

AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO DE MEMBRANAS DE QUITOSANA TRATADAS POR PLASMA DE HIDROGÊNIO PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

M.O.C. Macêdo^{1*}; H.R.A. Macêdo¹; Z.M. Santos²; M.R. Pereira³; C. Alves Jr⁴

¹ UFRN, Programa de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, 59.072-970, Natal, RN

² UFRSA, 59.625-900, Natal, RN

³ UFRN, Departamento de Química, 59.072-970, Natal, RN

⁴ UFRN, Departamento de Mecânica, 59.072-970, Natal, RN

Palavras-chave: Quitosana, modificação, plasma, hidrogênio.

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se as modificações das membranas de quitosana tratadas por plasma de hidrogênio. A introdução de membranas poliméricas em plasma permite a formação de vários radicais livres e a inserção de grupos funcionais, principalmente com gases não formadores de filmes como é o caso do hidrogênio. As espécies ativas presentes no tratamento são responsáveis pelas modificações superficiais que ocorrem no material. Membranas de quitosana foram tratadas durante 1 hora em atmosfera de hidrogênio, com pressão de 6 mbar, corrente 0,09A e fluxo de 16 cm³/min de hidrogênio. Durante o tratamento realizou-se o diagnóstico por espectroscopia de emissão ótica das espécies ativas presentes no plasma. As modificações superficiais foram caracterizadas por microscopia de força atômica e molhabilidade. Além disso, realizaram-se ensaios de absorção e permeação em relação ao fármaco sulfamerazina de sódio. As amostras tratadas apresentaram-se mais rugosas (5,062nm) e hidrofílicas(41,98°). Quanto ao teste de permeabilidade as membranas tratadas apresentaram uma permeação constante (2,36210⁻⁵g cm².min⁻¹) indicando que as mesmas podem ser usadas em sistema de liberação de fármacos.

ABSTRACT

In this study we evaluated the modification of chitosan membranes treated by hydrogen plasma. The introduction of polymeric membranes in plasma allows the formation of several free radicals and the insertion of functional groups, mainly with non-forming films gases such as hydrogen. The active species present in the treatment are responsible for surface modifications that occur in the material. Chitosan membranes were treated for 1 hour in hydrogen atmosphere, with pressure of 6 mbar, current 0.09 A and flow of 16 cm³/min of hydrogen. During treatment the diagnosis was carried out by optical emission spectroscopy of active species present in plasma. The surface modifications were characterized by atomic force microscopy and wettability. In addition, assays were performed absorption and permeation in relation to drug sulfamerazina sodium. The treated samples were more rough (5.062 nm) and hydrophilic (41.98°). The test permeability membranes treated showed a

permeation constant (2,36210⁻⁵g cm².min⁻¹) indicating that they can be used in drug delivery system.

1. INTRODUÇÃO

Nesses últimos anos, a indústria farmoquímica tem-se destacado pelo uso e aproveitamento de matérias primas de baixo custo e fácil acesso, como por exemplo, os materiais poliméricos. Esses estão sendo utilizados na liberação controlada de fármacos [1].

Dentre esses materiais podemos citar as membranas poliméricas. Polímeros biodegradáveis naturais e/ou sintéticos estão sendo utilizados na fabricação destas membranas, mas apenas alguns têm demonstrado biocompatibilidade. Entre os polímeros que se destacam pela excelente biocompatibilidade estão os polissacarídeos. Como exemplo tem-se a quitosana que devido a sua abundância, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade tem-se destacado entre os polímeros polissacarídicos utilizados em sistemas carreadores de fármacos [2,3].

Além disso, a quitosana foi um dos biopolímeros mais citados em um estudo de monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros, obtendo o 2º lugar dentre os biomateriais mais citado e em número de patentes [4].

As membranas de quitosana possuem uma boa resistência mecânica aliada a uma permeabilidade molecular seletiva. Devido a estas características, membranas de quitosana estão sendo utilizadas em: empacotamento de alimentos, pele artificial, cicatrização de ferimentos, sistemas de liberação de fármacos e outras aplicações. A permeabilidade das membranas de quitosana é afetada por vários fatores como: espessura do filme, grau de desacetilação, massa molar e grau de molhabilidade [5].

Atualmente esforços têm sido utilizados para modificar o grau de molhabilidade das membranas, ajustando a superfície hidrofílico-hidrofóbica, com o objetivo de alterar a permeabilidade. A modificação da permeabilidade das membranas de quitosana é de suma importância no estudo do tratamento de água para ultrafiltração (hemodiálise) e liberação de fármacos [6].

O tratamento por plasma tem-se mostrado como uma técnica particularmente interessante para transformar membranas poliméricas. Essa técnica altera somente a natureza química

* marinalabplasma@gmail.com

e morfológica da superfície das mesmas, sem a necessidade de adicionar outro polímero ou modificar as propriedades volumétricas do material [6].

Com o objetivo de avaliar os efeitos do plasma de hidrogênio nas membranas de quitosana, a fim de alterar as suas propriedades de superfície e sua permeabilidade, realizou-se este trabalho.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 MATERIAIS

A quitosana (Polymar Ltda, Fortaleza, Brasil) usada neste trabalho apresentou grau de desacetilação em torno de 90% segundo o fabricante. Sua massa molar ($\overline{M}_v = 2,0 \times 10^5$ Da) foi determinada pelo método de viscosimetria, utilizando a equação de Mark-Howink-Sakurada [7,8]. O fármaco sulfamerzina de sódio ($MM = 286,8 \text{ gmol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foi usado como recebido.

2.2 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS

A quitosana em pó foi dissolvida em solução aquosa de ácido acético 0,35 mol/L, sob agitação constante. Após um período de 24h a solução passou por duas filtrações e um volume de 27 ml da solução de quitosana foi então adicionado às placas de Petri e estas colocadas em estufa a 50°C para evaporação do solvente. Depois de retiradas da estufa, às membranas formadas ficaram imersas em uma solução aquosa de 1,25 mol/L de NaOH. Em seguida as mesmas foram lavadas com água destilada em abundâncias para remoção dos resíduos de sal. E por fim na última etapa realizou-se o estiramento e secagem das membranas à temperatura ambiente, por 24 h.

2.3 TRATAMENTO POR PLASMA

O equipamento utilizado para tratar as membranas de quitosana foi desenvolvido no laboratório de processamento de materiais por plasma da UFRN e encontra-se ilustrado na Figura 1.

Durante o tratamento das membranas de quitosana utilizou-se como gás de trabalho o hidrogênio no fluxo de $16 \text{ cm}^3/\text{min}$. Pressão de trabalho em 6,0 mbar, corrente 0,09 A, durante 1 hora.

2.4 DIAGNÓSTICO DO PLASMA

Para investigar as espécies presentes no plasma, o diagnóstico por espectroscopia óptica foi realizado por um sistema composto de um espectrômetro de emissão Acton Spectrapro 2500i com comprimento focal de 500 mm, resolução espectral mínima de 0.05nm.

Neste trabalho foi utilizado a rede de 1800g/mm e uma fibra ótica de 5m de comprimento que interliga a luz proveniente do plasma ao monocromador. Um fotodiodo de silício de 10mm de diâmetro com resposta óptica entre 200-1100nm foi utilizado como detector.

A fibra ótica foi posicionada próximo ao reator, apontando diretamente para a descarga luminescente. Os espectros de emissão adquiridos foram comparados com os valores encontrados no banco de dados de transição atômica disponível.

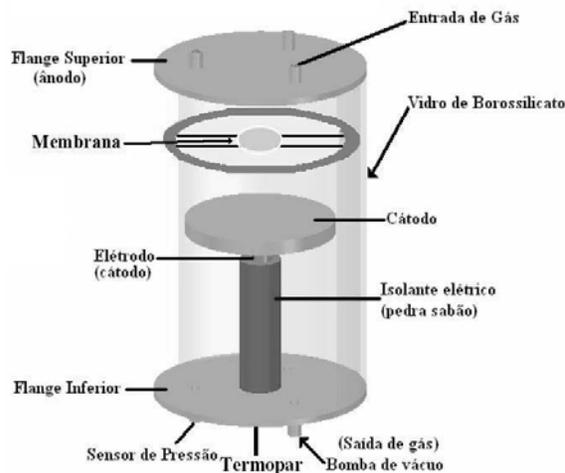


Figura 1 - Desenho esquemático do reator a plasma utilizado para tratamento de membranas de quitosana [9].

2.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As amostras tratadas e não tratadas foram analisadas por microscopia de força atômica (MFA), buscando-se caracterizar a topografia das mesmas e identificar as mudanças que pudessem ser atribuídas ao tratamento por plasma. Imagens tanto em duas como em três dimensões foram capturadas. Também foram realizadas medidas de rugosidade da superfície das membranas.

As imagens de MFA foram obtidas em um microscópio da shimadzu, modelo SPM-9600 (Japão), utilizando modo dinâmico numa taxa de varredura de 1Hz. Áreas aleatórias de $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$ foram escaneadas e analisadas pelo programa SPM Maneger Versão 3.4 (Japão).

2.6 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

As medidas de ângulo de contato, baseadas na técnica de gota sêssil, foram realizadas em um aparato desenvolvido no Laboratório de processamento de materiais por plasma (lab-plasma), o qual se baseia na determinação do ângulo de contato através de medidas de diâmetro da base da gota e da altura da mesma.

O aparato usado para medir o ângulo de contato está ilustrado na Figura 2. O mesmo é composto de uma base móvel, com movimentos no sentido vertical, uma microcâmera, uma pipeta de volume regulável, e uma fonte de luz difusa.

As amostras foram colocadas sobre a base plana e em seguida foi depositado uma gota de $10 \mu\text{l}$ dos seguintes líquidos: água destilada, formamida e glicerol, sobre a superfície das membranas. O software utilizado para isolar as imagens foi o Pinnacle Studio Quickstart versão 8 e o software utilizado para calcular o ângulo de contato foi o surfpens.

2.7 ENSAIO DE ABSORÇÃO

A quantidade de água absorvida pelas membranas foi determinada pela imersão destas em água destilada a temperatura ambiente por 24h. As membranas de quitosana tratadas e não tratadas por plasma foram pesadas em uma balança analítica e em seguida imersas em água destilada. Acompanhou-se a porcentagem de ganho de massa através da pesagem da amostra em diferentes tempos. O ganho percentual de massa M foi calculado através da relação (Eq. 1):

$$\% = \frac{m_u - m_s}{m_s} \times 100 \quad (1)$$

onde m_u e m_s , representam respectivamente as massas das membranas úmida e seca.

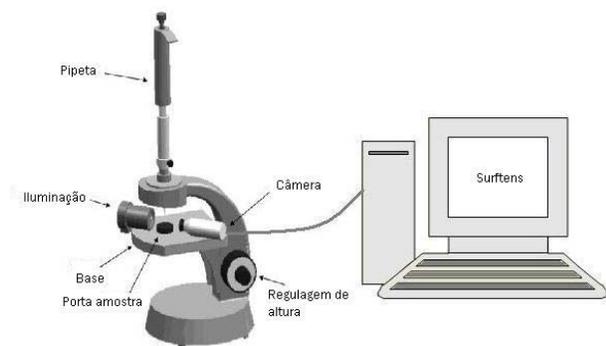


Figura 2 - Ilustração do equipamento utilizado para determinação do ângulo de contato [10].

2.8 ENSAIO DE PERMEAÇÃO

O fármaco modelo escolhido para ser permeado foi a sulfamerazina de sódio, em virtude de algumas de suas características como solubilidade em água e absorção na região do ultravioleta.

O ensaio de permeação consistiu em colocar a membrana em estudo presa firmemente entre dois compartimentos A e B de uma célula de permeação (Figura 3) em formato de U feita de PVC. No compartimento A, colocou-se 230,0 ml de solvente puro (água destilada) e no compartimento B, colocou-se 230,0 ml da solução de fármaco na concentração de 0,017 mol/L. Ambos os compartimentos foram submetidos à agitação constante. A célula de permeação estava imersa em banho termostático constante de $30^\circ \pm 0,1^\circ\text{C}$.

Uma bomba peristáltica foi usada para fazer a conexão entre a célula de permeação e o espectrofotômetro através de um tubo de silicone obtendo-se assim um sistema de fluxo contínuo. Uma das extremidades do tubo de silicone foi colocada no compartimento A do sistema de permeação onde a alíquota foi retirada, levada até a cubeta de quartzo do espectrofotômetro e continuamente devolvida ao compartimento A. A medida de absorbância foi feita no comprimento de onda (λ) de 260 nm, pois a sulfamerazina de sódio tem sua banda de absorção neste ponto. Obteve-se um gráfico da

permeação, pegou-se um ponto desse gráfico e calculou-se através da lei de Lambert-beer (Eq. 2).

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2)$$

onde A é absorbância, ε é absorvidade molar da solução, b o caminho ótico, c é a concentração.

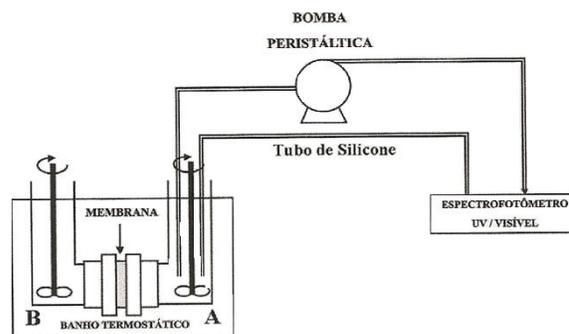


Figura 3 - Esquema da célula de permeação [11].

3. RESULTADOS

3.1 DIAGNÓSTICO DO PLASMA

A Figura 4 representa um típico espectro de OES do plasma de hidrogênio. Nesta figura é observado picos correspondentes às transições radiativa do átomo de hidrogênio excitado. Esses picos de hidrogênio são conhecidos como as linhas espectrais de Balmer [12]. Predominantemente o mecanismo para a produção de hidrogênio é a dissociação da molécula de hidrogênio por impacto de elétrons [13]. Além do hidrogênio também, é observado átomo de nitrogênio que pode ser oriundo da amostra, já que a quitosana possui em sua estrutura o grupo amina (-NH-).

O plasma gerado a partir do gás hidrogênio não resulta na deposição de filmes, e o impacto ou a reação química de íons do plasma com o material resulta na formação de sítios ativos na superfície modificando, portanto suas propriedades superficiais como rugosidade, textura e grau de molhabilidade.

3.2 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

Através das imagens obtidas por AFM (Figura 5) obtivemos o valor da rugosidade natural da membrana de quitosana (Tabela 1) e observou-se também a textura desse material. Sua superfície apresentou-se com picos pequenos e pontiagudos, distribuídos de forma homogênea.

Após o tratamento com plasma de hidrogênio, a superfície passou a apresentar vales e picos dispersos. Os picos apresentaram-se mais pontiagudos e mais altos, do que na amostra não tratada (Figura 6). Com o tratamento houve também um aumento da rugosidade do material (Tabela 1).

As modificações observadas no material tratado estão relacionadas com as espécies presentes durante o tratamento. Através do OES constatou-se a presença de átomos de hi-

drogênio, estes são leves e, portanto possuem grande mobilidade, essa mobilidade por sua vez proporciona o impacto das espécies presentes no plasma com a amostra em tratamento, esse impacto provoca deformações no material, modificando a textura e rugosidade.

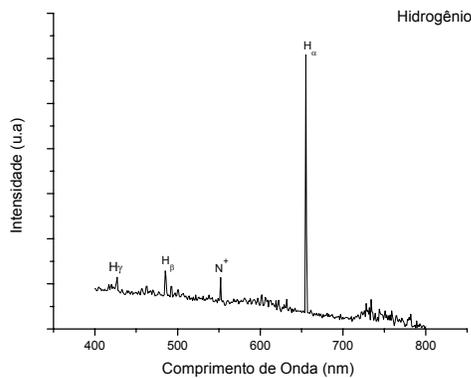


Figura 4 - Espectroscopia de emissão ótica de hidrogênio.

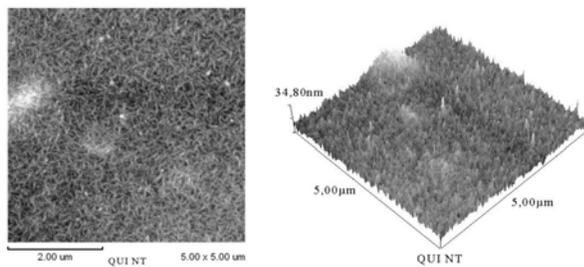


Figura 5 - Microscopia de força atômica das amostras não tratadas.

Tabela 1 - Valores de rugosidade e altura máxima do picos

Membrana	Rugosidade (Ra)	Altura dos picos (nm)
QUI NT	3.426 nm	34,80
QUI H ₂	5.062 nm	246,12

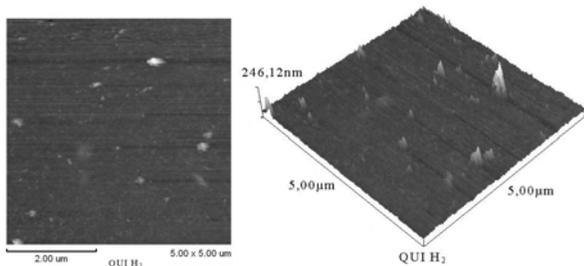


Figura 6 - Microscopia de força atômica das amostras tratadas.

3.3 MEDIDAS DE ÂNGULO DE CONTATO

Na Figura 7 observam-se as medidas de ângulo de contato para as membranas não tratadas e tratadas por plasma de hidrogênio. A amostra tratada apresentou uma molhabilidade

maior do que a não tratada. O aumento dessa molhabilidade é atribuído a modificações químicas que pode ter ocorrido no material. As espécies de hidrogênio e nitrogênio encontradas no diagnóstico do plasma estão relacionadas ao aumento da coordenada polar da tensão superficial que torna o material mais hidrofílico.

O impacto dessas espécies com o material provoca a formação de sítios ativos como, por exemplo, radicais livres, tornando a superfície ativada, esta pode sofrer um rearranjo molecular e a inserção de grupos funcionais, neste caso grupos funcionais hidrofílicos, como afirma Chen Jie-Rong et.al. [14] em seu trabalho de tratamento de filmes de poliéster com plasma de hidrogênio.

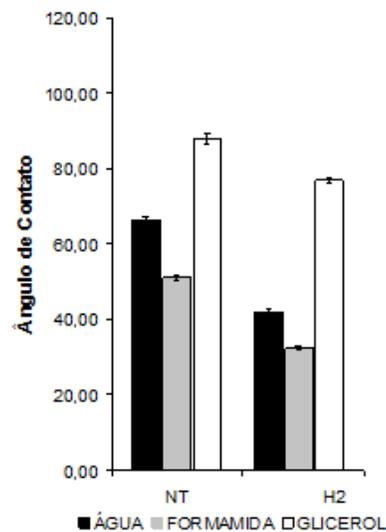


Figura 7 - Ângulo de contato das amostras não tratadas (NT) e tratadas com hidrogênio (H₂).

3.4 ENSAIO DE ABSORÇÃO

Analisando a Figura 8 que apresenta o gráfico de ganho de massa das membranas observa-se que tanto a membrana não tratada e tratada com hidrogênio apresentou um ganho de massa superior a 100%, o que é uma indicação da forte afinidade desse polímero pela água, isso é devido aos grupos amino (-NH-) e hidroxila (-OH-) que estão na estrutura da membrana e dão a quitosana um caráter hidrofílico.

Observando a Figura 8 percebe-se que houve poucas diferenças no ganho de massa entre as membranas tratadas e não tratadas apesar de que as membranas tratadas com plasma de hidrogênio apresentaram um grau de hidrofiliidade maior como visto nos testes de medidas de ângulo de contato.

3.5 ENSAIO DE PERMEACÃO

Todos os experimentos de permeação do fármaco sulfamezazina de sódio foram feitos em duplicatas e apresentaram boa reprodutibilidade (Figura 9). Durante os ensaios também não foi observado nenhum desvio na reta, isso é um indicativo de que não houve nenhuma interação do fármaco com a membrana (Figura 10)

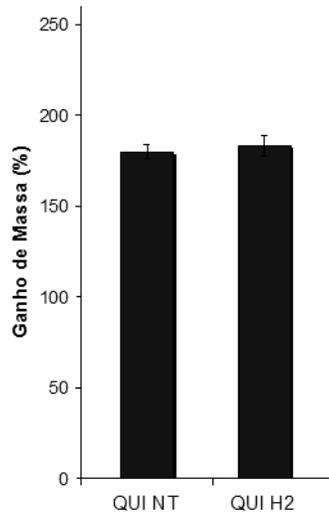


Figura 8 - Gráfico representativo do ensaio de absorção das amostras tratadas e não tratadas.

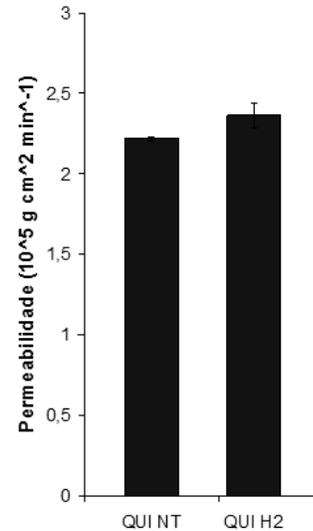
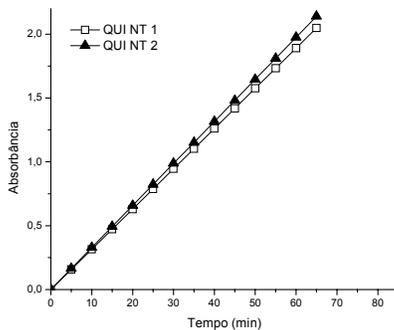
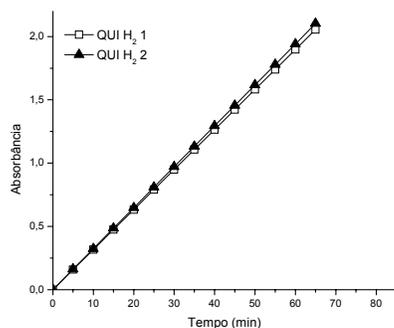


Figura 10 - Permeabilidade das membranas não tratadas (NT) e das membranas tratadas (H₂).



(a)



(b)

Figura 9 - Gráfico do ensaio de permeação das membranas não tratadas (a) e das membranas tratadas (b).

Na Figura 11 e Tabela 2 são apresentados os valores de permeabilidade do fármaco sulfamerazina de sódio calculados para os dois tipos de membranas estudadas. Na Figura 9 observou-se pouca diferença entre a permeabilidade das membranas tratadas e não tratadas.

Tabela 2 - Permeabilidade das membranas

Membrana	P($10^{-5} \text{ g cm}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$)	Desvio Padrão
QUI	2,218	0,014
QUI H ₂	2,362	0,074

4. CONCLUSÃO

O tratamento por plasma de hidrogênio é uma técnica eficiente na modificação das propriedades superficiais como rugosidade e molhabilidade. As membranas tratadas apresentaram uma permeação constante, indicando que essas podem ser usadas em sistemas de liberação de fármacos, entretanto pode-se afirmar que não existe diferença de permeação entre as membranas estudadas. O aumento da molhabilidade pode ser um indicativo de aumento de biocompatibilidade do material, para confirmar tal aumento de biocompatibilidade as membranas podem ser submetidas a testes in vitro para avaliação de citotoxicidade e adesão celular.

AGRADECIMENTOS

A Capes, CNPq, Laboratório de membranas e colóides, Labplasma.

REFERÊNCIAS

- TRINDADE, C.G.N. *Obtenção de membranas de quitosana modificadas e estudo das suas propriedades térmicas e permeabilidade*. Dissertação de Mestrado (2006). UFRN, Natal (RN).
- FREIRE, A.C.; PODCZECK, F.; SOUSA, J.; VEIGA, F., *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 42 (2006) 337-355.
- DODANE, V.; VILIVALAM, V.D., *Pharmaceutical Science & Technology Today* 1 (1998) 246-253.
- BORSCHIVER, S.; ALMEIDA, L.F.M.; ROITMAN, T., *Pólimeros: Ciência e Tecnologia* 18 (2008) 256-261.

5. CHEN, X.; ZHENG, L.; WANG, Z.; LEE, C.; PARK, H., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 30 (2002) 5915-5918.
6. WANG, H.; FANG, Y.; YAN, Y., *Journal of Materials Chemistry* 11 (2001) 1374-1377.
7. TSAIH, M. L.; CHEN, R.H.J., *Journal of Applied Polymer Science* 73 (1999) 2041-2050.
8. TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G., *Química Nova* 25 (2002) 943-948.
9. MACÊDO, M.O.C., *Modificação de Membranas de Quitosana por Plasma para uso Biológico*, Dissertação de Mestrado (2009), UFRN, Natal (RN).
10. MACEDO, H.R.A., *Efeito do Tratamento Térmico do Titânio sobre a Proliferação de Células Pré-osteoblásticas*, Dissertação de Mestrado (2008), UFRN, Natal (RN).
11. OLIVEIRA, H.C.L., *Membranas de Complexos Polieletrólitos de Quitosana e Poli (Ácido Acrílico): Preparo, Caracterização e Estudos de Permeabilidade* (2006), Dissertação de Mestrado, UFRN, Natal (RN).
12. JIN, D-Z; YANG, Z-H.; TANG, P-Y.; XIAO, K-X.; DAI, J-Y. *Vaccum* 83 (2009) 451-453.
13. VESEL, A.; DRENIK, A.; MOZETIC, M.; PICHELIN, M.B. *Vaccum* 84 (2010) 969-974.
14. CHEN, J.R., *Journal of Applied Polymer Science* 62 (1996) 1325-1329.