ESTUDO DA DESACETILAÇÃO DO BIOPOLÍMERO QUITOSANA PARA SER UTILIZADO NA ENGENHARIA DE TECIDOS

Juliana R. de Souza e Reinaldo Giudici
Departamento de Engenharia de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP,
julianaengdemateriais@yahoo.com, rgiudici@usp.br

Resumo: Devido à necessidade de maior eficácia nos tratamentos para pessoas que sofreram queimaduras graves, novas técnicas envolvendo o uso de biomateriais vêm sendo estudadas no campo da engenharia de tecidos, um dos materiais mais estudados na área médica hoje é o biopolímero quitosana. Este polissacarídeo possui características em sua estrutura que lhe permite auxiliar nas etapas de cicatrização de feridas e agir como inibidor de crescimento de bactérias e fungos que poderiam retardar a reparação de tecidos. A quitosana possui em sua estrutura unidades N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina em proporções que variam ao longo da cadeia, quanto maior a quantidade de D-glicosamina maior será seu grau de desacetilação, o aumento deste grau impacta de forma significativa nas propriedades da quitosana permitindo uma ação mais efetiva nas fases de recuperação de tecidos queimados. O objetivo deste estudo foi à obtenção de quitosana com grau de desacetilação em torno de 90%, para seu uso futuro no auxílio da restauração ou regenaração de tecidos danificados por queimaduras, e o entendimento da influência dos fatores sobre o grau de desacetilação.
Palavras-chave: quitosana, grau de desacetilação, engenharia de tecidos e queimaduras.

STUDY OF CHITOSAN BIOPOLYMER DESACETILATION TO BE USED IN TISSUE ENGINEERING

Abstract: Nowadays treatments for people who have suffered severe burns are not very effective, to reverse this current situation new techniques involving the use of new materials have been studied in the field of tissue engineering, one of the most studied materials in the medical field today is the chitosan biopolymer. This polysaccharide has characteristics in its structure that allows it to assist in the wound healing stages and act as a growth inhibitor of bacteria and fungi that could delay tissue repair. Chitosan has in its structure N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine units in proportions that vary along the chain, the greater the amount of D-glucosamine the greater its degree of deacetylation, the increase of this grade significantly impacts on the properties of chitosan allowing a more effective action in the recovery phases of burnt tissue. The objective of this study was to obtain chitosan with a degree of deacetylation around 90%, for its future use in the restoration or regeneration of tissues damaged by burns, and the understanding of the effect of the process variables on the degree of desacetylation.
Keywords: Chitosan, degree of deacetylation, tissue engineering and burns.

Introdução

Atualmente mais de um milhão de pessoas são vítimas de queimaduras no Brasil de acordo com informações da Sociedade Brasileira de Queimaduras. A queimadura é uma lesão tecidual, multifatorial e que pode causar danos irreversíveis no local afetado, e sua restauração é um processo de extrema complexidade envolvendo a interação de células, a ação de micro-organismos e processos físico-químicos e bioquímicos [1,2]. Diante das dificuldades da reparação de tecidos lesionados, surgiu um campo interdisciplinar chamado de engenharia de tecidos com foco no estudo para o desenvolvimento de suportes tridimensionais constituídos de materiais sintéticos ou naturais com células do próprio paciente que são cultivadas para sua proliferação e adesão adequada para posteriormente serem reinseridas no paciente permitindo regeneração do tecido. Os materiais, de origem natural, mais utilizados hoje na área médica são o colágeno, a quitina, a quitosana, a queratina, a elastina e o acido hialurônico. A quitosana é um biomaterial utilizado no campo interdisciplinar da engenharia de tecidos devido sua alta capacidade de agir na reparação de lesões,

este polissacarídeo possui grande similaridade estrutural com o ácido hialurônico que é uma substância existente na matriz extracelular do tecido conjuntivo e de extrema importância nas etapas de cicatrização de tecidos [3]. A grande semelhança da estrutura da quitosana com o ácido hialurônico permite que este biomaterial tenha papel fundamental nas três fases da reparação de tecidos que sofreram queimaduras, são elas, a fase inflamatória, a fase proliferativa e a fase reparadora [4]. Na fase inflamatória ocorre a formação de uma barreira contra agentes infecciosos e se inicia o processo para restauração da matriz extracelular, a quitosana auxilia nesta etapa devido sua capacidade de ativar macrófagos que são células com papel importante na defesa do organismo contra infecções, ainda nesta fase, a quitosana tem a capacidade de se ligar aos grupos aniônicos das paredes celulares de micro-organismos inibindo seu crescimento devido os grupos amino protonados da sua estrutura. Na fase proliferativa ocorre a movimentação das células epiteliais que compõem o tecido de granulação, onde os fibroblastos produzem a nova matriz extracelular, a quitosana possui a capacidade de estimular a formação adequada de tecido de granulação, pois a quebra da cadeia da quitosana em seus monômeros dão origem ao ácido hialurônico, necessário em grande quantidade nesta etapa de formação da matriz extracelular. E por fim, na fase de reparação do tecido ocorre uma tentativa de recuperação da estrutura tecidual normal, a quitosana nesta fase final de reparação pode aumentar as funções de células inflamatórias tais como, os leucócitos, macrófagos e fibroblastos, facilitando assim, a granulação e organização das células durante o processo de epitelização [5-6]. Devido à capacidade da quitosana de auxiliar nas etapas que envolvem a restauração de tecidos que sofreram queimaduras, o objetivo desta pesquisa é o estudo do aumento do grau de desacetilaçao da quitosana, permitindo intensificar sua ação devido o aumento significativo dos grupos amino em sua estrutura [7].

Experimental

Utilizou-se quitosana com alta massa molar e grau de desacetilação de 75% fornecido pela empresa Sigma Aldrich. Nas reações foram utilizadas soluções de NaOH preparadas com água destilada e mantidas em repouso por 24 horas antes do uso, para sua total dissolução. Os experimentos foram planejados nas variações de concentração de NaOH, tempo de reação e temperatura de acordo com o projeto experimental 2^3 feitos em triplicata em todos os pontos, de acordo com a Tabela 1. Os experimentos foram realizados em sequência aleatória. A quantidade de 125 mL solução de hidróxido de sódio (p/v) pré-aquecida foi colocada em balão de fundo redondo de 500 mL e uma alíquota de 10 mL foi retirada do balão volumétrico e adicionada ao béquer com 2,5 g de quitosana e devolvida ao balão volumétrico e assim dando inicio ao tempo de reação. O balão volumétrico foi equipado com termômetro, condensador de refluxo e entrada de nitrogênio, e foi envolto por fluído térmico que permitiu atingir a temperatura de reação desejada. Após o tempo definido, a solução foi imediatamente filtrada a vácuo para interromper a reação. A quitosana retida no filtro foi lavada com água destilada até pH neutro. O filtro juntamente com a quitosana retida foi colocado em placa de Petri e levado à estufa por 48 h na temperatura de 40°C. Por fim, a quitosana obtida foi triturada utilizando-se um pistilo e almofariz [7,8]. O grau de desacetilação foi medido por espectroscopia na região do infravermelho, usando os picos da amida I do grupo acetil a 1655 cm^{-1} e do grupo hidroxil a 3450 cm^{-1}, calculadas após correção da linha de base, usando a Eq. 1 proposta por Domszy e Roberts:

Grau de desacetilação % = 100 - [(A1655/A3450) • 75.2] **Equação (1)**

Para esta análise foi misturada cerca de 1,5 mg de quitosana diluida com KBr devidamente seco e limpo, macerados e posteriormente prensados até adquirir a forma de uma pastilha para então ser inserido no espectômetro da marca SHIMADZU, operado com média de 32 varreduras e resolução de 2 cm^{-1} na região de 4000 – 700 cm^{-1} [9,10].

A análise dos efeitos e das interações entre os fatores tempo, temperatura e concentração de NaOH, no fatorial completo 2^3 foram feitos mediante o uso do software minitab.

Tabela 1 – Planejamento fatorial completo 2^3 com três replicações em cada ponto com seus fatores e níveis.

Experimentos	Temperatura (°C)	Concentração de NaOH (%)	Tempo (horas)
1	-	-	-
2	+	-	-
3	-	+	-
4	+	+	-
5	-	-	+
6	+	-	+
7	-	+	+
8	+	+	+

Fatores	Níveis	
	-	+
Temperatura (°C)	80	110
Concentração NaOH (%)	20	60
Tempo (horas)	1	6

Após os resultados do planejamento experimental 2^3, foi feito um planejamento experimental 2^2 com três repetições no ponto central, de acordo com a Tabela 2, para verificar o aumento do grau de desacetilação no decorrer do tempo de reação de seis horas. Nestes ensaios, foram retiradas 11 alíquotas durante a reação. As etapas de preparação e análise, envolvendo as reações do fatorial 2^2 foram semelhantes ao experimento fatorial 2^3, assim como a verificação de efeitos e interações pelo software Minitab [9,10].

Tabela 2 – Planejamento fatorial completo 2^2 com três repetições no ponto central e fatores e níveis.

Experimentos	Temperatura (°C)	Concentração de NaOH (%)
1	-	-
2	+	-
3	-	+
4	+	+
5	0	0
6	0	0
7	0	0

Fatores	Níveis		
	-	0	+
Temperatura (°C)	80	95	110
Concentração NaOH (%)	20	40	60

Resultados e discussão

A Figura 1 apresenta os espectros de infravermelho das oito amostras finais dos ensaios do planejamento experimental 2^3, destacando os picos do grupo hidroxil (3450 cm^{-1}) e do grupo acetil da amida I (1655 cm^{-1}) em circulo amarelo, utilizados para calcular o grau de desacetilação. Nos espectros, foi possível verificar que os picos referentes ao grupo hidroxil não se alteram permitindo utiliza-lo como referência para o uso da equação 1 de acordo com o artigo de Domszy e Roberts.

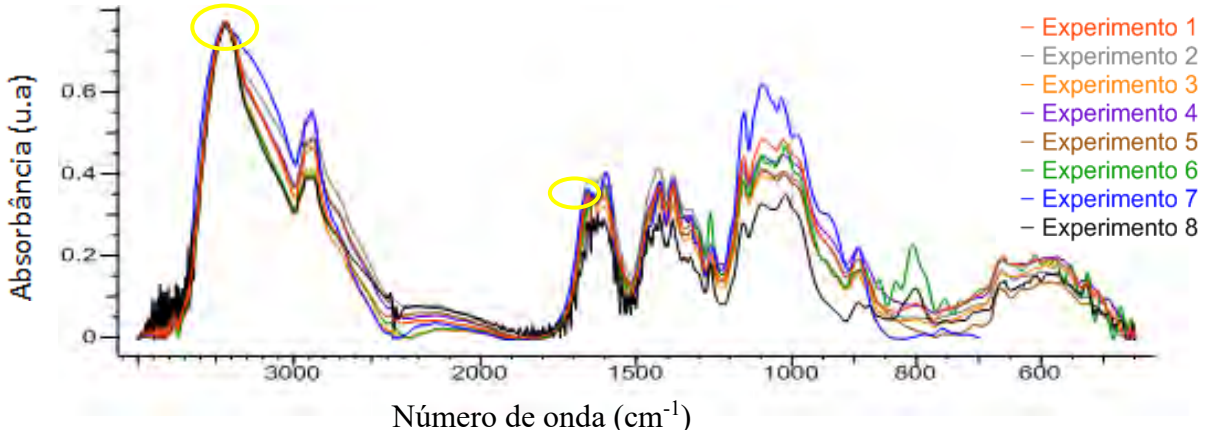

Figura1 – Gráfico com os espectros dos resultados dos últimos oito ensaios do fatorial completo 2^3.

A tabela 3 apresenta os resultados dos 24 ensaios, onde foi possível observar que os experimentos que atingiram os maiores graus de desacetilação ocorreram nos níveis máximos de temperatura, tempo de reação e concentração de NaOH, conforme referência do artigo de Methacanon.

.

Tabela 3 – Resultados da triplicata do planejamento fatorial completo 2^3.

Ordem real dos experimentos	Experimentos	Temperatura (° C)	Concentração de NaOH (%)	Tempo (Horas)	Grau de Desacetilação (%)
6	1	80	20	1	82,10
4	2	110	20	1	84,50
2	3	80	60	1	83,10
8	4	110	60	1	84,45
3	5	80	20	6	85,21
1	6	110	20	6	89,50
5	7	80	60	6	87,12
7	8	110	60	6	89,99
6	9	80	20	1	82,37
4	10	110	20	1	84,25
2	11	80	60	1	83,00
8	12	110	60	1	85,50
3	13	80	20	6	85,92
1	14	110	20	6	88,10
5	15	80	60	6	87,01
7	16	110	60	6	90,01
6	17	80	20	1	82,59
4	18	110	20	1	85,10
2	19	80	60	1	83,00
8	20	110	60	1	85,00
3	21	80	20	6	85,33
1	22	110	20	6	89,10
5	23	80	60	6	87,68
7	24	110	60	6	89,45

Verificou-se no fatorial 2^2 que o maior grau de desacetilação obtido, ocorreu na reação com níveis máximos dos fatores temperatura e concentração de NaOH, e que a cinética da reação seguiu resultados semelhantes aos resultados do artigo de Methacanon, onde nos sessenta minutos iniciais a reação ocorre com grande velocidade e com o aumento do tempo ela tende a estabilizar.

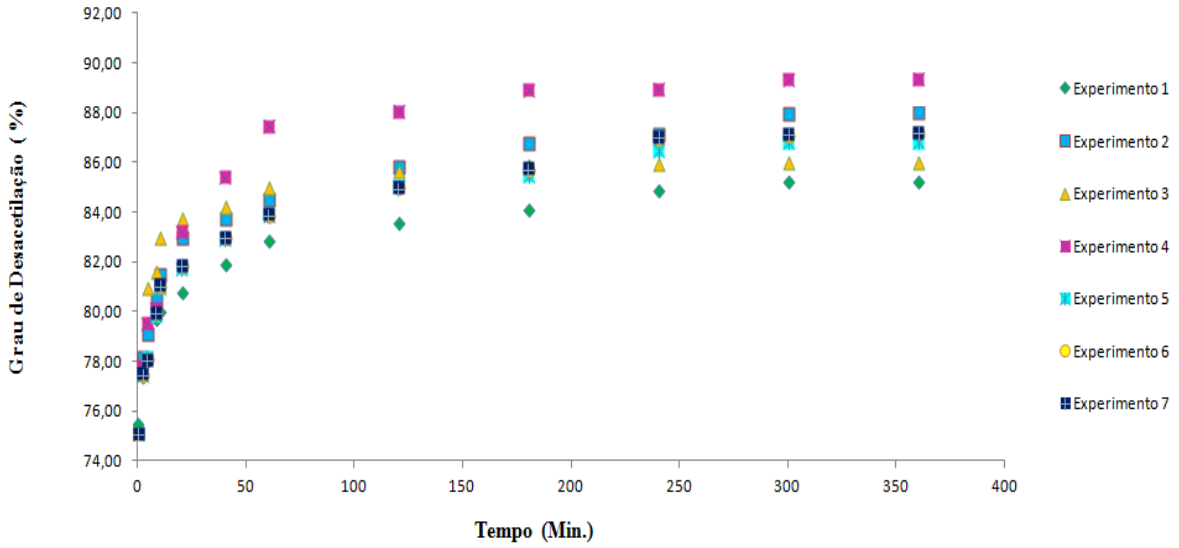

Figura 2 – Gráfico dos resultados do fatorial completo 2^2 com as três repetições do ponto central.

Na figura 3 é possível verificar que os dois efeitos mais importantes são primeiramente o tempo de reação seguido da temperatura, e que as interações entre os fatores foram baixas como mostradas nas retas quase paralelas.

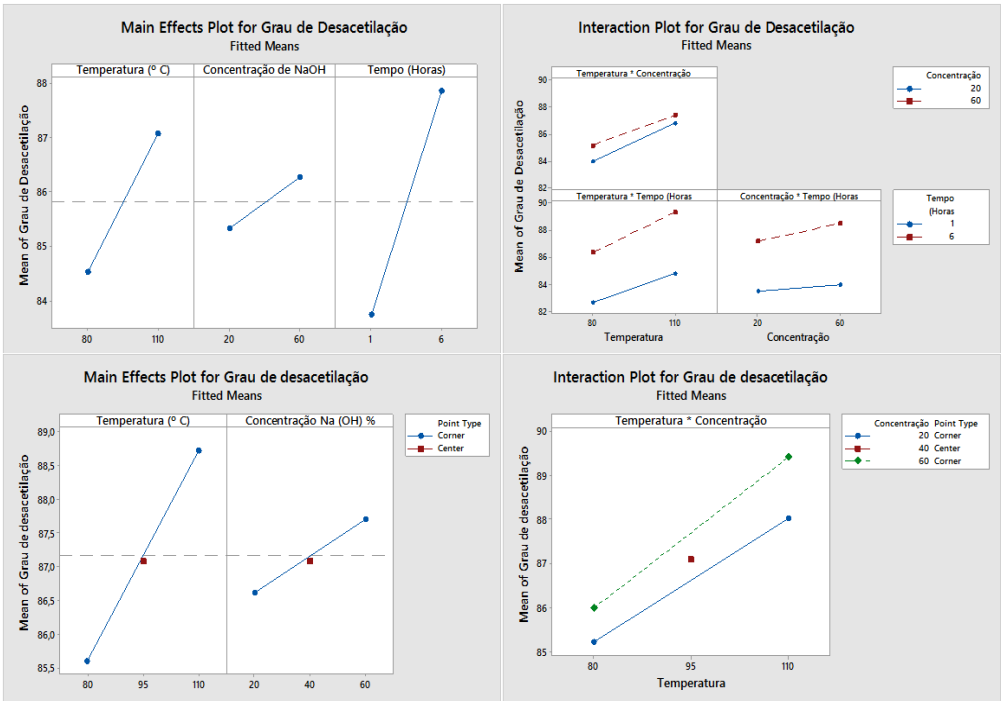

Figura 3 - Análise das interações e efeitos principais do fatorial completo 2^3 e do fatorial completo 2^2.

Conclusões

Os resultados dos graus de desacetilação obtidos através das análises dos espectros de infravermelho permitem concluir que é possível obter quitosana com grau de desacetilação de 90% partindo de quitosana de alta massa molar com grau de desacetilação de 75% no tempo de seis horas de reação, na temperatura de 110°C e com concentração de NaOH de 60%. O tempo, como efeito principal na reação, tem grande influência na velocidade no aumento do grau de desacetilação, iniciando com alta velocidade e sofrendo redução significativa para tempos maiores.

Agradecimentos

Agradeço a CAPES pelo suporte financeiro.

Referências Bibliográficas

1. SERRA, M.C.V.F.; GOMES, D.R., CRISOSTOMO, M.R. Fisiologia e fisiopatologia. In: Lima Junior EM, ed. Tratado de queimaduras: São Paulo: Editora Atheneu, p.37- 42, 2004.
2. VIDAL, M.O. Assistência de Enfermagem com o Paciente Queimado. In: LIMA JR, E. M.; SERRA, M. C.V.F. Tratado de queimaduras. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 325-327, 2006.
3. CHUA, K.-G. NEOH, E.-T. KANG, W. WANG, Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion, Biomaterials, 29, 1412-1421, 2008.
4. YOSHIDA, C.M.P.; OLIVEIRA, E.N.; Chitosan Tailor made films: The effects of additives on barrier and mechanical properties. Packaging Technology Science, v.22, n.3, p.161-170, 2009.
5. SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J.K.V.; JEAN, Y.J. Food applications of chitin and chitosans. Trends in Food Science and Technology, v.10, n.2, p. 37-51, 1999.
6. PARK .Y.J, LEE Y.M, PARK, S.N. Platelet derived growth factor releasing chitosan sponge for periodontal bone regeneration. Biomaterials, p 153–159, 2000.
7. METHACANON, P.; PRASITSILP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. Carbohydrate Polymers, v. 52, n. 2, p. 119- 123, 2003.
8. BOX, G. E. P.; HUNTER. The 2^{k-p} Fractional Factorial Designs. J. S., J. Technometrics. v. 3, p. 311-458, 1961.
9. DOMSZY, J.G.; ROBERTS, G. A. F.; Evaluation of infrared spectroscopic techniques for analysing chitosan. Die Makromolekulare Chemie, 186, 1671–1677, 2003.
10. PAVIA, D.; LAMPMAN, G.Introdution to spectroscopy, 3. ed., 2001; Philadelphia: Brooks/Cole.