CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO DE FILMES DE QUITOSANA COM DIFERENTES QUANTIDADES DE AGENTE RETICULANTE

Viviane M. Bispo[1], Alexandra A. P. Mansur[1], Herman S. Mansur[1]*

[1] Depto. de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte-MG - hmansur@demet.ufmg.br*

Filmes de quitosana reticulados com genipin foram preparados e suas propriedades químicas verificadas Os filmes foram caracterizados por FTIR . Com a análise por infravermelho foi possível verificar as reações entre genipin e quitosana. A intensidade da faixa de amida à aproximadamente 1650 cm^{-1} sugere que o grupo carboximetil do genipin reagiu com o grupo amino para formar uma amida secundária. Procurou-se assim verificar as reações químicas que acompanham a formação dos filmes quitosana reticulados genipin, permitindo identificar possíveis mecanismos de modificação deste polímero para aplicação em biomateriais.

Palavras-chave: *Quitosana , Filme, Genipin, FTIR, Reticulação.*

Infrared characterization of chitosan films crosslinked with different amounts of genipin

Chitosan films were crosslinked with genipin and characterized by infrared spectroscopy. Through the infrared analysis it was possible to verify the reaction between genipin and chitosan. Changes in the intensity of the amide band, nearly 1650 cm^{-1}, suggests the carboxymethyl group of genipin reacted with the amino group to form a secondary amide. Thus, it has been sought to find out the chemical reactions during the formation of the blends. Based on the results, properties of crosslinked films might be modeled for biomaterial applications.

Keywords: *Chitosan, Film, Genipin, FTIR, Crosslinking.*

Introdução

Muitos materiais e suas combinações materiais têm sido cogitados como suporte para crescimento de células ou tecidos. Neste sentido, materiais poliméricos bidegradegradáveis e biocompatíveis estão sendo largamente pesquisados, desenvolvidos e aperfeiçoados para aplicações biomédicas [1,2]. Isto vem ocorrendo, em grande parte, por causa da grande necessidade que existe em melhorar os tratamentos médicos em todo o mundo, procurando assim obter melhores resultados na recuperação de pacientes. Neste sentido, um campo que vem se desenvolvendo muito, nos últimos tempos, é a engenharia de tecidos. Para engenharia de tecidos a produção de materiais que servem de suporte para desenvolvimento de células, tecidos e até órgãos vem sendo requisitada. Estes materiais devem possuir características adequadas para o desenvolvimento destas células vivas. Estes suportes podem ser feitos de materiais poliméricos, que possuem muitas propriedades que se fazem necessárias para a fabricação de materiais biomédicos. Entre eles flexibilidade, a semelhança

com os tecidos do organismo humano e a possibilidades de serem modificados com certa facilidade, adequando suas características a função que irão desempenhar [3-6].

Dentre os polímeros utilizados na atualidade a quitosana vem ganhando destaque. Os inúmeros estudos sobre a quitosana decorrem de várias propriedades deste polímero como biocompatibilidade, biodegradabilidade, aceleração na recuperação de lesões, reduz o colesterol sanguíneo, além de ser bacteriostático e fungiostático [7]. Todas estas características fazem a quitosana apropriada para ser utilizada em matrizes para engenharia de tecidos. Entretanto, existem propriedades difíceis de controlar como as propriedades mecânicas. Uma maneira de se obter o controle dessas propriedades é a utilização de substâncias chamadas de agentes reticulantes. Estes agentes reticulantes irão reagir com os polímeros formando estruturas semelhantes a redes conferindo maior estabilidade ao material. Entre os agentes reticulantes o glutaraldeído tem sido muito utilizado. Entretanto esta substância é produzida sinteticamente e produz efeitos citotóxicos. Numa pesquisa recente, Sung e colaboradores [7] verificaram que o genipin é um agente reticulante 10.000 vezes menos citotóxico que o glutaraldeído. Assim, filmes e matrizes de quitosana poderiam ter suas propriedades mecânicas melhoradas com genipin. Genipin é encontrado em medicina chinesa tradicional é extraído do fruto da gardênia. O genipin é comumente utilizado para reagir com amino ácido e proteínas [8,9]. Devido sua baixa toxicidade é uma substância que pode ser utilizada na produção de matrizes para desenvolvimento de tecidos.

Neste trabalho, foram utilizadas diferentes quantidades diferentes de genipin para produzir filmes de quitosana reticulados. O objetivo foi verificar como a quantidade de reticulante influiu nas interações químicas, utilizando espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).

Experimental

Uma solução de 1% (em massa) de quitosana (QUI) (Sigma-Aldrich, com grau de desacetilação (GD) de 76%, (MW)=161.000g/mol) foi preparada pela dissolução de 2,5g em 250ml de solução de CH_3COOH (Merck) 2% (em massa). Para a solubilização e homogeneização a solução foi agitada magneticamente por um período entre 24-120h. O pH da solução de quitosana foi ajustado para 4 com uma solução de 0,5 molar de NaOH. As misturas de QUI e genipin, bem como de quitosana pura, foram vertidas em placas plásticas e secas a 40º C em estufa por 48h. A reticulação foi realizada pela adição de 0,5% e 1% (em massa) de genipin em relação à quitosana.

Para caracterizar a presença de grupos químicos nos materiais e filmes obtidos foi realizada análise de espectroscopia de infravermelho (FTIR) usando o modos de ATR (reflexão total atenuada). Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de 4000 a 650 cm^{-1} durante 60 varreduras, com resolução de 2 cm^{-1} (Paragon 1000, Perkin-Elmer, USA). Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos.

A caracterização de quitosana em pó também foi realizada por espectroscopia de infravermelho para determinação do grau de desacetilação. O grau de desacetilação é imprescindível para o controle do tipo de quitosana obtida e controle das propriedades dos materiais produzidos a partir dela. Existem divergências quanto às técnicas mais recomendadas para a verificação do grau de desacetilação da quitosana. Dentre as técnicas utilizadas tem-se, por exemplo, titulometria potenciométrica, espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear. Entretanto, o infravermelho tem sido a técnica mais empregada e mais aceita. A Equação (1) é utilizada com espectros de absorção de infravermelho para obtenção de grau de desacetilação [10, 11,12].

$$GD = 97,67 - (A1/A2) \qquad \text{Equação (1)}$$

Onde A1 e A2 representam as absorções principais no espectro de infravermelho nas freqüências 1655 e 3450 cm^{-1} respectivamente, oriundas do espectro de quitosana [11].

A caracterização por ensaio de intumescimento foi realizada com filmes de 1cm^2 em 10mL de solução de fosfato tampão, à temperatura ambiente. Utilizando a equação 2 obteve-se os resultados para intumescimento dos filmes de quitosana reticulados e sem reticulação.

$$GI = (M_i - M_s/M_s) \times 100 \qquad \text{Equação (2)}$$

Resultados e Discussão

O espectro obtido a partir da quitosana em pó está mostrado na Figura 1. Nesta curva as absorções apresentadas com picos em 1321 cm^{-1}, 1260 cm^{-1}, 1379 cm^{-1} correspondem às vibrações de dobramento das aminas que estão detalhadas na Tabela 1, juntamente com as demais bandas características da quitosana. As vibrações da ligação C-H correspondentes à estrutura sacarídea em 1154 cm^{-1} e 896 cm^{-1} são também encontradas neste espectro. Observam-se, ainda, absorções entre 1100 e 1500 cm^{-1}. Elas são muito discutidas pela literatura e representam o estiramento C-N presente no carbono 2 do anel glicopiranosídeo.

A partir das intensidades das bandas de infravermelho nas freqüências 1655 e 3450 cm^{-1} (A1 e A2 na Equação 1, respectivamente), foi calculado o grau de desacetilação médio deste polímero sendo obtido o valor de (80±4)%, pelo método de espectroscopia de infravermelho proposto por Lima (2005). Este resultado apresenta-se relativamente similar ao fornecido pelo fabricante (76%), conforme indicado no procedimento experimental.

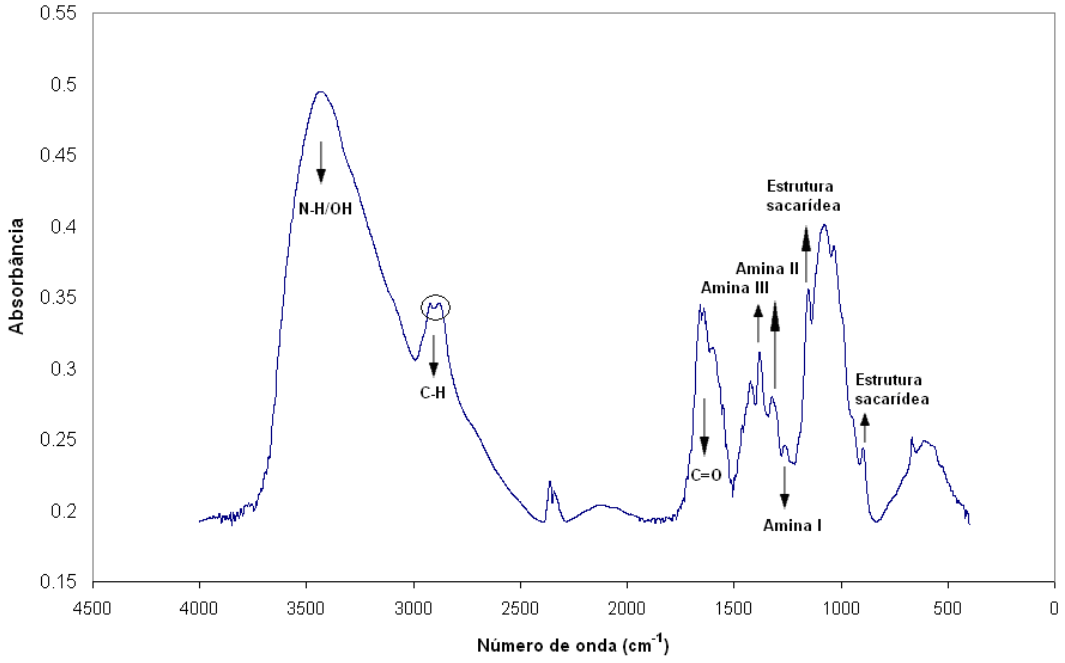
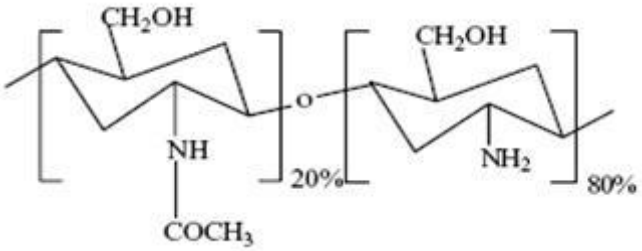


Figura 1 - Espectro de FTIR de quitosana com grau de desacetilação calculado em 80%.

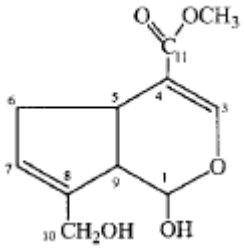
Tabela1- Grupos característicos no infravermelho para a quitosana [6, 12] onde ν=estiramento; δ= dobramento.

Material	Bandas (cm^{-1})	Grupos Associados
Quitosana	3570-3200	OH ligado: ν
Quitosana	2955-2845	C-H (assimétrico): ν
Quitosana	2878	C-H ν (simétrico):
Quitosana	1658-1630	N-H: δ
Quitosana	1570-1515	N-H: δ
Quitosana	1465 e 1423	O-H: δ e CH_2 (tesoura)
Quitosana	1406	- CH_2 (C=O)
Quitosana	1340-1250 e 1379	C-N (terciária): δ
Quitosana	1321	C-N (primária): ν
Quitosana	1260	C-N (secundária): ν
Quitosana	1154 e 896	C-O-C (estrutura sacarídea- β): ν
Quitosana	890	C-N: ν e C-C: ν

A estrutura da quitosana está mostrada na Figura 2(a) onde podem ser identificados os grupos listados na Tabela 1 e verificados no espectro de infravermelho do material. Nesta Figura 2(b) também está mostrada a representação do genipin utilizado como agente reticulante cujos picos característicos antes e após reticulação estão listados na Tabela 2.



(a)



(b)

Figura 2 - Representação da fórmula estrutural (a) monômero da quitosana e (b) molécula de genipin.

Tabela 2 - Grupos característicos no infravermelho do genipin [12,14].

Material	Bandas (cm^{-1})	Grupos Associados
Genipin	1000-1060	Álcool primário
Genipin	1270-1200	Éster: H-C-O-O-R
Genipin	1300-1170	Éter
Genipin	1300-1530	Anel Heterocíclico
Genipin	1400-1450	Íons carboxilatos
Genipin	1406	C=C
Genipin	1600-1700	C=C
Genipin	1750-1700 1270-1200	Éster: H-C-O-O-R
Genipin	2750-3000	C=C

Os filmes constituídos de quitosana e reticulados apresentaram-se com maior estabilidade à manipulação após a reticulação, tornando-se também materiais homogêneos devido às interações químicas estabelecidas pela adição do genipin que podem sem observadas através dos espectros mostrados na Figura 3 onde se observam a quitosana reticulada e sem reticulação.

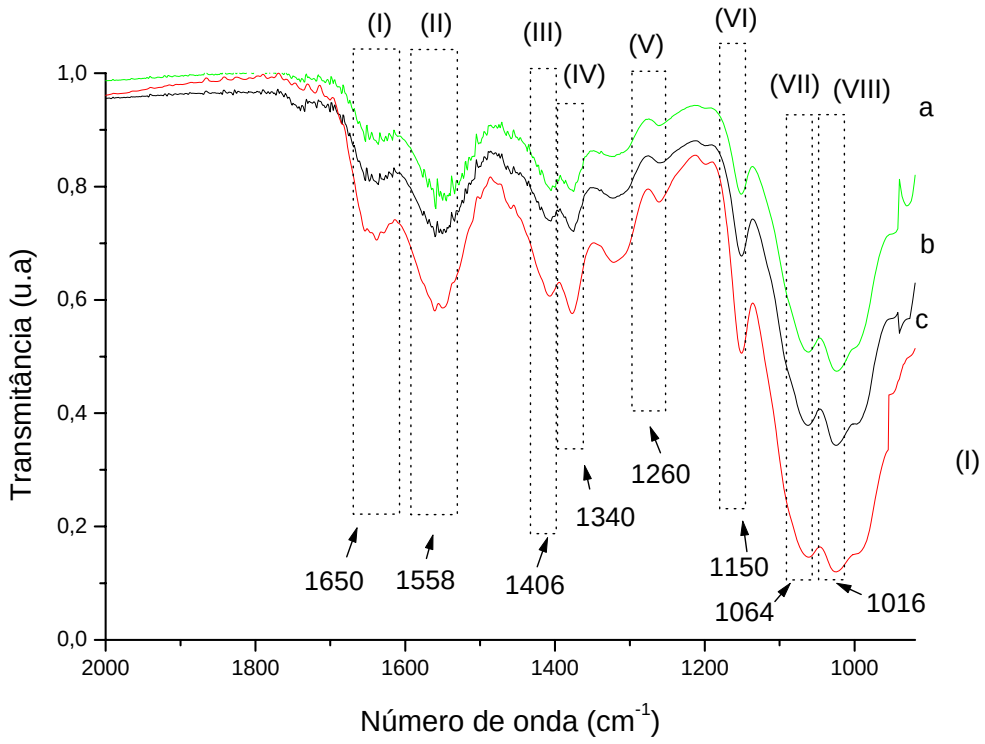


Figura 3 - Espectro de FTIR. (a) Filme de quitosana sem reticulante, (b) filme de quitosana com 0,5% de genipin e (c) filme de quitosana com 1% de genipin.

Nos espectros da Figura 3, a absorção da banda em 1650 cm^{-1} associada ao grupamento amida aumenta da curva (a) para a curva (c) com o aumento do teor de agente reticulante quando se observa a quitosana sem reticulação em relação à quitosana reticuladas. A banda em 1064 cm^{-1} é resultante do estiramento C-O e a banda em 1406 cm^{-1} ao estiramento do anel da molécula de genipin (C=C). A vibração na faixa de 1540 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} é devida aos grupos amina protonados e ao grupo ácido carboxílico da molécula de ácido acético. O estiramento do anel da amina heterocíclica aparece em 1340 cm^{-1} e ocorre com aumento de absorção, para maiores concentrações de genipin [14]. O perfil típico de polissacarídeo é mantido em 1150 cm^{-1}, característica de estiramento C-O-C.

A Figura 4 mostra o aumento na intensidade de vibração das amidas em 1540 cm^{-1} e a Figura 5 a redução das aminas características da quitosana em 1321 cm^{-1}, com aumento de agente reticulante, onde as absorbâncias foram normalizadas em relação à banda em 3276 cm^{-1} associada ao grupo C-H [15].

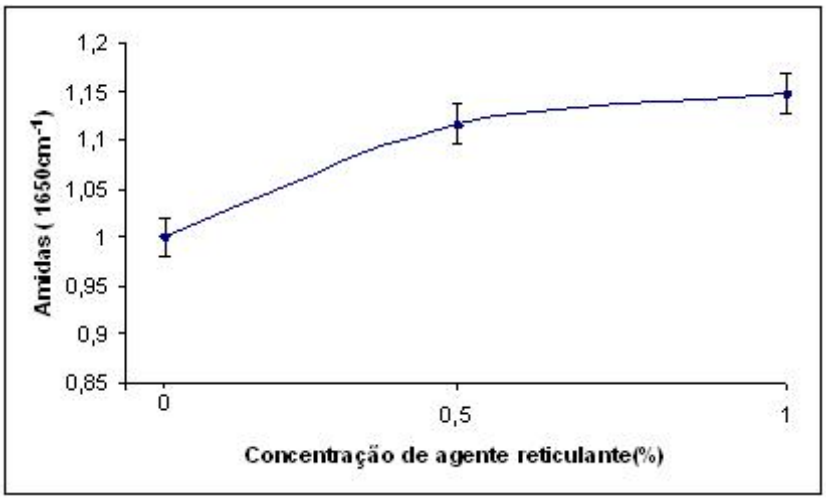


Figura 4- Intensidade das bandas das amidas formadas pela reação de genipin cm quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 3276 cm^{-1}.

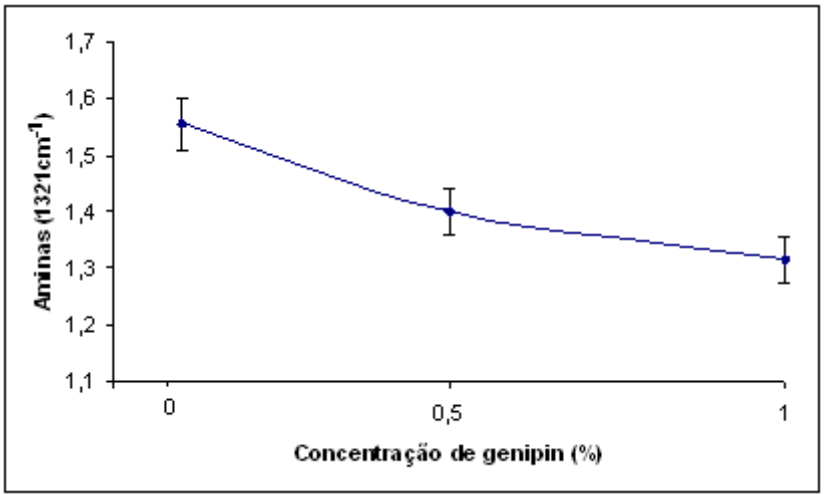


Figura 5 - Intensidade das bandas das aminas formadas pela reação de genipin cm quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 3276 cm^{-1}.

A Figura 6 mostra o ensaio de intumescimento em solução de fosfato tampão (PBS) de filmes de quitosana sem reticulação e reticulados. Os resultados mostram que a reticulação ocorreu da forma esperada. Isto porque o intumescimento diminui com o aumento da reticulação. As cadeias de polímeros reticuladas diminuem sua mobilidade e se expandem menos em contato com solvente, que as cadeias não reticuladas ou menos reticuladas. Para géis de quitosana durante o

ensaio de intumescimento, é verificado que seu caráter iônico será um dos parâmetros importantes a serem levados em consideração durante a expansão dos géis.

Para géis iônicos de acordo com a teoria de Flory-Huggins, a pressão osmótica irá levar ao intumescimento do gel que ocorre com a diferença de concentração dos íons entre o gel e a solução [3]. Assim quando se reticula com 0,5% de genipin alguns grupos amina protonados (NH^{3+}) estarão reticulados e estes grupos são grupos que irão interagir com os íons dissolvidos (presentes no tampão fisiológico PBS) e com a água que solvata estes íons. Este fenômeno promove o intumescimento observado das membranas. Portanto, quando a membrana é menos reticulada, por exemplo, com 0,5 % de genipin sobram mais grupos hidrofílicos, com NH^{3+} na membrana, para interagir com a água e os íons do que com 1% de genipin. Por isso, os grupos hidrofílicos estão em menores quantidades com 1% . Acrescenta-se ainda que as cadeias apresentarão menos mobilidade para se expandirem durante as interações. Este efeito depende do tipo de reticulante pois pequenas quantidades do mesmo não modificam muito o intumescimento, porém o acréscimo de determinada quantidade mesmo que não muito superior, irá reduzir bastante o intumescimento. Isto ocorre por causa de propriedades como hidrofilicidade e eficiência do agente reticulante e é verificado em trabalhos como o de Bispo e Ginani e colaboradores [4,16].

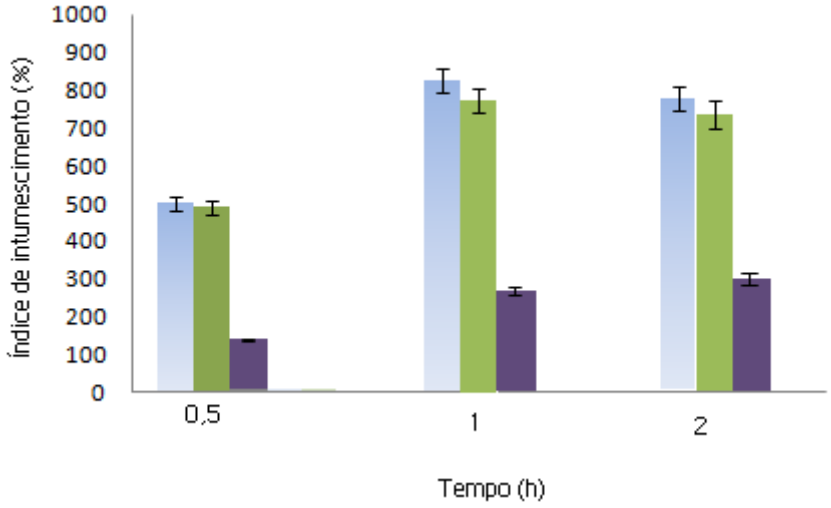


Figura 6 - Intensidade Intumescimento em PBS de filmes de quitosana: sem reticulação, com 0,5% de genipin, com 1% de genipin.

Levando em consideração estes resultados e a investigação dos mecanismos de reação em meio ácido feitas por Butller e colaboradores [17] a síntese de quitosana reticulada por genipin pode

ser representada conforme mostrado na Figura 10 onde as bandas aminas do polímero reagem com o genipin formando amidas.

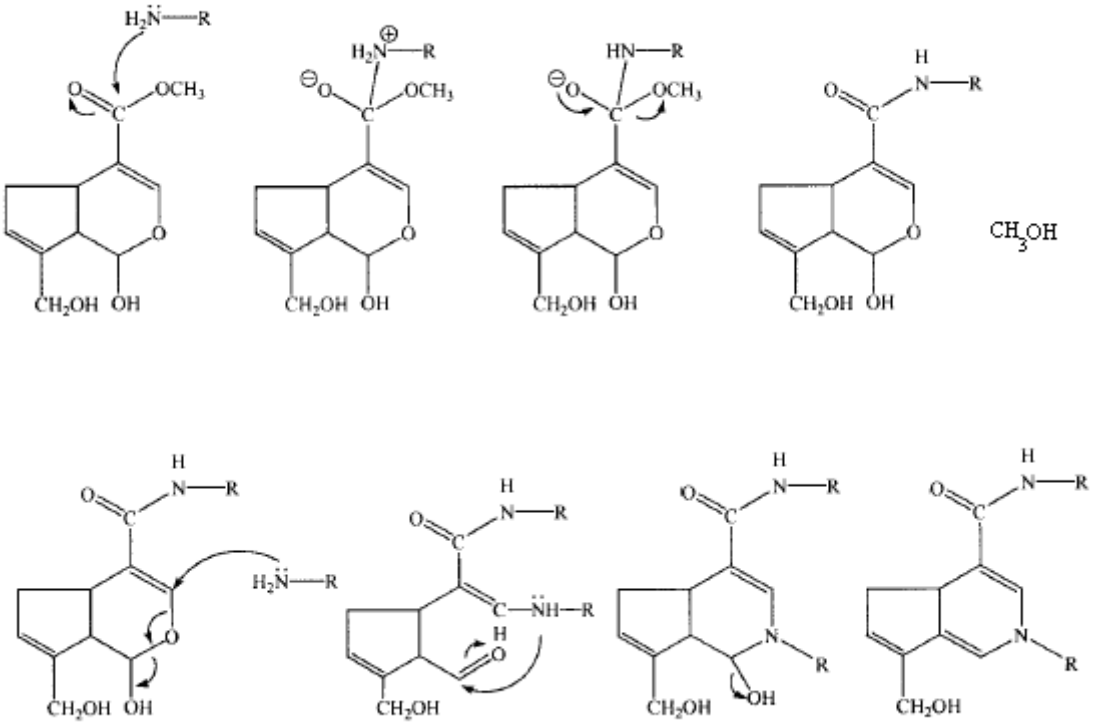


Figura 6 -Reações de grupos aminas de polímeros como quitosana com genipin [17].

Conclusões

Os espectros de infravermelho sugerem que a quitosana reagiu com o genipin para formar ligações cruzadas. Isto é evidenciado com aumento da banda da amida para a reticulação da quitosana. Baseado nestes resultados fica evidenciada a possibilidade de manipulação das propriedades do polímero através da reticulação com genipin viabilizando sua aplicação na produção de biomateriais.

Agradecimentos

Os autores agradecem o suporte financeiro da CAPES, CNPq e FAPEMIG.

Referências Bibliográficas

1. E.S.Gil; D.J.Frankowski; R.J Spontak; S.M. Hudson *J. Biom.* 2005**,** *6*, 3079.

2. S.H. Gehrke, *Fundamental Aspects of Polymers in Pharmaceutics*. Marcel Dekker, New York, 2000.
3. P.J. Flory, *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, 1953.
4. V.M. Bispo, Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.
5. S.H. Gehrke; P.I. Lee, *Hydrogels for Drug Delivery*, Marcel Dekker, New York, 1990.
6. E.S. Costa Jr; H.S. Mansur in Anais do 9º Congresso brasileiro de Polímeros, Campina, 2007, Grande, Vol.1.
7. H.W. Sung; R.N. Huang; L.L.H. Huang; C.C. Tsai; C.T. Chiu. *J. Biomed. Mater. Res*, 1998, *42*, 568.
8. J. Jin; M.Song; D. J. Hourston *J. Biomacrom.* 2004, *5*, 162.
9. A.A.P. Mansur; H.S. Mansur in Anais do 8o Congresso Brasileiro de Polímeros, 2005, Vol. 1, 349.
10. W. Lin; D. Yu; M. Yang *J. Col. Surf. B:Bio.* 2006, *47*, 43.
11. S.I. Lima, Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, 2005.
12. D.A. Skoog; D.M.West; F.J. Holler, *Fundamentals of Analytical Chemistry*, Bookman, Phoenix, Fort Worth, 2002.
13. N.J.Elizondo; P.J.A. Sobral; F.C. Menegalli *J. Carb. Pol.* 2009, *75*, 592.
14. F.L. Mi; H.W. Sung; S.S. Shyu. J. *Pol. Sci. A* 2000, *38*, 2804.
15. E.S. Costa Jr; H.S.Mansur; E.F.B. Stancioli; A.A.P Mansur; W.L. Wasconcelos. *Carb. Pol.* 2009, *76*, 472.
16. M. F. Ginani; M. V. Navarro; E. G. Nascimento; U. O. B. Oliveira. Quím. Nova. 1999, 22,801.
17. M.F. Butler; P.D.A Pudney *J. Pol. Sci. A: Pol. Chem.* 2003, *41*, 3941.

.