



## CARACTERIZAÇÃO E OBTENÇÃO DE FILMES FINOS DE *N,N,N*-TRIMETIL QUITOSANA E HEPARINA ATRAVÉS DA TÉCNICA LAYER-by-LAYER.

Alessandro F. Martins<sup>1\*</sup>, Heveline D. M. Follmann<sup>1</sup>, Adley F. Rubira<sup>1</sup>, Edvani C. Muniz<sup>1</sup>

*1 - Universidade Estadual de Maringá - UEM, Av. Colombo, 5970, 87020-900 Maringá - PR*

### Resumo

Filmes finos de Heparina (HP) e *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC) com elevado grau de quaternização (DQ) foram obtidos em pH 7,4 a partir da técnica layer-by-layer (LbL). O poliestireno (PS) foi oxidado em solução aquosa de persulfato de sódio e posteriormente empregado como substrato. A síntese da TMC foi realizada por sucessiva metilação usando metodologia convencional e a caracterização da TMC e respectiva determinação do DQ foram realizadas através da espectroscopia de RMN <sup>1</sup>H. Os filmes finos de TMC/HP foram caracterizados por FTIR-ATR e AFM. Ambas as técnicas confirmaram a adsorção de TMC e HP na superfície do PS. O aumento do número de bicamadas proporcionou diminuição das projeções e/ou rugosidade, além de minimizar as depressões existentes na superfície dos filmes. Estudos sobre filmes finos a base de TMC/HP preparados a partir da técnica LbL ainda não foram relatados na literatura. É esperado que os filmes de TMC/HP apresentem propriedades antiaderentes e antimicrobianas.

**Palavras-chave:** *Quitosana, N,N,N-trimetilquitosana, Heparina, Layer-by-layer*

### ***Characterization and obtainment of thin films based on N,N,N-trimethyl chitosan and heparin through the technical layer-by-layer.***

#### Abstract

Thin films of Heparin (HP) and *N,N,N*-trimethyl chitosan (TMC) with a high degree of quaternization (DQ) were obtained at pH 7.4 through the layer-by-layer (LbL) technique. Polystyrene (PS) was oxidized with aqueous solution of sodium persulfate and subsequently employed as substrate. The characterization of TMC and the respective determination of DQ were performed through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. The thin films de TMC/HP were characterized by FTIR-ATR and AFM. Both techniques confirmed the adsorption of TMC and HP in surface of the PS. The increasing of the bilayers provides a decrease of the projections and/or roughness, further of minimizing the depressions at the surface of the films. Studies of thin films the base of TMC/HP prepared from the LbL technique has not been reported in the literature. It is expected that the thin films of TMC/HP present anti-adhesive and antimicrobial properties.

**Keywords:** *Chitosan, N,N,N-trimethyl chitosan, Heparin, Layer-by-layer*

## 1. Introdução

Quitosana (QT) é um polissacarídeo derivado do processo de desacetilação da quitina, que constitui a maior fração dos exoesqueletos de insetos e crustáceos [1]. A QT possui propriedades interessantes e por isso tem sido extensivamente estudada e aplicada em diversas áreas [2]. A *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC) é um derivado da QT que apresenta ampla solubilidade em grande faixa de pH [3-5]. Estudos confirmaram que a atividade antimicrobiana da TMC contra *Escherichia*



*coli* (*E. coli*) foi superior em relação à QT [6]. Sadeghi e colaboradores verificaram também que a TMC apresenta atividade antimicrobiana contra o microorganismo da classe *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) [7].

A heparina (HP) é um polissacarídeo natural de cadeia linear, formada por uma seqüência alternada de unidades sulfatadas de ácido urônico e D-glucosamina [3-5]. Este polímero apresenta atividade anticoagulante, induz o crescimento celular e promove a reparação de tecidos [2-5]. A HP também atua como agente antiadesiva [2,8]. Filmes de QT e HP com propriedades antimicrobianas e antiaderentes baseados no Poli(etileno) Tereftalato (PET), como substrato, foram preparados pela técnica “*layer-by-layer*” (LbL) [8]. Foi mostrado que o número de *E. coli* aderidas e mortas diminui consideravelmente com a adsorção das monocamadas de HP e QT na superfície do substrato [8]. A LbL é uma técnica eficiente que proporciona a produção de filmes com multicamadas [9]. Esta técnica consiste na adsorção consecutiva de polieletrólitos de cargas opostas em substratos específicos [9]. Visto que as propriedades antimicrobianas da TMC são superiores às encontradas na QT, o presente trabalho tem como objetivo principal o preparo e a caracterização de filmes finos a base de TMC e HP utilizando a técnica LbL tendo como substrato. O Poliestireno (PS) com superfície modificada por oxidação em solução aquosa de persulfato de sódio.

## 2. Experimental

### 2.1. Materiais

Quitosana (Golden-Shell Biochemical, China) com grau de desacetilação igual a 85 % e massa molar viscosimétrica ( $M_v$ ) igual a  $87 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ ; Iodeto de Metila e *N*-metil-2-pirrolidona foram obtidos da Sigma-Aldrich. Heparina Sódica foi gentilmente fornecida pela Kin Master (Passo Fundo/RS, Brasil) e o Persulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ), P.A., foi obtido da Vetec.

### 2.2. Síntese da TMC

A metodologia empregada neste trabalho para a obtenção da TMC foi adaptada do trabalho de Martins *et al.* [3-5].

### 2.3. Modificação da superfície do poliestireno (PS)

A metodologia empregada neste trabalho para a modificação da superfície do PS com persulfato de sódio encontra-se detalhada no trabalho de Curti *et al.* [10].



#### 2.4. Preparo dos filmes finos de TMC/HP por meio da técnica LbL

O substrato sólido, placa de poliestireno oxidado por reação com solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (PS-oxidado) e carregado negativamente, foi imerso por 60 segundos em uma solução (2% m/v - pH 7,4) do polieletrólito positivo (TMC). Posteriormente, o conjunto PS-oxidado/TMC foi lavado em uma solução aquosa com o mesmo pH da solução inicial de TMC, a fim de eliminar o excesso do material não adsorvido na superfície do substrato. Assim, é esperada a formação de um filme fino na superfície do PS-oxidado. Após 30 segundos o substrato com a monocamada de TMC foi imerso em uma solução (2% m/v - pH 7,4) do polieletrólito aniônico (HP), e novamente lavado, como descrito acima. Foram obtidos filmes finos de TMC/HP com 3, 6, 9, 12, 15 e 18 bicamadas, sempre respeitando as condições (tempo de imersão e lavagem) estabelecidas acima. A obtenção dos filmes finos de TMC/HP foi feita com auxílio do aparelho *dipping coating*. Aparelho este, produzido e adaptado por R. Matos [11].

#### 2.5. Espectroscopia de RMN $^1\text{H}$

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da TMC foi adquirido utilizando um espectrômetro de RMN Varian, Mercury Plus 300 BB, operando em 300,06 MHz para a frequência do  $^1\text{H}$ . Para a aquisição do espectro de RMN  $^1\text{H}$ , foram preparadas soluções de TMC (10 mg) por dissolução em 0,7 mL  $\text{D}_2\text{O}/\text{HCl}$  (100/1 v/v) e em  $\text{D}_2\text{O}$ , conforme descrito por Martins *et al* [3].

#### 2.6. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

As estruturas químicas dos filmes de TMC/HP formados, bem como o crescimento do número de bicamadas foram caracterizados por meio da espectroscopia na região do infravermelho usando um espectrômetro Bomem, modelo MB-100, empregando técnica de reflexão total atenuada (FTIR- ATR), na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ .

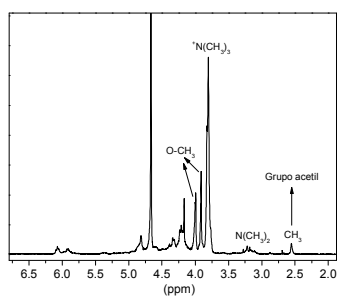
#### 2.7. Microscopia de Força Atômica

As análises de microscopia de força atômica (AFM) foram realizadas em aparelho Shimadzu SPM-9500J3, modo não contato, para verificar possíveis variações topográficas dos filmes em função do incremento do número de bicamadas depositadas.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1. Caracterização da TMC (RMN $^1H$ )

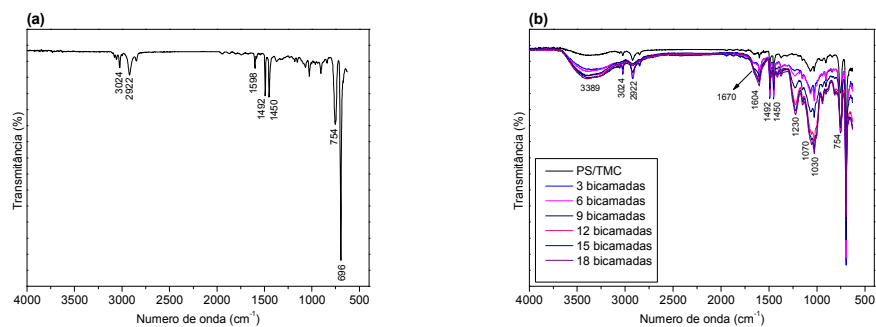
As diferenças nos espectros de RMN  $^1H$  apresentados na Figura 1 indicam que a TMC foi efetivamente obtida. As atribuições dos deslocamentos químicos ( $\delta$ ) e o cálculo do grau de quaternização (DQ) da TMC encontram-se descritos nos trabalhos de Martins *et al.* [3-5]. A TMC do presente trabalho apresentou DQ = 80%.



**Figura 1.** Espectro de RMN  $^1H$  da TMC.

#### 3.2. Caracterização dos filmes finos de TMC/HP por FTIR-ATR.

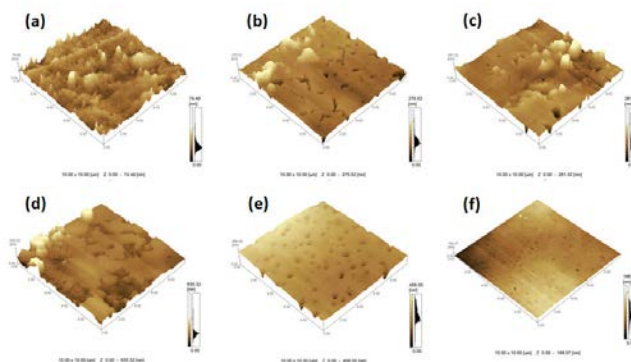
Na Figura 2 é apresentado o espectro de FTIR-ATR do PS-oxidado (Fig. 2a) e os espectros de FTIR-ATR dos filmes finos de TMC/HP (Fig. 2b). As bandas características no espectro das Figuras 2a e 2b na região de 3024, 2922, 1492, 1450 e 754  $cm^{-1}$  ocorrem devido à deformação axial das ligações CH, C=C, deformação angular das ligações CH<sub>2</sub> e CH do anel aromático do PS, respectivamente [12]. A confirmação da adsorção dos polissacarídeos (TMC e HP) na superfície do PS-oxidado é feita com base no aumento das intensidades das bandas em 3389, 1670, 1604, 1230, 1070 e 1030  $cm^{-1}$  (Fig. 2b). Vale apenas destacar o aumento de intensidade das bandas referentes à deformação axial das ligações S=O e C=O do ânion carboxilato que ocorrem em 1230 e 1604  $cm^{-1}$  (Fig. 2b). Estes grupos estão presentes na estrutura da HP [5].



**Figura 2.** Espectros de FTIR-ATR do PS (a) e do PS-oxidado com: TMC, 3, 6, 9, 12, 15 e 18 bicamadas de TMC/HP (b).

### 3.3. Caracterização dos filmes finos de TMC/HP por AFM

Uma análise mais detalhada da superfície dos filmes de PS, PS-oxidado, PS-oxidado/TMC (Figura não apresentada) e dos filmes finos de TMC/HP (Fig. 3) foi realizada por meio da técnica de AFM.



**Figura 3.** Imagens de AFM das superfícies dos filmes de PS-oxidado com: 3 (a), 6 (b), 9 (c), 12 (d), 15 (e) e 18 (f) bicamadas de TMC/HP.

A diminuição das ondulações e/ou projeções, além da minimização das depressões na superfície dos filmes finos de TMC/HP é favorecida com o aumento do número de bicamadas (Fig. 3).



#### 4. Conclusões

A TMC foi sintetizada com êxito e seu DQ (80 %) foi determinado por espectroscopia de RMN  $^1\text{H}$ . Devido a manutenção de densidades de cargas positivas ao longo das cadeias de TMC e de cargas negativas nas cadeias da HP foi possível obter filmes finos de TMC/HP a partir da técnica LbL em pH 7,4. A adsorção das monocamadas de TMC e HP na superfície do PS-oxidado foi confirmada por FTIR-ATR e AFM. Através das imagens de AFM observou-se diminuição da rugosidade e minimização das depressões na superfície do filme com o aumento do número de bicamadas. Estudos de filmes finos de TMC/HP ainda não foram encontrados na literatura. Espera-se que este tipo de material apresente propriedades interessantes, tais como atividade antimicrobiana e superfície antiaderente.

#### 5. Agradecimentos

A.F.M. e H.D.M.F agradecem ao CNPq e à CAPES, respectivamente, pela concessão da bolsa de estudos (doutorado), e ao COMCAP/UEM pelas análises de AFM.

#### 6. Referências Bibliográficas

1. W.I. Abdel-Fattah; T. Jiang; G.E.T. El-Bassyouni; C.T. Laurencin *Acta Biomater.* 2007, 3, 503.
2. D-K. Kweon; S-B. Song; Y-Y. Park *Biomaterials*, 2003, 24, 1595.
3. A.F. Martins; J.F. Piai; I.T.A. Schüquel; A.F. Rubira; E.C. Muniz *J. Coll. Interf. Sci. In Press* 2011.
4. A.F. Martins; A.G.B. Pereira; A.R. Fajardo; A.F. Rubira; E.C. Muniz *Carbohydr. Polym.* Submitted at 2011.
5. A.F. Martins, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2011.
6. Z. Jia; D. Shen; W. Shu *Carbohydr. Res.* 2001, 333, 1.
7. A.M.M. Sadeghi; F.A. Dorkoosh; M.R. Avadi *Int. J. Pharm.* 2008, 355, 299.
8. J. Fu; J. Ji; W. Yuan; J. Shen *Biomaterials* 2005, 26, 6684.
9. A. Fujii; T. Maruyama; T. Sotani; Y. Ohmukai.; H. Matsuyama *Colloid. Surfaces* 2009, 337, 159.
10. P.S. Curti; M.R. Moura; E. Radovanovic; A.F. Rubira; E.C. Muniz; R.A. Moliterno *J. Mater. Sci.- Mater. Med.* 2002, 13, 1175.
11. R. Matos, Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Maringá, 2005.
12. R.M. Silverstein; G.C. Bassler; T.C. Morrill. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos, Ed.; Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2007, Ed.3ª, 1-299.