas suas propriedades polieletrólitas e muitos estudos e aplicações vem sendo reportados utilizando quitosana. A quitosana pode formar um filme quando complexada com tripolifosfato, por exemplo, para encapsular teofilina, indometacina, além de também ser associada com alginato em sistemas de *drug delivery*.^{18,19,20,21,22}

A quitosana pode se combinar com outros biomateriais, fazendo dela uma excelente opção para ser explorada não apenas como *drug delivery*, mas também para aplicações em diversas outras áreas como regeneração de tecidos, setor agrícola, processamento e embalagens de alimentos, cosmética e têxtil.²³

Apesar das suas excelentes propriedades, a quitosana apresenta algumas limitações que restringem seu uso. Sua solubilidade em pH neutro, por exemplo, é uma de suas principais limitações. Desta forma, modificações químicas ou físicas se tornaram essenciais para potencializar suas aplicações.²³

A quitosana possui grupos amino e hidroxilas em C3 e C6, que são grupos suscetíveis a reações químicas, fazendo com que a quitosana seja facilmente modificável, superando as limitações deste biomaterial.⁷

Comparando a reatividade dos dois grupos, o grupo amino é mais reativo do que os grupos hidroxilas. Para criar derivados, a quitosana pode sofrer reações químicas no grupo NH_2 , OH ou ambos os grupos, como mostra a Figura 6.²⁴

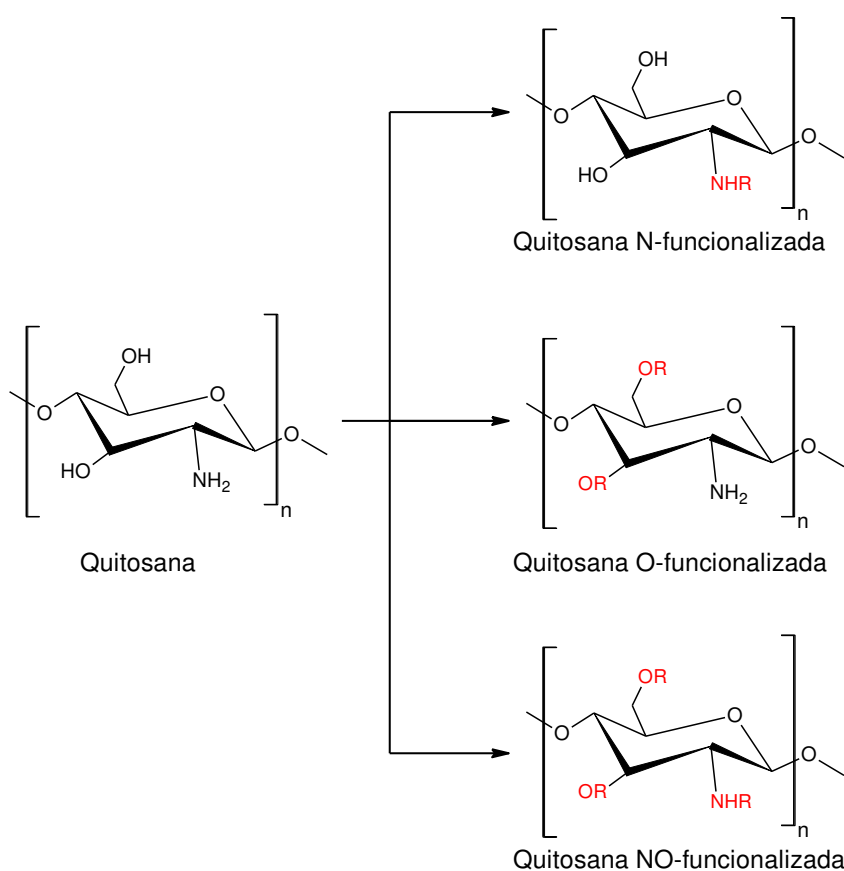


Figura 6: Possibilidades de funcionalização da Quitosana.

Os derivados apresentados na Figura 6, podem ser obtidos por diferentes métodos, dentre eles estão os métodos físicos, químicos e biológicos.⁷ A Tabela 1 e a Figura 7 apresentam algumas das diferentes técnicas de modificações envolvendo quitosana e suas diferentes aplicações.^{24,25}

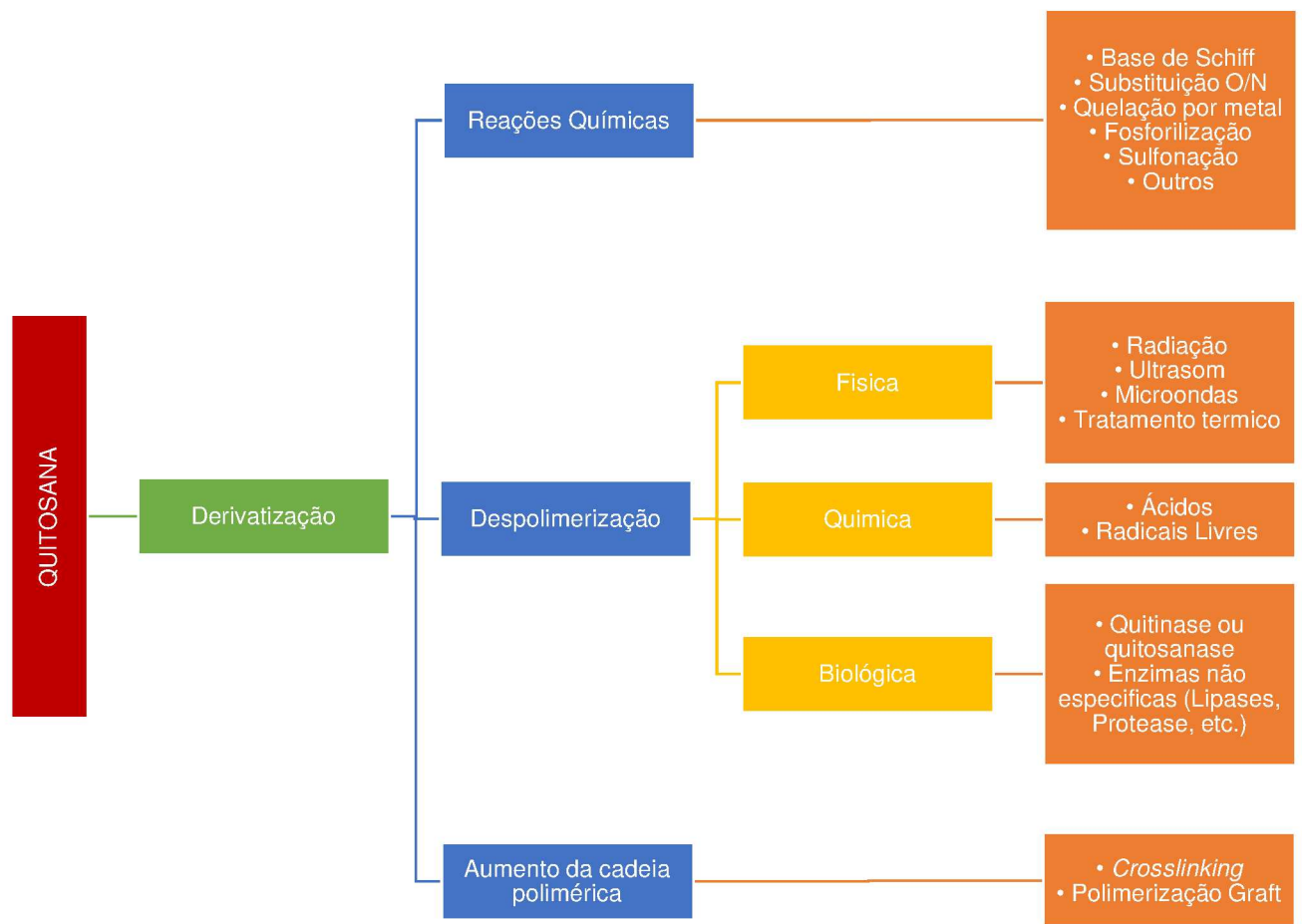
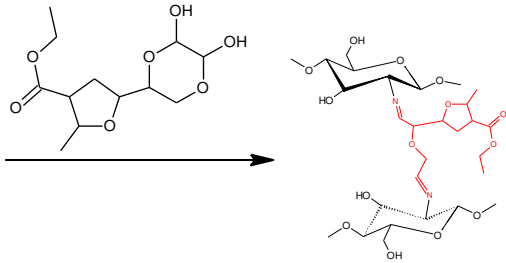
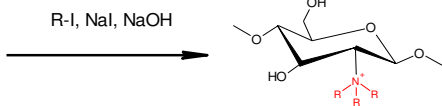
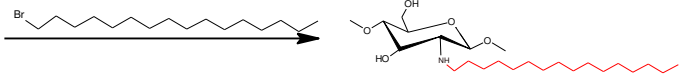
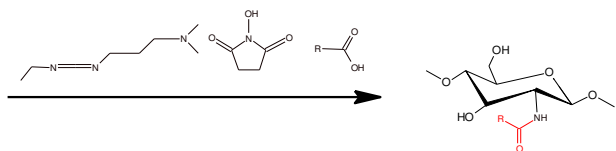
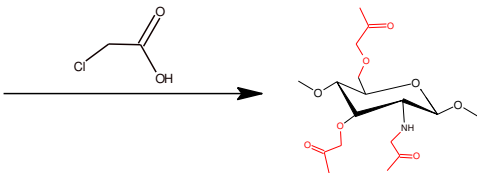
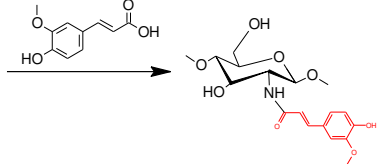
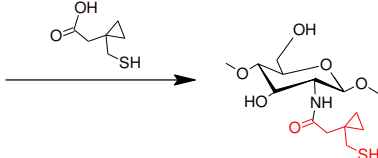
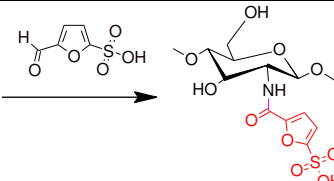


Figura 7: Derivatizações da Quitosana. (Fonte: O autor)

Tabela 1: Rotas para a Derivatização de Quitosana e suas propriedades. (Fonte: O autor)

Modificações da Quitosana	Exemplos de Reações	Aplicações da Quitosana modificada	Ref.
Base de Schiff		Atividade antibacteriana, anticancerígena e atividade antifúngica	26,27
Quaternarização		Atividade antimicrobiana, antibacteriana, <i>drug delivery</i> , engenharia de tecido	28,29
Alquilação		Atividade anticancerígena e antibacteriana	30,31
Acilação		<i>Drug delivery</i>	32, 33
Carboxilação		Ação anti-inflamatória, analgésica, cicatrização de feridas e atividade antibacteriana	34,35
Graft Copolimerização		Ação antioxidante, atividade antibacteriana, <i>oral carrier</i> e <i>drug delivery</i>	36,37
Tiolção		Engenharia de tecido, <i>drug delivery</i> e atividade antibacteriana	38
Sulfonação		Atividade antiviral, anticoagulantes e regeneração óssea	39

Dentre as modificações existentes, este trabalho terá como foco a modificação da quitosana via **fosforilação**. O fosfato faz parte de uma variedade de constituintes importantes das células incluindo DNA, RNA, ATP, fosfolipídeos e muitos intermediários em vias metabólicas.⁴⁰ Desta forma, além de modificar a solubilidade da quitosana, a torna muito interessante para aplicações biológicas.

A fosforilação da quitosana pode resultar em diversos derivados que apresentam características que se destacam pela grande importância no uso para regeneração de tecidos, *drug delivery*, células combustíveis e indústrias de alimentos.⁴¹

• Fosforilação da Quitosana

A fosforilação da Quitosana pode ser realizada por diferentes rotas sintéticas, as principais estão apresentadas na Figura 8.^{42,43}

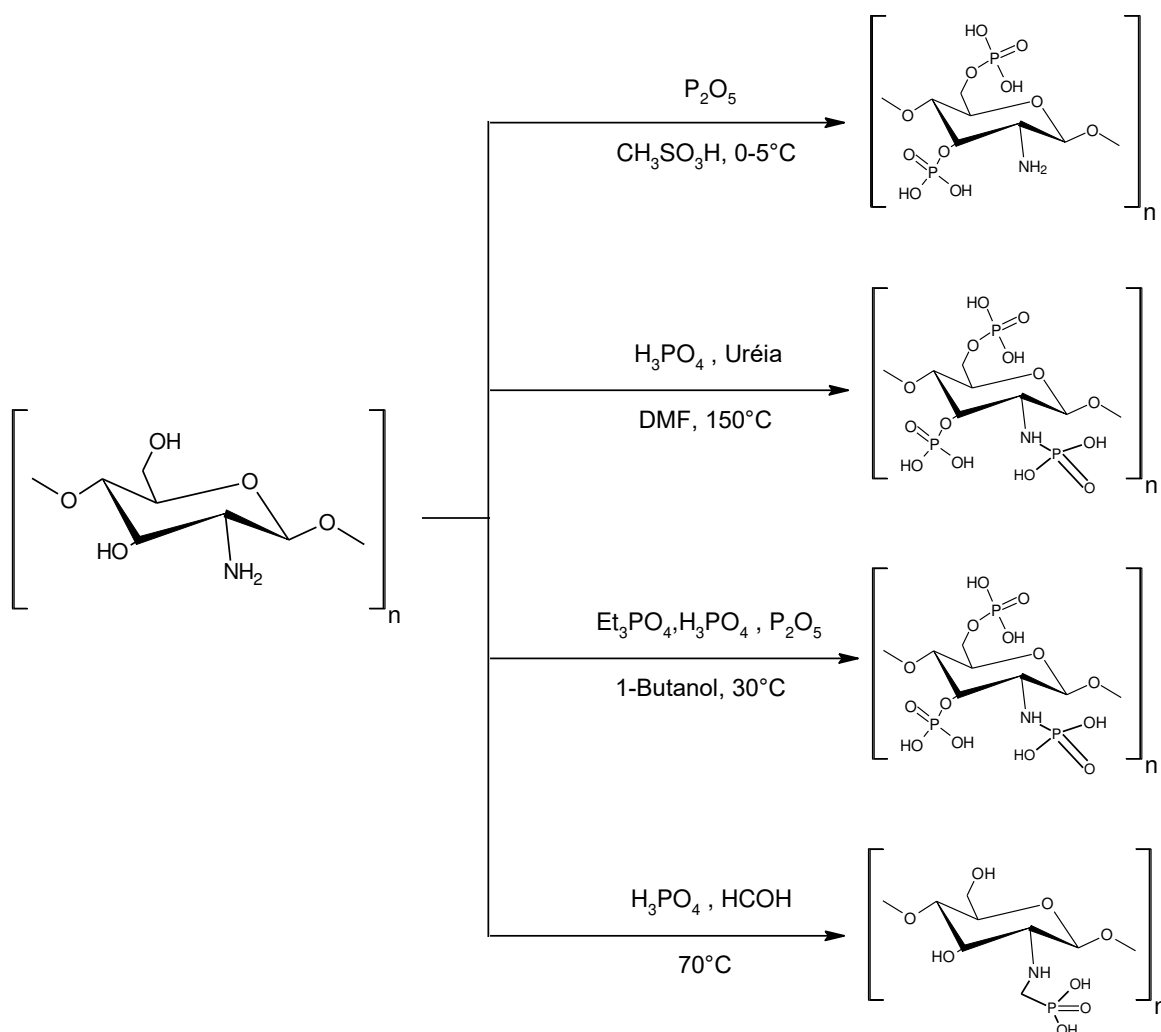


Figura 8: Reações de Fosforilação da Quitosana.

Quitosanas fosforiladas vem ganhando espaço devido suas propriedades, quando comparadas a quitosana. A introdução de grupos com cargas negativas na cadeia polimérica da quitosana, além de aumentar a solubilidade em água, pode também influenciar positivamente nas suas características como biomaterial, melhorando diversas propriedades.^{44,45}

A introdução dos grupos fosfatos à quitosana faz dela um material pH-responsivo, sendo muito estudadas para encapsulamento de medicamentos grandes e hidrofóbicos, com a liberação do fármaco iniciada em resposta ao pH. Em nano-formulações, as estudadas com quitosanas fosforiladas apresentaram liberação mais prolongada do medicamento quando comparado com as nanopartículas de quitosana não fosforilada.⁴⁶

A presença de grupos fosfatos na quitosana, aumenta a capacidade do material de doar elétrons, formar complexos mais estáveis e permitir a quelação de diversos íons metálicos, como metais de transição e lantanídeos.^{44,47, 48, 49}

A alta capacidade de adsorção de íons metálicos da quitosana fosforilada pode ser extremamente útil na recuperação de metais valiosos ou para tratamento de efluentes contaminados, pois podem ser utilizados para remoção de íons urânio (VI) em soluções residuais,⁵⁰ na criação de adsorventes magnéticos para adsorção seletiva de íons chumbo⁵¹ e na remoção de corantes no tratamento de água.⁵²

Além disso, a presença do grupo fosfatos faz com que esse efeito quelante não se limite apenas aos metais de transição, mas também seja capaz de se ligar a íons cálcio.⁵⁰

Neste trabalho iremos explorar as propriedades da quitosana fosforilada, com a modificação direcionada apenas às hidroxilas da quitosana, preservando o grupo amino.

As Figuras 7 e 8 mostram que existem diversas modificações pelo grupo amino. Desta forma, modificar apenas os grupos hidroxilas com fosfatos, preservando o grupo amino, abre novas possibilidades de modificações posteriores a fosforilação. Além disso, a presença de dois grupos reativos diferentes, faz do material um polieletrólito pH-responsivo, permitindo explorar seu comportamento em função do pH do meio no qual ele se encontra disperso.

2. METODOLOGIA

2.1 Fosforilação da Quitosana com proteção do grupo amino

A reação de fosforilação, com proteção do grupo amino, foi realizada adaptando-se o método descrito por *Nishi et al.*^{53,54,55} 1 g de quitosana em pó, de alta massa molecular (Sigma Aldrich), foi dissolvida em 14 mL de ácido metanossulfônico em um balão de fundo redondo de 100 mL, com duas juntas esmerilhadas. Adicionou-se lentamente ao meio reacional 2 g de P_2O_5 , com agitação constante. A reação ficou sob atmosfera inerte e temperatura entre 0 e 5 °C, utilizando banho de gelo, por 3 horas.

Após reação, a mistura foi vertida em etanol absoluto, resultando na formação imediata de um precipitado branco.

O sólido foi lavado e centrifugado três vezes com etanol absoluto e suspenso em água destilada, esta suspensão foi dialisada em membrana de celulose em água destilada até pH neutro.

A suspensão dialisada foi vertida em etanol absoluto com a formação de um sólido branco. O sólido foi lavado com etanol absoluto, centrifugado e seco à vácuo. A Figura 9 mostra a reação de fosforilação com proteção do grupo amino, resultando na P-Quitsana.

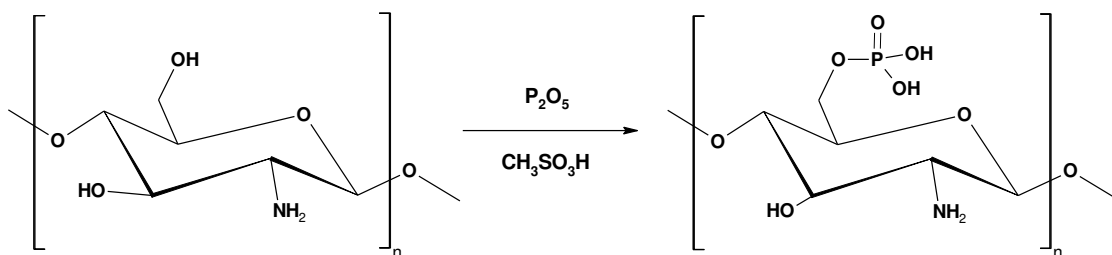


Figura 9: Reação de fosforilação da Quitosana com proteção do grupo amino.

2.2 Caracterização da P-Quitosana

2.2.1 Espectroscopia no Infravermelho FTIR

Os espectros no Infravermelho foram obtidos utilizando pastilha de KBr. As amostras foram diluídas em KBr grau espectroscópico a 1% (m/m) e prensadas para a formação das pastilhas. Os espectros foram obtidos no equipamento Cary 630 Agilent, acoplado a um módulo de transmitância com resolução de 4 cm^{-1} na região espectral de 650 a 4000 cm^{-1} .

2.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: MAS-RMN ^{13}C e ^{31}P

A P-Quitosana foi caracterizada por MAS-RMN (*Magical Angle Spinning – Nuclear Magnetic Resonance*) no estado sólido utilizando o equipamento Bruker Avance III 400 MHz. Foram obtidos espectros dos núcleos de ^{31}P e ^{13}C .

2.2.3 Determinação dos pKa dos grupos ionizáveis da P-Quitosana e sua solubilidade em função do pH

A determinação dos pKa da P-Quitosana foi realizada através da titulação potenciométrica da solução de quitosana fosforilada com pH 11, ajustado pela adição de NaOH, e solução de HCl $0,1\text{ molL}^{-1}$ como titulante. O registro da variação do pH foi feito utilizando pHmetro Metrohm. Para a determinação dos pontos de inflexão da curva de titulação, foi utilizado o método da segunda derivada.

2.2.4 Avaliação da integridade da cadeia polimérica da P-Quitosana por Cromatografia Líquida por Exclusão de Tamanho – SEC-HPLC

A análise por cromatografia líquida da P-Quitosana e da Quitosana foi realizada no equipamento Agilent serie 1200, com detector de índice de refração a 35°C . As amostras foram preparadas nas respectivas fases móveis a uma concentração de 100 ppm.

Para a P-Quitosana utilizou-se como fase móvel tampão Tris-HCl $0,1\text{ molL}^{-1}$ pH 7,5 + $0,3\text{ molL}^{-1}$ NaCl e $1.10^{-3}\text{ molL}^{-1}$ EDTA e para a Quitosana, tampão acetato pH 4,75 + $0,3\text{ molL}^{-1}$ NaCl, com vazão de 1 mL.min^{-1} , em uma coluna Spherogel TSK DNA-PWHR (7,8 x 300 mm) a 40°C . Fase móvel e as amostras

foram filtradas utilizando filtro Millipore Millex – HV (PVDF), poro de 0,45µm. O volume injetado foi de 20 µL e a análise foi realizada a uma pressão de 35 bar.

2.2.5 Determinação do grau de fosforilação

A determinação de números de grupos fosfatos ligados aos anéis glicosídeos da cadeia da P-Quitosana, foi realizada por titulação indireta e por Análise Termogravimétrica (TGA).

Para a titulação, soluções de P-Quitosana contendo excesso de íons Ca^{2+} foram tituladas de forma indireta, utilizando EDTA como titulante e Negro de Eriocromo como indicador.

0,0618g de P-Quitosana foram dissolvidas em 10 mL de tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 10,00. Adicionou-se 10 mL de solução de Ca^{2+} 0,04 molL⁻¹, para que haja a interação dos grupos fosfato com o cálcio.

Após a decantação do produto da reação de P-Quitosana com íons Ca^{2+} , retirou-se uma alíquota de 1 mL do sobrenadante, adicionou-se 10 mL de tampão $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ pH 10,00 com uma pequena quantidade de indicador Eriocromo-T 1% em NaCl e titulou-se o excesso de cálcio utilizando uma solução de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,03 molL⁻¹.

Além da determinação do grau de fosforilação por titulação indireta, o grau de fosforilação também foi determinado por análise termogravimétrica. Para esta análise, utilizou-se o sólido gelatinoso formado durante a titulação. Este sólido foi separado da solução, congelado com N_2 líquido e liofilizado.

O TGA foi realizado em atmosfera oxidante, com taxa de aquecimento de 5°C/min, entre 50 e 1000°C. Para o cálculo do número de grupos de fosfatos, o resíduo do TGA foi considerado como $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Fosforilação da Quitosana com proteção do grupo amino

A fosforilação da quitosana, preservando o grupo amino presente nos anéis glicosídeos do polímero, foi realizada pela reação com ácido metanossulfônico na presença de P_2O_5 . O ácido metanossulfônico atua como reagente protetor protonando o grupo amino conforme indicado pela reação mostrada na Figura 10.^{53,54,55} Desta forma, a fosforilação pode ocorrer nas hidroxilas dos carbonos C3 e C6 da quitosana.

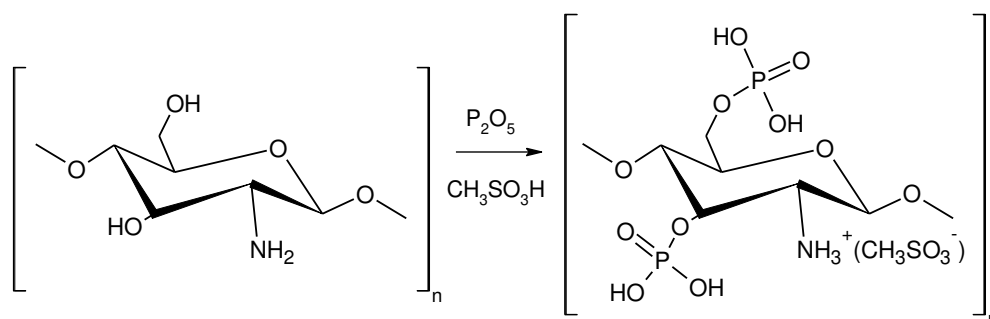


Figura 10: Reação de fosforilação com proteção do grupo amino.

Durante as reações de proteção e de fosforilação, podem ocorrer interações inter e intramolecular entre os grupos amino e outros íons devido as interações eletrostáticas. As lavagens com etanol após o término da síntese removem o metanossulfônico da estrutura, assim como outros íons formados na reação.⁵⁶

Durante a reação de fosforilação em meio ácido, apesar do uso de reagentes anidros, atmosfera inerte e temperatura controlada, ocorre a formação de água a qual pode causar hidrólise das cadeias da quitosana. A diálise com membrana de celulose com “Cut-Off” entre 12000 a 1600 Da após a síntese, permite separar fragmentos de menor massa molar, assim como íons que estejam presentes no sólido obtido após a reação.

A Figura 11 mostra características da P-Quitossana: Pó branco, com menor granulação e significativa diminuição da tendência de aglutinação quando comparada com a Quitossana usada como reagente.

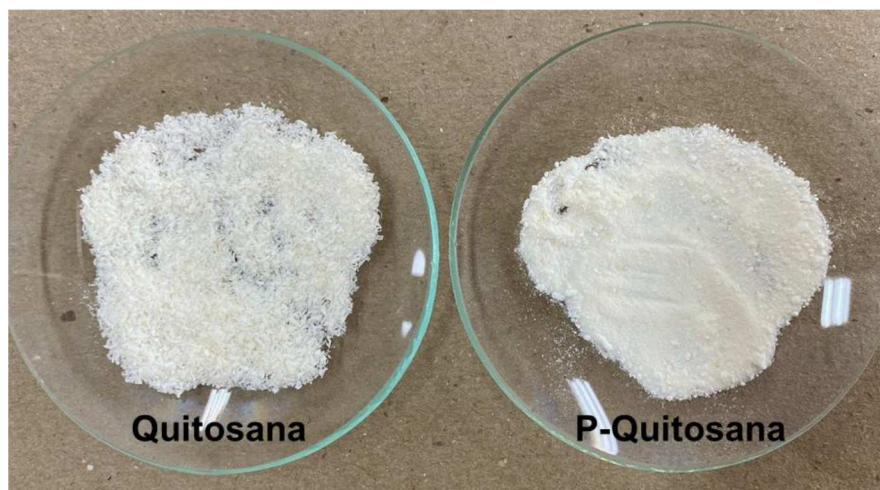


Figura 11: Foto comparativa da Quitosana e P-Quitosana.

3.2 Caracterização da P-Quitosana

3.2.1 Espectroscopia no Infravermelho FTIR

A P-Quitosana foi caracterizada por FTIR, utilizando pastilhas de KBr. A Figura 12 mostra os espectros da P-Quitosana e Quitosana e a Tabela 2 as atribuições dos picos de cada espectro.

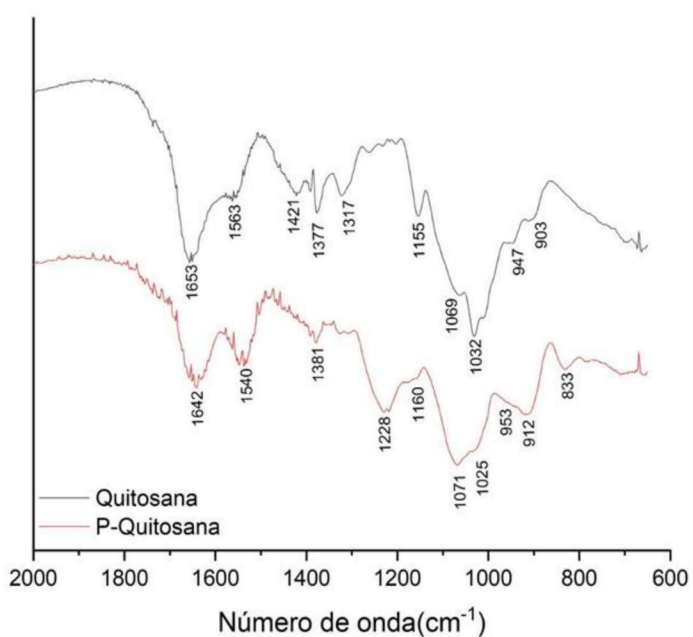


Figura 12: Espectros de FTIR da Quitosana não modificada e da P-Quitosana.

O espectro da P-Quitosana apresenta pico característico em 1228 cm^{-1} que pode ser atribuído ao estiramento assimétrico de $\text{P}=\text{O}$ de fosfatos. O aumento na intensidade do pico em $1069 - 1071\text{ cm}^{-1}$ também pode ser atribuído ao surgimento do estiramento $\text{C}-\text{O}-\text{P}$ em ésteres fosfatados.^{57,58}

Os picos presentes na faixa espectral entre 1500 a 1700 cm^{-1} do espectro da P-Quitosana, correspondem aos estiramentos de grupos aminos, assim como, o pico em 1540 cm^{-1} atribuído a deformação simétrica de NH_3^+ , mostrando que este grupo foi preservado na fosforilação.

Tabela 2: Atribuição dos picos observados nos espectros de FTIR para a Quitosana e P-Quitosana.

Frequência dos picos (cm^{-1})		Atribuição dos picos	Ref.
Quitosana	Quitosana Fosforilada		
	1540	Deformação simétrica $-\text{NH}_3^+$	57
1421	-	C-N estiramento de $\text{C}-\text{NH}_2$	57
-	1228	$\text{P}=\text{O}$ estiramento assimétrico	57
1069	1071	-C-O estiramento em grupos éter C-O-P estiramento de ésteres de fosfatos	57
1032	1025	-C-O estiramento em éteres	58
947	953	CH_3 rocking	57
-	912	estiramento $\text{P}-\text{OH}$	57
903	912	C-O estiramento de anel	58
-	833	P-O estiramento em fosfatos monoester	58

3.2.2 Espectro de RMN ^{13}C e ^{31}P para P-Quitosana

Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi utilizada para determinar quais átomos do anel glicosídeo da Quitosana foram mais influenciados pela fosforilação. A Figura 13 mostra os espectros de RMN ^{13}C da P-Quitosana e Quitosana.

O espectro de RMN ^{13}C da Quitosana apresenta picos em 57.81, 61.28, 72.25, 75.43, 83.81, 105.18 ppm atribuídos aos carbonos do anel C2, C6, C3, C5, C4, C1 e 23.73 e 174.50 ppm atribuídos aos grupos metila e a carbonila remanescentes na quitosana.⁵⁹

Já no espectro de RMN ^{13}C da P-Quitosana observa-se diferenças nos deslocamentos químicos dos carbonos C1, C3, C4 e C6, em relação aos carbonos da Quitosana. Esses deslocamentos se dão devido à fosforilação nos grupos hidroxilas em C3 e/ou C6. Outro ponto observado, é que o deslocamento para C2 não é alterado, mostrando que esse carbono não é afetado pela reação de fosforilação.

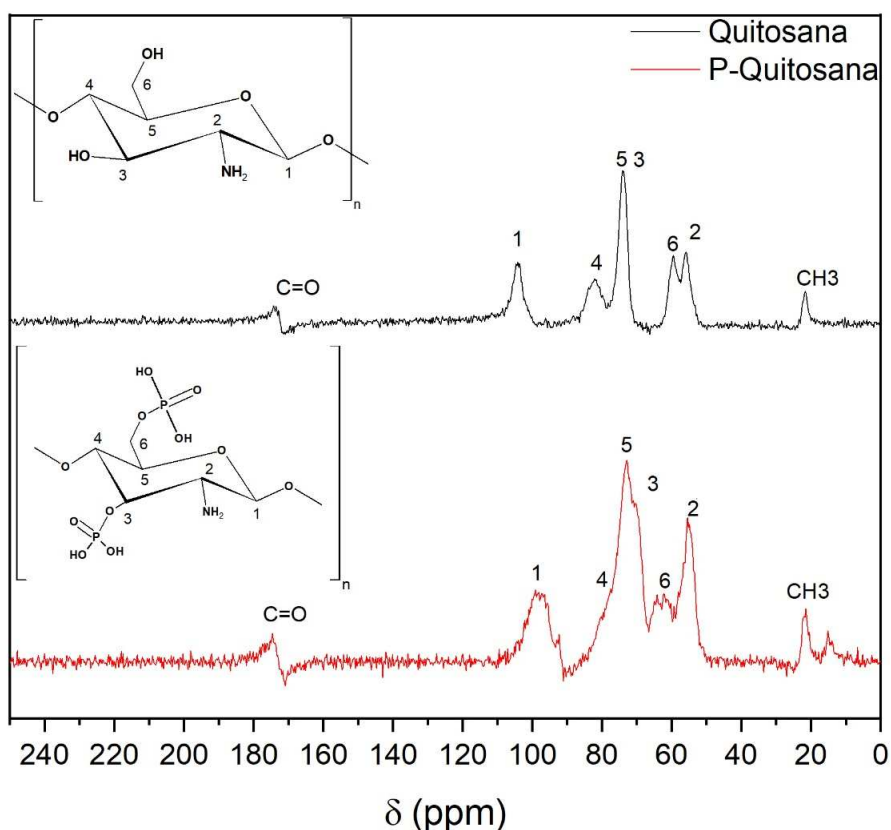


Figura 13: Comparação dos espectros de RMN ^{13}C , obtidos em estado sólido, para a quitosana e P-Quitosana.

O alargamento dos picos referentes aos carbonos C1, C3, C4 e C6 pode estar relacionado ao grau de fosforilação, mostrando que existem espécies

fosforiladas e não fosforiladas na mesma estrutura polimérica. Apesar da modificação não ocorrer nos carbonos C1 e C4, a proximidade espacial dos grupos fosfatos a esses carbonos faz com que a nuvem eletrônica desses grupos desloque o sinal de RMN para valores menores de deslocamento químico. Este comportamento também contribui para a confirmação de que a modificação com o grupo fosfato ocorreu nas hidroxilas da quitosana.

O espectro de RMN ^{31}P para a P-Quitosana mostrado na Figura 14, apresenta três picos referentes a fósforos, os quais têm sido reportados para reações com P_2O_5 .⁶⁰ De acordo com a literatura, reações com pentóxido de fósforo geram uma rede semelhante à estrutura encontradas em vidro, conhecidas como fosfatos vítreos. A rede de fosfato é formada por tetraedros interconectados e pode ser descrita como Q^n , onde n representa o número de oxigênios em pontes. Desta forma, Q^3 é a condensação máxima observada em redes de fosfatos, já que existem apenas três oxigênios disponíveis para a formação da ponte P-O-P (Figura 15).⁶⁰ Quando P_2O_5 é utilizado, ocorre a formação de espécies Q^0 , Q^1 e Q^2 , como observado no espectro obtido da P-Quitosana apresentado na Figura 14.

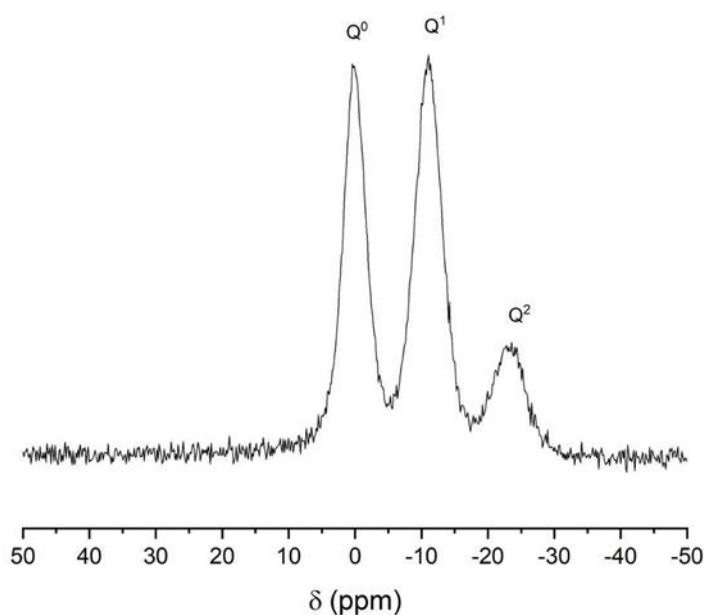


Figura 14: Espectro de RMN ^{31}P para P-quitosana.

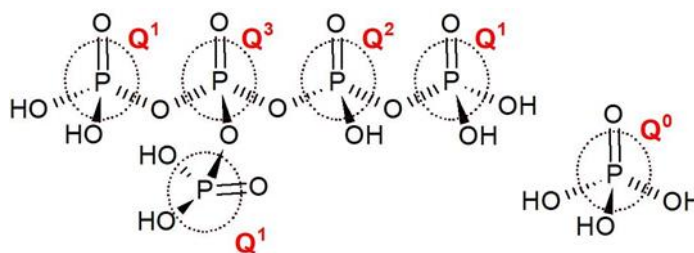


Figura 15: Estruturas de fosfatos tetraédricos que podem existir em fosfatos vítreos.

3.2.3 Determinação dos pKa dos grupos ionizáveis da P-Quitossana

A modificação da Quitossana com grupo fosfato preservando o grupo amino torna o material pH-responsivo em função das protonações e desprotonações destes grupos. Para determinar estas protonações, o pKa dos grupos foi determinado realizando uma titulação potenciométrica de solução de P-Quitossana em solução de hidróxido de sódio.

A curva de titulação da P-Quitossana é mostrada na Figura 16, na qual pode-se observar dois pontos de inflexão em pH 4,57 e 7,93, que correspondem aos pKa 6,70 e 10,08, respectivamente. Segundo a literatura^{61,62}, a quitossana pode apresentar uma faixa de pKa entre 6,00 a 7,20^{61,62,63,64} atribuída ao grupo amino, sendo influenciada por alguns parâmetros do material como: o grau de desacetilação, a massa molar do polímero e o parâmetro “ α ” referente ao ambiente dielétrico do grupo amino. Portanto, para a P-Quitossana, podemos atribuir o pKa de 6,70 determinado na curva de titulação (Figura 16) ao grupo amino.

A maior dificuldade na interpretação dessa curva de titulação é na atribuição do pKa para o grupo fosfato. Como discutido anteriormente, a reação da quitossana com pentóxido de fósforo pode gerar diversos polifosfatos, sendo que cada um deles pode apresentar valores de pKa diferentes. Esse fato pode ser o responsável pelo comportamento da curva de titulação nesta faixa de pH, na qual a variação de pH com a adição do titulante é muito menos acentuada do que a observada nos pontos de inflexão, o que mostra possivelmente a presença de diversos equilíbrios nesta região. De forma geral, o valor de pKa 10,08 pode ser atribuído a diversos fragmentos fosfatos em ambientes químicos diferentes.

A literatura indica a existência de outra ionização para o grupo fosfato com pKa próximo de 1,54, porém as condições experimentais utilizadas neste trabalho não permitiram observá-lo.⁶⁵

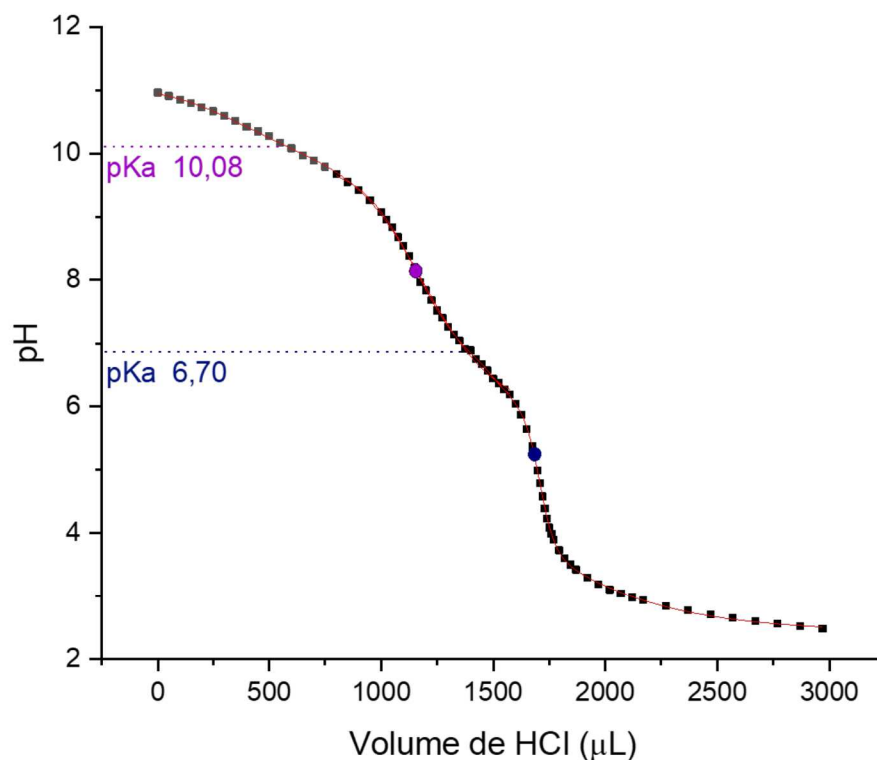


Figura 16: Curva de titulação da P-Quitossana para determinação dos pKa. Os pontos em rosa e azul correspondem às equivalências da titulação e indicam a inflexão de cada curva.

3.2.4 Determinação da solubilidade da P-Quitossana em função do pH

A Quitossana tem sido considerada um biomaterial com propriedades versáteis para produção de géis, filmes e diversas outras aplicações já citadas.^{41,66,67,68,69} Porém, sua solubilidade é uma das principais limitações, pois geralmente é dissolvida em solução de ácido acético com pH em torno de 4,00, muito diferente do pH fisiológico. Além disso, possui solubilidade restrita, sendo muito difícil preparar materiais que contenham mais do que 3% de Quitossana.

Com isso, as modificações de sua estrutura podem ser uma alternativa para contornar este problema. A presença dos grupos aminos e dos grupos fosfatos,

tornam a P-Quitosana um polímero pH-responsivo para uma ampla faixa de pH, permitindo a modificação reversível de sua solubilidade e conformações do polímero como consequência de modificações nas interações iônicas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas.⁶⁹

A Figura 17 mostra os resultados do experimento para a determinação das faixas de pH para a solubilidade da P-Quitosana.

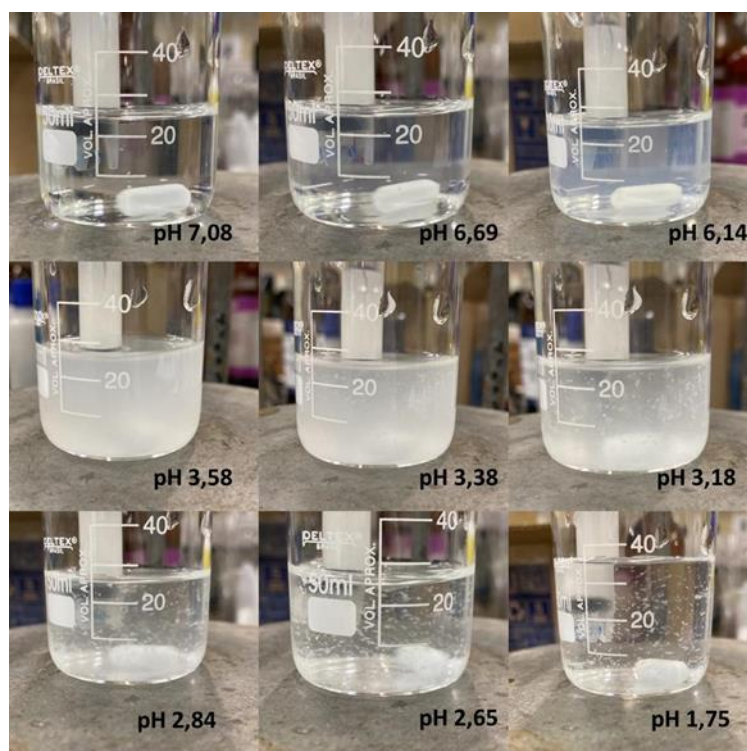


Figura 17: Fotos do experimento para a verificação da solubilidade da P-Quitosana em diferentes pH.

A solubilidade da P-Quitosana em função do pH mostrada na Figura 17, pode ser explicada através dos pKa encontrados, relacionando-os através de um balanço de cargas.

A insolubilidade da P-Quitosana entre pH 1,50 e próximo de 7,00 pode ser atribuída à presença de uma carga negativa do íon fosfato ligado ao anel glicosídeo da Quitosana e a presença de uma carga positiva devido à protonação do grupo NH_2 , como mostrado na Figura 18. A presença destas cargas opostas confere neutralidade elétrica ao composto resultando na sua insolubilidade.

Para pH acima de 7,00 o grupo amino está completamente desprotonado e, portanto, sem carga, enquanto o grupo fosfato apresenta todos os seus hidrogênios ionizados, conforme indicado na Figura 18, resultando na presença de carga e consequentemente na solubilização da P-Quitossana.

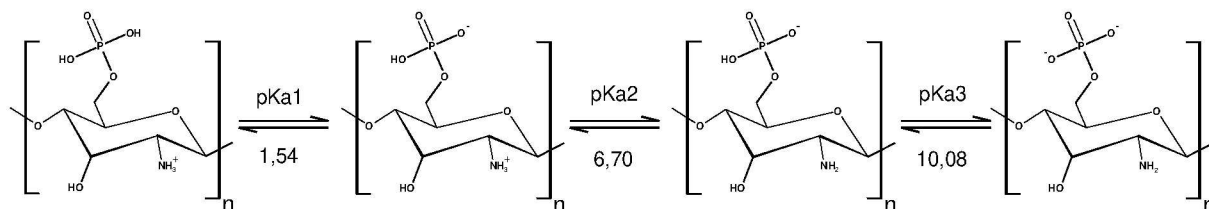


Figura 18: Equilíbrios entre as espécies carregadas da P-Quitossana em função do pH.

Além da diferença de solubilidade entre a Quitossana e a P-Quitossana, a P-Quitossana é solúvel em pH fisiológico, como mostrado na Figura 17, o que amplia as possibilidades do seu uso como Biomaterial, além disso, sua elevada solubilidade neste pH permite preparar dispersões contendo até 15% de P-Quitossana. Estas dispersões em pH fisiológico, contendo uma elevada razão massa de quitosana/massa de solvente, formam géis de fácil manipulação como mostrado na Figura 19, abrindo novas perspectivas para o seu uso.

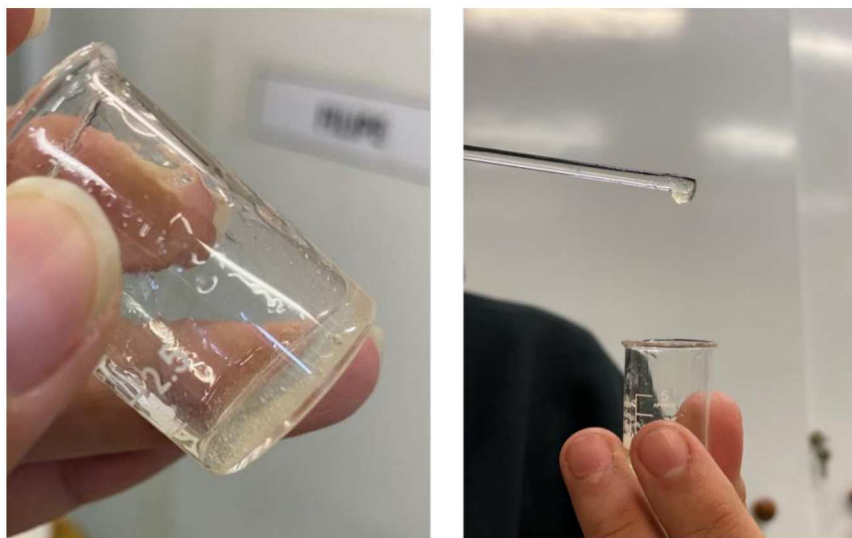


Figura 19: Gel formado pela solubilização de P-Quitossana a 15% em Tampão pH 7,30.

3.2.5 Cromatografia Líquida por exclusão de tamanho – SEC-HPLC

A síntese da P-Quitossana utiliza P_2O_5 como fonte de fosfato, deixando o meio ácido e nesta condição, a hidrólise da cadeia pode vir a ocorrer. A análise de cromatografia líquida por exclusão de tamanho permitiu investigar se o produto da reação apresenta uma dispersão de tamanhos e verificar se a diálise com “Cut-Off” de 12000 a 1600 Da excluiu possíveis oligômeros. A Figura 20 nos mostra o resultado da cromatografia para P-Quitossana e Quitossana.

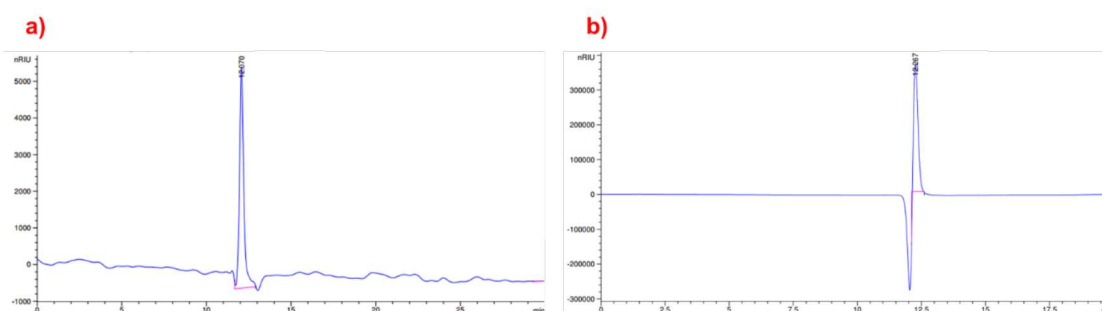


Figura 20: Cromatograma por exclusão de tamanho a) P-Quitossana; b) Quitossana.

Para cada amostra utilizou-se uma fase móvel diferente, desta forma os cromatogramas não são comparativos, porém nota-se que existe apenas um pico para cada composto, sendo o tempo de retenção da P-Quitossana em 12,07 min e da Quitossana em 12,26 min, indicando que as amostras apresentam apenas um tamanho de cadeia majoritariamente, o que indica que a diálise foi efetiva removendo grupos de cadeias menores da P-Quitossana em caso de hidrólise durante a reação.

3.2.6 Determinação do grau de fosforilação da P-Quitossana

A fosforilação da Quitossana possibilita que os grupos fosfatos ionizados em pH próximo de 10 reajam com íons cálcio em solução. Esta reação, além de modificar a carga do polímero resulta na gelificação ionotrópica do material.

A reação com íons cálcio também possibilita estimar o grau de fosforilação, isto é, a razão média do número de grupos fosfatos por anel glicosídeo da Quitossana. Desta forma, para verificar a interação dos grupos fosfato com íons cálcio, realizou-se uma titulação indireta de complexação.

O resultado da titulação indireta, conforme descrito na metodologia, permitiu determinar que o número de grupos fosfatos por anel glicosídeo corresponde a 0,48 grupos por anel.

A reação com íons cálcio também possibilita determinar o grau de fosforilação através da técnica de TGA, uma vez que, a queima da matéria orgânica do sólido gelatinoso formado pela reação dos íons Ca^{2+} com a P-Quitossana deve resultar em um resíduo de fosfato de cálcio.

A Figura 21 mostra o resultado obtido pela análise de TGA. É possível observar uma perda de massa acentuada entre 200 e 450°C que, segundo a literatura ^{70,71}, está relacionado à queima do material orgânico da quitossana.

Considerando que a porcentagem de resíduo com massa estável a partir de 600°C (45,91%) equivale a fosfato de cálcio, o resultado coincide com o valor obtido pela titulação indireta com íons cálcio. Mostrando que em média a fosforilação resulta em 1 grupo fosfato para cada dois anéis glicosídeo da Quitossana.

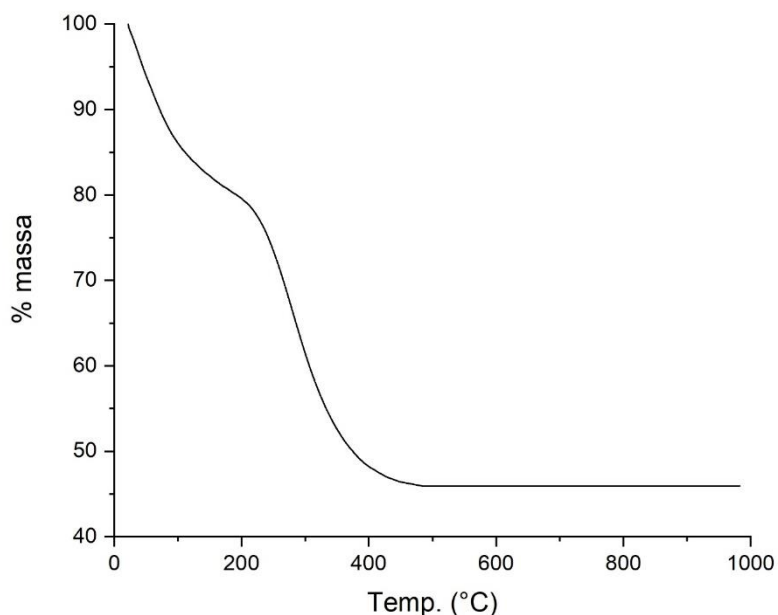


Figura 21: Análise Termogravimétrica (TGA) para P-Quitossana após reação com íons cálcio.

4. CONCLUSÃO

O objetivo desta etapa do projeto foi alcançado, já que a reação de fosforilação da Quitosana ocorreu apenas nos grupos hidroxilas, com a preservação do grupo amino.

Através das análises, foi possível confirmar que os grupos fosfatos foram incorporados à estrutura da quitosana e que o grupo amino foi preservado, já que o material apresenta pKa específicos de fosfato e amina, além de apresentar picos característicos no FTIR e RMN, sendo capaz de complexar cálcio, como visto no TGA, e se tornou um material pH-responsivo com uma solubilidade bem diferente da quitosana.

Desta forma, a P-Quitosana apresenta as propriedades aniônicas do grupo fosfato associada as propriedades catiônicas da quitosana devido a presença do amino livre, mantendo a possibilidade de explorar outras modificações que possam adicionar propriedades ao material fosforilado através do grupo amino.

CAPÍTULO 02

EXPLORANDO A P-QUITOSANA

1. INTRODUÇÃO

A P-Quitosana, obtida conforme descrito no Capítulo 01, foi cuidadosamente caracterizada para comprovar a presença dos grupos fosfatos e amino ligados à estrutura da quitosana. Estes grupos, conferem propriedades polieletrólíticas ao polímero, tornando-o pH-responsivo em uma ampla faixa de pH.

Muitas reações de modificações da quitosana ocorrem a partir grupo amino, devido a sua reatividade.²⁴ Desta forma, a presença dos grupos aminos e fosfatos ligados à cadeia do polímero, permite explorar propriedades muito além do comportamento pH-responsivo.

A reatividade destes grupos possibilita a reticulação química e/ou física da P-Quitosana. A associação dessas reticulações geram géis que apresentam uma estrutura 3D, hidrofílico e a estrutura reticulada do polímero pode absorver e reter quantidade substancial de água ou fluídos biológicos através de forças capilares, osmóticas e de hidratação, causando a expansão da rede polimérica.⁷³

Esses géis, podem ser convertidos em *scaffolds*, que apresentam poros interconectados, que podem ser utilizados como um suporte para o crescimento de novas células, além de estimular e estabelecer uma matriz, para a construção de um novo tecido.

- **Reticulação Química da P-Quitosana**

O grupo amino permite reticular a P-Quitosana através de reações de reticulação. A reticulação interconecta as cadeias do polímero, aumentando a massa molar, melhorando suas propriedades mecânicas e sua estabilidade.⁷² A escolha do reticulante é uma etapa extremamente importante, já que este pode influenciar na degradabilidade do material, assim como, na sua citotoxicidade.⁷²

A Figura 22 mostra diversas possibilidades de reações envolvendo o grupo amino da quitosana. Essas reações podem resultar em reticulações químicas ou físicas.⁷³

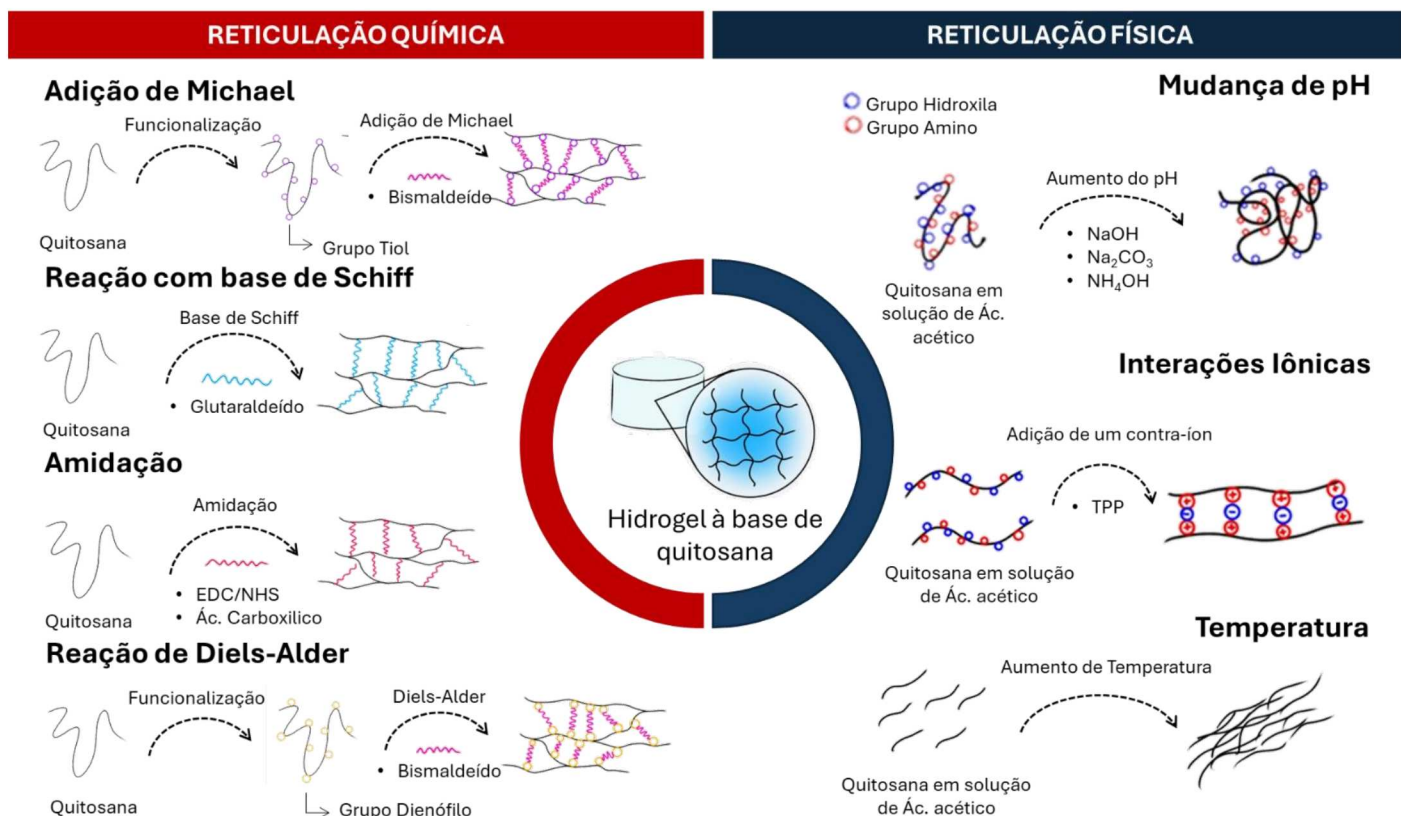


Figura 22: Tipos de reticulações da Quitosana.

A reticulação química gera géis de quitosana mais estáveis, devido às ligações covalentes formadas entre as cadeias poliméricas.⁸⁷ Diversas reações químicas são utilizadas para reticulação, dentre elas podemos citar reação de Michael, reação com base de Schiff e reação de Diels-Alder.⁷⁴ Entretanto, alguns métodos diretos são preferíveis como a reação com base de Schiff e amidação.

Para a quitosana, a reação de reticulação química mais comum é a reação utilizando base de Schiff, que se dá através da reação entre o grupo amino e dialdeídos, frequentemente o glutaraldeído, formando iminas que interconectam as cadeias como apresentado na Figura 23.^{75,76,77,78,79}

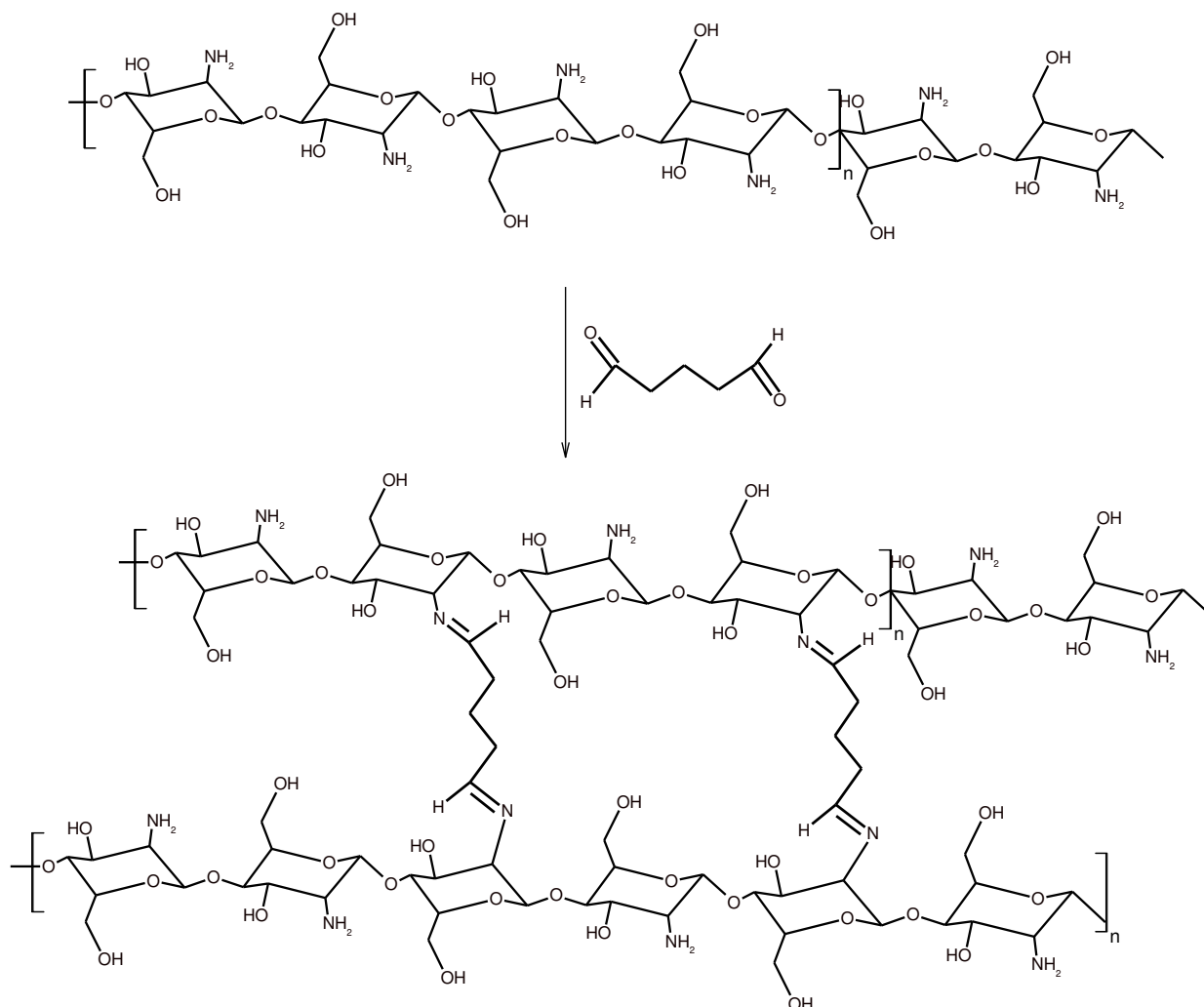


Figura 23: Reação de reticulação da quitosana utilizando glutaraldeído.

Esse reticulante permite uma reação direta em meio aquoso, em condições brandas, sem a adição de moléculas auxiliares. Porém, o glutaraldeído apresenta toxicidade intrínseca ao tecido humano, mesmo em baixas concentrações (0,05 ppm de exposição)⁸⁰, necessitando de etapas de purificações adicionais para garantir a remoção total do reagente antes do material ser utilizado.⁸¹

Neste trabalho, a reticulação da P-Quitosana será realizada via amidação, resultado da reação entre o grupo amino com grupos carboxílicos de um ácido dicarboxílico.

Para que o ácido carboxílico reaja com o grupo amino, é necessário um reagente ativante. Reagentes como SOCl_2 (cloreto de tionila), $(\text{COCl})_2$ (Cloreto de oxalila), EDC (Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida), NHS (N-Hidroxisuccinamida), carbonildiimidazol, DCC (diciclohexilcarbodiimida), entre

outros, têm sido muito utilizados como reagentes ativantes em reticulações da quitosana. Porém, para aplicações biomédicas, devido às limitações de toxicidade, somente EDC/NHS e DCC/NHS têm sido explorados.⁷⁴

A reação de amidação, com a ativação do ácido carboxílico utilizando EDC/NHS, está representado na Figura 24.⁸²

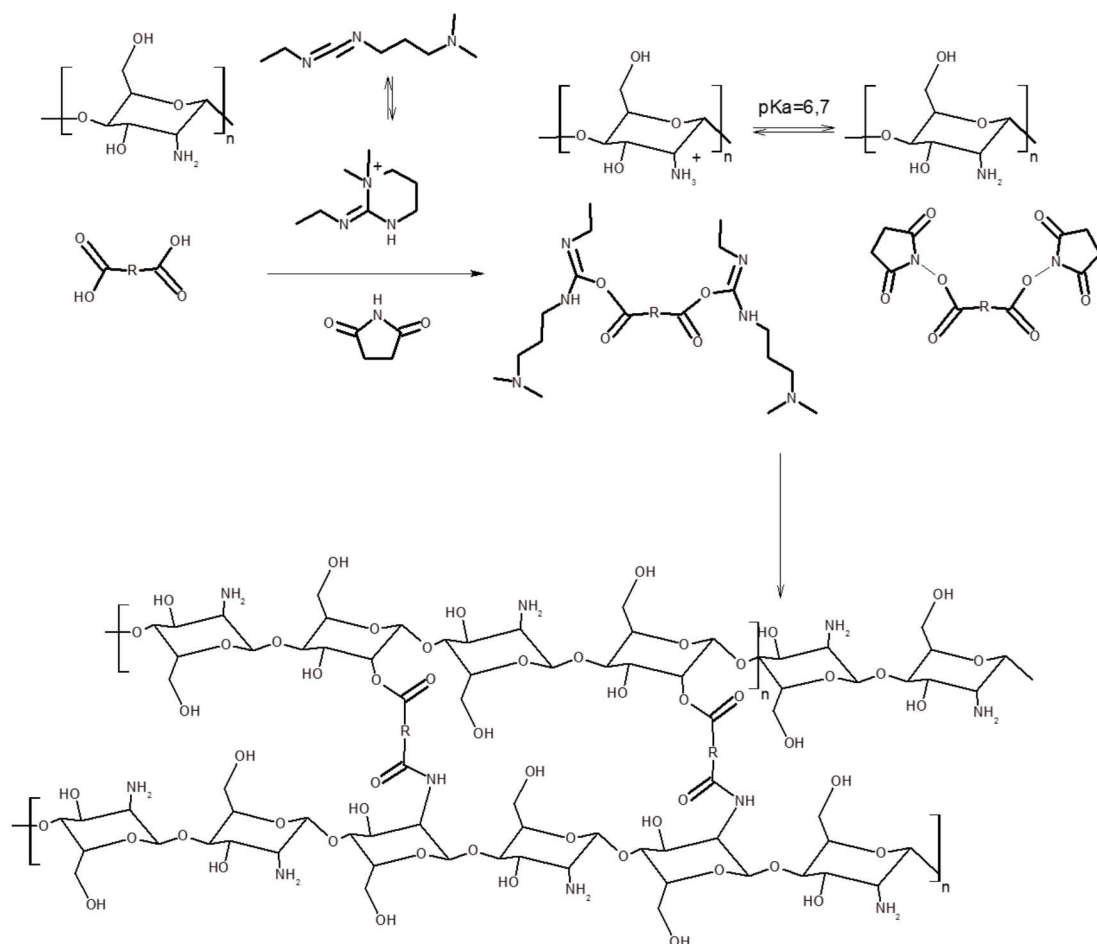


Figura 24: Reação de reticulação da quitosana com diácido carboxílico, utilizando EDC e NHS como ativadores da reação.

O ácido oxálico, ácido malônico, ácido succínico, ácido cítrico, EDTA e ácido tartárico têm sido utilizados como reticulantes de quitosana via amidação para aplicações biomédicas.^{74,83,84}

Neste trabalho, o ácido dicarboxílico escolhido para a reticulação da P-Quitosana foi o ácido tartárico, considerando a possibilidade de uso biomédico para os géis e *scaffolds* que serão obtidos a partir da reticulação.

O ácido tartárico foi escolhido devido sua reduzida toxidez e ações terapêuticas a ele associadas, tais como: ação antioxidante, quelante de íons metálicos, prevenção de formação de cálculos renais e estabilizante da pressão sanguínea.^{85,86}

- **Reticulação Física**

A reticulação física da quitosana consiste em interações físicas como ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e interações hidrofóbicas. Esta reticulação, é um método simples e eficaz para a preparação de hidrogéis a base de quitosana.⁸⁷

Géis de quitosana podem ser obtidos pela utilização de um reticulante iônico, como por exemplo o tripolifosfato (TPP). Quando uma solução de TPP é misturada com uma solução ácida de quitosana, ocorre a formação de um gel, devido a interação eletrostática entre o ânion do TPP e a carga positiva do grupo amino da quitosana.⁸⁷

O mesmo acontece nos complexos polieletrólitos (PEC), nos quais os géis são formados pela combinação da quitosana com outras macromoléculas polianiónicas, como alginato e ácido poliacrílico.^{18,21,22,87}

A reticulação de polímeros polieletrólitos com moléculas de carga oposta é denominada gelificação ionotrópica.^{81,88,89} As reações de gelificação ionotrópica, têm sido empregadas para formação de hidrogéis à base de quitosana. Esses hidrogéis são amplamente aplicados na biomedicina para imobilização de enzimas, no preparo de *scaffolds*, implantes, entre outros.⁹⁰

Neste trabalho, será explorada, além da reticulação com ácido tartárico, a possibilidade de reticulação ionotrópica da P-Quitosana a partir da interação entre os grupos fosfatos e íons cálcio. Os grupos fosfatos, quando desprotonados, interagem com íons de carga positiva, como o cálcio, resultando na gelificação ionotrópica do polímero.

- **Formação dos *Scaffolds***

O termo “*Scaffold*” refere-se a uma matriz temporária, de estrutura porosa, utilizada para apoiar, reparar ou melhorar o reparo de um tecido vivo. Para garantir

as funções dos tecidos danificados, o *scaffold* se faz necessário para substituir o defeito ou mimetizar os órgãos e estruturas de maneira tridimensional.⁹¹

Algumas características são essenciais para a aplicação de *scaffolds* no reparo de tecidos como biocompatibilidade, biodegradabilidade, porosidade, tamanho dos poros, entre outros. Além disso, o *scaffold* precisa ser uma estrutura adequada para a adesão, proliferação e diferenciação celular criando um ambiente adequado para regeneração dos tecidos.⁹¹

Existem diversas técnicas para a fabricação de *scaffolds* a partir de polímeros biodegradáveis como a quitosana. As técnicas convencionais abrangem adição de solvente, lixiviação de partículas, espuma a gás, liofilização etc.⁹²

O método *Freeze-Drying*, baseado no processo denominado ISISA (*Ice Segregation Induced Self-assembly*) foi escolhido para a formação do *scaffold* a partir do hidrogel da P-Quitosana reticulada com ácido tartárico e gelificada com íons cálcio (RET-P-QuiN_{Ca}). Este método se baseia no processo de congelamento e sublimação da água em baixa temperatura e pressão.⁹³

A etapa de congelamento é muito importante, porque define a estrutura do *scaffold*. Desta forma, o congelamento lento e unidirecional produz materiais com macro poros, com uma estrutura bem padronizada.⁹³

Quando a água congela, é possível crescer cristais de gelo formando uma microestrutura lamelar. Durante o processo de congelamento, os cristais de gelo crescem paralelamente e a fase sólida do gel é exsudada. Quando o gelo é sublimado, a estrutura não colapsa e o *scaffold* formado é uma réplica negativa do líquido congelado.^{93,94}

A Figura 25 ilustra o processo ISISA para a obtenção do *scaffold*.

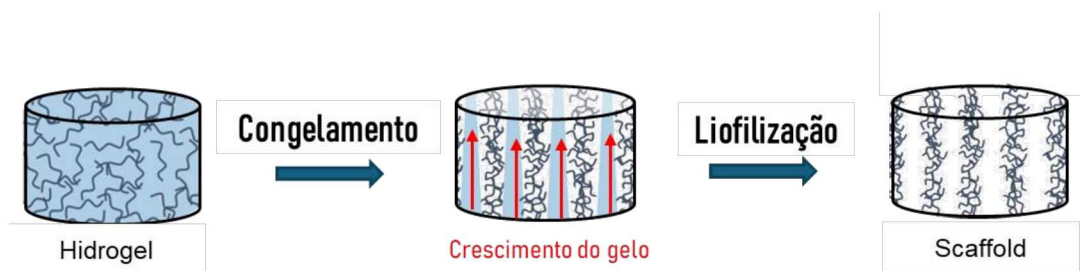


Figura 25: Processo ISISA de congelamento do hidrogel.

Todos os materiais resultantes da P-Quitosana estão apresentados na Figura 26 com a sequência cronológica das reações.

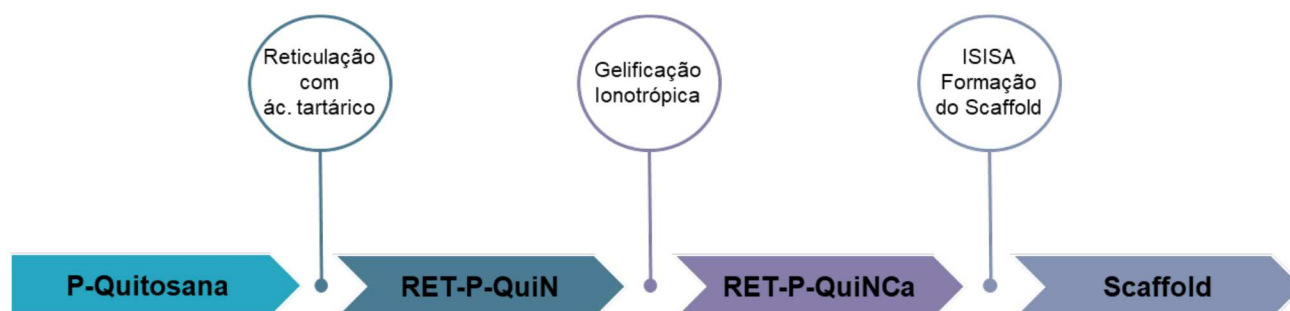


Figura 26: Etapas para obtenção dos materiais provenientes da P-Quitosana.

Considerando a perspectiva de um possível uso biomédico para a P-Quitosana, as escolhas realizadas neste trabalho, deveram-se ao fato de que a possível degradação do material não resulte em fragmentos ou substâncias tóxicas ao organismo, o que é contemplado pela escolha do fosfato como grupo modificador da cadeia, ácido tartárico como reticulante químico e pelo íon cálcio como reticulante físico.

Para RET-P-QuiN e RET-P-QuiNCa foram observados apenas mudanças no aspecto físico dos materiais, sem o uso de técnicas analíticas para sua caracterização, que serão discutidos nos itens 3.1 e 3.2 deste capítulo.

2. METODOLOGIA

2.1 Reticulação da P-Quitosana utilizando EDC, NHS e Ácido Tartárico

A reticulação da P-Quitosana foi realizada adaptando-se o método descrito por *Pujana et al.*⁹⁵ utilizando Ácido Tartárico, EDC (Cloridrato de 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida) e NHS (N-Hidroxisuccinamida). A proporção utilizada entre EDC, NHS, Ácido Tartárico e P-Quitosana foi de 5:2:1:2, respectivamente.

0,0646 g de EDC foi adicionado previamente a 0,0125 g de Ácido tartárico em 5 mL de água destilada. A mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos e em seguida adicionou-se 0,0192 g de NHS gradualmente, mantendo-se a mistura em agitação por mais 4 horas. Esta solução do reticulante foi vertida em uma solução de 0,040 g de P-Quitosana em 5 mL de NaOH 0,5 molL⁻¹. Como o pH da mistura não deve ser menor que 8 para que não haja a precipitação da P-Quitosana, o pH foi ajustado com solução de NaOH 0,5 molL⁻¹. A reação foi mantida sob agitação por 24 horas a temperatura ambiente.

A mistura foi acidificada com solução de HCl 0,1 molL⁻¹ até pH 4 resultando na formação de um sólido. O material reticulado (RET-P-QuiN) foi centrifugado e lavado com água destilada.

2.2 Gelificação Ionotrópica da RET-P-QuiN com íons Ca²⁺

A gelificação ionotrópica da RET-P-QuiN foi realizada pelo contato com soluções saturadas de CaCl₂ conforme indicado na Figura 27.

Preparou-se uma solução saturada de CaCl₂ e adicionou-se 2 mL desta solução em uma seringa com a ponta cortada. 50 mg de RET-P-QuiN foi dissolvido em 1 mL de NaOH 0,5 molL⁻¹ e adicionado cuidadosamente sobre a solução de cálcio na seringa para que o processo de gelificação ionotrópica, decorrente da reação dos grupos fosfatos com os íons Ca²⁺_(aq), ocorresse de forma gradual e uniforme.

A utilização das seringas com as pontas cortadas permitiu a extrusão do gel após a reticulação em formato cilíndrico, formato adequado para serem utilizados

posteriormente na preparação de *scaffolds* e realização de testes biológicos, como será descrito no Capítulo 03. A reticulação com íons cálcio transforma a RET-P-QuiN em RET-P-QuiNCa.

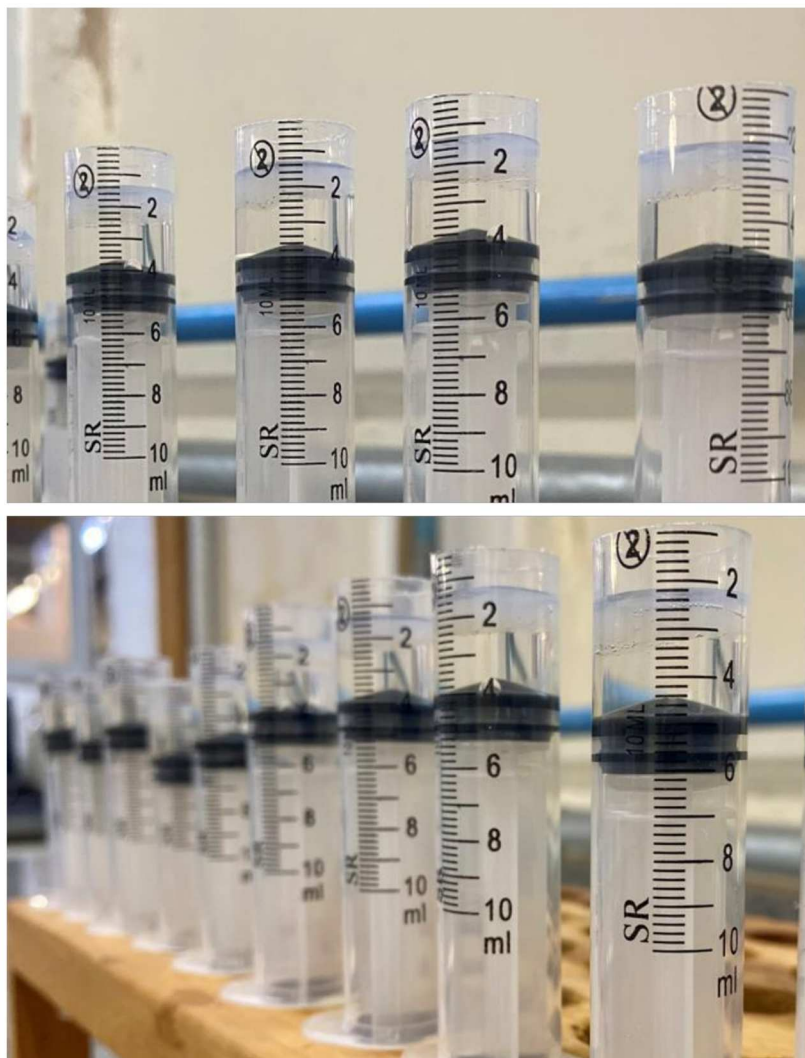


Figura 27: Arranjo experimental utilizado para a Preparação do cilindro de gel de RET-P-QuiNCa pela reticulação ionotrópica da RET-P-QuiN. A foto mostra um conjunto de seringas adaptadas, possibilitando preparar vários cilindros de gel simultaneamente.

2.3 Obtenção do *scaffold*

Os géis cilíndricos de RET-P-QuiNCa foram congelados lentamente em N₂ líquido e liofilizados por 48 horas resultando em *scaffolds*.

2.4 Caracterização dos *scaffolds* de RET-P-QuiNCa

2.4.1 Caracterização dos *scaffolds* de RET-P-QuiNCa e de Quitosana por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

O *scaffold* de quitosana, preparado a partir de soluções de quitosana a 3% em ácido acético $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, congelados e liofilizados conforme item 2.3, e o *scaffold* obtido a partir do gel de RET-P-QuiNCa, foram analisados por Microscopia de Varredura Eletrônica (MEV) utilizando o equipamento Quanta FEG 250 – FEI.

As amostras foram cuidadosamente aderidas à fita de carbono, colada sobre o stub, e metalizadas pela deposição de Carbono.

2.4.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear: MAS-RMN ^{13}C e ^{31}P do *Scaffold* de RET-P-QuiNCa

Scaffold de RET-P-QuiNCa foi caracterizado por MAS-RMN (*Magical Angle Spinning – Nuclear Magnetic Resonance*) no estado sólido utilizando o equipamento Bruker Avance III 400 MHz. Foram obtidos espectros de núcleos de ^{31}P e ^{13}C .

2.4.3 Espectroscopia de Fotoelétrons por Raios X (XPS)

Mesmo com todas as caracterizações realizadas anteriormente, algumas informações sobre a estrutura do material não foram elucidadas. A técnica de XPS foi utilizada para verificar e quantificar algumas ligações presentes na RET-P-QuiNCa, além de complementar as informações sobre as ligações presentes na P-Quitosana.

Para isso, foram analisados os seguintes materiais: quitosana, P-Quitosana e *scaffold* de RET-P-QuiNCa.

Utilizou-se o equipamento K-alpha XPS da Thermo Scientific, utilizando uma fonte monocromática com ânodo de Alumínio operando com uma energia $K\alpha$ de 1486 eV. Para as análises Survey foram obtidas 20 varreduras com tamanho do spot definido de 400 μm . A energia de passagem foi ajustada para 150 eV, com um passo de energia de 0.500 eV e um tempo de residência de 10 ms. Para os espectros de

alta resolução, o número de varreduras foi aumentado para 100. A energia de passagem foi reduzida para 40.0 eV, com um passo de energia de 0.050 eV e um tempo de residência de 50 ms. A calibração dos espectros foi realizada utilizando metais ouro (Au), prata (Ag) e cobre (Cu).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Reticulação da P-Quitosana com Ácido Tartárico

Neste estudo, a reticulação da P-Quitosana a partir da reação de amidação foi realizada utilizando ácido tartárico como reticulante e EDC e NHS como ativadores da reação. A formação do polímero reticulado, denominado RET-P-QuiN, é mostrado na Figura 28.

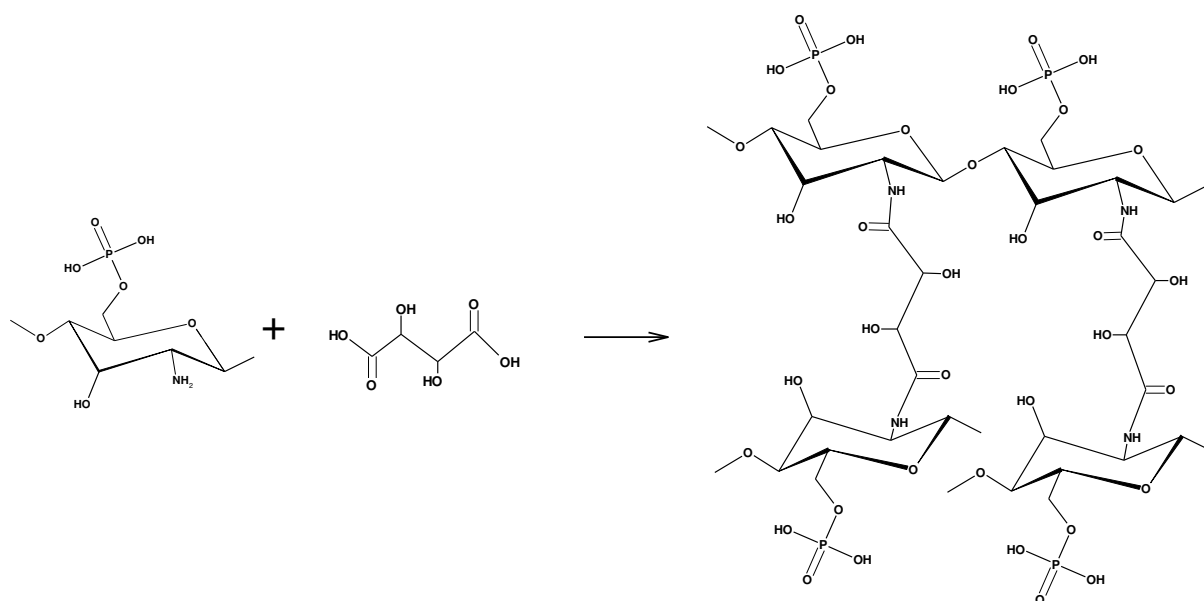


Figura 28: Reação de reticulação da P-Quitosana com formação do RET-P-QuiN.

A Figura 29 ilustra o processo de reticulação da P-Quitosana a partir da formação do reticulante. Inicialmente, o ácido tartárico reage com o EDC formando um intermediário reativo. Com a adição do NHS, a hidroxila ligada ao nitrogênio ataca a carbonila do ácido para formar o reticulante, o qual reage com o grupo amino da P-Quitosana para gerar RET-P-QuiN, um polímero elástico e aderente, como mostra a Figura 30, e solúvel em NaOH.

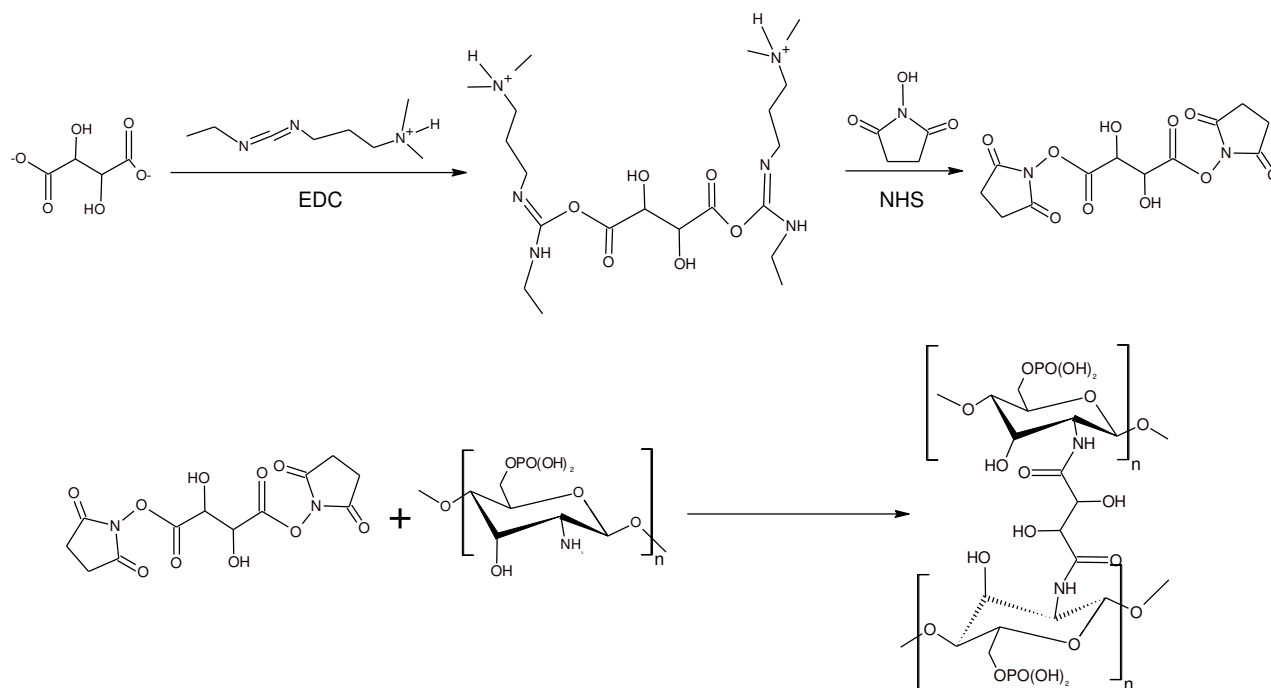


Figura 29: Formação do reticulante e reação de reticulação.

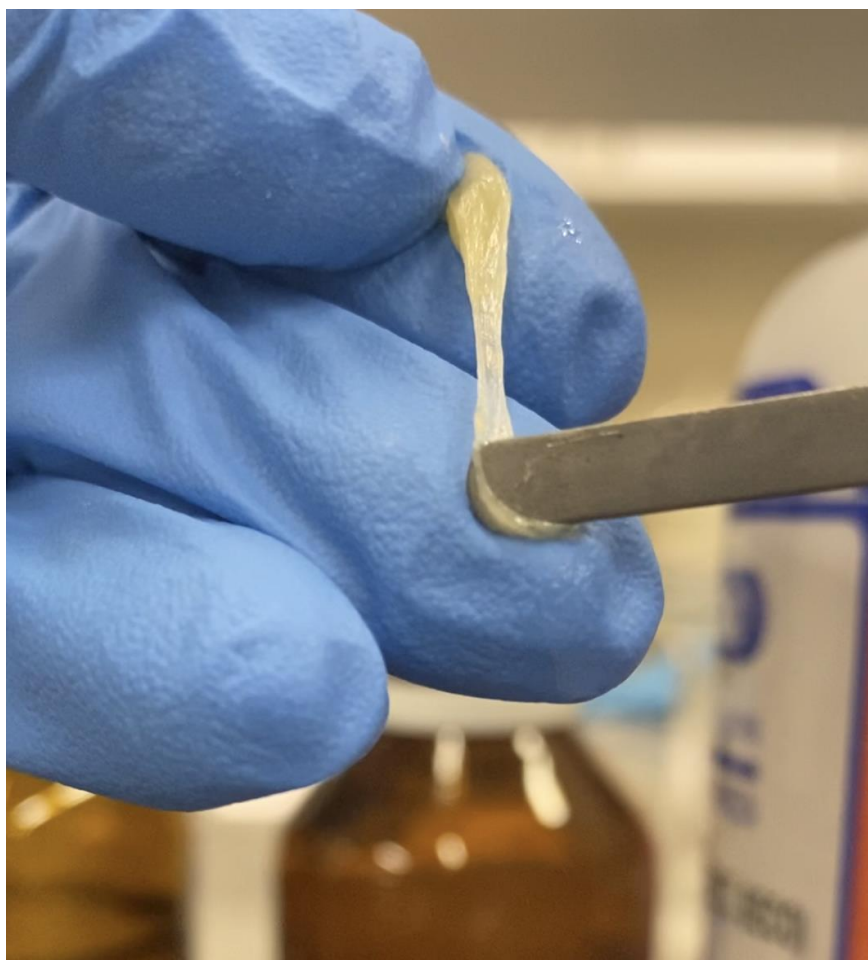


Figura 30: Fotografia demonstrando as características viscoelásticas do material RET-P-QuiN.

3.2 Geleificação Ionotrópica da RET-P-QuiN

O polímero RET-P-QuiN possui grupos fosfatos na sua estrutura e reage com íons cálcio sendo possível reticulá-lo ionotropicamente.

Conforme apresentado na Figura 27, a adição da solução de RET-P-QuiN sobre a solução saturada de íons cálcio, resultou na formação dos cilindros de gel de RET-P-QuiN_{Ca}.

O cilindro de gel foi extrudado da seringa e lavado com solução de NH_4OH $0,1 \text{ molL}^{-1}$ para remover o excesso de cálcio e evitar a lixiviação. O cilindro de gel foi lavado diversas vezes e apresentou boa resistência, mantendo-se transparente e íntegro durante o processo. A Figura 31 mostra o cilindro de gel após as lavagens.

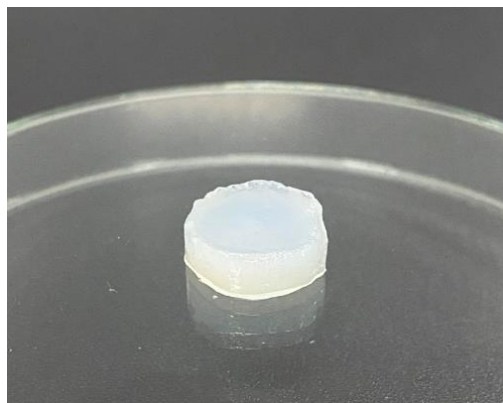


Figura 31: Cilindro de Gel de RET-P-QuiN_{Ca} resultante da Geleificação Ionotrópica de RET-P-QuiN.

O cilindro de gel de RET-P-QuiN_{Ca} deu origem ao *scaffold*, através da técnica ISISA. A Figura 32 mostra uma fotografia do *scaffold* formado por RET-P-QuiN_{Ca} após a liofilização.



Figura 32: Scaffold de RET-P-QuiNCa.

3.3 Caracterização do *scaffold* de RET-P-QuiNCa

3.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A Figura 33 mostra micrografias obtidas por MEV comparando a porosidade típica dos *scaffolds* de quitosana com o *scaffold* de RET-P-QuiNCa.

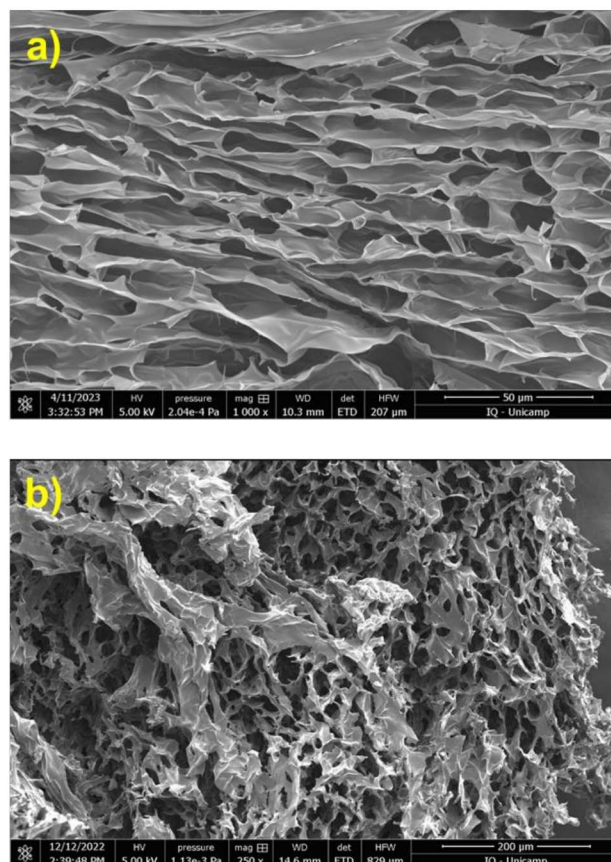


Figura 33: Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) dos materiais: a) Scaffold de quitosana; b) Scaffold de RET-P-QuiNCa

Como pode ser observado pela comparação das micrografias mostradas na Figura 33, o *scaffold* de RET-P-QuiNCa tem poros interconectados e com dimensões em torno de 50 μm , adequadas para a invasão celular e permeação de fluídos corpóreos, o que não é observado no *scaffold* obtido a partir da quitosana.⁹⁶

3.3.2 Espectro de RMN ^{13}C e ^{31}P para *scaffold* de RET-P-QuiNCa

A Figura 34 mostra o espectro de RMN ^{31}P obtido do *scaffold* de RET-P-QuiNCa, apresentando apenas um pico correspondente ao fósforo e, como discutido anteriormente, representa fosfatos do tipo Q^0 ⁶⁰, indicando que durante as reações de reticulação e gelificação, os polifosfatos presentes na P-Quitossana, mostrados na Figura 14, são hidrolisados.

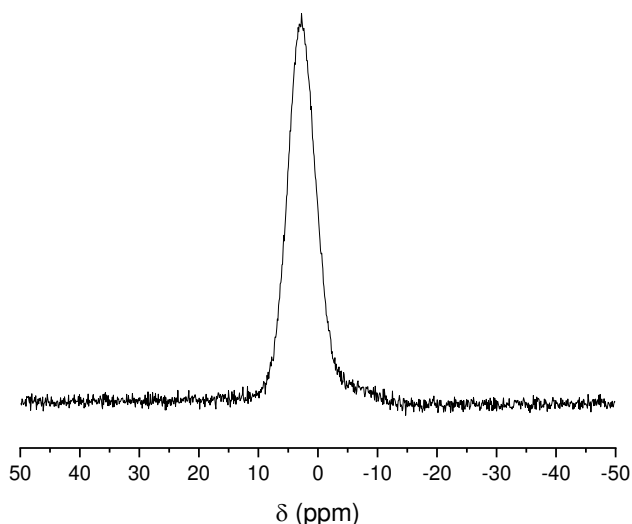


Figura 34: Espectro de RMN ^{31}P da RET-P-QuiNCa.

Ao observarmos o espectro de RMN ^{13}C , apresentado na Figura 35, observa-se um novo pico em 168 ppm, atribuído à carbonila de amidas, indicando a formação da ligação entre o reticulante e o nitrogênio da P-Quitossana. Além disso, o aumento da intensidade do sinal em torno de 73 ppm é atribuído à sobreposição dos sinais do carbono C5 da quitosana e do carbono ligado às hidroxilas do ácido tartárico.⁹⁷ Esse aumento de intensidade, juntamente com o leve deslocamento químico do sinal de C2, evidencia a formação da reticulação entre as cadeias da P-Quitossana.

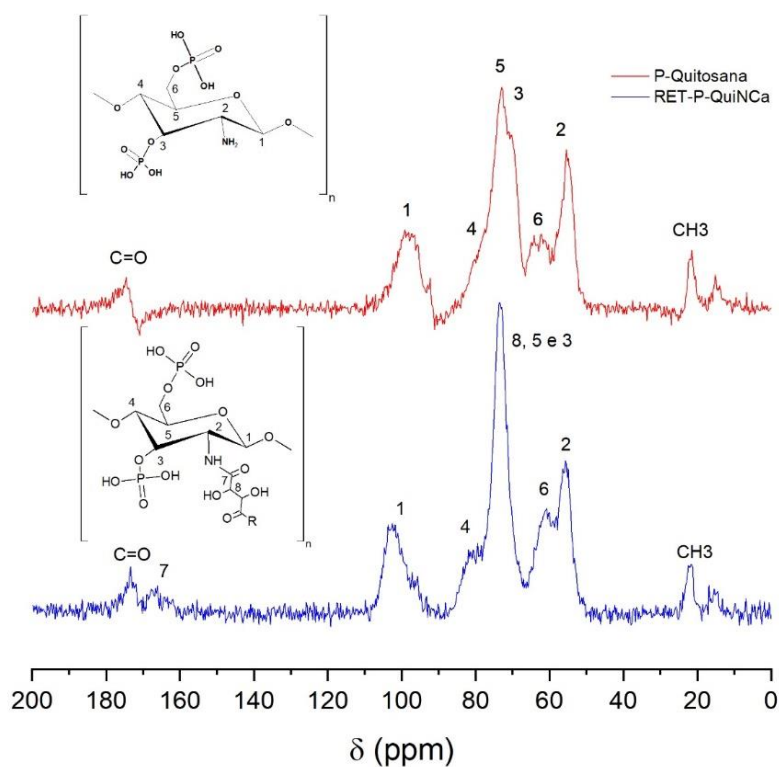


Figura 35: Comparação entre os espectros de RMN ^{13}C da P-Quitosana e do scaffold de RET-P-QuiNCa obtidos em estado sólido.

3.4 Espectroscopia Fotoeletrônica de Raio-X (XPS)

O espectro de XPS da Quitosana, P-Quitosana e *scaffold* de RET-P-QuiNCa estão representados nas Figura 36, Figura 37, Figura 38 e Figura 39 com as energias de ligações (*Binding Energy – BE*) e suas atribuições apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3: Atribuições das deconvoluções para o espectro de XPS da Quitosana, P-Quitosana e RET-P-QuiNCa.

Elemento	Quitosana		P-Quitosana		RET-P-QuiNCa		Atribuição	Referência
	BE (eV)	Proporção da área dos picos (%)	BE (eV)	Proporção da área dos picos (%)	BE (eV)	Proporção da área dos picos (%)		
C_{1s}	286,35	45	286,45	25	286,63	31	C-O	98,99
	284,83	15	285,03	16	284,87	14	CH₂	
	286,6	13	286,56	15	286,47	13	C-N	
	288,04	16,5	287,81	17	287,91	14	O-C-O	
	284,63	4	284,45	6	284,47	4	CH₃	
	289,48	6,5	289,3	6	289,23	9	C=O	
			285,56	15	285,42	15	C-O-P	
N_{1s}	399,63	75	399,67	72	399,66	55	Amina	43,99
	400,91	25	400,62	28	400,45	45	Amida	
O_{1s}	532,9	90	532,81	33	532,7	30	C-O	98,99
	531,04	3	0	0	0	0	H₂O	
	534,42	7	533,91	8	533,32	20	C=O	
			531,25	59	531,27	50	P-O e P=O	
P_{2p}			132,85	28	133,34	65	Q₀ 2_{p3/2}	98,99
			133,35	19	134,3	35	Q₀ 2_{p1/2}	
			133,66	27			Q₁ 2_{p3/2}	
			134,23	17			Q₁ 2_{p1/2}	
			134,82	6			Q₂ 2_{p3/2}	
			135,55	3			Q₂ 2_{p1/2}	

A Figura 36 mostra os sinais C_{1s} da Quitosana, P-Quitosana e RET-P-QuiNCa deconvoluídos. Desta forma, é possível atribuir as bandas de cada carbono, aos diferentes ambientes, presentes nas estruturas dos materiais.

A estrutura molecular da Quitosana exibe uma razão de 3:1:1:1 para os carbonos referentes às ligações C-O, CH₂, C-N e O-C-O, respectivamente. Essa razão também é observada experimentalmente para as proporções entre as áreas dos picos no espectro de XPS para a Quitosana na Figura 36a.

Além da proporção entre os carbonos, os sinais em 284,63 (curva bege) e 289,48 eV (curva azul clara), referentes ao carbono da metila e carbonila,

respectivamente, apresentam uma área de aproximadamente 4% e 6,5% cada, correspondente a aproximadamente $\frac{1}{4}$ de área referente ao sinal da ligação C-N (curva verde), comprovando o grau de acetilação de 25% para a quitosana utilizada como material de partida para todas as sínteses realizadas neste trabalho.

Já para a P-Quitosana, apresentado na Figura 36b, quando comparamos com o espectro C1s da Quitosana, nota-se uma diminuição da área referente a C-O em 286,45 eV (curva vermelha), isso ocorre devido a fosforilação nos grupos hidroxilas da quitosana, fazendo com que um novo pico apareça em 285,56 eV (curva rosa) referente à ligação C-O-P. Além disso, as proporções entre carbonila, metila e C-N, que são observadas na Quitosana, são mantidas na P-Quitosana, reforçando que não houve fosforilação no grupo amino e que a proteção, durante a reação, ocorreu.

Para o *scaffold* de RET-P-QuiNCa, apresentado na Figura 36c, é possível observar um aumento de área referente ao pico da carbonila em 289,23 eV devido a presença do reticulante entre as cadeias.

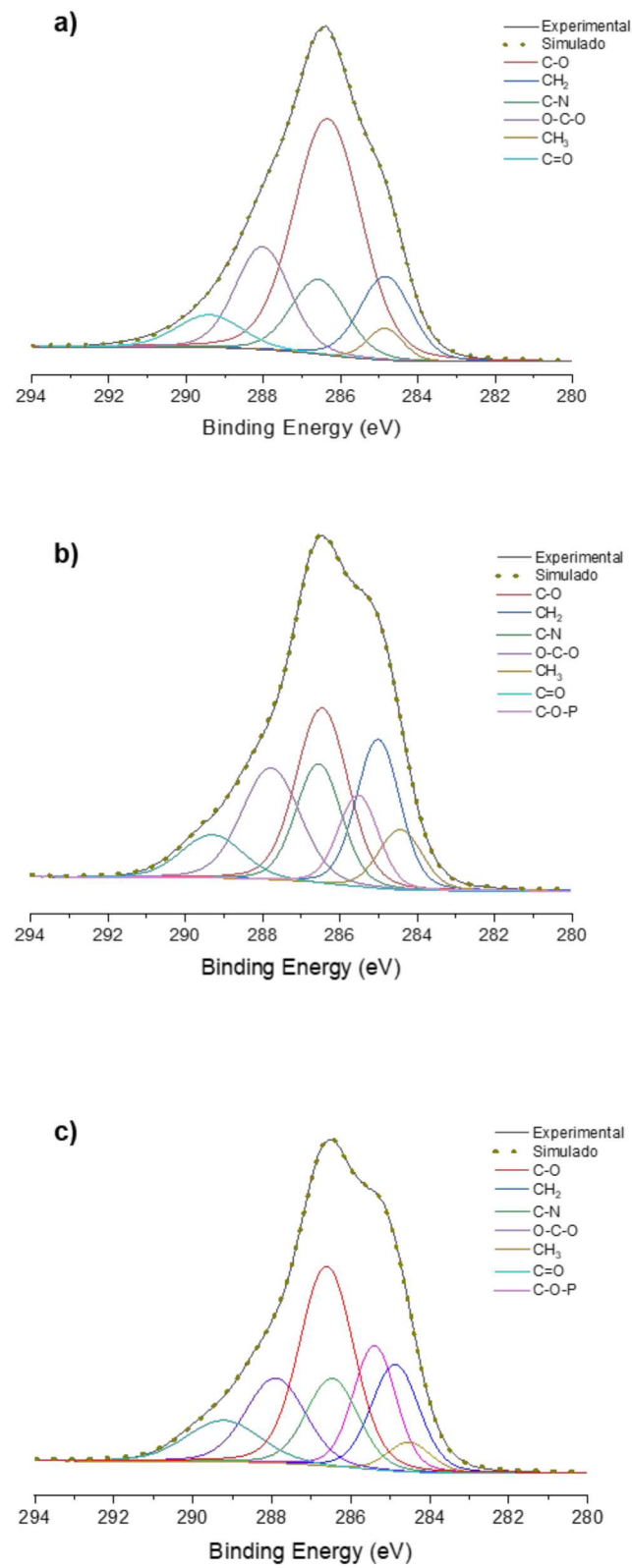


Figura 36: Espectro Fotoeletrônico de Raio X de alta resolução do elétron C_{1s} : a) Qitosana; b) P-Qitosana; c) RET-P-QuiNca.

A Figura 37 mostra os sinais N1s da Quitosana, da P-Quitosa e do *scaffold* de RET-P-QuiNCa deconvoluídos. Ao compararmos a Quitosana e P-Quitosa observa-se que a proporção entre os grupos amino e amida são mantidas, mostrando que esses grupos não participam da reação de fosforilação. Quando comparamos com o *scaffold* de RET-P-QuiNCa (Figura 37c) observamos um aumento de área referente à amida devido à reação de reticulação, que ocorre no grupo amino.

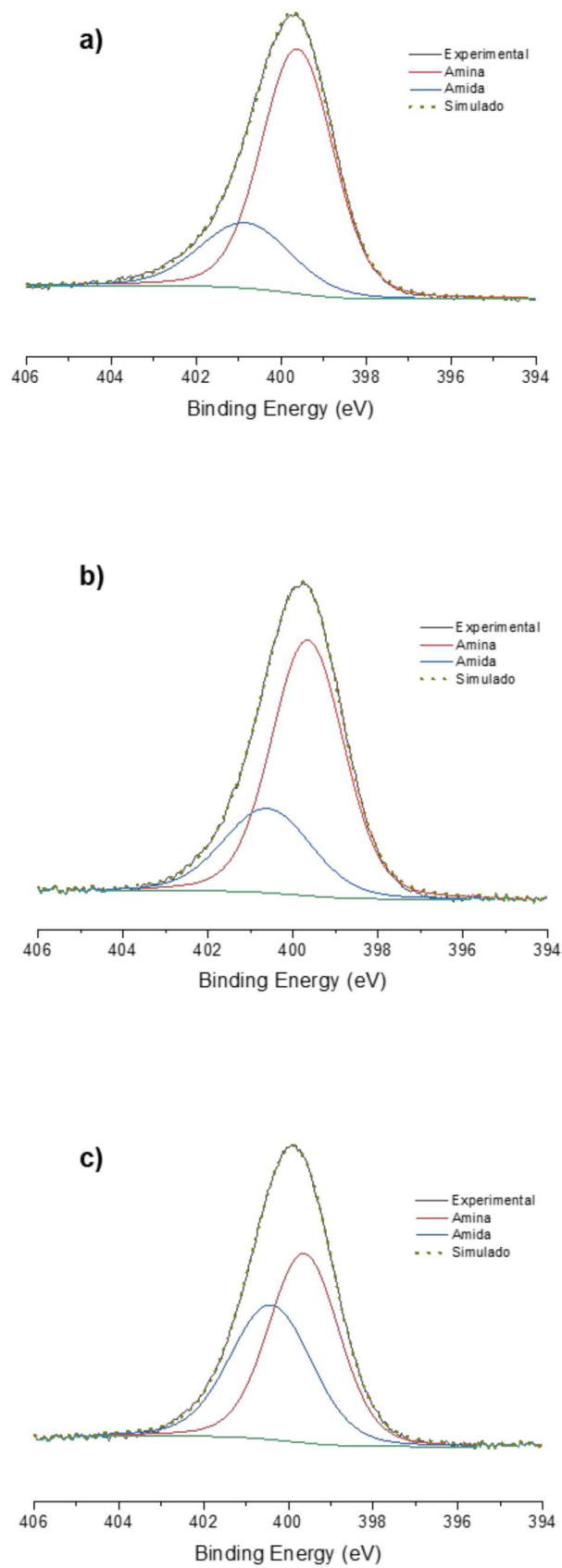


Figura 37: Espectro Fotoeletrônico de Raio X de alta resolução do elétron N_{1s} : a) Quitosana; b) P-Quitosana; c) RET-P-QuiNCa.

A Figura 38 mostra os sinais O1s da Quitosana, da P-Quitosana e do *scaffold* de RET-P-QuiNCa deconvoluídos. No espectro de O1s da Quitosana na Figura 38a observa-se um sinal intenso em torno de 532,9 eV (curva vermelha) associado aos oxigênios ligados ao carbono (C-O), e outros dois sinais menos intensos, um em 530,98 eV (curva rosa), referente à carbonila do fragmento acetilado, e outro em 534,40 eV (curva roxa), relacionado ao oxigênio entre dois carbonos do anel da quitosana.

Já para a P-Quitosana na Figura 38b, temos o perfil do espectro deslocado para menores energias de ligação. Conforme discutido anteriormente, reações de fosforilação utilizando P_2O_5 podem gerar estruturas tetraédricas conhecidas como fosfatos vítreos. A análise por XPS de fosfatos vítreos vem sendo reportada há anos e muitos estudos apontam que espectros O1s de fosfatos vítreos podem ser divididos em dois diferentes componentes.⁹⁸ O primeiro, com maior energia de ligação em aproximadamente 532 eV (curva vermelha), correspondente ao oxigênio em ponte (P-O-P) e sobreposto com o sinal de C-O, enquanto o segundo, em torno de 531 eV (curva azul), está associado aos oxigênios terminais, como P=O e P-O, sobreposto com o sinal do C=O. Estes sinais indicam que há polifosfatos na estrutura da P-Quitosana, gerados a partir da reação de fosforilação utilizando P_2O_5 .

Ao se analisar o *scaffold* de RET-P-QuiN na Figura 38c, observamos uma alteração nas proporções dos sinais em 532 eV e 531 eV. Isso ocorre por conta da reação de reticulação, a adição do ácido tartárico na estrutura do material contribui com o aumento do sinal de C=O, indicando que a reticulação ocorreu através desse fragmento específico. Porém, durante a reação os polifosfatos são hidrolisados, diminuindo as ligações do oxigênio em ponte, corroborando com o observado na análise de RMN ^{31}P .

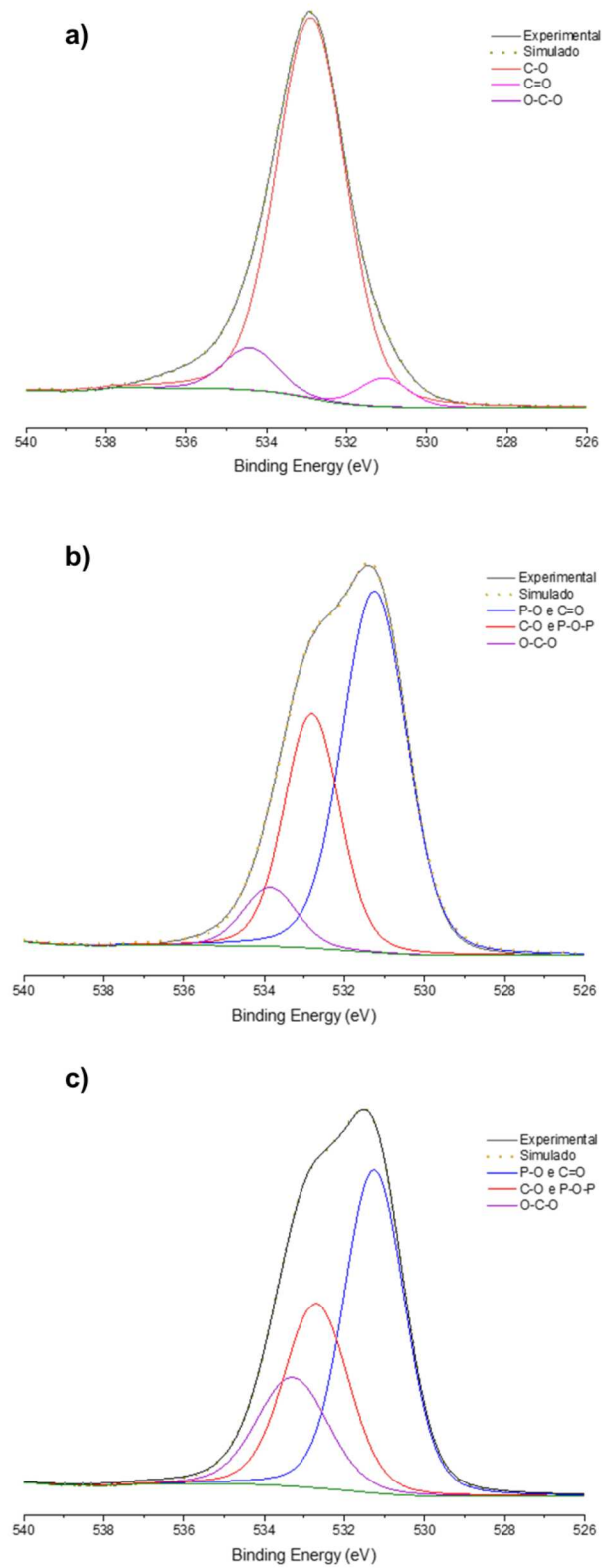


Figura 38: Espectro Fotoeletrônico de Raio X de alta resolução do elétron O_{1s} : a) Quitosana; b) P-Quitosana; c) RET-P-QuiNCA.

Ao analisarmos os espectros P2p da P-Quitosana e do *scaffold* de RET-P-QuiNCa, apresentados na Figura 39, verificamos que houve uma diminuição dos tipos de fósforo, o mesmo observado no RMN ^{31}P , mostrado na Figura 34. No espectro P2p do *scaffold* de RET-P-QuiNCa temos apenas um pico, que pode ser deconvoluído em dois componentes spin-órbita, um em 133,34 eV referente à $\text{Q}^0 \text{P}2\text{p}_{3/2}$ e outro em 134,30 eV referente à $\text{Q}^0 \text{P}2\text{p}_{1/2}$. Já na P-Quitosana, observamos três tipos de fósforos com seus respectivos sinais spin-órbita na mesma proporção observada no RMN ^{31}P , apresentado na Figura 14. O que indica que durante a reação de reticulação, os polifosfatos foram hidrolisados.

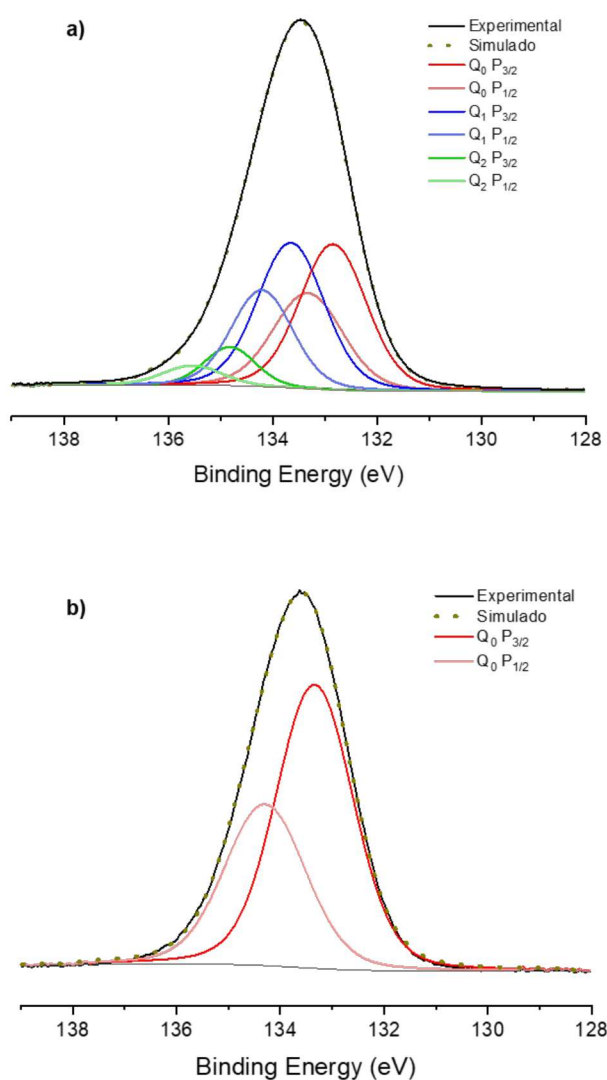


Figura 39: Espectro Fotoeletrônico de Raio X de alta resolução do elétron $\text{P}_{2\text{p}}$: a) P-Quitosana; b) RET-P-QuiNCa.

A partir das análises de XPS podemos concluir que a Quitosana, utilizada como material de partida, apresentava 25% de acetilação e durante a fosforilação essa proporção se manteve na P-Quitosana, mostrando que o grupo amino foi protegido e não participou da reação. Além disso, comprovou-se que a reação de fosforilação gerou polifosfatos, corroborando com os estudos utilizando P_2O_5 como fonte de fosfatos.

Já para o *scaffold* de RET-P-QuiNCa, podemos observar a presença do reticulante ligado ao polímero devido ao aumento da área do pico referente à amida. Entretanto, os polifosfatos foram hidrolisados, apresentando apenas um tipo de fósforo ligado ao polímero.

4. CONCLUSÃO

Com a caracterização detalhada da P-Quitosana e a comprovação de que o grupo amino foi preservado na reação de fosforilação, foi possível explorar outras reações a partir da P-Quitosana devido a presença de dois grupos reativos no material.

A reticulação química com ácido tartárico, mediado por EDC e NHS, interconectou as cadeias do material, como observado nas análises de RMN e XPS. Essa modificação conferiu ao material reticulado (RET-P-QuiN) propriedades mecânicas diferenciadas, tornando-o elástico, aderente e solúvel em meio básico.

Além da reticulação química, a presença de grupos fosfatos permitiu a exploração de uma segunda estratégia de reticulação, a gelificação ionotrópica. Os fosfatos quando desprotonados interagiram com íons cálcio, resultando na formação de um gel estável que pode se transformar em uma matriz porosa com características de *scaffolds* e poros adequados para aplicações biológicas.

Desta forma, as modificações propostas para a P-Quitosana resultaram em um material com propriedades diferentes se comparado a quitosana. A combinação da reticulação química e física permitiu a obtenção de um material capaz de formar estruturas porosas, expandindo o potencial de aplicação da quitosana em diversas áreas.

CAPÍTULO 03

SCAFFOLD DE RET-P-QuiNCa: UM AMBIENTE PROMISSOR PARA CÉLULAS E NOVAS PERSPECTIVAS

1. INTRODUÇÃO

Em um organismo vivo as células realizam atividades biológicas em respostas a estímulos de um ambiente altamente complexo. A composição da matriz, na qual elas estão dispersas e as interações célula-célula e célula-matriz são fundamentais para o funcionamento do organismo. Para mimetizar esse microambiente complexo e estudar o comportamento das células, a cultura celular tridimensional (3D) utilizando *scaffolds* vem sendo fundamental.^{100,101}

A construção representada por uma matriz 3D porosa e biocompatível dos *scaffolds*, simula a matriz extracelular e influencia na adesão, proliferação, migração e diferenciação celular. Desta forma, para satisfazer esta condição fundamental, o desenvolvimento de um *scaffold* deve envolver condições apropriadas que determinam a resposta celular e a regeneração do tecido.^{100,101}

O *scaffold* de RET-P-QuiNCa, desenvolvido neste trabalho, apresenta características que o torna promissor para aplicações como biomaterial para reparos em tecidos danificados. Além da estrutura porosa com poros interconectados, paredes finas e dimensões adequadas para a proliferação celular. Sua composição corresponde a materiais e espécies biocompatíveis e participantes dos processos bioquímicos do organismo.^{40,102,103}

Diante do potencial que o *scaffold* de RET-P-QuiNCa apresenta para possíveis aplicações biológicas, este Capítulo será dedicado para avaliar sua biocompatibilidade. Através de teste de citotoxicidade e citocompatibilidade para células de fibroblastos NIH 3T3.

A escolha do método de ensaio de citotoxicidade depende da característica do material a ser avaliado. Para biomateriais sólidos, podemos realizar os testes por contato direto, indireto ou por extrato, conforme ilustrado na Figura 40, permitindo uma avaliação qualitativa, semiquantitativa ou quantitativa da citotoxicidade.¹⁰⁴

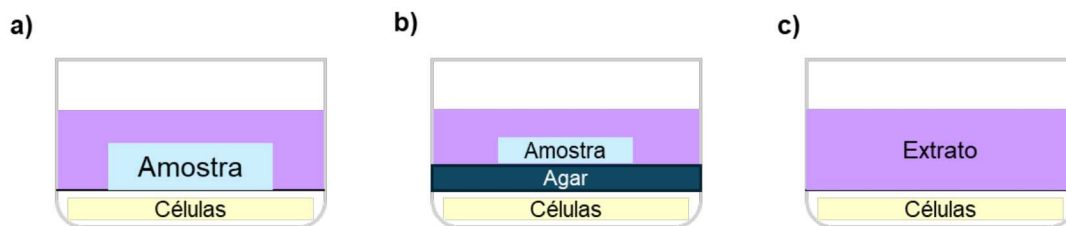


Figura 40: Ensaios de citotoxicidade in vitro. (a) Contato direto, (b) difusão em ágar e (c) ensaios baseados em extrato.

Enquanto os testes de citotoxicidade avaliam a morte celular, os testes de citocompatibilidade avaliam a resposta da célula a um biomaterial.¹⁰⁴ Com isso, será avaliado a citotoxicidade do extrato do *scaffold* de RET-P-QuiNCa e a citocompatibilidade do material, utilizando os testes de MTT, Calceína-AM e imageamento de células marcadas com Calceína, Iodeto de Propídeo e Hoechst.

O teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) avalia a viabilidade celular através da quantificação da atividade enzimática mitocondrial. Todas as células eucariontes são ricas em enzimas desidrogenase mitocondrial, essenciais para a produção de ATP. A enzima succinato desidrogenase, presente nas mitocôndrias, cliva o anel tetrazólico do reagente MTT, cristal amarelo, em um cristal de formazan de coloração violeta insolúvel em água, conforme ilustrado na Figura 41.¹⁰⁴

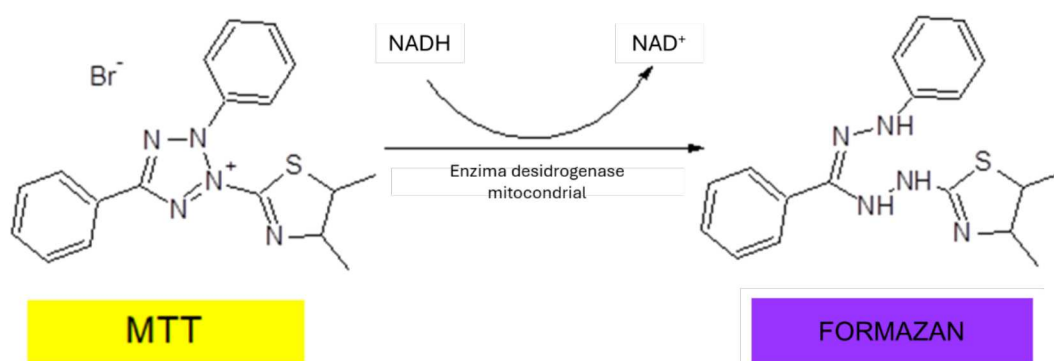


Figura 41: Reação do teste de MTT.

Os cristais de formazan são extraídos com solvente adequado e analisados por absorvância em 570nm. A amostra é considerada citotóxica se a viabilidade ou atividade metabólica das células for menor que 70%.¹⁰⁴

Diferente do teste de MTT, que avalia a atividade metabólica através da quantificação do formazan, a Calceína-AM avalia a integridade da membrana plasmática, essencial para células vivas. A perda da integridade da membrana está associada ao processo de morte celular.

A Calceína-AM (éster acetoximetil calceína), um éster não fluorescente, permeia facilmente a membrana celular. Uma vez dentro das células, as enzimas esterase hidrolisam a Calceína-AM em calceína fluorescente. A membrana celular de células saudáveis é impermeável à calceína fluorescente, ficando retida no seu interior. Desta forma, é possível quantificar as células vivas através da fluorescência.¹⁰⁴

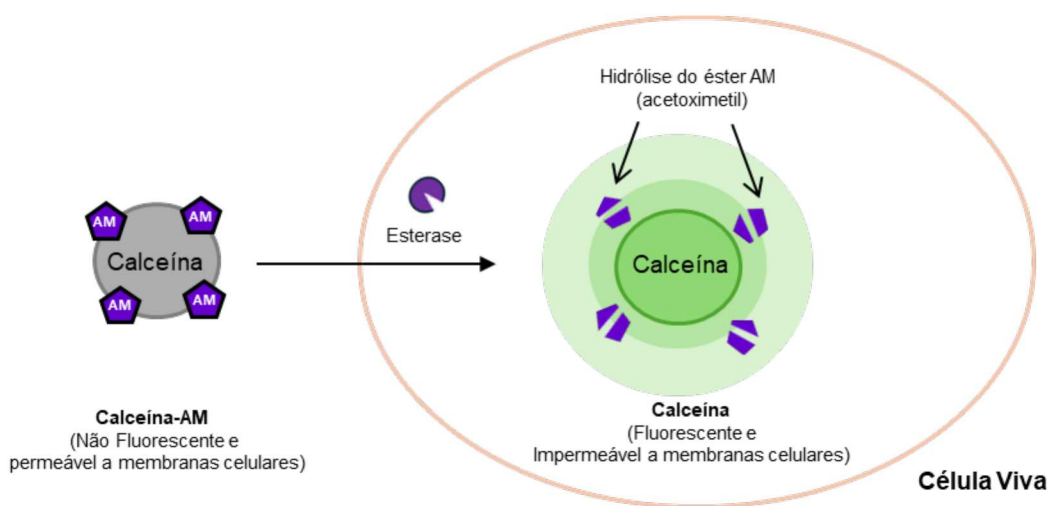


Figura 42: Ilustração da hidrólise da Calceína-AM pelas enzimas esterase em células vivas.

A utilização de corantes fluorescentes para células vem sendo amplamente aplicados em estudos de viabilidade celular. Dentre os corantes mais comuns, estão a calceína-AM, o iodeto de propídio (PI) e o Hoechst.

A Calceína-AM, como citado anteriormente, é um corante fluorescente verde que indica a atividade enzimática da célula, fazendo fluorescer somente células saudáveis. Já o Iodeto de Propídio (PI) é um corante fluorescente vermelho que se liga ao DNA, permeando apenas membranas celulares comprometidas indicando as células mortas. O Hoechst, um corante azul fluorescente, se liga especificamente às bases nitrogenadas do DNA, sendo utilizado para determinar a contagem total de células, sendo capaz de permear tanto células viáveis quanto não viáveis.¹⁰⁴

As células coradas pela combinação da Calceína-AM, Iodeto de Propídeo (PI) e Hoechst em um meio de cultura celular, permite identificar as frações de células vivas e células mortas em uma população.

2. METODOLOGIA

Em estreita colaboração com o Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual do Instituto de Biologia da Unicamp, os experimentos deste capítulo foram realizados no Laboratório de Biomembranas, coordenado pela Profa. Dra. Eneida de Paula, e colaboração da mestrandia Talita Cesarim e no Laboratório de Interações Nanopartícula-Célula, coordenado pelo Prof. Dr. Marcelo Bispo, e colaboração do doutorando André Lopes.

2.1 Teste de estabilidade do *scaffold* de RET-P-QuiNCa

Para garantir a integridade do *scaffold* de RET-P-QuiNCa durante os testes biológicos, realizou-se um teste de estabilidade em meio de cultura (DMEM) a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas.

A estabilidade do *scaffold* de RET-P-QuiNCa foi comparada com a de um *scaffold* de quitosana, preparado a partir de soluções de quitosana a 3% em ácido acético 0,1 molL⁻¹, congelados e liofilizados conforme item 2.3 do Capítulo 02.

Os *scaffolds* de RET-P-QuiNCa e de quitosana foram incubados em placa com 12 poços por 24 horas em DMEM e fotografados.

2.2 Teste de Citotoxicidade do extrato do *scaffold* de RET-P-QuiNCa

2.2.1 Preparação do extrato do *scaffold* de RET-P-QuiNCa e adição à cultura de fibroblastos NIH 3T3.

Extratos dos *scaffolds* de RET-P-QuiNCa foram obtidos incubando-se 32 mg do *scaffold* em 3 mL de meio FluoroBrite™ DMEM por 24 horas.

Em paralelo, as células de fibroblastos (NIH 3T3) foram plaqueadas a uma densidade de 5 mil células por poço, em uma placa de 96 poços, e cultivadas por 24 horas em meio FluoroBrite™ DMEM, sob condições padrão (37 °C e 5% de CO₂).

O meio de cultura das células foi substituído pelo extrato do *scaffold* e incubado por 24 horas.

Para o controle dos testes de citotoxicidade as células foram incubadas sob as mesmas condições dos testes descritos no parágrafo anterior, porém com o uso apenas do meio de cultura, sem o extrato do *scaffold*.

2.2.2 Teste de citotoxicidade do extrato de *scaffold* de RET-P-QuiNCa via MTT

Após a incubação e tratamento das células com o extrato, como descrito em 2.2.1, o meio de cultura das células foi substituído por uma solução de MTT (1,0 mg mL⁻¹ em DMEM) e após 3 horas, o meio foi removido e os cristais de MTT foram dissolvidos em 100 µL de DMSO.

A placa foi homogeneizada por 5 minutos em um agitador orbital e a absorbância foi medida em um leitor de múltiplos modos de imagem Cytation 5 (Biotek, EUA) a 570 nm. Os dados de viabilidade celular foram determinados por três experimentos independentes (n = 3).

2.2.2 Teste de citotoxicidade do extrato de *scaffold* de RET-P-QuiNCa via Ensaio Calceína-AM

Após o tratamento com o extrato, as células foram incubadas com 50 µL da solução de Calceína-AM (0,025 µmol L⁻¹ em FluoroBrite™ DMEM) por 30 minutos a 37° C e 5% de CO₂. A fluorescência foi medida no equipamento Cytation 5, com excitação em 494 nm e emissão em 517 nm.¹⁰⁵ A citotoxicidade foi obtida comparando-se a fluorescência do controle e da amostra.

2.2.3 Análise das células marcadas com Calceína/PI/Hoechst

Após o tratamento das células com o extrato, as células foram incubadas com 50 µL de uma solução contendo os fluoróforos Calceína AM (0,025 µmol L⁻¹), iodeto de propídio (PI) (1 µg mL⁻¹) e Hoechst (1 µg mL⁻¹) em meio FluoroBrite™ DMEM por 30 minutos a 37 °C e 5% de CO₂.

As placas foram analisadas no equipamento Cytation 5 e fotografadas em seis campos diferentes e em três canais de fluorescência, DAPI ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 358/461 nm), PI ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 530/622 nm) e GFP ($\lambda_{Ex}/\lambda_{Em}$ = 395/509 nm), com aumento de 10x. Após a aquisição das imagens, os núcleos corados com Hoechst (canal DAPI,

fluorescência no azul) foram contados, representando o total de células, e os núcleos corados com iodeto de propídio (canal PI, fluorescência no vermelho), também foram contados, representando as células mortas.

A partir desses dados, a quantidade de células viáveis foi calculada utilizando a equação 1.

Esse valor foi então usado na equação 2, obtendo assim a porcentagem de células viáveis contadas por poço.

1

$$\text{Células Viáveis da Amostra} = (\text{Núcleos corados com Hoechst} - \text{Núcleos corados com PI})$$

2

$$\text{Células Viáveis (\%)} = \left(\frac{\text{Células Viáveis da Amostra}}{\text{Células Viáveis do Controle}} \right) \times 100$$

2.3 Teste de Citocompatibilidade das células no *scaffold* de RET-P-QuiNCa

Para o estudo de citocompatibilidade, os *scaffolds* de RET-P-QuiNCa (32 mg) foram imersos em 3 mL de meio de cultura DMEM, em uma placa de 12 poços, e acondicionados por 24 horas em condições padrões.

Após este período, o meio foi retirado e as células foram plaqueadas, juntas ao *scaffold*, a uma densidade de $5 \cdot 10^5 \text{ mL}^{-1}$, sob condições padrões, por períodos de 24, 72 e 120 horas.

Após cada período, as células foram incubadas, na presença dos *scaffolds*, com 50 μL de uma solução contendo Calceína AM ($0,025 \mu\text{mol L}^{-1}$), iodeto de propídio ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) e Hoechst ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) dissolvidos em meio FluoroBrite™ DMEM. Após 30 minutos de incubação a 37°C e 5% de CO_2 , imagens foram capturadas manualmente usando o equipamento Cytation 5.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Teste de estabilidade do *scaffold* de RET-P-QuiNCa em meio de cultura DMEM

A Figura 43 mostra a foto dos *scaffolds* de quitosana e RET-P-QuiNCa antes da adição do meio de cultura e após terem sido incubados por 24 horas em meio de cultura DMEM. O resultado indica a maior estabilidade dos *scaffolds* de RET-P-QuiNCa. Enquanto os *scaffolds* de RET-P-QuiNCa não deliquescem e permanecem imersos no meio de cultura celular (Figura 43B), os *scaffolds* de quitosana não imergem no meio de cultura (Figura 43A), mostrando que os poros não são conectados e tampouco adsorvem este fluído mantendo a coloração branca.

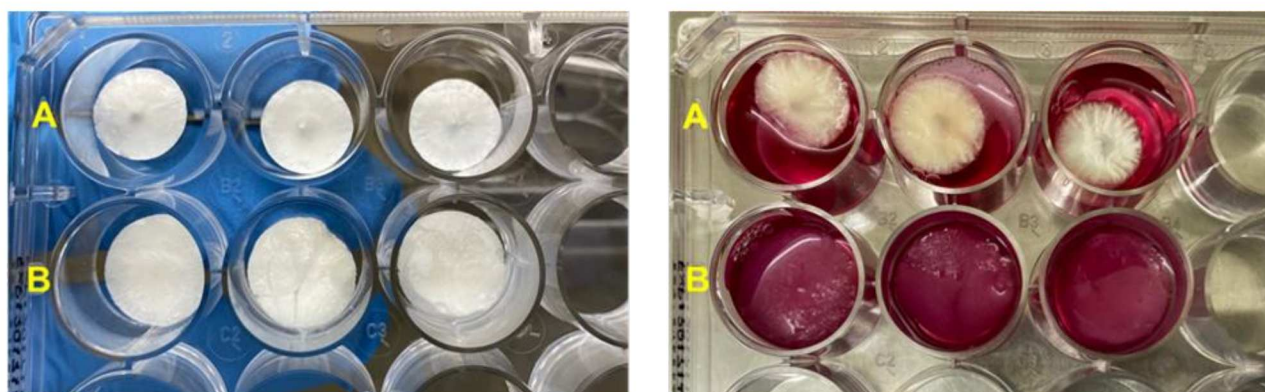


Figura 43: Teste de Estabilidade dos (A) Scaffolds de Quitosana e (B) RET-P-QuiNCa em meio de cultura. Imagem a esquerda: scaffolds sem meio de cultura. Imagem à direita: scaffolds após 24h no meio de cultura.

A estabilidade apresentada pelo *scaffold* de RET-P-QuiNCa em meio de cultura, indicando uma estrutura porosa, interconectada, que permite a permeação do meio de cultura, indica que eles são adequados para serem submetidos aos testes de citotoxicidade e citocompatibilidade.

3.2 Teste de citotoxicidade: Efeito do extrato de *scaffold* RET-P-QuiNCa sobre culturas de fibroblastos NIH 3T3

A viabilidade celular dos extratos do *scaffold* foi comparada ao controle nos ensaios de MTT, Calceína-AM, PI-Hoechst e micrografia, e os resultados obtidos estão discutidos nos itens abaixo.

3.2.1 Teste de Citotoxicidade do extrato do *scaffold* de RET-P-QuiNCa pelo ensaio MTT

A análise de MTT, um método quantitativo, colorimétrico e indireto, é utilizado como indicador da atividade metabólica de células viáveis através da leitura da absorbância em 570 nm da solução de formazan gerado após tratamento das células com MTT. O gráfico da Figura 44 apresenta a viabilidade celular do controle e do extrato do *scaffold* de RET-P-QuiNCa.

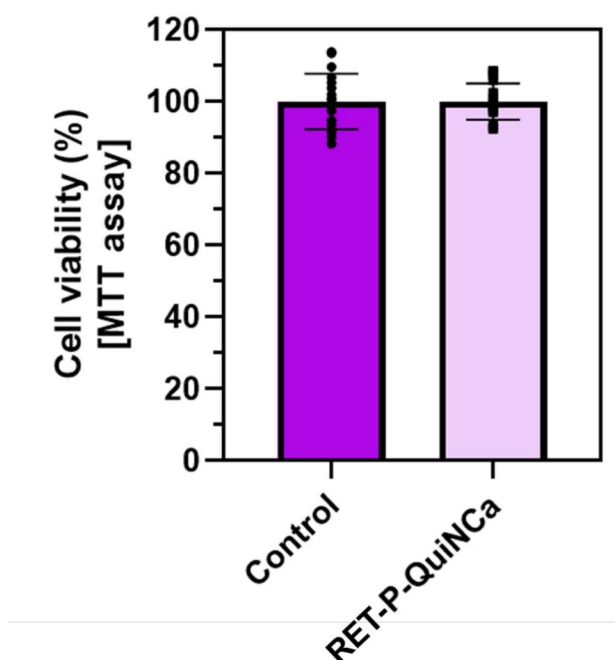


Figura 44: Viabilidade celular de células NIH 3T3 na presença do extrato de RET-P-QuiNCa por 24h determinada pelo ensaio MTT. Os pontos no gráfico representam as médias e desvios-padrão de três experimentos.

A análise do gráfico mostra que o material não é citotóxico às células de fibroblastos 3T3, pois não são observadas diferenças estatísticas na viabilidade

celular de acordo com o teste t (comparação de médias com controle) com $p < 0,05$, entre o tratamento e o controle.

3.2.2 Teste de citotoxicidade do extrato de *scaffold* de RET-P-QuiNCa via Ensaio Calceína-AM.

Outra forma de avaliar a viabilidade celular é por meio do ensaio de Calceína-AM, que determina as células viáveis pela atividade da esterase.

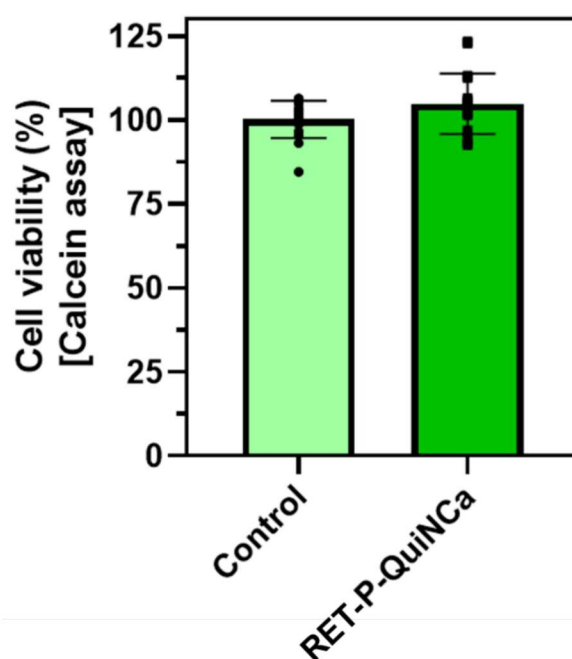


Figura 45: Viabilidade celular de células NIH 3T3 na presença do extrato de RET-P-QuiNCa por 24h determinada por Calceína-AM. Os pontos no gráfico representam as médias e desvios-padrão de três experimentos.

A viabilidade celular foi avaliada usando a intensidade de fluorescência da calceína ($n=3$), presente apenas em células vivas. Os valores de viabilidade foram normalizados para células não tratadas, que foram consideradas como tendo 100% de viabilidade. Análises estatísticas foram realizadas para comparar a viabilidade de células tratadas com o extrato do *scaffold* e com células não tratadas, onde a viabilidade permaneceu próximo a 100 % em ambos os casos (controle e tratado), reforçando que o *scaffold* de RET-P-QuiNCa não compromete a viabilidade celular.

3.2.3 Análise das células marcadas com Calceína/PI/Hoechst

Nesta análise a viabilidade celular foi avaliada pela marcação com os fluoróforos Hoechst (canal DAPI), Calceína (canal GFP) e Iodeto de propídio (canal PI). Utilizando a Equação 1 e 2, obteve-se o gráfico apresentado na Figura 46.

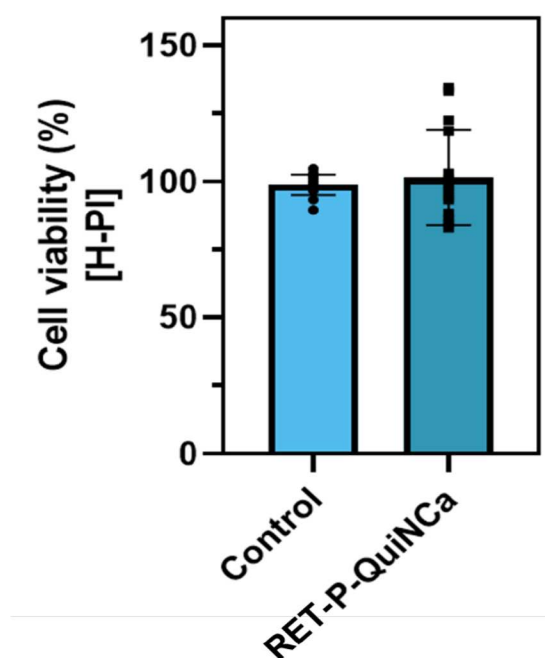


Figura 46: Viabilidade celular de células NIH 3T3 na presença do extrato de RET-P-QuINCa por 24h determinada pela marcação com Hoechst e PI. Os pontos no gráfico representam as médias e desvios-padrão de três experimentos.

Análises estatísticas foram realizadas para comparar a viabilidade de células tratadas com o extrato do *scaffold* e com células não tratadas, resultando em $p < 0,05$; onde não foram encontradas diferenças de viabilidade entre os tratamentos.

Além disso, a análise de micrografia do controle e da amostra (Figura 47d e Figura 47e) confirma a não toxicidade, por meio de diversos métodos de coloração celular. O fluoróforo Hoechst, observado no canal DAPI, é utilizado para marcação de DNA, permitindo a contagem total de células (vivas e mortas). A coloração com calceína, observada no canal GFP, fluoresce verde, indicando que a atividade da esterase está presente apenas em células viáveis e metabolicamente ativas.¹⁰⁶ Já o iodeto de propídio, observado no canal PI, cora exclusivamente o núcleo de células com a membrana plasmática comprometida, referidas como células mortas. Os

resultados obtidos usando um modelo de células 3T3 não mostram efeitos tóxicos significativos in vitro, demonstrando assim o potencial atóxico do material.

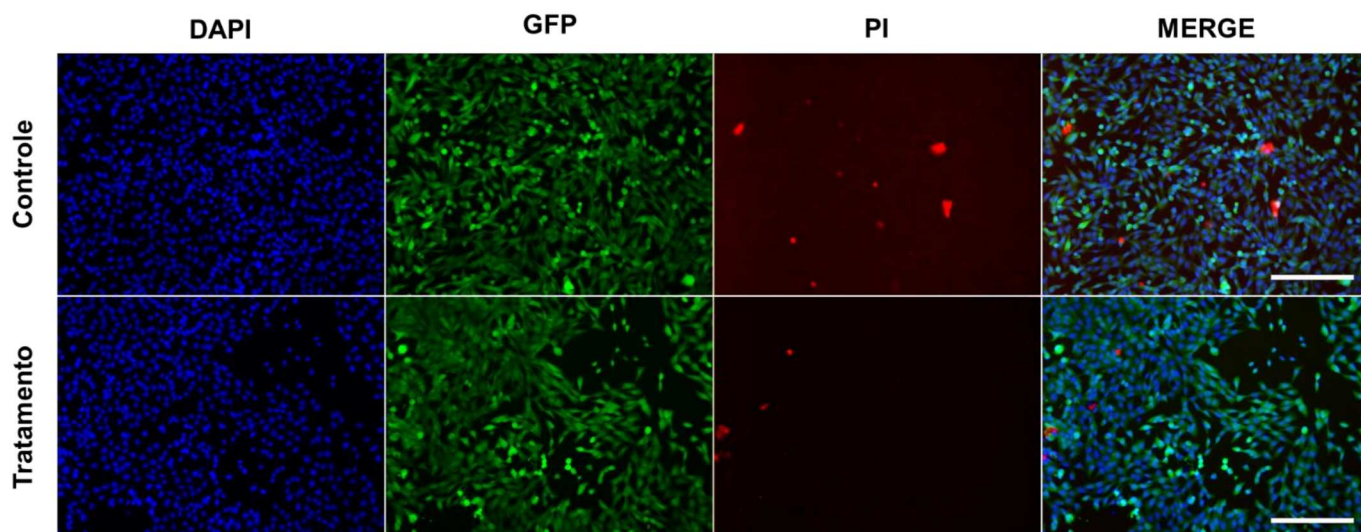


Figura 47: Análise de citotoxicidade do P-quiNCa em células de fibroblastos embrionários 3T3 determinada através do uso dos fluoróforos Hoechst (canal DAPI), Calceína (canal GFP), iodeto de propídio (canal PI) para controle e para 24 hora de exposição ao extrato do scaffold de RET-P-QuiNCa. Os dados foram normalizados considerando o controle como 100% (controle foi plotado segundo o desvio padrão).

2.3 Teste de Citocompatibilidade das células no *scaffold* de RET-P-QuiNCa

A Figura 48 apresenta a análise de citocompatibilidade do *scaffold* de RET-P-QuiNCa desenvolvido em células de fibroblastos 3T3, em meio FluoroBrite™ DMEM sob condições padrões, em três intervalos de tempo: 24 horas, 72 horas e 120 horas. A análise foi realizada utilizando marcação com os fluoróforos: Hoechst (DAPI), Calceína AM (GFP) e iodeto de propídio (PI), além de imagens de contraste. As imagens foram capturadas manualmente, focando em regiões onde as células estavam em contato direto com o *scaffold*.

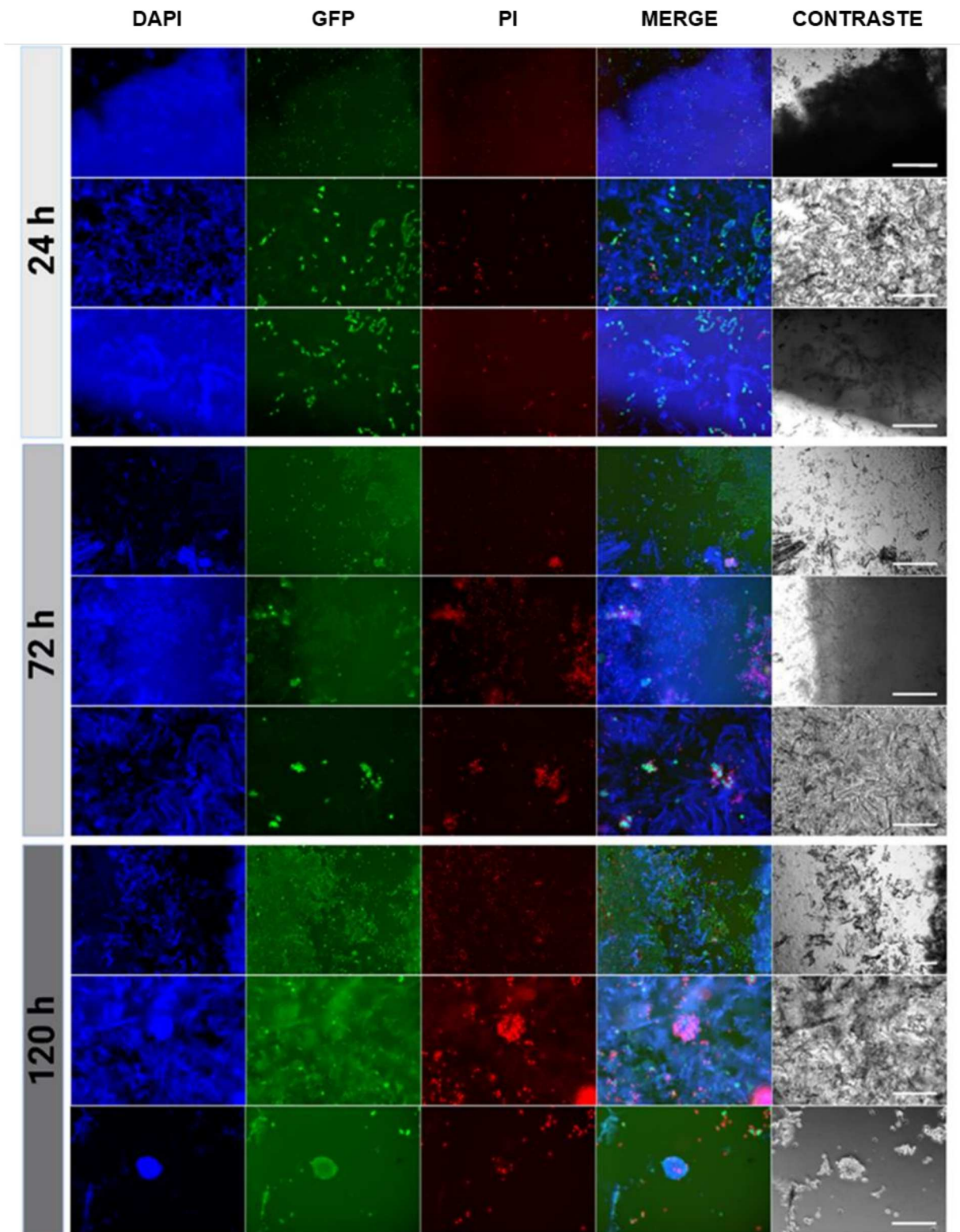


Figura 48: Análise da biocompatibilidade do scaffold de RET-P-QuiNCa em células de fibroblastos 3T3 em diferentes intervalos de tempo (24 h, 72 h e 120 h). O conjunto de 3 imagens, para cada intervalo de tempo, indicam as triplicatas realizadas.

Observando as imagens de contraste de fase, é possível identificar claramente a presença do material (partes mais escuras) sobre as células. Nas imagens de 24 horas, observa-se uma intensa coloração azul (canal DAPI), decorrente da emissão de fluorescência azul do próprio *scaffold* de RET-P-QuiNCa. Nesse mesmo canal, encontra-se a marcação dos núcleos celulares em azul. A marcação verde com Calceína (GFP) sugere que a maioria das células marcadas estão metabolicamente ativas e viáveis, além de possuir integridade de membrana. A marcação vermelha com PI indica poucas células mortas, sugerindo que o *scaffold* não é citotóxico em exposições curtas, como 24 horas.

Após 72 horas de exposição ao *scaffold* de RET-P-QuiNCa, observa-se uma diminuição na viabilidade celular, quando comparado ao período de 24 horas, caracterizada pela redução da fluorescência verde da Calceína e aumento da fluorescência vermelha (PI).¹⁰⁷ No entanto, a quantidade de células viáveis ainda parece ser significativa, sugerindo que o *scaffold* começa a ter algum efeito adverso com o tempo, mas ainda não é altamente citotóxico. Podemos levantar a hipótese de que o aumento no número de células mortas seja decorrente da movimentação e estresse mecânico do *scaffold* sobre as células que ficaram aderidas no fundo do poço. O que corrobora essa hipótese é a observação das células mortas estarem abaixo do *scaffold* e de uma grande quantidade de células viáveis nas regiões mais distantes do *scaffold*.

Nas imagens de 120 horas de exposição ao material, observa-se um aumento na densidade celular, sugerindo uma proliferação celular. Entretanto, ao observarmos as células marcadas com calceína e PI, observa-se que nas regiões periféricas ao *scaffold* houve um aumento significativo na viabilidade, enquanto nas proximidades do material, há um aumento considerável na morte celular, principalmente nas regiões de contato direto com o *scaffold*, indicando que a morte celular pode ter sido ocasionada por estresse mecânico devido a movimentação do *scaffold*.

Além disso, neste período de 120 horas, observa-se a formação de esferoides celulares, sendo caracterizados como agregados tridimensionais de células que mimetizam a arquitetura e o microambiente dos tecidos in vivo. Sua formação é um mecanismo de resposta celular comum a estímulos mecânicos que

ocorrem em culturas celulares tridimensionais, como a movimentação do *scaffold* no poço.¹⁰⁸

Essas observações sugerem que o *scaffold* não apresenta citotoxicidade significativa após exposições prolongadas e é biocompatível com as células NIH 3T3. Porém deve-se considerar a movimentação do material que pode comprometer a viabilidade das células 3T3.

4. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos dos testes biológicos, o *scaffold* de RET-P-QuiNCa apresenta um excelente perfil de biocompatibilidade para as células de fibroblastos (NIH 3T3).

Além disso, o teste de MTT e Calceína no extrato do *scaffold*, incubado por 24 horas, não revelou citotoxicidade.

No entanto, o teste a longo prazo na presença do *scaffold* pode ter sido influenciado por estresse mecânico causado pela movimentação do *scaffold* no poço, havendo um aumento de células mortas próximos ao *scaffold*. No entanto, observa-se também, a formação de esferoides, indicando que o material proporciona um microambiente favorável a agregação celular e formações dessas estruturas tridimensionais.

No geral, o *scaffold* de RET-P-QuiNCa é um material muito promissor, com grande potencial para aplicações no reparo de tecidos danificados.

CONCLUSÃO GERAL DO PROJETO E PERSPECTIVAS FUTURAS

A modificação da quitosana via fosforilação alterou significativamente sua solubilidade, sendo solúvel em pH acima de 7 e abaixo de 1,5.

A fosforilação estratégica nos grupos hidroxilas preservou as características catiônicas da quitosana, mantendo sua resposta a variações de pH e aumentando as possibilidades de modificações.

A presença de dois grupos reativos na quitosana permitiu explorar outras modificações como a reticulação química, utilizando ácido tartárico, e física através da gelificação ionotrópica. A combinação dessas reticulações, permitiu a obtenção de um material poroso, biocompatível, com alto potencial para diversas aplicações.

Além disso, os testes biológicos demonstraram que o *scaffold* promove adesão e proliferação celular, indicando sua capacidade em fornecer um microambiente favorável ao crescimento tecidual.

Entretanto, são necessários estudos adicionais para otimizar suas propriedades. Ao submeter o *scaffold* de RET-P-QuiNCA a longos períodos submerso em meio de cultura, observa-se que o estresse mecânico acaba afetando as células.

Desta forma, é necessário estudar outros reticulantes químicos que forneça uma estabilidade maior ao *scaffold*, além de se realizar testes com outros tipos de células e não apenas fibroblastos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Choy, Y. K. Introduction: Sustainable Development—A Preliminary Reflection. In *Global Environmental Sustainability*; Choy, Y. K., Ed.; Elsevier: **2021**; pp 1.
- ² Crini, G. The Period of Application: From 1970 Until Now. In *Chitin and Chitosan*; Crini, G., Ed.; Academic Press: **2022**; pp 125.
- ³ Zhang, J.; Said, F. M.; Jing, Z. Hydrogels Based on Seafood Chitin: From Extraction to the Development. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *253*, (Part 1), pp 126482.
- ⁴ Khor, E. Overview of Chitin and Chitosan Research. In *Chitin (Second Edition)*; Khor, E., Ed.; Elsevier: **2014**; pp 1.
- ⁵ Peniche, C.; Argüelles-Monal, W.; Goycoolea, F. M. Chitin and Chitosan: Major Sources, Properties and Applications. In *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*; Belgacem, M. N., Gandini, A., Eds.; Elsevier: 2008; pp 517.
- ⁶ Ahmad, S. I.; Ahmad, R.; Khan, M. S.; Kant, R.; Shahid, S.; Gautam, L.; Hasan, G. M.; Hassan, M. I. Chitin and Its Derivatives: Structural Properties and Biomedical Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, pp 526.
- ⁷ Crini, G. Chitin and Chitosan: Production, Properties, and Applications. In *Chitin and Chitosan*; Crini, G., Ed.; Academic Press: 2022; pp 149.
- ⁸ Al-Rooqi, M. M.; Hassan, M. M.; Moussa, Z.; Obaid, R. J.; Suman, N. H.; Wagner, M. H.; Natto, S. S. A.; Ahmed, S. A. Advancement of Chitin and Chitosan as Promising Biomaterials. *J. Saudi Chem. Soc.* **2022**, *26* (6) pp 101561.
- ⁹ Kumar, M. N. V. R.; Muzzarelli, R. A. A.; Muzzarelli, C.; Sashiwa, H.; Domb, A. J. Chitin and Chitosan. *Chem. Rev.* **2004**, *104* (12), pp 6017.
- ¹⁰ Kumar, M. N. V. R. A Review of Chitin and Chitosan Applications. *Reactive Funct. Polym.* **2000**, *46* (1), pp 1.
- ¹¹ Aranaz, I.; Mengibar, M.; Harris, R.; Paños, I.; Miralles, B.; Acosta, N.; Galed, G.; Heras, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Curr. Chem. Biol.* **2009**, *3*, pp 203.
- ¹² Koide, S. S. Chitin-Chitosan: Properties, Benefits and Risks. *Nutr. Res.* **1998**, *18*, pp 1091.
- ¹³ Khor, E. Traditional Chitin and Chitosan Biomaterials Research. In *Chitin (Second Edition)*; Khor, E., Ed.; Elsevier: **2014**; pp 29.
- ¹⁴ Wang, J.; Duan, X.; Zhong, D.; Zhang, M.; Li, J.; Hu, Z.; Han, F. Pharmaceutical Applications of Chitosan in Skin Regeneration: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, *261* (Part 1), pp 129064.
- ¹⁵ Kumar, A.; Vimal, A.; Kumar, A. Why Chitosan? From Properties to Perspective of Mucosal Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *91*, 615.
- ¹⁶ Lankalapalli, S.; Kolapalli, V. R. Polyelectrolyte Complexes: A Review of Their Applicability in Drug Delivery Technology. *Indian J. Pharm. Sci.* **2009**, *71*, (5), pp 481.
- ¹⁷ Wani, T. U.; Pandith, A. H.; Sheikh, F. A. Polyelectrolytic Nature of Chitosan: Influence on Physicochemical Properties and Synthesis of Nanoparticles. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2021**, *65*.

-
- ¹⁸ Kawashima, Y.; Handa, T.; Kasai, A.; Takenaka, H.; Lin, S. Y.; Ando, Y. Novel Method for the Preparation of Controlled-Release Theophylline Granules Coated with a Polyelectrolyte Complex of Sodium Polyphosphate-Chitosan. *J. Pharm. Sci.* **1985**, *74* (3), 264.
- ¹⁹ Kalam, M. A.; Khan, A. A.; Khan, S.; Almalik, A.; Alshamsan, A. Optimizing Indomethacin-Loaded Chitosan Nanoparticle Size, Encapsulation, and Release Using Box-Behnken Experimental Design. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *87*, pp 329.
- ²⁰ Wani, S. U. D.; Ali, M.; Mehdi, S.; Masoodi, M. H.; Zargar, M. I.; Shakeel, F. A Review on Chitosan and Alginate-Based Microcapsules: Mechanism and Applications in Drug Delivery Systems. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, pp 248.
- ²¹ Lacerda, L.; Parize, A. L.; Fávere, V.; Laranjeira, M. C. M.; Stulzer, H. K. Development and Evaluation of pH-Sensitive Sodium Alginate/Chitosan Microparticles Containing the Antituberculosis Drug Rifampicin. *Mater. Sci. Eng. C* **2014**, *39*, pp 161.
- ²² Zhao, B.; Alonso, N. F.; Miras, J.; Vílchez, S.; García-Celma, M. J.; Morral, G.; Esquena, J. Triggered Protein Release from Calcium Alginate/Chitosan Gastro-Resistant Capsules. *Colloids Surf., A*, **2024**, 693, pp 133998.
- ²³ Lingait, D.; Rahagude, R.; Gaharwar, S. S.; Das, R. S.; Verma, M. G.; Srivastava, N.; Kumar, A.; Mandavgane, S. A Review on Versatile Applications of Biomaterial/Polycationic Chitosan: An Insight into the Structure-Property Relationship. *Int. J. Biol. Macromol.* **2024**, 257 (Part 2), pp 128676.
- ²⁴ Iqbal, Y.; Ahmed, I.; Irfan, M. F.; Chatha, S. A. S.; Zubair, M.; Ullah, A. Recent Advances in Chitosan-Based Materials: The Synthesis, Modifications and Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2023**, 321, pp 121318.
- ²⁵ Harugade, A.; Sherje, A. P.; Pethe, A. Chitosan: A Review on Properties, Biological Activities and Recent Progress in Biomedical Applications. *Reactive Funct. Polym.* **2023**, 191, pp 105634.
- ²⁶ Haj, N. Q.; Mohammed, M. O.; Mohammad, L. E. Synthesis and Biological Evaluation of Three New Chitosan Schiff Base Derivatives. *ACS Omega* **2020**, *5*, 23, pp 13948.
- ²⁷ Elhag, M.; Abdelwahab, H. E.; Mostafa, M. A.; Yacout, G. A.; Nasr, A. Z.; Dambruoso, P.; El Sadek, M. M. One Pot Synthesis of New Cross-Linked Chitosan-Schiff' Base: Characterization, and Anti-Proliferative Activities. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 184, pp 558.
- ²⁸ Andreica, B.-I.; Cheng, X.; Marin, L. Quaternary Ammonium Salts of Chitosan: A Critical Overview on the Synthesis and Properties Generated by Quaternization. *Eur. Polym. J.* **2020**, 139, pp 110016.
- ²⁹ Oyervides-Muñoz, E.; Avérous, L.; Sosa-Santillán, G. D. J.; Pollet, E.; Pérez-Aguilar, N. V.; Rojas-Caldera, C. M.; García-Astrain, C. EDC-Mediated Grafting of Quaternary Ammonium Salts onto Chitosan for Antibacterial and Thermal Properties Improvement. *Macromol. Chem. Phys.* **2019**, 220 (8), pp 1800530.
- ³⁰ Mansour, H.; El-Sigeny, S.; Shoman, S.; Abu-Serie, M. M.; Tamer, T. M. Preparation, Characterization, and Bioevaluation of Fatty N-Hexadecanyl Chitosan Derivatives for Biomedical Applications. *Polymers*, **2022**, 14 (19), pp 4011.

-
- ³¹ Fardioui, M.; Kadmiri, I. M.; Qaiss, A. el K.; Bouhfid, R. Bio-Active Nanocomposite Films Based on Nanocrystalline Cellulose Reinforced Styrylquinoxalin-Grafted-Chitosan: Antibacterial and Mechanical Properties. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, 114, pp 733.
- ³² Rusu, A. G.; Chiriac, A. P.; Nita, L. E.; Rosca, I.; Pinteala, M.; Mititelu-Tartau, L. Chitosan Derivatives in Macromolecular Co-Assembly Nanogels with Potential for Biomedical Applications. *Biomacromolecules*, **2020**, 21 (10), pp 4231.
- ³³ Piegat, A.; Goszczyńska, A.; Idzik, T.; Niemczyk, A. The Importance of Reaction Conditions on the Chemical Structure of N, O-Acylated Chitosan Derivatives. *Molecules*, **2019**, 24 (17), pp 3047.
- ³⁴ Adnan, S.; Ranjha, N. M.; Hanif, M.; Asghar, S. O-Carboxymethylated Chitosan: A Promising Tool with In Vivo Anti-Inflammatory and Analgesic Properties in Albino Rats. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 156, pp 531.
- ³⁵ Li, H.; Cheng, F.; Wei, X.; Yi, X.; Tang, S.; Wang, Z.; Zhang, Y. S.; He, J.; Huang, Y. Injectable, Self-Healing, Antibacterial, and Hemostatic N,O-Carboxymethyl Chitosan/Oxidized Chondroitin Sulfate Composite Hydrogel for Wound Dressing. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, 118 pp 111324.
- ³⁶ Li, C.; Fang, K.; He, W.; Li, K.; Jiang, Y.; Li, J. Evaluation of Chitosan-Ferulic Acid Microcapsules for Sustained Drug Delivery: Synthesis, Characterizations, and Release Kinetics In Vitro. *J. Mol. Struct.* **2021**, 1227, pp 129353.
- ³⁷ Wang, Y.; Du, H.; Xie, M.; Ma, G.; Yang, W.; Hu, Q.; Pei, F. Characterization of the Physical Properties and Biological Activity of Chitosan Films Grafted with Gallic Acid and Caffeic Acid: A Comparison Study. *Food Packag. Shelf Life* **2019**, 22, pp 100401.
- ³⁸ Luo, Q.; Han, Q.; Wang, Y.; Zhang, H.; Fei, Z.; Wang, Y. The Thiolated Chitosan: Synthesis, Gelling and Antibacterial Capability. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 139, pp 521.
- ³⁹ Dimassi, S.; Tabary, N.; Chai, F.; Blanchemain, N.; Martel, B. Sulfonated and Sulfated Chitosan Derivatives for Biomedical Applications: A Review. *Carbohydr. Polym.* **2018**, 202, pp 382.
- ⁴⁰ Feher, J. Calcium and Phosphorus Homeostasis I: The Calcitropic Hormones. In Quantitative Human Physiology, 2nd ed.; Feher, J., Ed.; Academic Press, **2017**; pp 924.
- ⁴¹ Negm, N. A.; Hefni, H. H. H.; Abd-Elaal, A. A. A.; Badr, E. A.; Abou Kana, M. T. H. Advancement on Modification of Chitosan Biopolymer and Its Potential Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 152, pp 681.
- ⁴² Jayakumar, R.; Selvamurugan, N.; Nair, S. V.; Tokura, S.; Tamura, H. Preparative Methods of Phosphorylated Chitin and Chitosan—An Overview. *Int. J. Biol. Macromol.* **2008**, 43 (3), pp 221.
- ⁴³ Wang, K.; Liu, Q. Chemical Structure Analyses of Phosphorylated Chitosan. *Carbohydr. Res.* **2014**, 386, pp 48.
- ⁴⁴ Laffargue, T.; Moulis, C.; Remaud-Siméon, M. Phosphorylated Polysaccharides: Applications, Natural Abundance, and New-to-Nature Structures Generated by Chemical and Enzymatic Functionalisation. *Biotechnol. Adv.* **2023**, 65, pp 108140.

-
- ⁴⁵ Lunkov, A. P.; Zubareva, A. A.; Varlamov, V. P.; Nechaeva, A. M.; Drozd, N. N. Chemical Modification of Chitosan for Developing of New Hemostatic Materials: A Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, 253 (Part 8), pp 127608.
- ⁴⁶ Zaiki, Y.; Iskandar, A.; Wong, T. W. Functionalized Chitosan for Cancer Nano Drug Delivery. *Biotechnol. Adv.* **2023**, 67, pp 108200.
- ⁴⁷ Subhapradha, N.; Ramasamy, P.; Sudharsan, S.; Seedeve, P.; Moovendhan, M.; Srinivasan, A.; Shanmugam, V.; Shanmugam, A. Preparation of Phosphorylated Chitosan from Gladius of the Squid *Sepioteuthis lessoniana* (Lesson, 1830) and Its In Vitro Antioxidant Activity. *Bioact. Carbohydr. Diet. Fibre* **2013**, 1 (2), pp 148.
- ⁴⁸ Xie, W.; Xu, P.; Liu, Q. Antioxidant Activity of Water-Soluble Chitosan Derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2001**, 11 (13), pp 1699.
- ⁴⁹ Cao, Y.-Y.; Ji, Y.-H.; Liao, A.-M.; Huang, J.-H.; Thakur, K.; Li, X.-L.; Hu, F.; Zhang, J.-G.; Wei, Z.-J. Effects of Sulfated, Phosphorylated and Carboxymethylated Modifications on the Antioxidant Activities In Vitro of Polysaccharides Sequentially Extracted from *Amana edulis*. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, 146, pp 887.
- ⁵⁰ Morsy, A. M. A. Adsorptive Removal of Uranium Ions from Liquid Waste Solutions by Phosphorylated Chitosan. *Environ. Technol. Innov.* **2015**, 4, pp 299.
- ⁵¹ Huang, Y.; Hu, C.; An, Y.; Xiong, Z.; Hu, X.; Zhang, G.; Zheng, H. Magnetic Phosphorylated Chitosan Composite as a Novel Adsorbent for Highly Effective and Selective Capture of Lead from Aqueous Solution. *J. Hazard. Mater.* **2021**, 405, p p 124195.
- ⁵² Subramaniam, S.; Foo, K. Y.; Md Yusof, E. N.; Jawad, A. H.; Wilson, L. D.; Sabar, S. Hydrothermal Synthesis of Phosphorylated Chitosan and Its Adsorption Performance towards Acid Red 88 Dye. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 193 (Part B), pp 1716.
- ⁵³ Nishi, N.; Nishimura, S.; Ebina, A.; Tsutsumi, A.; Tokura, S. Preparation and characterization of water-soluble chitin phosphate, *Int. J. Biol. Macromol.* **1984**, 6, pp 53.
- ⁵⁴ Nishi, N.; Nishimura, S.; Ebina, A.; Tsutsumi, A.; Hasegawa, O.; Tokura, S. Highly phosphorylated derivatives of chitin, partially deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: preparation and characterization, *Int. J. Biol. Macromol.* **1986**, 8, pp 311.
- ⁵⁵ Nishi, N.; Maekita, Y.; Nishimura, S.; Hasegawa, O.; Tokura, S. Highly phosphorylated derivatives of chitin, partially deacetylated chitin and chitosan as new functional polymers: metal binding property of the insolubilized materials, *Int. J. Biol. Macromol.* **1987**, 9, pp 109.
- ⁵⁶ Tachaboonyakiat, W.; Netswasdi, N.; Srakaew, V.; et al. Elimination of Inter- and Intramolecular Crosslinks of Phosphorylated Chitosan by Sodium Salt Formation. *Polym. J.* **2010**, 42, pp 148.
- ⁵⁷ Brugnerotto, J.; Lizardi, J.; Goycoolea, F. M.; Argüelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization, *Polymer* **2001**, 42, pp 3569.
- ⁵⁸ Mihalopoulos, N.; Barnes, I.; Becker, K. H., Infrared Absorption spectra and integrated band intensities for gaseous methanesulphonic acid (MSA), *Atmos. Environ.* **1992**, 26A, pp 807.
- ⁵⁹ Kasaai, M. R. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications; *CRC Press*, **2001**; p 149.

-
- ⁶⁰ Tricot, G. Mixed Network Phosphate Glasses: Seeing Beyond the 1D ^{31}P MAS NMR Spectra with 2D X ^{31}P NMR Correlation Maps. *Annu. Rep. NMR Spectrosc.* **2019**, 96, pp 35.
- ⁶¹ Wang, Q. Z.; Chen, X. G.; Liu, N.; Wang, S. X.; Liu, C. S.; Meng, X. H.; Liu, C. G. Protonation Constants of Chitosan with Different Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Carbohydr. Polym.* **2006**, 65 (2), pp 194.
- ⁶² Sorlier, P.; Viton, C.; Domard, A. Relation between Solution Properties and Degree of Acetylation of Chitosan: Role of Aging. *Biomacromolecules* **2002**, 3, pp 1336.
- ⁶³ Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, Solubility and Fiber Formation. *Prog. Polym. Sci.* **2009**, 34 (7), pp 641.
- ⁶⁴ Sacco, P.; Paoletti, S.; Cok, M.; Asaro, F.; Abrami, M.; Grassi, M.; Donati, I. Insight into the Ionotropic Gelation of Chitosan Using Tripolyphosphate and Pyrophosphate as Cross-Linkers. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, 92, pp 476.
- ⁶⁵ Elliott, T. S.; Slowey, A.; Ye, Y.; Conway, S. J. The use of phosphate bioisosteres in medicinal chemistry and chemical biology, *MedChemComm* **2012**, 3, pp 735.
- ⁶⁶ Wang, W.; Meng, Q.; Li, Q.; Liu, J.; Zhou, M.; Jin, Z.; Zhao, K. Chitosan Derivatives and Their Application in Biomedicine. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, 21 (2), pp 487.
- ⁶⁷ Resmi, R.; Yoonus, J.; Beena, B. Anticancer and Antibacterial Activity of Chitosan Extracted from Shrimp Shell Waste. *Mater. Today Proc.* **2021**, 41 (Part 3), pp 570.
- ⁶⁸ Ai, H.; Wang, F.; Xia, Y.; Chen, X.; Lei, C. Antioxidant, Antifungal and Antiviral Activities of Chitosan from the Larvae of Housefly, *Musca domestica* L. *Food Chem.* **2012**, 132 (1), pp 493.
- ⁶⁹ Dai, S.; Ravi, P.; Tam, K. C. pH-Responsive Polymers: Synthesis, Properties and Applications. *Soft Matter* **2008**, 4, pp 435.
- ⁷⁰ Mohy Eldin, M. S.; Abd Elmageed, M. H.; Omer, A. M.; Tamer, T. M.; Yossuf, M. E.; Khalifa, R. E. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2016**, 11, pp 3467.
- ⁷¹ Gaan, S.; Rupper, P.; Salimova, V.; Heuberger, M.; Rabe, S.; Vogel, F. Thermal Decomposition and Burning Behavior of Cellulose Treated with Ethyl Ester Phosphoramidates: Effect of Alkyl Substituent on Nitrogen Atom. *Polym. Degrad. Stab.* **2009**, 94, pp 1125.
- ⁷² Reddy, N.; Reddy, R.; Jiang, Q. Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications. *Trends Biotechnol.* **2015**, 33, pp 362.
- ⁷³ Pita-López, M. L.; Fletes-Vargas, G.; Espinosa-Andrews, H.; Rodríguez-Rodríguez, R. Physically Cross-Linked Chitosan-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A State-of-the-Art Review. *Eur. Polym. J.* **2021**, pp 145.
- ⁷⁴ Saeedi, M.; Vahidi, O.; Moghbeli, M. R.; Ahmadi, S.; Asadnia, M.; Akhavan, O.; Seidi, F.; Rabiee, M.; Saeb, M. R.; Webster, T. J.; Varma, R. S.; Sharifi, E.; Zarrabi, A.; Rabiee, N. Customizing Nano-Chitosan for Sustainable Drug Delivery. *J. Controlled Release* **2022**, 350, pp 175.
- ⁷⁵ Monteiro, O. A. C.; Airoidi, C. Some Studies of Crosslinking Chitosan–Glutaraldehyde Interaction in a Homogeneous System. *Int. J. Biol. Macromol.* **1999**, 26 (2-3), pp 119.
- ⁷⁶ El Kaim Billah, R.; Aminul Islam, M.; Nazal, M. K.; Bahsis, L.; Soufiane, A.; Abdellaoui, Y.; Achak, M. A Novel Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan@Acid-Activated Bentonite Composite for Effective

Pb(II) and Cr(VI) Adsorption: Experimental and Theoretical Studies. *Sep. Purif. Technol.* **2024**, 334, (14), pp 126094.

⁷⁷ Herdiana, Y.; Wathoni, N.; Shamsuddin, S.; Muchtaridi, M. Drug Release Study of the Chitosan-Based Nanoparticles. *Heliyon* **2022**, 8 (1) pp e08674.

⁷⁸ Chacón-Cerdas, R.; Medaglia-Mata, A.; Flores-Mora, D.; Starbird-Pérez, R. Synthesis of Chitosan, Pectin, and Chitosan/Pectin Microspheres by Two Water-in-Oil Emulsion Crosslinking Methods. *Chem. Pap.* **2020**, 74, pp 509.

⁷⁹ Andriani, Y.; Grasiyanto; Siswanta; Mudasar. Glutaraldehyde-Crosslinked Chitosan-Pectin Nanoparticles as a Potential Carrier for Curcumin Delivery and Its In Vitro Release Study. *Int. J. Drug Deliv.* **2015**, 7, pp 167.

⁸⁰ Takigawa, T.; Endo, Y. Effects of Glutaraldehyde Exposure on Human Health. *J. Occup. Health* **2006**, 48, pp 75.

⁸¹ Hu, C.; Lu, W.; Mata, A.; Nishinari, K.; Fang, Y. Ions-Induced Gelation of Alginate: Mechanisms and Applications. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, 177, pp 578.

⁸² Valderruten, N. E.; Valverde, J. D.; Zuluaga, F.; Ruiz-Durántez, E. Synthesis and Characterization of Chitosan Hydrogels Cross-Linked with Dicarboxylic Acids. *Reactive Funct. Polym.* **2014**, 84, pp 21.

⁸³ Suwattanachai, P.; Pimkhaokham, A.; Chirachanchai, S. Multi-Functional Carboxylic Acids for Chitosan Scaffold. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, 134, pp 156.

⁸⁴ Naskar, S.; Sharma, S.; Kuotsu, K. Chitosan-Based Nanoparticles: An Overview of Biomedical Applications and Its Preparation. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* **2019**, 49, pp 66.

⁸⁵ Jantwal, A.; Durgapal, S.; Upadhyay, J.; Joshi, T.; Kumar, A. Chapter 4.17 - Tartaric Acid. In Antioxidants Effects in Health; Nabavi, S. M., Sanches Silva, A., Eds.; Elsevier **2022**; pp 485.

⁸⁶ Kousar, M.; Salma, U.; Khan, T.; Shah, A. J. Antihypertensive Potential of Tartaric Acid and Exploration of Underlying Mechanistic Pathways. *Dose-Response* **2022**, 20, (4).

⁸⁷ Wang, J.; Zhuang, S. Chitosan-Based Materials: Preparation, Modification and Application. *J. Cleaner Prod.* **2022**, pp 355.

⁸⁸ Giri, T. K. Chapter 20 - Alginate Containing Nanoarchitectonics for Improved Cancer Therapy. In Nanoarchitectonics for Smart Delivery and Drug Targeting; Holban, A. M., Grumezescu, A. M., Eds.; William Andrew Publishing **2016**; pp 565.

⁸⁹ Chellathurai, M. S.; Yong, C. L.; Sofian, Z. M.; Sahudin, S.; Hasim, N. B. M.; Mahmood, S. Self-Assembled Chitosan-Insulin Oral Nanoparticles — A Critical Perspective Review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, pp 243.

⁹⁰ Bodnar, M.; Hartmann, J. F.; Borbely, J. Synthesis and Study of Cross-Linked Chitosan-N-Poly(ethylene glycol) Nanoparticles. *Biomacromolecules* **2006**, 7 (11), pp 3030.

⁹¹ El-Sherbiny, I. M.; Yacoub, M. H. Hydrogel Scaffolds for Tissue Engineering: Progress and Challenges. *Global Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, pp 316.

⁹² Reddy, M. S. B.; Ponnamm, D.; Choudhary, R.; Sadasivuni, K. K. A Comparative Review of Natural and Synthetic Biopolymer Composite Scaffolds. *Polymers* **2021**, 13, (7), pp 1105.

-
- ⁹³ Deville, S.; Saiz, E.; Nalla, R. K.; Tomsia, A. P. Freezing as a Path to Build Complex Composites. *Science* **2006**, 311, pp 515.
- ⁹⁴ Fereshteh, Z. Freeze-Drying Technologies for 3D Scaffold Engineering. In *Functional 3D Tissue Engineering Scaffolds*; Deng, Y., Kuiper, J., Eds.; *Woodhead Publishing*: **2018**; pp 151.
- ⁹⁵ Pujana, M. A.; Pérez-Álvarez, L.; C. C. Iturbe, L.; Katime, I. Water Dispersible pH-Responsive Chitosan Nanogels Modified with Biocompatible Crosslinking Agents. *Polymer* **2012**, 53, pp 3107.
- ⁹⁶ Aldridge 3rd, J. M.; Urbaniak, J. R. Avascular Necrosis of the Femoral Head: Role of Vascularized Bone Grafts. *Orthop. Clin. North Am.* **2007**, 38 (1), pp 13.
- ⁹⁷ <https://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/landingpage?sdbno=1071>, acessado em 07/03/24.
- ⁹⁸ Crobu, M.; Rossi, A.; Mangolini, F.; Spencer, N. D. Chain-length-Identification Strategy in Zinc Polyphosphate Glasses by Means of XPS and ToF-SIMS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 403, pp 1415.
- ⁹⁹ Amaral, I. F. Granja p. L., Barbosa M. A., Chemical modification of chitosan by phosphorylation: an XPS, FT-IR and SEM study, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 2005, 16, (12), pp 1575
- ¹⁰⁰ Gholap, A. D.; Rojekar, S.; Kapare, H. S.; Vishwakarma, N.; Raikwar, S.; Garkal, A.; Mehta, T. A.; Jadhav, H.; Prajapati, M. K.; Annapure, U. Chitosan Scaffolds: Expanding Horizons in Biomedical Applications. *Carbohydr. Polym.* **2024**, 323, pp 121394.
- ¹⁰¹ Duval, K.; Grover, H.; Han, L. H.; Mou, Y.; Pegoraro, A. F.; Fredberg, J.; Chen, Z. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology* **2017**, 32 (4), 266.
- ¹⁰² Armiento, A. R.; Hatt, L. P.; Sanchez Rosenberg, G.; Thompson, K.; Stoddart, M. J. Functional Biomaterials for Bone Regeneration: A Lesson in Complex Biology. *Adv. Funct. Mater.* **2020**, 30 (44), pp 1909874.
- ¹⁰³ Barrère, F.; Mahmood, T. A.; de Groot, K.; van Blitterswijk, C. A. Advanced Biomaterials for Skeletal Tissue Regeneration: Instructive and Smart Functions. *Mater. Sci. Eng. R: Reports* **2008**, 59 (1-6), pp 38.
- ¹⁰⁴ Komeri, R.; Kasoju, N.; Anil Kumar, P. R. In Vitro Cytotoxicity and Cytocompatibility Assays for Biomaterial Testing Under Regulatory Platform. In *Biomedical Product and Materials Evaluation*; Mohanan, P. V., Ed.; *Woodhead Publishing*: **2022**; pp 329.
- ¹⁰⁵ da Costa, T. S.; da Silva, M. R.; Barbosa, J. C. J.; Das Neves, U. S.; de Jesus, M. B.; Tasic, L. Biogenic Silver Nanoparticles' Antibacterial Activity and Cytotoxicity on Human Hepatocarcinoma Cells (Huh-7). *RSC Adv.* **2024**, 14, pp 2192.
- ¹⁰⁶ Miles, F. L.; Lynch, J. E.; Sikes, R. A. Cell-Based Assays Using Calcein Acetoxymethyl Ester Show Variation in Fluorescence with Treatment Conditions. *J. Biomed. Mat.* **2015**, 2 (3), pp 1.
- ¹⁰⁷ Crowley, L. C.; Scott, A. P.; Marfell, B. J.; Boughaba, J. A.; Chojnowski, G.; Waterhouse, N. J. Measuring Cell Death by Propidium Iodide Uptake and Flow Cytometry. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, 2016 (7), pp 647.
- ¹⁰⁸ Cortés-Sánchez, J. L.; Melnik, D.; Sandt, V.; Kahlert, S.; Marchal, S.; Johnson, I. R. D.; Calvaruso, M.; Liemersdorf, C.; Wuest, S. L.; Grimm, D.; et al. Fluid and Bubble Flow Detach Adherent Cancer Cells to Form Spheroids on a Random Positioning Machine. *Cells* **2023**, 12, pp 2665.