

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Curso De Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

**Tese de doutorado**

"Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA,  
quimicamente reticulado para aplicação potencial em  
engenharia de tecido epitelial"

Autor: Ezequiel de Souza Costa Júnior  
Orientador: Prof. Herman Sander Mansur  
Dezembro/2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

**Ezequiel de Souza Costa Júnior**

"Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulada para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial"

**Tese de doutorado apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da Universidade Federal de Minas Gerais**

**Área de concentração: Ciência e Engenharia de Materiais**  
**Orientador:** Prof. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte  
Escola de Engenharia da UFMG  
Dezembro de 2008

---

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo e por permitir minha convivência, indistintamente, com àqueles que me impuseram obstáculos instigando-me a superá-los, e aos que me apoiaram e incentivaram para que eu acreditasse ser capaz de transpô-los.

Aos meus pais, Ezequiel de Souza Costa e Maria José M. de Souza Costa, e aos meus irmãos, Eugênio, Maria Clara, Maria Ângela, Fernando, Maria Celeste, Maria Cristina e Hermes, que sempre estiveram presentes durante a minha caminhada.

Em especial à minha Esposa, Valéria Bruno de Souza Costa, que sempre compreendeu e suportou com paciência, dedicação e contribuições durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus filhos, Gustavo e Giovana, que privados do meu convívio souberam compreender e esperar pacientemente.

Ao Professor Herman Sander Mansur, pela amizade e orientação incentivadora em todas as etapas do trabalho.

À Professora Edel Figueiredo Barbosa-Stancioli, pela amizade e orientação na execução de toda a parte biológica envolvida neste trabalho.

Aos laboratoristas, Andréa Bicalho, Denise Souza, Ilda Batista, Isabel Batista, Patrícia Azevedo e Mateus Laguardia que tiveram a maior presteza e cortesia em me atender sanando minhas dúvidas operacionais.

Aos meus colegas, Agda Linero, Alexandra Mansur, Eliane Ayres, Fagner Oliveira, Hermes Costa, Juliano Oliveira, Lívio Jacques, Magda Rocha, Nelício Sales e Patrícia Santiago pelo companheirismo e disponibilidade para discussões que sem dúvida

esclareceram minhas observações equivocadas além da colaboração na execução dos ensaios.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG, aos professores pela disponibilidade de infraestrutura dos laboratórios e materiais para realização dos ensaios, e em especial aos funcionários Maria Aparecida Pacheco, Efigênia Araújo, Nelson Azevedo e Vicente Alves pela amizade.

À minha colaboradora Maria Aparecida Rodrigues principalmente pela atenção com meu conforto para eu conseguir realizar esse trabalho.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para participação de eventos ligados minha formação.

À JHS Laboratório Químico Ltda pelo fornecimento de hidroxiapatita utilizado nos experimentos biológicos *in vitro*.

Aos amigos e colegas professores da Coordenação do Curso Técnico do CEFET-MG que me incentivaram nessa empreitada.

Ao CEFET-MG que viabilizou minha liberação das atividades acadêmicas durante o período de doutoramento e à Fundação CefetMinas que apoiou esse trabalho.

## SUMÁRIO

	Lista de Figuras	viii
	Lista de Tabelas	xiii
	Lista de Notações	xiv
	<b>Resumo</b>	xviii
	<b>Abstract</b>	xix
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	5
<b>2.1</b>	<b>Objetivo principal</b>	5
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	5
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	7
<b>3.1</b>	<b>Estado da Arte</b>	7
3.1.1	Engenharia de tecidos, biomaterial e biodegradação	7
<b>3.2</b>	<b>Quitina/Quitosana</b>	9
3.2.1	Aspectos Gerais	9
3.2.2	Propriedades da Quitina e da Quitosana	12
3.2.2.1	Cristalinidade da Quitosana	12
3.2.2.2	Solubilidade da Quitosana	13
3.2.2.3	Grau de desacetilação e massa molar da quitosana	13
3.2.3	Aplicações	14
3.2.4	Modificações Químicas da Quitosana	17
<b>3.3</b>	<b>Poli(álcool vinílico-co-acetato de vinil) - PVA</b>	19
3.3.1	Aspectos Gerais	19
3.3.2	Propriedades	20
3.3.3	Aplicações	21
<b>3.4</b>	<b>Hidrogéis</b>	21
3.4.1	Intumescimento de hidrogéis	23
3.4.2	Degradação de hidrogéis	25
3.4.3	Propriedades mecânicas de hidrogéis	25
3.4.4	Reticulação de hidrogéis	27
<b>3.5</b>	<b>Reticulantes</b>	28

---

3.5.1	Glutaraldeído ou 1,5 pentanodial	28
3.5.2	Epicloridrina	29
3.5.3	Outros Reticulantes	29
<b>3.6</b>	<b>Avaliação da biocompatibilidade de materiais para aplicações médicas</b>	<b>30</b>
3.6.1	Redução do MTT	31
3.6.2	Produção de óxido nítrico por macrófagos	31
<b>3.7</b>	<b>Tecido Epitelial</b>	<b>33</b>
3.7.1	Histologia Da Pele	34
3.7.2	Processo de Cura de Lesões	37
3.7.3	Pele Artificial	39
<b>4</b>	<b>PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>43</b>
<b>4.1</b>	<b>Etapas de desenvolvimento do trabalho</b>	<b>43</b>
<b>4.2</b>	<b>Matérias Primas</b>	<b>43</b>
4.2.1	Caracterização das matérias primas	44
<b>4.3</b>	<b>Preparação dos filmes de hidrogel por evaporação de solvente</b>	<b>46</b>
4.3.1	Caracterização dos filmes de hidrogel	46
4.3.2	Caracterização biológica dos filmes de hidrogel <i>in vitro</i>	50
4.3.2.1	Procedimento de neutralização	50
4.3.2.2	Bloqueio dos sítios não reagidos com L-arginina	51
4.3.2.3	Viabilidade de células VERO <i>in vitro</i> por MTT	51
4.3.2.4	Citotoxicidade e viabilidade celular por produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	52
<b>4.4</b>	<b>Preparação das matrizes de hidrogel obtidos (<i>Scaffolds 3D</i>)</b>	<b>53</b>
4.4.1	Caracterização das matrizes de hidrogel 3D	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>56</b>
<b>5.1</b>	<b>Caracterização das matérias primas</b>	<b>56</b>
5.1.1	Quitosana e PVA	56
5.1.1.1	Difração de Raios-X	56
5.1.1.2	Espectroscopia na região do infravermelho	59
5.1.1.3	Titulação potenciométrica	62
<b>5.2</b>	<b>Caracterização dos filmes de hidrogel</b>	<b>64</b>

---

5.2.1	Avaliação qualitativa	64
5.2.2	Microscopia eletrônica de varredura	66
5.2.3	Espectroscopia na região do infravermelho	66
5.2.4	Difração de Raios-X	74
5.2.5	Propriedades mecânicas	77
5.2.6	Grau de intumescimento	86
5.2.7	Ensaio de degradação <i>in vitro</i>	91
5.2.8	Medição do ângulo de contato	96
<b>5.3</b>	<b>Caracterização biológica dos filmes de hidrogel <i>in vitro</i></b>	<b>98</b>
5.3.1	Citotoxicidade e viabilidade celular <i>in vitro</i> por MTT	98
5.3.2	Citotoxicidade e viabilidade celular por produção de óxido nítrico <i>in vitro</i>	101
5.3.2.1	Análises da produção de óxido nítrico pós-estímulo	104
5.3.2.2	Análises da produção de óxido nítrico sem estímulo	105
<b>5.4</b>	<b>Caracterização das matrizes 3D de hidrogel</b>	<b>107</b>
5.4.1	Avaliação visual qualitativa	107
5.4.2	Grau de intumescimento	107
5.4.3	Degradação das matrizes	108
5.4.4	Avaliação das propriedades mecânicas das matrizes	109
5.4.5	Avaliação da deposição biomimética	111
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>112</b>
<b>7</b>	<b>CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO</b>	<b>114</b>
<b>8</b>	<b>TRABALHOS FUTUROS</b>	<b>116</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>117</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 3.1</b>	– Estrutura da celulose, quitina e quitosana, (a), (b) e (c), respectivamente	10
<b>FIGURA 3.2</b>	– Derivados de quitosana	19
<b>FIGURA 3.3</b>	– Classificação de hidrogéis quanto a natureza da ligação	23
<b>FIGURA 3.4</b>	– Classificação de hidrogéis de quitosana	23
<b>FIGURA 3.5</b>	– Propriedades mecânicas de um polímero	26
<b>FIGURA 3.6</b>	– Estrutura molecular e tridimensional do glutaraldeído	28
<b>FIGURA 3.7</b>	– Estrutura molecular e tridimensional da epícloridrina	29
<b>FIGURA 3.8</b>	– Composição do tecido epitelial	35
<b>FIGURA 3.9</b>	– Divisões do tecido epitelial	37
<b>FIGURA 3.10</b>	– As fases de reparo de lesões cutâneas	38
<b>FIGURA 4.1</b>	– Fluxograma das etapas de trabalho	43
<b>FIGURA 4.2</b>	– Modelo de divisão do difratograma em regiões	47
<b>FIGURA 4.3</b>	– Esquema de obtenção da matriz 3D	54
<b>FIGURA 5.1</b>	– Difratogramas das matérias primas: Quitosana (a) e PVA (b)	56
<b>FIGURA 5.2</b>	– Estrutura tridimensional <i>in silico</i> das fibras de Quitosana	57
<b>FIGURA 5.3</b>	– Espectro de FTIR e estrutura química da quitosana com GD=75,6%	59
<b>FIGURA 5.4</b>	– Espectro de FTIR e estrutura química do PVA com GH=80%	62
<b>FIGURA 5.5</b>	– Curva de titulação potenciométrica e derivada primeira da quitosana – GD = 75,6%	63
<b>FIGURA 5.6</b>	– Filmes das blendas de QUI/PVA, quitosana e PVA puros e reticulados com 1% e 5% de GA	65
<b>FIGURA 5.7</b>	– Filmes de Q/P/G (1:3:1), vista superficial (a), seção transversal (b); Q/P/G (1:1:1), vista superficial (c), seção transversal (d); Q/P/G(3:1:1), vista superficial (e), seção transversal (f).	67
<b>FIGURA 5.8</b>	– Espectros de FTIR dos filmes Q/P/G(1:0:0) (a); Q/P/G(1:0:0,5) (b); Q/P/G(1:0:1) (c) e Q/P/G(1:0:5) (d).	68

- FIGURA 5.9** – Espectros de FTIR dos filmes de Q/P/G(1:0:0) (a); Q/P/G(3:1:0) (b); Q/P/G(1:1:0) (c); Q/P/G(1:3:0) (d) e Q/P/G(0:1:0) (e). 69
- FIGURA 5.10** – Relação entre a intensidade das bandas da amina e a concentração de GA na quitosana. 70
- FIGURA 5.11** – Relação entre a intensidade das bandas da imina e a concentração de GA na quitosana. 70
- FIGURA 5.12** – Reticulação da quitosana (a) e PVA(b) 72
- FIGURA 5.13** – Espectro de FTIR das blendas de Q/P/G(1:3:0)(a), Q/P/G(1:3:1) (b) e Q/P/G(1:3:5) (c). 72
- FIGURA 5.14** – Imagem 3D das fibras de quitosana reticuladas com glutaraldeído 73
- FIGURA 5.15** – Evolução das bandas de formação de imina (C=N) e redução de amina (NH<sub>2</sub>), durante a reticulação da quitosana pelo GA na blenda Q/P(1:3). 74
- FIGURA 5.16** – Evolução da banda de 1,110cm<sup>-1</sup> durante a reticulação do PVA 74
- FIGURA 5.17** – Difratoograma da quitosana pura e com [GA] de 1,0% e 5,0%, (a), (b) e (c), respectivamente. 75
- FIGURA 5.18** – Difratoograma dos filmes de PVA – (a) Q/P/G(0:1:0); (b) Q/P/G(0:1:0,5); (c) Q/P/G(0:1:1); (d) Q/P/G(0:1:3); (e) Q/P/G(0:1:5) 76
- FIGURA 5.19** – Difratoograma de filmes das blendas de quitosana /PVA, (a) Q/P/G(1:3:0); (b) Q/P/G(1:3:0,5); (c) Q/P/G(1:3:1); (d) Q/P/G(1:3:3);(e) Q/P/G(1:3:5) 77
- FIGURA 5.20** – Gráfico típico de tensão de tração x deformação específica do PVA GH=80% 78
- FIGURA 5.21** – Gráfico de tensão x deformação apresentando as curvas dos filmes das blendas Q/P/G(0:1:0) (a), Q/P/G(1:3:0)(b), Q/P/G(1:1:0)(c), Q/P/G(3:1:0)(d) e Q/P/G (1:0:0) (e) 79
- FIGURA 5.22** – Influência da concentração de quitosana na tensão máxima de tração. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c). 80

- FIGURA 5.23** – Influência da concentração de GA na tensão máxima de tração. 82  
PVA ■, Q/P(1:3) □, Q/P(1:1) ▨, Q/P(3:1) ▩, QUI ≡
- FIGURA 5.24** – Influência da concentração de quitosana na deformação específica das blendas. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c) 83
- FIGURA 5.25** – Influência da concentração de GA no módulo de elasticidade das blendas. PVA ■, Q/P(1:3) □, Q/P(1:1) ▨, Q/P(3:1) ▩, QUI ≡ 83
- FIGURA 5.26** – Influência da concentração de quitosana no módulo de elasticidade das blendas. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c) 84
- FIGURA 5.27** – Influência da concentração de GA no módulo de elasticidade das blendas. PVA ■, Q/P(1:3) □, Q/P(1:1) ▨, Q/P(3:1) ▩, QUI ≡. 84
- FIGURA 5.28** – Influência da concentração de quitosana na tenacidade das blendas. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c). 85
- FIGURA 5.29** – Influência da concentração de GA na tenacidade das blendas. PVA ■, Q/P(1:3) □, Q/P(1:1) ▨, Q/P(3:1) ▩, QUI ≡ 85
- FIGURA 5.30** – Efeito do teor de quitosana nas blendas com 5% de GA em 4h de imersão em SBF 87
- FIGURA 5.31** – Intumescimento em SBF pelo PVA com 5% de GA. 88
- FIGURA 5.32** – Intumescimento em SBF pela quitosana sem reticulação (▩) e reticulada com 1% (▨) e 5% (▩) de GA. 89
- FIGURA 5.33** – Intumescimento em SBF pela blenda Q/P(1:3) sem reticulação (▩) e reticulada com 1% (▨) e 5% (▩) de GA 89
- FIGURA 5.34** – Intumescimento em SBF pelas blendas Q/P(1:3) (▩), Q/P(1:1) (▨), Q/P(3:1) (▩) sem reticulação 90
- FIGURA 5.35** – Intumescimento em SBF pelas blendas Q/P(1:3) (▩), Q/P(1:1) (▨), Q/P(3:1) (▩) com 1% de agente reticulante. 90
- FIGURA 5.36** – Taxa de intumescimento em SBF da blenda Q/P(1:3) sem reticulação (a) e reticulada com 1%(b) e 5% (c) de GA 91

<b>FIGURA 5.37</b>	– Degradação do PVA com 5% de GA em SBF	92
<b>FIGURA 5.38</b>	– Índice de degradação da blenda Q/P(1:3) sem reticulação(▣) e com 1% (▤) e 5% (▥) de GA.(n=3)	93
<b>FIGURA 5.39</b>	– Imagem de MEV da blenda Q/P/G(1:3:0), Q/P/G(1:3:1) , Q/P/G(1:3:5) após degradação em SBF	93
<b>FIGURA 5.40</b>	– Espectros de FTIR das blendas Q/P/G(1:3:0), Q/P/G(1:3:1) Q/P/G(1:3:5) antes (a), (c) e (e) e após o período de degradação (b) (d) e (f), respectivamente	94
<b>FIGURA 5.41</b>	– Taxa de degradação em SBF da blenda Q/P(1:3) sem reticulação (a) e reticulada com 1%(b) e 5% (c) de GA	95
<b>FIGURA 5.42</b>	– Gráfico do ângulo de contato em relação ao teor de quitosana nos filmes obtidos	96
<b>FIGURA 5.43</b>	– Ângulos de contato quitosana (a), PVA (b) e blenda Q/P/G(1:3:0) (c).	97
<b>FIGURA 5.44</b>	– Tensão superficial estimada a partir do ângulo de contato em função do teor de quitosana dos filmes obtidos	97
<b>FIGURA 5.45</b>	– Viabilidade de células VERO analisadas com a metodologia de MTT	99
<b>FIGURA 5.46</b>	– Viabilidade de células VERO com e sem bloqueio por L-arginina	100
<b>FIGURA 5.47</b>	– Imagens de MEV evidenciando morfologia, adesão e proliferação celular	100
<b>FIGURA 5.48</b>	– Produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados ▣ ou não ▤ em diferentes blendas de quitosana/PVA	102
<b>FIGURA 5.49</b>	– Produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados ▥ ou não ▦ em diferentes blendas de quitosana/PVA com e sem bloqueio por L-arginina	103
<b>FIGURA 5.50</b>	– Viabilidade de células de macrófagos analisadas com a metodologia de MTT	104
<b>FIGURA 5.51</b>	– Registro fotográfico da leitura de MTT por macrófagos	106

- FIGURA 5.52** – Imagem fotográfica da matriz obtida Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1) 107
- FIGURA 5.53** – Grau de intumescimento das matrizes 3D, Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1) (a); Q/P/G(1:3:1)/Q/P/G(1:3:5) (b) e Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:5) (c) 108
- FIGURA 5.54** – Taxa de degradação das matrizes 3D Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1)(a); Q/P/G(1:3:0)/ Q/P/G(1:3:5)(b); Q/P/G(1:3:1)/Q/P/G(1:3:5)(c) 109
- FIGURA 5.55** – Evolução do Módulo de elasticidade das matrizes 3D 110
- FIGURA 5.56** – Evolução da tenacidade das matrizes 3D 110
- FIGURA 5.57** – Imagem de MEV e gráfico de EDS da matriz Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1), lado do filme Q/P/G(1:3:0) após 14 dias de imersão em SBF 111
- FIGURA 5.58** – Imagem de MEV e gráfico de EDS da matriz Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1), lado do filme Q/P/G(1:3:1) após 14 dias de imersão em SBF. 111

---

**LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 3.1</b>	Influência da MW e GH do PVA sobre suas propriedades	20
<b>TABELA 4.1</b>	Concentração iônica das soluções de SBF e Plasma Sanguíneo e TRIS	49
<b>TABELA 4.2.</b>	Relação de reagente do PBS	51
<b>TABELA 5.1</b>	Números de onda e grupos característicos da quitosana	60
<b>TABELA 5.2</b>	Números de onda e grupos característicos do PVA e PVAc	61
<b>TABELA 5.3</b>	Avaliação qualitativa dos filmes moldados	65
<b>TABELA 5.4</b>	Excesso de grupos reativos por mol	71
<b>TABELA 5.5</b>	Valores de Tensão, Deformação, Módulo de Elasticidade e Tenacidade com Respetivos Desvios Padrão	78

## LISTA DE NOTAÇÕES

$\beta$	–	Ângulo da célula unitária monoclinica
$\sigma$	–	Tensão de tração
$\Delta\ell$	–	Variação de comprimento
“C”	–	Concentração
“D”	–	Coefficiente de difusão
“X”	–	Posição genérica
2D	–	Bidimensional
3D	–	Tridimensional
A	–	Área da seção
$A_A$	–	Área amorfa
ABNT	–	Associação Brasileira de Normas Técnicas
$A_C$	–	Área cristalina
ASTM	–	<i>American Society Testing and Materials</i>
ATCC-CCL	–	<i>American Type Cell Collection-Continuous Cells Lineage</i>
BSA	–	Soro albumina bovina
CC	–	Controle celular
DE	–	Deformação específica
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido desoxirribonucléico
E	–	Módulo de elasticidade
EDX	–	Espectroscopia dispersiva de raios X
EFSA	–	<i>(European Food Safety Authority)</i>
EGF	–	<i>(Epidermal growth factor)</i> – Fator de crescimento epidérmico
Esp.	–	Espessura
FAK	–	<i>(Focal adhesion kinase)</i> - Cinase de adesão focal
FTIR	–	<i>Fourier Transformed Infrared</i>
GA	–	Glutaraldeído
GC	–	Grau de cristalinidade

---

GD	–	Grau de desacetilação
$\overline{GD}$	–	Grau médio de desacetilação
GH	–	Grau de hidrolise
GI	–	Grau de intumescimento
Gly	–	Glicina
HA	–	Hidroxiapatita
HEMA	–	Metacrilato de 2-Hidroxietila
HUVECS	–	<i>(Human Umbilical Vein Endothelial Cells)</i> - células endoteliais de cordão umbilical
ID	–	Índice de degradação
IFN- $\gamma$	–	Interferon gama
IL	–	<i>Interleukin</i>
ISO	–	<i>International Standardization Organization</i>
IUPAC	–	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IV	–	Infravermelho
$\ell_0$	–	Comprimento inicial
LPS	–	Lipopolissacarídeo
M	–	Massa
MEM	–	<i>(Minimum Eagle Medium -)</i> - Meio mínimo de Eagle
MEV	–	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	–	brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio
MW	–	Massa molar
N	–	Número de mols
NADPH	–	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
ND	–	Não determinado
NO	–	<i>(nitric oxide)</i> - Óxido nítrico
NOS	–	<i>(Nitric oxide synthase)</i> – Óxido nítrico sintase
PBS	–	<i>(Phosphate buffered saline)</i> – Tampão fosfato salino
PDGF	–	<i>(Platelet-derived growth factor)</i> - fator de crescimento derivado de plaquetas
PEG	–	Poli(etilenoglicol)

---

PEO	– Poli(óxido de etileno)
pH	– Potencial hidrogeniônico
pK <sub>a</sub>	– Logaritmo negativo da constante de acidez
PM	– Peso molecular
PMNs	– neutrófilos polimorfonucleares
PMVM	– Peso molecular viscosimétrico médio
PVA	– Poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila)
PVAc	– Poli(acetato de vinila)
PVP-I	– Polivinilpirrolidona Iodo
Q/P/G	– Quitosana/PVA/GA
R	– Radical genérico
RPMI-1640	– Meio de cultura desenvolvido por MOORE no <i>Roswell Park Memorial Institute</i> para suportar o crescimento de muitos tipos de cultura celular.
SBF	– <i>simulated body fluid</i> – Fluido corporal simulado
SFB	– Soro fetal bovino
T	– Temperatura
t	– Tempo
TGF-β	– ( <i>Transforming growth factor-β</i> ) - fator de crescimento transformante β
Tn	– Tenacidade
UV	– Ultravioleta
V	– Volume
VERO	– Linhagem celular oriunda de rim de macaco verde africano
WVP	– ( <i>Water vapor permeability</i> ) – permeabilidade ao vapor d'água
X	– Proporção de quitosana na blenda
XRD	– ( <i>X-ray diffraction</i> ) - Difractometria de raios X
Y	– Proporção de PVA na blenda
Z	– Proporção de glutaraldeído em relação a massa total de polímero
θ	– Ângulo de contato

## RESUMO

A pele é o órgão de revestimento corporal que exerce o papel de fronteira, entre o organismo e o ambiente, funciona, portanto, como interface organismo/ambiente. Esse papel exige do órgão funções de transição muito complexas e específicas, e está sujeito aos mais variados tipos de solicitações e lesões provocadas por agentes de origens diversas, tais como, origens físicas, mecânicas, químicas, eletromagnéticas, entre outras, além das inúmeras combinações entre elas. Entretanto apresenta uma enorme capacidade de auto-reparação. Essas características da pele têm suscitado inúmeras pesquisas no sentido de desvendar os fenômenos que ocorrem neste tecido além de procurar materiais que facilitem e acelerem o processo de auto-reparo.

A demanda crescente por materiais sintéticos para reparação tecidual também é resultante das fontes limitadas de materiais de enxerto autógeno e do risco aumentado para a saúde, associado ao uso de enxertos alógenos. Diante do exposto, este estudo foi realizado com o escopo de preparar e caracterizar do ponto de vista físico, químico, mecânico, de degradação *in vitro* e quanto a viabilidade celular *in vitro*, um biomaterial híbrido à base de polímeros de origens natural e sintética, quitosana/poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila), reticulados quimicamente com glutaraldeído, e construir uma matriz tridimensional para ser usada como substituto degradável de tecido epitelial.

O sistema investigado apresentou resultados promissores quanto a aplicação *in vivo*, pois as características mecânicas, de degradação *in vitro* e viabilidade celular foram compatíveis com as características do tecido epitelial. Os materiais apresentaram tenacidade variando de 1,4 a 34MJ/m<sup>3</sup>, grau de intumescimento de 150% a 700% em 24h, índice de degradação entre 20% e 75% em 24h e viabilidade celular *in vitro* acima de 60%, se comparada com o controle celular .

---

**ABSTRACT**

The skin is the organ of corporal covering that exercises the function of body boundary, between the body and the environment, therefore have functions as interface body/environment. That role requires both specific and much complex transition functions of the organ, and is subject to various kinds of demands and wounds provoked by agents from different sources, such as, electromagnetic, chemical, mechanical, physical, etc. and the countless combinations between them. However the skin presents a capacity of considerable self-repairing. Those characteristics of the skin have prompted countless researches in order to reveal the phenomena that occur in this tissue and to find materials that facilitate and accelerate the self-repairing process.

The increasing demand for synthetic materials to be used in tissue repair also results from the limited sources of autogenous graft biomaterials and from the increased risk for the health, associated to alogenuous grafts. This work was carried out aiming at the preparation and characterization, from the mechanical, chemical and physical standpoint, the degradation *in vitro* and the cellular viability *in vitro* of hybrid biomaterial based on polymers from both synthetic and natural sources, chitosan/poly(vinyl alcohol-co-vinyl acetate), chemically crosslinked with glutaraldehyde, and to build a three-dimensional matrix to be used as a degradable epithelial tissue substitute.

The investigated system provided encouraging results regarding its application *in vivo*. The mechanical properties, swelling behavior, degradation rate *in vitro* and cellular viability were compatible with the characteristic of an epithelial tissue. The material presented a toughness range from 1.4 to 34MJ/m<sup>3</sup>, swelling from 150% to 700% in 24h, degradation rate range of 20% and 75% in 24h and cellular viability *in vitro* above 60% compared to the cellular control.

## CAPÍTULO 1

### INTRODUÇÃO

As propriedades de crescimento de tecido são controladas tanto pelas características do tecido quanto do material do substrato suporte para seu desenvolvimento. A interação entre as duas substâncias conduz a propriedades físico-químicas e cinéticas específicas; que podem ser decisivas para sua aplicação prática, sendo assim, um biomaterial suporte criteriosamente escolhido pode aumentar significativamente o desempenho operacional de tal sistema. Embora seja reconhecido que não há um biomaterial universal para todas as aplicações, um número de características desejáveis deve ser comum a qualquer material considerado para tal fim. Entre as principais características incluem-se: alta afinidade a proteínas, leveza, ausência de odor, permeabilidade ao vapor d'água e ao oxigênio, disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com tecido vivo e para modificações químicas, hidrofília, estabilidade mecânica e rigidez, capacidade de regeneração, e facilidade de preparação em configurações de geometria diferente de modo a auxiliar a permeabilidade com o sistema além de área superficial conveniente para a biotransformação escolhida.

Dos muitos biomateriais que foram considerados e estudados como substrato-suporte para desenvolvimento de tecido, a quitina natural ou sintética, e a quitosana são interessantes, pois oferecem a maioria das características acima relacionadas (KOIDE, 1998; LEE, 1992; CHEN, 1996; KOBAYASHI, 1996; LEE, 1996; KURITA, 1998; MINOURA, 1998; BEPPU, 1999; OHYA, 1999; NOUSIAINEM, 2000; KUMAR, 2000; KOYANO, 2000; CHO, 2000; SUH, 2000; KUMAR, 2004; RINAUDO, 2006 )

A quitina que é um polissacarídeo natural e um dos recursos orgânicos renováveis mais abundantes do mundo. Um dos principais constituintes das conchas de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e da parede celular de fungos onde fornece resistência e estabilidade, e estima-se que pelo menos 10Gt por ano de quitina são sintetizadas e

degradadas na biosfera (KUMAR, 2004; KRAJEWKA, 2004; WANG, 2004; RINAUDO, 2006).

A quitosana obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina, apresenta solubilidade tanto em soluções ácidas quanto a agregação com poliânions que atribuem propriedades excelentes à mesma. Junto com propriedades biológicas raras que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade em produtos inofensivos, não tóxicos, fisiologicamente inertes, afinidade notável com proteínas, e propriedades hemostática, fungistática, antitumoral, anticolesterol. A quitina e a quitosana até agora, indubitavelmente, oferecem um potencial extraordinário numa larga faixa de aplicações que tendem a crescer rapidamente uma vez que os materiais quitinosos padronizados tornam-se disponíveis (MUZZARELLI, 1997; KUMAR, et al., 2004; BERGER, et al., 2004; RINAUDO, 2006). A quitosana se degrada pela hidrólise enzimática e apresenta cinética de degradação aparentemente relacionada ao grau de cristalinidade que é controlado principalmente pelo grau de desacetilação (GD) (MUZZARELLI, 1997; SUH, 2000), entretanto sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas principalmente para aplicação como filmes em bandagens, por exemplo, e por isso a mistura da mesma com outros polímeros é um procedimento utilizado para alterar ou obter as propriedades de interesse. Com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas e variar a taxa de degradação deste polissacarídeo utiliza-se a mistura da mesma com outros hidrogéis poliméricos sintéticos tais como o poli(álcool vinílico) (PVA), bem como, com reticulantes; que permitem a formação de ligações cruzadas para obtenção de redes.

O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e também ser biocompatível e biodegradável (CHIELLINI, 2003; MANSUR, 2005; LIN, 2006). Um estudo promovido pelo *European Food Safety Authority* (EFSA) em 2005 indicou que o PVA com massa molar de até 30kg/mol não apresentou evidência de toxicidade nem em 90 dias nem em 2 gerações de estudos com altos níveis de dosagem administradas (5,000mg/kg dia). O PVA não é mutagênico nem genotóxico nem apresentou atividade carcinogênica.

A pele é formada por um revestimento de camadas de células sobrepostas, sendo que as células superficiais são achatadas e compõem uma camada córnea rica em queratina. A pele, com o sistema tegumentário, forma a cobertura externa do corpo e como um dos maiores órgãos do corpo atinge aproximadamente 16% do peso corporal. As células empilhadas não são todas iguais: a camada mais superficial é o estrato ou camada córnea. Mais abaixo encontram-se as camadas: granulosa, espinhosa e basal. As células nascem na camada basal e vão empurrando as células mais externas, de forma que a divisão entre as camadas mencionadas acima não é nítida, mas um processo contínuo (JUNQUEIRA, 2004; RAMOS, 2004; WULF, 2004; XU, 2008).

O desenvolvimento de novos materiais e aprimoramento dos já existentes para a regeneração de pele constitui grande área de pesquisa em biomateriais. Anualmente, várias centenas de pessoas necessitam de enxertos devido a feridas dérmicas. O trauma à pele pode ser causado pelo calor, por agentes químicos, energia elétrica, ultravioleta e nuclear, resultando em vários graus de dano à mesma. Doenças como diabetes e úlceras de pressão também provocam sérias lesões. As lesões menos traumáticas que atingem apenas o epitélio, camada externa da pele, são regeneradas prontamente e não necessitam de enxerto o que não acontece com as lesões mais profundas que atingem a derme. Segundo o Ministério da Saúde estima-se que em 2001 aconteceram 1.000.000 de acidentes por queimadura, sendo 150.000 (15%) causados por álcool líquido e 45.000 (30%) atingiram crianças de até 12 anos (BRASIL, 2005). De acordo com o “National Institute of General Medical Sciences”, 1,25 milhões de lesões relacionadas a queimaduras, exigem atendimento médico anualmente só nos Estados Unidos. Destes pacientes, 50.000 exigem hospitalização e 25.000 são atendidos em unidades especiais de queimados. Infecções provocam a morte de aproximadamente 10.000. Felizmente, avanços no cuidado de feridas, tais como enxertos, têm aumentado a taxa de sobreviventes de vítimas de queimaduras e especialmente melhorado as chances de sobrevivência de pessoas com mais de 50% da cobertura corporal queimada (SEAL, 2001).

As características, anteriormente relacionadas, da quitina, quitosana, da pele e do PVA são as que nortearam e justificaram o interesse desse trabalho que é o estudo de um sistema hidrogel a base de quitosana/PVA, quimicamente reticulado por glutaraldeído, que possibilite o desenvolvimento de tecido epitelial artificial, e onde se possa modular a taxa de degradação do mesmo de maneira inversamente proporcional à taxa de regeneração tecidual a partir de modificações químicas incorporadas no material do substrato suporte. No caso de tratamento de lesões cutâneas, queimaduras, por exemplo, que normalmente exigem um número elevado de intervenções tal material reduziria esse número e a possibilidade de complicações diversas, além de reduzir custos hospitalares e internações.

O caráter inovador ressaltado desse trabalho consiste na avaliação da modulação do comportamento de intumescimento e degradação *in vitro*, das propriedades mecânicas, da citotoxicidade e viabilidade celular *in vitro* de várias formulações de blendas de quitosana com o poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila) – (PVA), bem como, a utilização de L-arginina para o bloqueio dos grupos aldeído não reagidos do agente reticulante, com o objetivo de aumentar a viabilidade celular do material obtido e potencializar sua utilização como biomaterial.

## CAPÍTULO 2

### 2 OBJETIVOS

#### 2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento (obtenção e caracterização) de uma estrutura polimérica híbrida, polímero de origem natural/polímero de origem sintética, à base de quitosana e poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila) – (PVA), quimicamente reticulada, para utilização potencial como biomaterial em engenharia de tecido, especificamente como tecido epitelial artificial. Este estudo é baseado na caracterização das propriedades físicas, químicas e biológicas obtidas, através de técnicas analíticas e espectroscópicas, bem como, através da avaliação em relação a citotoxicidade, viabilidade celular.

#### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Além do objetivo principal o trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

- 1 – Caracterizar os polímeros utilizados como matérias primas dos precursores através de técnicas de espectroscopia e titulação potenciométrica visando identificar as propriedades dos mesmos.
- 2 – Promover, em diversas extensões, a reticulação química da quitosana, do PVA e da blenda Quitosana - PVA para potencializar propriedades bioativas, biocompatíveis e biodegradáveis;
- 3 – Caracterizar os materiais obtidos através das técnicas de espectroscopia de infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratometria de raios-X (DRX), bem como, avaliar as propriedades mecânicas dos filmes e tensão superficial entre o substrato e água.

- 4 - Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos materiais obtidos verificando o potencial de degeneração ou morte celular utilizado ensaio colorimétrico de redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e a produção de NO por macrófagos murinos.
  
- 5 – Avaliar a grau de intumescimento e o índice de degradação através de ensaios de absorção de fluido e perda de massa *in vitro* do substrato suporte em fluido corporal simulado (SBF).

## CAPÍTULO 3

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ESTADO DA ARTE

##### 3.1.1 ENGENHARIA DE TECIDOS, BIOMATERIAL E BIODEGRADAÇÃO

A evolução das intervenções no organismo vivo passou por diversas linhas de pensamento até atingir os atuais procedimentos que ainda têm inúmeras limitações do ponto de vista prático em relação ao ideal conceitual. Imaginam-se intervenções indolores, com capacidade de reconstrução acelerada de tecidos, restabelecendo características geométricas, estéticas e, de funções físicas, químicas e biológicas, para todos os tipos de tecidos existentes desde os mais simples aos mais complexos.

Williams (2006) evidencia o paradigma central da engenharia de tecido que consiste em persuadir as células a produzir novo tecido sob circunstâncias nas quais elas normalmente não o fariam; fazer isso não é um processo trivial. Mais ainda, é de extrema importância que durante esse processo seja gerado o tipo correto de tecido; que os sinais dados às células possam ser desligados quando o processo estiver completo; e que o tecido resultante seja totalmente funcional, ou seja, o processo de engenharia inicia-se com a fonte de células relevantes e termina com a total incorporação funcional do tecido gerado dentro do sítio hospedeiro. Neste sentido ele sugere que a Engenharia de Tecido é a criação de novo tecido objetivando a reconstrução terapêutica do corpo humano, por deliberada e controlada estimulação de células alvo através de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos.

Esse ramo do conhecimento tem se desenvolvido devido à crescente demanda por órgãos e tecidos em função de acidentes e/ou tratamentos de enfermidades diversas (DRURY, 2003). Em vista disso, biomateriais para engenharia de tecido ou liberação controlada de drogas tiveram inúmeros avanços nos últimos anos pois os pesquisadores continuam a desenvolver e modificar principalmente materiais poliméricos para atender

a demanda gerada por estas aplicações biomédicas. Neste sentido, muitos tipos de polímeros naturais e sintéticos têm sido sintetizados e empregados como veículos de liberação controlada de drogas e/ou estruturas matrizes, papel que exige precisa e controlável propriedade do polímero para o sucesso dessas utilizações (DAVIS et al., 2002; WANG, 2004; HOLLISTER, 2005; LAVIK et al., 2005). Semelhantemente, biopolímeros degradáveis têm recebido atenção particular pois reduzem a necessidade de intervenção cirúrgica para sua remoção. Resultados recentes demonstram que uma cisão apropriada do biomaterial sintético pode melhorar a cura e aumentar a função do tecido ou uma liberação altamente controlada de biomoléculas de grande peso molecular comparada aos construídos de hidrogéis não degradáveis (DAVIS et al., 2002; DRURY et al., 2003; KIM et al., 1998).

Além da degradação, é uma parte importante do projeto de biopolímeros a capacidade de trabalhar propriedades físicas de hidrogéis poliméricos degradáveis, propriedades tais como teor de fluido, permeabilidade a fluidos e resistência mecânica que influenciam a liberação controlada de fármacos, bem como, a função e crescimento celular, parâmetros críticos para aplicações como engenharia de tecido e liberação de fármacos (BURDICK et al., 2005; BUTLER et al., 2000; COWIN, 2000; LAVIK et al., 2005).

Numa expansão contínua da biblioteca de polímeros naturais e sintéticos disponíveis para aplicações biomédicas, blendas de copolímeros em bloco de Quitosana (QUI) e poli(acetato de vinila)-co-poli(álcool vinílico) (PVA) têm emergido como um dos mais promissores materiais biodegradáveis devido as suas propriedades físicas e químicas altamente controláveis (ARVANITOYANNIS et al., 1997; COSTA JR. et al, 2007a,b; MANSUR et al., 2004; MANSUR et al, 2008; MUZZARELLI et al, 2002; PEPPAS et al, 1997).

Diante dessas perspectivas, os biomateriais são materiais usados em dispositivos médicos, sobretudo naqueles que são temporária ou permanentemente implantados no corpo humano. Segundo a Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982; são qualquer substância (outra que não droga), ou combinação de substâncias sintéticas ou naturais em origem, que possam ser usadas por

um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo humano.

Um biomaterial é um material não vivo usado em aparelhos médicos que foi planejado para interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1990). O grande desafio é perceber que devido à diversidade de aplicações os biomateriais envolvem a ciência de maneira interdisciplinar em função das diversas formas de interação com o organismo, as características de obtenção e processamento, bem como, o processo de esterilização.

Já os materiais biodegradáveis são aqueles que podem ser degradados pela ação de microorganismos, tais como bactérias, fungos ou algas. São capazes de ativar defesas locais no organismo para impedir a infecção e acelerar o reparo de lesões, bem como, apresentam compostos que são absorvidos e metabolizados pelo organismo em compostos simples e inofensivos; sendo altamente desejáveis em condições de aplicação biomédicas (MEI, 2006; KUMAR et al., 2004; SEAL et al. 2001; ROSA et al., 2001; LEMONS, 1996). Daí a biodegradação consiste então na quebra de ligações químicas dos materiais pela ação de organismos vivos que conduz a mudanças nas propriedades físicas do mesmo o que implica na exigência de um processo biológico específico para a ocorrência de tais mudanças (COURY, 1996; RATNER, 1996)

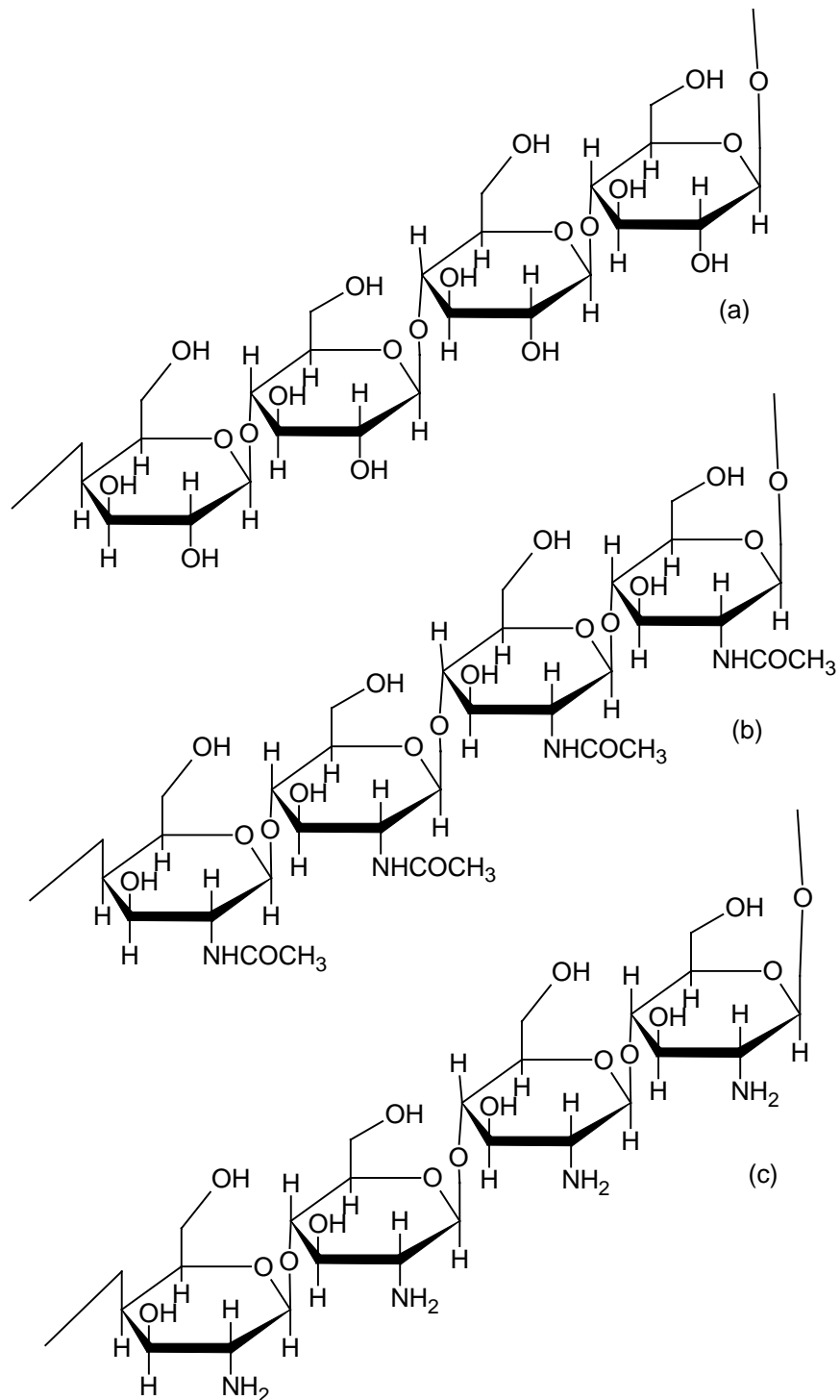
## **3.2 QUITINA/QUITOSANA**

### **3.2.1 ASPECTOS GERAIS**

A quitina e a quitosana (QUI) são poliaminosacarídeos de origem natural, sendo a quitina um dos recursos orgânicos renováveis mais abundantes do mundo. Ela é um dos principais constituintes das conchas de crustáceos, dos exoesqueletos de insetos e da parede celular de fungos onde fornece resistência e estabilidade (KRAJEWSKA, 2004).

A quitina se apresenta em duas versões alomórficas chamadas de forma  $\alpha$  e forma  $\beta$  que podem ser diferenciadas por espectroscopia de infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear juntamente com difração de Raios-X. A terceira forma  $\gamma$ -quitina também já foi

descrita mas com uma análise detalhada percebe-se que ela é apenas uma variação da família  $\alpha$ -quitina (RINAUDO, 2006).



**FIGURA 3.1** - Estrutura da celulose, quitina e quitosana, (a), (b) e (c) respectivamente

Quimicamente, a quitina é semelhante à celulose (FIG.3.1a) substituindo-se os grupos OH do carbono 2 de cada unidade glicosídica da celulose por grupos acetilados ( $\text{NHCOCH}_3$ ). Logo a quitina é um polissacarídeo contendo cadeias de resíduos  $\beta$ -(1-4)-2-acetamida-2-deoxi-D-glicose formando uma longa cadeia polimérica linear (FIG.3.1b). É um pó incolor, apresentando estrutura parte cristalina e parte amorfa, insolúvel na maioria dos solventes. Ela se dissolve em ácidos minerais concentrados com degradação simultânea da cadeia polimérica (DALLAN, 2005; SANTOS, 2004; RODAS, 2004).

A quitosana (FIG.3.1c), é o principal derivado da quitina, e é obtida por N-desacetilação em uma extensão variável que é caracterizada pelo grau médio de desacetilação ( $\overline{GD}$ ), que representa a porcentagem de grupos  $\text{NH}_2$  livres, sendo geralmente representado como um copolímero de 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose. Quando o grau de desacetilação (GD) da quitina alcança em torno de 50% (dependendo da origem do polímero) ele se torna solúvel em meio aquoso ácido e é chamado quitosana. A solubilização ocorre pela protonação da função  $-\text{NH}_2$  sobre o carbono 2 da unidade de repetição D-glicosamina, portanto, o polissacarídeo é convertido em um polieletrólito em meio ácido (RINAUDO, 2006). Entretanto, a solubilidade depende de vários parâmetros, tais como GD, massa molar, concentração do ácido e do biopolímero e da força iônica (SANTOS, 2004).

Comercialmente, a quitina e quitosana são obtidas num custo relativamente baixo a partir de conchas de molusco (principalmente caranguejos, camarões, lagostas e krills), rejeitos dos mariscos processados pela indústria. Basicamente, o processo consiste de desmineralização das cascas e ou esqueletos que são secos e moídos; o pó é tratado com solução de HCl 0,5 mol/L e, posteriormente, a desproteínação do material é executada com uma solução diluída de NaOH 1% sob agitação por 24h a 65°C. Para resultar em quitosana (GD de 70 – 90%), a quitina obtida (GD 5 – 2%) é submetida a N-desacetilação pelo tratamento com uma solução de NaOH 50% a 100°C de 2 a 5 horas sob atmosfera de nitrogênio e o resíduo é lavado para eliminação do excesso alcalino e seco a 110°C por 24 h (SANTOS, 2004).

### 3.2.2 PROPRIEDADES DA QUITINA E QUITOSANA

Em suas cadeias lineares de poliglicosamina de alto peso molecular, a quitosana possui propriedades químicas e biológicas distintas, pois tem grupos amino e hidroxila reativos capazes de serem submetidos a modificações químicas. Adicionalmente, os grupos amino tornam a quitosana um dos únicos polieletrólitos catiônicos achados na natureza ( $pK_a \sim 6,5$ ). Esta condição confere propriedades singulares a quitosana. A quitosana é solúvel em meios aquosos ácidos de  $pH < 6,5$  e quando dissolvida possui alta carga positiva sobre os grupos  $-NH_3^+$ . Adere a superfícies carregadas negativamente, agrega-se com compostos polianiônicos, e quela íons de metal pesado. Tanto a solubilidade em soluções ácidas quanto à agregação com poliânions atribuem propriedades excelentes a quitosana na forma de gel. Junto com propriedades biológicas raras que incluem biocompatibilidade, biodegradabilidade em produtos inofensivos, não tóxicos, fisiologicamente inertes, afinidade notável a proteínas, e propriedades hemostática, fungistática, antitumoral, antiolesterol, a quitina e a quitosana até agora, indubitavelmente, oferecem um potencial extraordinário numa larga faixa de aplicações que tendem a crescer rapidamente uma vez que os materiais quitinosos padronizados tornam-se disponíveis. De maneira importante, como biopolímeros e materiais biodegradáveis a quitina/quitosana são seguros para os seres humanos e para o ambiente natural (KUMAR et al., 2004; DALLAN, 2005; DENG, 2007).

#### 3.2.2.1 CRISTALINIDADE DA QUITOSANA

No estado sólido a quitosana é um polímero semicristalino. Sua morfologia foi investigada e seu polimorfismo é mencionado na literatura (CLARK, 1936; OGAWA, 1991; OGAWA, 1992; MAZEAU, 1994; OKUYAMA, 1999; OGAWA, 2004). Cristais simples de quitosana foram obtidos de quitina totalmente desacetilada de baixo peso molecular. A difração de raios-X indicou célula unitária ortorrômbica contendo duas cadeias de quitosana antiparalelas sem molécula de água e também foi feita a descrição da influência das condições experimentais sobre a cristalinidade (OGAWA, 1991; OGAWA, 1992). CLARK também não excluiu a possibilidade de uma estrutura monoclinica com ângulo de  $88^\circ$  entre o plano da base e o eixo do prisma.

### 3.2.2.2 SOLUBILIDADE DA QUITOSANA

As propriedades da solução de quitosana dependem não somente do grau médio de desacetilação mas também da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia principal e da massa molar. A desacetilação, usualmente feita no estado sólido, fornece uma estrutura irregular devido ao caráter semicristalino do polímero inicial. O exame do papel da protonação da quitosana na presença de ácidos sobre a solubilidade mostrou que o grau de ionização depende do pH e do pK do ácido. A solubilização em HCl da quitosana com alto GD e grau de ionização médio em torno de 0,5 corresponde a um pH entre 4,5 e 5 (RINAUDO, 2006).

A solubilidade da quitosana em solução 1% ou 0,1mol/L de ácido acético demonstrou que a quantidade de ácido necessariamente depende da quantidade de quitosana a ser dissolvida. A concentração de prótons necessária é no mínimo igual à concentração de unidades -NH<sub>2</sub> envolvidas (RINAUDO, 2006).

### 3.2.2.3 GRAU DE DESACETILAÇÃO E MASSA MOLAR

A literatura apresenta grandes variações nas propriedades físicas e biológicas dos filmes e membranas de quitosana associadas às características MW e GD que podem ser atribuídas a diversas combinações além da relação MW/GD, mas também à forma de obtenção do polímero, origem, modo de preparação dos filmes ou membranas, temperatura e tempo de secagem e assim por diante. O que se observa é que em valores médios para GD (60% a 80%) e MW (150kmol/kg a 450kmol/kg) o comportamento da quitosana apresenta melhor possibilidade de modulação das propriedades a partir da mistura com outros polímeros e/ou com a reticulação química (CHEN, 1996; DRAGET, 1996; XU, 1996; KURITA,1998; HSU, 2004; WENLING, 2005; GUPTA, 2006; SANTOS, 2006; TRUNG, 2006; LI,2007; SIPOS, 2007;TAKAHASHI, 2007).

O grau de desacetilação da quitosana pode ser determinado por diversas técnicas como análise elementar, titulação potenciométrica (TAN, 1998; TOLAIMATE, 2000; TORRES, 2005), espectroscopia de ultravioleta (WU, 2008), FTIR (SHIGEMASA,

1996; BRUGNEROTTO, 2001), A escolha da técnica depende do processo de purificação, da solubilidade da amostra e da disponibilidade de equipamento.

Em função da rapidez e devido à capacidade da quitosana em formar soluções viscosas o método mais indicado para a determinação da massa molar média da quitosana é a viscosimetria, entretanto pode ser usado cromatografia de permeação em gel, espectrometria de espalhamento de luz entre outros (SANTOS, 2004).

Com relação às propriedades mecânicas principais a literatura apresenta variações de 600MPa a 2900MPa, 6MPa a 75MPa e 3% a 90%, respectivamente, para o Módulo de elasticidade, a tensão de tração e o alongamento percentual (RAO et al., 2007; TAKAHASHI, 2007; SANTOS, 2006; LIU et al., 2005; WENLING, 2005; BAHRAMI et al. 2003; ARVANITTOYANNIS, et al., 1997; CHEN et al., 1996). Para o grau de intumescimento a literatura apresenta valores entre 500% para o PVA e 200% para a quitosana (CLAPER et al., 2007; ZHANG et al., 2007; GRUPTA et al., 2006; SANTOS, 2006; BERGER et al., 2004b; WANG et al., 2004;).

### 3.2.3 APLICAÇÕES

O desenvolvimento do conhecimento e aprofundamento científico da quitina e suas aplicações a partir do último quarto do século seguiu os períodos dominados por tópicos específicos que podem aproximadamente ser relacionados a (DALLAN, 2005; KUMAR et al., 2004):

- i) avanços tecnológicos (rotação, corante, absorção de espécie solúveis, de ingredientes funcionais em cosméticos);
- ii) significância bioquímica (coagulação do sangue, restauração de lesão, regeneração óssea, atividade de imunoadjuvante);
- iii) inibição de biosíntese (inseticidas);
- iv) enzimologia da quitina (isolação e caracterização das quitinases, de sua biologia molecular, de biosíntese, de hidrólises com atividade quitinolítica não específica);
- v) combinações de quitosana com os polímeros naturais e sintéticos (enxertos, complexação de polieletrólitos; misturas, revestimentos);

- vi) uso da quitosana como um suplemento dietético e de preservação de alimentos (produtos dietéticos anticolesterolêmico, revestimentos antimicrobial para grãos e de frutas exóticas).

Hoje, a liberação controlada de fármaco e a engenharia de tecido parecem ser os principais interesses para uma melhor compreensão dos princípios da química da quitina e da quitosana, notadamente os de modificações químicas, de biodegradação, de efeitos em vários tecidos, de distribuição em vários órgãos do corpo, de mucoadesão; de associação de quitosana com compostos inorgânicos, e de transformações tecnológicas avançadas (DHANIKULA, 2004; ADEKOGBE, 2005; HUANG, 2005; LI, 2005; LIU, 2005; TORRES, 2005; CHEN, 2006a,b; SHE, 2007; SUZUKI, 2008)

As considerações chaves que justificam este interesse são que a quitosana é biocompatível, têm capacidade bactericida e não provoca reações adversas quando em contato com células humanas. A quitosana pode ser degradada por enzimas amplamente encontradas no corpo humano, e os oligômeros podem ativar macrófagos e estimular a síntese de ácido hialurônico. Além disso, fornecem blocos de construção para a reconstrução de componentes da matriz extracelular. Por outro lado, a quitosana é reconhecida por células tumorais, e conseqüentemente, pode trazer fármacos ao seu alvo seletivamente. A quitosana é uma substância segura para o organismo humano; conseqüentemente, as aplicações médicas e farmacêuticas podem facilmente ser trabalhadas fora do corpo com esforços comuns de especialistas em vários campos do saber (MUZZARELLI, 1996; CHO, 2000; CHOI, 2001; KUMAR et al., 2004; SARASAM, 2008).

Como suporte de imobilização de enzima são usados materiais à base de quitina e quitosana na forma de pós, flocos e géis de diferentes configurações geométricas. Os pós de quitina/quitosana e flocos estão disponíveis como produtos comerciais da Sigma-Aldrich, Fluka, Polymar entre outros e quitosana em pastilha gel (quitopérolas) da Fuji Spinning Co. Ltd. (Tóquio, Japão). A preparação de géis de quitosana é facilitada pelo fato de que a quitosana dissolve prontamente em soluções diluídas na maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético, tartárico e ácidos cítricos, para formar

soluções viscosas que se precipitam com o aumento do pH e pela formação de complexos ionotrópicos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Deste modo, podem ser fabricados géis de quitosana na forma de contas, membranas, camadas, cápsulas, fibras, fibras ocas e esponjas. Geralmente, diferentes formas de acompanhar os tratamentos e modificações são aplicadas para melhorar a estabilidade e durabilidade do gel. Os métodos de preparação de gel de quitosana descritos na literatura podem ser divididos de forma ampla em quatro grupos: método de evaporação do solvente, método de neutralização, método de ligação cruzada e método de gelificação ionotrópica (KRAJEWSKA, 2004).

A presente revisão objetiva o aprofundamento interdisciplinar do conhecimento científico necessário para demonstrar o potencial da quitosana no campo da engenharia de tecido e veículo de liberação controlada de fármaco.

Dentre as diversas possibilidades, a quitosana se apresenta na forma de microesfera, fibra, matriz porosa, membrana densa e porosa, e filme que é função do interesse da aplicação. Dentre as diversas aplicações destacamos a seguintes: liberação controlada de fármacos (LIU et al., 1997; DHANIKULA et al., 2004; SMITH et al., 2004; CHAE et al., 2005; TA et al., 2008), engenharia de tecido ósseo (FAKHRY et al., 2004; SHIROSAKI et al., 2005; KONG et al., 2006; SHIROSAKI et al., 2008), engenharia de tecido nervoso (MINGYU et al., 2004), engenharia de tecido epitelial (CARREÑO\_GOMEZ et al., 1997; CHATELET et al., 2001; FAKHRY et al., 2004; LIU, et al., 2005; SILVA et al., 2005; NEAMNARK et al., 2008), bandagem para lesão (AZAD et al., 2004), conjugado para anticoagulação (LIU et al., 2004).

Ainda podemos ressaltar os resultados como o trabalho de CÁRDENAS et al. (2005) que prepararam e aplicaram filmes de quitosana, obtidas de camarão, com grau de desacetilação entre 80 e 100% em pacientes com feridas de queimadura e úlceras e obtiveram recobrimento entre 7 e 10 dias.

IWASAKI e colaboradores.(2004) estudaram um biomaterial híbrido à base de quitosana e alginato como suporte para a adesão de condrócitos de coelho que apresentou resultados melhores em comparação com as fibras de alginato apenas.

YAMANE et al.(2005) obtiveram fibras poliméricas híbridas à base de quitosana e ácido hialurônico que apresentaram desenvolvimento de colágeno tipo I e II, como biomaterial ideal para criar substrato suporte 3D com o objetivo de aplicar em grandes lesões de cartilagem e numa variedade de doenças como osteoartrites e artrites reumáticas.

RODAS (2004) estudou a mistura de polímeros sintéticos poli(álcool vinílico) e poli(vinilpirrolidona)) com a quitosana para a obtenção de compostos demopodérmicos reticulados por radiação gama ou glutaraldeído. A porção epidérmica formada por queratinócitos cultivados *in vitro* que melhor interagiram com as células foram aquelas preparadas com quitosana e reticuladas com GA, porém não satisfizeram as características mecânicas de manipulação.

DALLAN (2005) analisou a influência da concentração da solução de partida de quitosana nas características físicas, mecânicas e biológicas de membranas densas, bem como, do efeito da substituição de parte da quitosana por quitina e/ou glicerol visando a redução de custo dos biomateriais sem, entretanto, prejudicar suas características. Paralelamente, avaliou também a influência dos métodos de esterilização nas propriedades dos materiais obtidos e constatou que dos métodos avaliados o óxido de etileno foi aquele que apresentou os resultados mais promissores em termos de manutenção das características físicas, mecânicas e biológicas das membranas densas à base de quitosana.

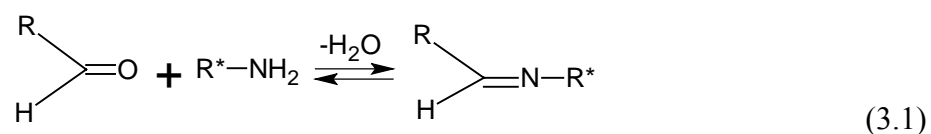
### **3.2.4 MODIFICAÇÕES QUÍMICAS DA QUITOSANA**

Devido a modificações químicas a quitosana apresenta inúmeros derivados relatados na literatura, entretanto este polímero ainda oferece potencial para variadas opções de modificações e melhoria de propriedades para as mais diversas aplicações. Podem ser observadas algumas das várias possibilidades de modificações químicas da quitosana

(FIG.3.2), devido a grande quantidade de grupos amino reativos em sua cadeia, principalmente N-acilação e reação de Schiff. A reatividade dos grupos pendentes ligados a carbonos do anel obedece à ordem decrescente  $C_2 > C_6 > C_3$ , referentes, respectivamente, ao grupo amino da quitosana, ao grupo hidroxila primário, de caráter mais instável e ao grupo hidroxila secundário, que requer um agente desprotonante para ficar pré-disponível à reação (LIMA, 2005)

De acordo com a IUPAC, as bases de Schiff ou iminas, são compostos orgânicos que apresentam pelo menos um grupo  $R_2C=NR^*$  onde  $R^* \neq H$ ,  $R=H$  ou aril e são formadas a partir da condensação de uma amina primária com um grupo carbonila.

Um esquema genérico para a obtenção de bases de Schiff é apresentado em (3.1). As condições experimentais que determinam a posição de equilíbrio dependem da natureza da amina e, principalmente, do composto carbonilado. A reação é reversível e prossegue com a formação do intermediário carbinolamina, com conseqüente remoção de água, de acordo com a reação:



onde R e  $R^*$  são alquil e/ou aril (SANTOS,2004).

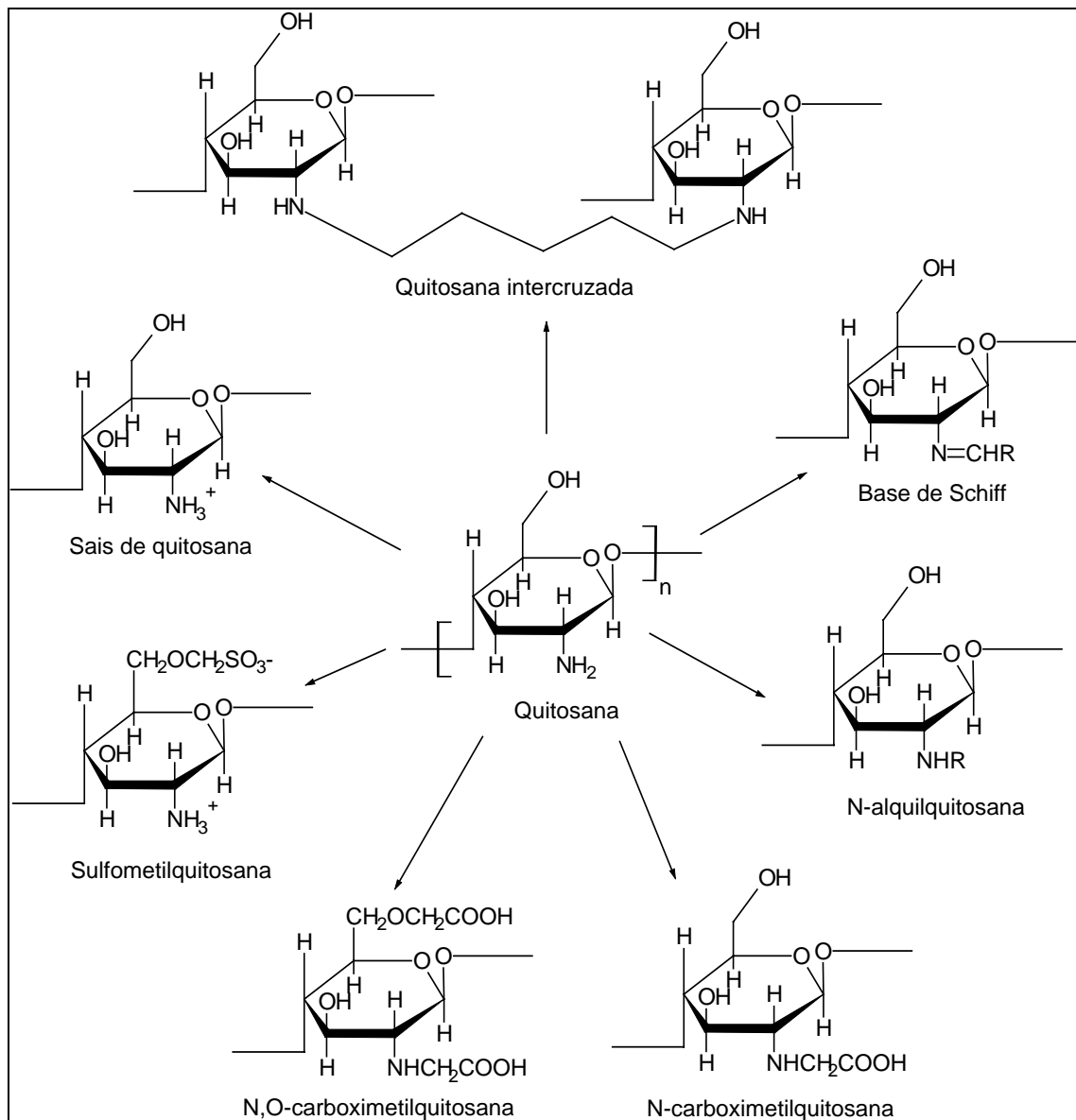


FIGURA 3.2- Derivados de quitosana (adaptado de SANTOS, 2004)

### 3.3 POLI(ÁLCOOL VINÍLICO-CO-ACETATO DE VINILA) - PVA

#### 3.3.1 ASPECTOS GERAIS

O PVA é um co-polímero produzido pela polimerização do acetato de vinila seguida de reação de hidrólise do poli(acetato de vinila) em poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila). A relação entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total inicial de grupos acetila representa o grau de hidrólise (GH) do PVA. Esse parâmetro é importante na caracterização das propriedades deste polímero. Um aumento do GH implica em redução da solubilidade na água, associada à

estabilização energética promovida pelas ligações de hidrogênio intra e intercadeias poliméricas, e no aumento da adesão em superfícies hidrofílicas, da viscosidade e da resistência à tração (MANSUR, 2007a,b). O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia quando na forma de membrana, além de apresentar excelente resistência química e ser biocompatível (LIN, 2006). A característica de não toxicidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade do PVA está associada em grande parte a massa molar menor que 30kDa (CHIELLINI, 2003; EFSA, 2005; MANSUR, 2005a,b; LIN,2006)

### 3.3.2 PROPRIEDADES

As duas características importantes do PVA que determinam uma série de propriedades do material obtido são o grau de hidrólise e a massa molar. A combinação dessas características influencia a solubilidade, a viscosidade, a resistência mecânica, o poder de dispersão, a adesão em superfícies, a flexibilidade e assim por diante. A TAB.3.1 apresenta qualitativamente a influência dessas duas características sobre as diversas propriedades do PVA.

**TABELA 3.1** - Influência da MW e GH do PVA sobre suas propriedades

<b>Aumentando a MW do PVA</b>	<b>Aumentando o GH do PVA</b>
Reduz a solubilidade	Reduz a solubilidade
Aumento da Resistência à água	Aumenta a resistência à água
Aumento da resistência de aderência	Aumenta a adesão em superfícies hidrofílicas
Aumento da viscosidade	Aumento da viscosidade
Aumento da Resistência à tração	Aumenta a resistência à tração
Aumento do poder de dispersão	Reduz o poder de dispersão
Reduz a flexibilidade	Reduz a flexibilidade
Não evidenciado	Aumenta a cristalinidade

(CELANESE CHEMICALS, 2008; MANSUR, 2007b)

Para às propriedades mecânicas principais a literatura apresenta variações de 200MPa a 1000MPa, 1MPa a 64MPa e 30 a 400%, respectivamente, para o Módulo de elasticidade, a tensão de tração e o alongamento percentual (COSTA-JR., 2008a,c; JIA, 2007; MANSUR, 2007b; SAPALIDIS, 2007; TONG, 2007; VARSHNEY, 2007; BAHARAMI, 2003; CHIELLINI, 2001).

### 3.3.3 APLICAÇÕES

O PVA apresenta-se como cobertura para produtos farmacêuticos e produtos de dieta com a função de manter a liberação de fármacos (RODWELL, 2003). Em cosméticos é usado como adesivo, filme e agente de aumento de viscosidade. Na indústria alimentícia é usado como diluente de misturas para pintura em cascas de ovos. Nas aplicações médicas aplica-se a rotas transdérmicas, preparação de geléias que secam rapidamente em contato com a pele, córnea sintética, engenharia de tecido de cartilagem, hidrogel mucoadesivo para liberação de fármacos (KELLY, 2003; ANSETH, 2002; KIM, 2002; RANDALL, 1998; PEPPAS, 1997; PEPPAS, 1996). Apresenta-se também na formas de filme protetor de aparelhos, bolsas para lavanderia de hospitais, trapos, esponjas, folhas, coberturas, bem como, produtos de higiene fisiológicos. Aplicado na fabricação de papeis, na indústria têxtil como espessante e agente de cobertura. É usado como agente espessante de tinta látex, fixador em cola branca e em misturas adesivas, selador, bem como, componente de argamassas para fixação de peças cerâmicas (MANSUR, 2007b; DEMERLIS, 2003).

### 3.4 HIDROGÉIS

Hidrogéis podem ser definidos como redes poliméricas capazes de reter uma quantidade significativa de água dentro de sua estrutura sem se dissolver (WANG, 2004). Segundo PEPPAS (1986), hidrogel é uma rede macromolecular intumescida em água ou fluidos biológicos. Para MANSUR et al. (2004) hidrogéis são redes poliméricas tridimensionais hidrofílicas capazes de absorver e reter diferentes quantidades de água ou fluidos biológicos.

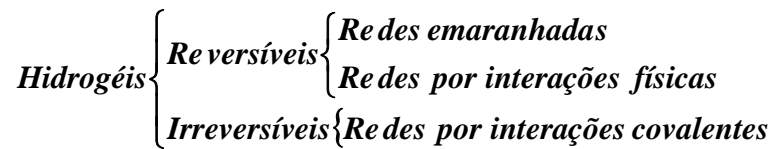
Dentre várias propriedades, os hidrogéis apresentam relativamente alto teor de água, hidrofiliabilidade, expansibilidade, permeabilidade seletiva, consistência semelhante à borracha macia e baixa tensão interfacial que são as propriedades que os habilita na substituição de delicados tecidos vivos (WANG, 2004).

Os hidrogéis de poli(álcool vinílico) (PVA) e poli(etilenoglicol) (PEG) têm sido amplamente explorados como polímeros solúveis em água para numerosas aplicações biomédicas e farmacêuticas devido às vantagens de não toxicidade, não carcinogenicidade e propriedades de bioadesão. Estes materiais com diferentes nanoestruturas reticuladas, criam oportunidades únicas para biodegradabilidade controlada, portadores de drogas sensíveis ao pH, e projeto de substrato suporte para engenharia de tecido (MANSUR et al., 2004).

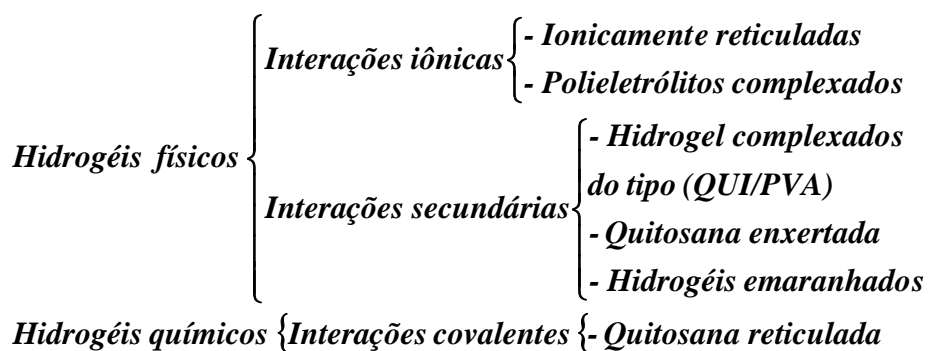
Tais materiais possuem alta permeabilidade para as moléculas de água e alguns gases além de um comportamento viscoelástico similar ao dos tecidos biológicos. Os hidrogéis poliméricos formam uma classe de materiais com elevado potencial para a substituição de tecidos moles ou para outras aplicações biomédicas tais como o preparo de sistemas de liberação controlada de fármacos, revestimento de próteses cardiovasculares, membranas para aplicações em máquinas de hemodiálise e purificação de proteínas dentre outras (FALCÃO, 2003).

Levando em conta a definição de que hidrogéis são redes macromoleculares intumescidas em água ou fluidos biológicos, BERGER e colaboradores (2004a,b) classificam os hidrogéis com base na natureza da rede polimérica em: redes emaranhadas, redes formadas por interações físicas e redes formadas por ligações cruzadas covalentes; (FIG. 3.3). Entretanto essa classificação não é totalmente adequada para hidrogéis de quitosana, devido à impossibilidade de delinear fronteiras bem definidas entre as estruturas, daí ele sugere uma classificação especial, isto é, hidrogéis físicos e hidrogéis químicos. Hidrogéis físicos formados por várias ligações reversíveis divididas em interações iônicas como em hidrogéis reticulados ionicamente e polieletrólitos complexos, ou interações secundárias como no caso de hidrogéis complexados de quitosana/PVA; hidrogéis de quitosana enxertados e hidrogéis

emaranhados. Hidrogéis químicos formados por ligações irreversíveis sendo que essas se reduzem apenas as ligações cruzadas covalentes (FIG. 3.4).



**FIGURA 3.3** Classificação de hidrogéis quanto a natureza da ligação



**FIGURA 3.4** Classificação de hidrogéis de quitosana

### 3.4.1 INTUMESCIMENTO DE HIDROGÉIS

Uma parte importante do comportamento físico do hidrogel é sua absorção de fluido, pois desde a sua preparação ele deve ser mantido em contato com o fluido para que sua estrutura de rede solvatada possa se deformar. Um dos possíveis processos de intumescimento é: um polímero seco com rede hidrofílica é colocado na água. Então a sua cadeia macromolecular interage com as moléculas do solvente devido a uma boa compatibilidade termodinâmica. Assim a rede expande para o estado solvatado. A teoria de Flory-Huggins pode ser usada para calcular as grandezas termodinâmicas envolvidas nesse processo de mistura. A força termodinâmica de intumescimento é contraposta pela força das ligações cruzadas da estrutura e o equilíbrio é atingido, para um solvente particular a uma determinada temperatura, quando as duas forças se igualam o grau de intumescimento pode ser calculado como a razão entre o volume atual e o volume no estado seco (RATNER, 1996), ou também pode ser determinado a partir da quantidade massa de fluido absorvida pelo polímero em relação a sua massa inicial, isto é, a diferença do peso intumescido e o peso seco, dividida pelo peso seco (CHEN, 2004;

CAMPOS, 2005; NETO, 2005; ZHANG, 2007). Já SPERLING (2001) considera o coeficiente de intumescimento como a razão entre a massa de fluido absorvida em relação a massa inicial multiplicada pelo volume específico do fluido utilizado para intumescer o polímero.

Fica claro que a proporção de ligações cruzadas é um dos fatores mais importantes que afetam o intumescimento dos hidrogéis. É definida como a razão entre a quantidade de matéria do agente reticulante e a quantidade de matéria das unidades de repetição do polímero. Quanto maior a razão de ligações cruzadas, maior quantidade de agente reticulante é incorporada a estrutura do hidrogel, tornando a estrutura mais rígida. Conseqüentemente, o intumescimento será menor, se comparado com o mesmo hidrogel, quando este apresenta menor razão de ligações cruzadas (PEPPAS, 2000).

A estrutura química dos polímeros pode também afetar o grau de intumescimento dos hidrogéis. Aqueles contendo grupos hidrofílicos absorvem fluido em maior quantidade quando comparado com aqueles contendo grupos hidrofóbicos, devido ao colapso destes na presença da água, minimizando a exposição do mesmo à água (PEPPAS, 2000).

A difusão da água através do hidrogel pode seguir uma cinética Fickiana ou não-Fickiana. Transporte Fickiano freqüentemente ocorre em polímeros como borracha onde a cadeia polimérica possui mobilidade suficiente para penetração da água. Este é o caso ideal no qual não há interferência dos efeitos tais como rearranjo da cadeia polimérica. Isto é porque a taxa de difusão da água é muito menor do que a de relaxação. Ele é descrito por (3.2)

$$\frac{dC}{dt} = \frac{d}{dx} \left( D(C) \frac{dC}{dx} \right) \quad (3.2)$$

Onde “C” é a concentração, “t” é o tempo “x” é a posição do filme na direção de difusão e “D” é o coeficiente de difusão ou difusividade da água no polímero. Uma curva de absorção de massa, M versus  $t^{1/2}$  é linear. A curva de absorção eventualmente estabiliza no nível de saturação,  $M_{\infty}$ . Um caso é normalmente referido como não

Fickiano quando situações anômalas são obtidas (BEPPU, 2007; CORRELO, 2007; GUPTA, 2007; TANG, 2007; LEE, 2005; NETO, 2005; VACHOUD, 2001; McDONOUGH, 1998; SHIBAYAMA, 1996).

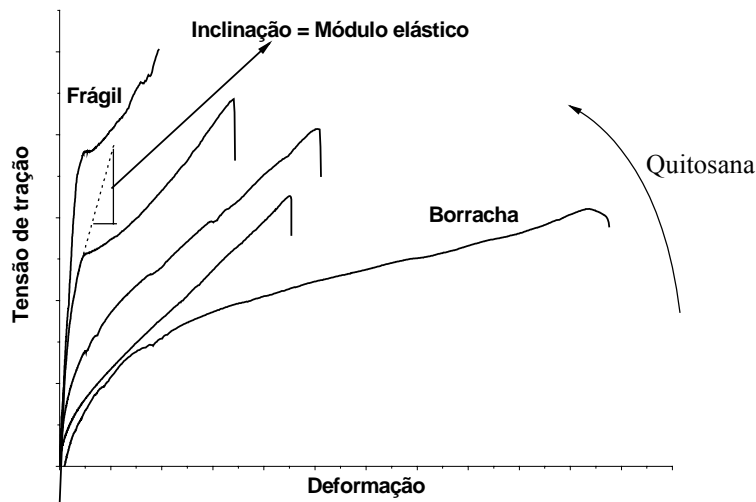
### **3.4.2 DEGRADAÇÃO DE HIDROGÉIS**

O termo amplamente usado “degradação” aqui será definido como um processo onde a deterioração nas propriedades de um polímero acontece devido a fatores de diferentes origens tais como: radiação, química, térmica, mecânica, entre outras. Portanto a degradação pode ser o resultado de atividades químicas tais como: solvatação, dessorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise, bem como, atividades físicas que podem erodir uma matriz de blenda polimérica devido a: difusão, abrasão, trinca, descamação, quebra mecânica ou combinação de qualquer umas dessas atividades físicas ou químicas. Uma das formas mais simples de se avaliar o efeito dessas atividades é através da avaliação da perda de massa que normalmente ocorre por dois fenômenos, a solvatação e a despolimerização da cadeia polimérica (COSTA JR et al., 2008; OREFICE, 2003; PANEVA, 2003;ZHANG, 2001). Entretanto, quando o colapso de ligações químicas do material acontece devido à ação de organismos vivos que conduzem a mudanças nas propriedades físicas do mesmo pode-se dizer que ocorre a biodegradação (ASTM D-883/08; TAKASU, 2008; ROSA, 2002; CHIELLINI, 1999; RATAJSKA, 1998; RATNER, 1996; XU, 1996; NOCEK, 1985).

### **3.4.3 PROPRIEDADES MECÂNICAS DE HIDROGÉIS**

As propriedades mecânicas de um hidrogel polimérico podem ser caracterizadas pelo seu comportamento de resposta a aplicação de uma carga (FIG. 3.5). Polímeros amorfos, como as borrachas, são macios e com grande capacidade de recuperação elástica, ou seja, retirada a carga ele retorna à sua forma original. A liberdade de movimento da cadeia do polímero é mantida no nível local enquanto que a estrutura de rede, resultante da reticulação química ou do emaranhado da cadeia, dificulta o movimento em grande escala ou o fluxo. Assim os polímeros dessa classe tendem a apresentar menor módulo de elasticidade ou rigidez e grande capacidade de deformação. As borrachas também podem exibir um aumento da tensão antes do colapso como

resultado da cristalização induzida pela deformação que provoca a orientação molecular na direção da carga. Vidros e polímeros semicristalinos têm alto módulo elástico e pouca deformação (SPERLING, 2001; RATNER, 1996).



**FIGURA 3.5** Propriedades mecânicas de um polímero

A tensão máxima em grandes deformações é importante para a seleção de polímeros e em particular para aplicações biomédicas. A tensão máxima de um polímero é a tensão no ou próxima ao colapso do material. Em materiais semicristalinos o ponto de falha pode ser definido pelo ponto de tensão no qual inicia o escoamento ou a deformação permanente. A tenacidade de um polímero está relacionada à energia absorvida até a falha e é proporcional a área sobre a curva tensão deformação (KHAN, 2000; ASTM D882-02; BAHRAMI, 2003; CAMPOS, 2005; RAO, 2007; COSTA JR., 2008a,c).

O comportamento de fadiga de um polímero é também importante e se caracteriza pelo colapso em uma carga inferior a carga máxima que o material suporta e ocorre devido ao número de ciclos de carregamento e descarregamento a que o material foi submetido.

Existem muitas dificuldades técnicas para medição real das características mecânicas de tecidos vivos, no caso da pele por exemplo, a influência da profundidade na consideração da medida é determinante. Entretanto, a literatura apresenta para a pele

valores de referência para o módulo de elasticidade, tensão de tração, deformação específica e massa específica variando de 4,6MPa a 20MPa, 2,5MPa a 16MPa,  $\approx 70\%$ ,  $\approx 1100\text{kg/m}^3$ , respectivamente (RODAS, 2004; DALLAN, 2005; HENDRIKS, 2006; PAILLER-MATTEI, 2008; XU, 2008).

#### **3.4.4 RETICULAÇÃO DE HIDROGÉIS**

Hidrogéis reticulados são cadeias poliméricas interconectadas pelo reticulante conduzindo a uma formação de rede tridimensional.

As propriedades dos hidrogéis reticulados dependem principalmente da sua densidade de ligações cruzadas, notadamente da relação de mols do agente reticulante com os da unidade de repetição do polímero. Exige-se um número crítico de ligações cruzadas por cadeia para permitir a formação da rede. A rede do hidrogel de quitosana reticulada pode ocorrer com ela mesma onde a reticulação envolve duas unidades estruturais que podem ou não pertencer à mesma cadeia, ou pode ser uma rede híbrida de polímero onde a reação de reticulação ocorre entre a unidade estrutural de quitosana e uma cadeia polimérica de outro tipo, ou ainda pode ser semi ou totalmente interpenetrada na qual contém um polímero não reagente adicionado a solução de quitosana antes da reticulação, isto é, a formação de uma rede de quitosana na qual um polímero não reagente está aprisionado pela mesma. A maioria dos reticulantes usados para realizar ligações cruzadas covalentes pode induzir toxidez se estiverem livres antes da administração. Um método para resolver esse problema e evitar um passo de purificação e verificação antes da administração é preparar hidrogéis por reticulação iônica reversível.

A quitosana por ser um polímero catiônico reage com componentes carregados, íons ou moléculas, conduzindo a formação de uma rede através de pontes iônicas entre cadeias poliméricas. Visto que a natureza destas interações é a mesma de polieletrólitos complexados fica difícil classificar separadamente estes dois tipos de rede. Neste sentido, a ligação cruzada é considerada como uma ponte cujo peso molecular é muito menor do que o peso molecular da cadeia entre duas ligações cruzadas consecutivas, ou do peso molecular de um pequeno polímero formando um polieletrólito complexado, ou

de uma grande molécula que permite que a ligação cruzada iônica possa convergir e torna-la muito próxima. Numa ligação cruzada iônica, as entidades reagentes com a quitosana são íons ou moléculas com peso molecular bem definido, ao contrário, em complexação de polieletrólitos as entidades reagentes com a quitosana são polímeros com uma ampla distribuição de peso molecular (GUPTA, 2007, MANSUR, 2007a; SADAHIRA, 2007; NETO, 2005; BERGER, et al., 2004b; LEE, 1992).

### 3.5 RETICULANTES

Reticulantes são moléculas de peso molecular muito menor que o peso molecular da cadeia entre duas ligações cruzadas consecutivas além de apresentar no mínimo dois grupos funcionais reativos que permitam a formação de ponte entre cadeias poliméricas (BERGER, et al., 2004b).

#### 3.5.1 GLUTARALDEÍDO OU 1,5 PENTANODIAL

O glutaraldeído (FIG. 3.6) é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura e com menor intensidade com o grupo tiol. O mecanismo de reação do glutaraldeído com os grupos  $\text{NH}_2$  está relacionado com a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos compostos originando a formação de uma base de Schiff ( $\text{C}=\text{N}$ ), embora no caso de glutaraldeído (diluído em água) e proteínas se acreditar que ocorra a formação de duplas ligações etilênicas conjugadas (WANG, 2004; MONTEIRO JR., 1999). Este fato ganha apoio pela estabilidade desta interação, irreversível e bastante resistente a variações de pH e temperatura, o que normalmente não é observado para interações que envolvem simplesmente uma base de Schiff (MONTEIRO JR., 1999).

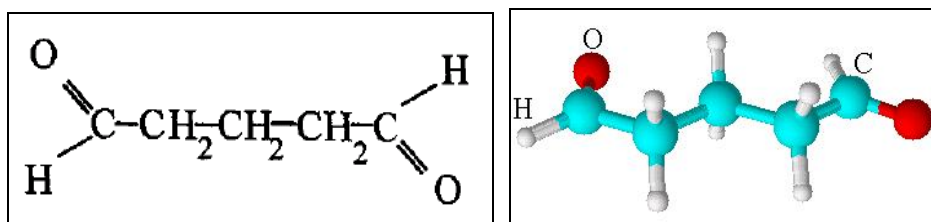


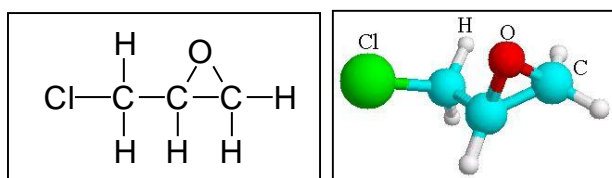
FIGURA 3.6- Estrutura molecular e tridimensional do glutaraldeído

Segundo MONTEIRO JR. (1999) nos poucos trabalhos em que se arrisca a comentar sobre a estrutura da interação com grupo amino sugerem-se três estruturas:

- há a formação de apenas uma base de Schiff com um dos grupos aldeídos do glutaraldeído, o outro grupo permanece livre e é utilizado para uma reação subsequente,
- os dois grupos aldeído de uma única molécula de glutaraldeído reagem com duas aminas formando uma ligação cruzada, e
- a ligação cruzada é formada por mais de uma molécula de glutaraldeído.

### 3.5.2 EPICLORIDRINA

A molécula da quitosana apresenta dois grupos funcionais, hidroxila (OH) e amino (NH<sub>2</sub>), sendo este último mais ativo que a hidroxila. O agente reticulante epiclоридrina FIG. 3.7, é insolúvel em água, miscível em álcool, éter, clorofórmio. A reação com a quitosana envolve a abertura do anel epóxido, reagindo apenas com os grupos hidroxila da quitosana, sob condições alcalinas, mantendo os grupos amino livres, formando uma rede polimérica tridimensional. À medida que o número de grupos amino livres é maior, o número de interações entre a água e o suporte aumenta havendo maior expansão do polímero. A quitosana reticulada com epiclоридrina é insolúvel tanto em meio ácido quanto em meio básico. A reticulação é alcançada em 2h a 50°C e a membrana de quitosana reticulada é insolúvel em solução de ácido acético 5%v/v (pH=2,5) e sua resistência aumenta em condições úmidas (ZENG,1996).



**FIGURA 3.7** Estrutura molecular e tridimensional da epiclоридrina

### 3.5.3 OUTROS RETICULANTES

Também são utilizados outros reticulantes para a quitosana como o formaldeído, etilenoglicol, sulfato de condroitina, glicosaminoglicos e pela sua estrutura o ácido

tartárico pode ser um reticulador devido aos grupos funcionais ácidos carboxílicos e álcool.

### **3.6 AVALIAÇÃO DA BIOCOMPATIBILIDADE DE MATERIAIS PARA APLICAÇÕES MÉDICAS**

Os métodos de cultura de célula têm sido usados para avaliar a biocompatibilidade de materiais por mais três décadas. Células primárias (com exceção dos eritrócitos em ensaios de hemólises) são raramente usadas porque os ensaios são menos reprodutíveis, menos eficientes e em alguns casos indisponíveis. Existem vários métodos validados por repetibilidade (dados comparáveis dentro de um mesmo laboratório) e reprodutibilidade (dados comparáveis entre laboratórios) (NEAMNARCK, 2008; SHIROSAKI, 2008; TIGH, 2007; KONG, 2006; ZHU, 2006; RATNER, 1996).

Muitos produtos que são inicialmente considerados muito citotóxicos podem ser modificados ou então o seu uso pode ser controlado pelo fabricante para evitar a citotoxicidade. Nesses testes podem ser usadas células de mamíferos ou de não-mamíferos, bactérias, levedos ou fungos, para determinar se há mutação gênica. Esses ensaios avaliam também mudanças na estrutura cromossomial ou mudanças genéticas que são causadas pelo material de teste, instrumentos e extratos dos materiais (ANUSAVICE, 1998)

Um dos métodos utilizados é avaliação do comportamento de células VERO (acrônimo de VERDA RENO), uma linhagem estabelecida a partir de células renais de macaco verde africano adulto normal (*Cercopithecus aethiops*), quanto à adesão, crescimento, proliferação e diferenciação de células fibroblásticas em meios de cultura. Estas células foram isoladas pela primeira vez na Universidade de Chiba, no Japão, em 27 de março de 1962 por Y. Yasumura e Y. Kawakita (ASTM F813-01, ATCC - *American Type Culture Collection* ).

Um material tóxico é definido como um material que libera uma quantidade de componentes químicos em quantidades suficientes para matar as células direta ou indiretamente através da inibição de sua rota metabólica principal. Embora uma série de

fatores afeta a toxicidade química, o mais importante é a dose liberada a cada célula individualmente (ANUSAVICE, 1998).

### 3.6.1 REDUÇÃO DO MTT

A viabilidade celular usando o ensaio de MTT consiste em avaliar a atividade da mitocôndria a partir das enzimas presentes na célula viva capazes de promover a redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio. Os testes de citotoxicidade usando culturas de células são aceitos como primeiro passo na identificação de compostos ativos e/ou como testes de biosegurança (VISTICA, 1991).

### 3.6.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS

Macrófagos são as células de infiltração dominantes que respondem rapidamente ao implante de um biomaterial tanto em tecidos moles quanto duros. Estas células e suas variantes morfológicas, células gigantes multinucleadas ou células gigantes de corpos estranhos, usualmente permanecem na interface tecido-biomaterial por toda a vida útil do aparelho *in vivo*. Como um componente do sistema imune a atividade dos macrófagos estão mais relacionadas às respostas imunes, inflamatórias e respostas a presença de corpos estranhos. Entretanto, os macrófagos também medeiam a biodegradação de materiais bioabsorvíveis via fagocitose e degradação extracelular. Além disso, os macrófagos são essenciais para a efetiva regeneração tecidual pois eles regulam o recrutamento, proliferação e diferenciação de células alvo, tais como, fibroblastos, osteoblastos, endoteliais e queratinócitos durante o processo de reparo (XIA et al., 2006; SANTOS, 2002).

O modo como os macrófagos respondem ao biomaterial é dependente do tamanho do material. Partículas de material com dimensões menores que um único macrófago nucleado (normalmente em torno de 10µm de diâmetro) podem ser fagocitadas. Grandes partículas (entre 10µm e centena de micrometros) que são além da capacidade de fagocitose do macrófago, podem ser englobadas por células gigantes multinucleares ou células gigante de corpo estranho. Materiais volumosos como aparelhos médicos, tais como, pinos, placas, suturas ou implantes de membranas formarão células gigantes de

corpo estranho que se unirão à superfície do material e ficarão na superfície por toda vida útil do implante (XIA et al., 2006).

Os macrófagos também têm um papel importante na regeneração de tecidos. Os macrófagos secretam um espectro de citocinas e fatores de crescimento para regular o recrutamento, proliferação e a diferenciação celular que conduz a efetiva regeneração do tecido e a angiogênese. Mais recentemente, foi mostrado que macrófagos ativados por citosinas liberadas por células T “*helper*” 1, produzem óxido nítrico (*nitric oxide* – NO) molécula gasosa que atua inibindo a respiração mitocondrial, a síntese de DNA e a atividade da enzima aconitase do ciclo de Krebs (XIA et al. 2006; CERQUEIRA, 2002; SANTOS, 2002).

Desde o início das pesquisas com o NO, a partir de uma proposta de participação em defesas não-específica do hospedeiro, está claro que o NO tem um papel chave na orquestração da resposta da pele aos estímulos externos tal como calor, luz ultravioleta (UV), resposta a infecção e reparo de lesões, assim como certas condições patológicas subjacentes. A importância da sinalização mediada pelo NO na pele foi revisada por vários autores, embora previamente a ênfase freqüentemente foi colocada em condições patológicas (CALS-GRIERSON, 2004).

Além desse papeis o NO medeia vários fenômenos, como vasorrelaxamento dependente do endotélio, citotoxicidade mediada por macrófagos, inibição da ativação, adesão e agregação plaquetária, relaxamento do corpo cavernoso peniano humano, regulação da pressão sanguínea basal, depressão sináptica em longo prazo, potencialização da transmissão sináptica em longo prazo, microcirculação medular e glomerular e prevenção de piloroespasmo em estenose pilórica hipertrófica infantil. A atividade do NO foi relatada em endotélio, cerebelo, nervos não adrenérgicos não colinérgicos, macrófagos, neutrófilos, rins, células epiteliais pulmonares, mucosa gastrintestinal e miocárdio. O NO também pode ser responsável pela vasodilatação presente na angiogênese fisiológica ou patológica, como no caso de tumores. No nosso caso é importante ressaltar o papel como mediador para reparo de lesões (MESQUITA, 2007; CERQUEIRA, 2002; FRANK, 2002).

O óxido nítrico é sintetizado em células de mamíferos pela ação de uma classe de enzimas, com pelo menos três isoformas, conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). As NOS catalizam a reação enzimática de oxidação do nitrogênio terminal guanidínico do aminoácido L-arginina, na presença de oxigênio molecular e de NADPH reduzido, gerando um produto intermediário, a L-hidroxiarginina. Esta última sofre outra reação de oxidação produzindo a molécula de NO e uma citrulina (XIA et al. 2006; CALS-GRIERSON, 2004; CERQUEIRA, 2002; SANTOS, 2002; QURESHI,1996).

No sistema circulatório, em particular na coagulação sangüínea, o NO está envolvido com a cascata fibrinolítica e trombótica associados com dano endotelial, sendo que as propriedades antitrombóticas do NO resultam em parte da inibição da adesão e agregação plaquetária. A deficiência de NO foi associada com trombose arterial. Nos vasos sangüíneos, o NO exerce função na modulação do diâmetro vascular e da resistência vascular pela sua habilidade em relaxar o músculo liso vascular. O NO inibe interações de elementos sangüíneos circulatórios com a parede do vaso. Uma deficiência de NO pode promover trombose vascular, restenose, arterogênese e injúria da reperfusão. A diminuição da vasodilatação dependente do endotélio pode ser induzida por hipertensão, diabetes e/ou aterosclerose. O NO pode ser um inibidor da adesão leucocitária em microvasos pós-capilares (MESQUITA, 2007; WU, 2007; CERQUEIRA, 2002)

### **3.7 TECIDO EPITELIAL**

Apesar de não ser considerado escopo específico do trabalho esse tópico sobre tecido epitelial foi incluído para que o leitor possa se inteirar de forma breve sobre a complexidade desse órgão do corpo humano e os grandes desafios que a engenharia de tecido tem que sobrepor para atingir resultados promissores na substituição e reparo de lesões a esse tecido.

A pele é formada por um revestimento de camadas de células sobrepostas, sendo que as células superficiais são achatadas e compõem uma camada córnea rica em queratina (por isso a pele é classificada como um epitélio estratificado pavimentoso

queratinizado). Com o sistema tegumentário, forma a cobertura externa do corpo e como um dos maiores órgãos do corpo atinge aproximadamente 16% do peso corporal. A camada mais superficial é o estrato ou camada córnea. Mais abaixo encontram-se as camadas: granulosa, espinhosa e basal. A pele renova-se continuamente pois as células nascem na camada basal e vão empurrando as células mais externas, de forma que a divisão entre as camadas mencionadas acima não é nítida, mas um processo contínuo.

A cor da pele resulta de uma série de fatores dentre os quais os de maior importância são: seu conteúdo em melanina (um pigmento marrom escuro produzido pelos melanócitos que são células que ficam junto à camada basal e espinhosa da epiderme), e caroteno, além da quantidade de capilares e da cor do sangue que corre nos capilares da derme.

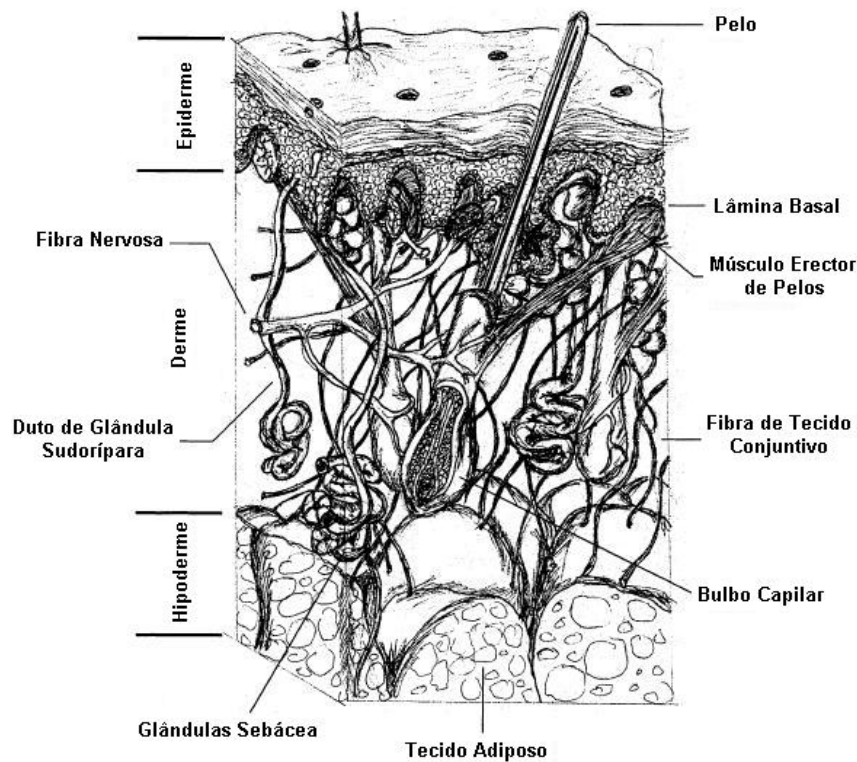
A hipoderme não é considerada parte da pele. Na hipoderme há também tecido adiposo, cujas células armazenam a gordura subcutânea (panículo adiposo). É formada por um tecido conjuntivo frouxo que serve para unir, de maneira pouco firme, a derme aos outros órgãos do corpo, permitindo que a pele tenha certo grau de deslizamento, variável com a região do corpo (JUNQUEIRA, 2004).

### **3.7.1 HISTOLOGIA DA PELE**

Como mostrado na FIG.3.8, a pele não consiste de uma estrutura simples. As duas principais camadas da pele incluem a epiderme, composta de epitélio escamoso estratificado, e a derme, composta de tecido conjuntivo denso de fibroblastos. A epiderme é o local de células epiteliais e a matriz produz queratinócitos, bem como os melanócitos produzem a melanina e sua espessura varia de acordo com a região do corpo, chegando a 1,5mm nas plantas dos pés. A hipoderme, compreendida de um tecido conjuntivo mais leve (menos denso), constitui a camada inferior da derme. A pele possui sensores receptores, folículos capilares para produção e crescimento do pelo, e dois tipos de glândulas: as glândulas sudoríparas, que primeiramente regulam a temperatura do corpo, e glândulas sebáceas. Como em outros órgãos, a pele é perfurada por capilares e innervada pelo sistema nervoso (DALLAN, 2005; RODAS, 2004).

O suor secretado pelas glândulas sudoríparas é uma solução extremamente diluída, que contém pouquíssima proteína, além de sódio, potássio, cloreto, uréia, amônia e ácido úrico, e a secreção das glândulas sebáceas é uma mistura complexa de lipídios que contém triglicerídeos, ácidos graxos livres, colesterol e ésteres.

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado, de origem ectodérmica. Além desse epitélio, que constitui sua maior parte, a epiderme apresenta três tipos de células: os melanócitos, as células de Langerhans, que fazem parte do sistema imunológico podendo processar e acumular na sua superfície os antígenos cutâneos, apresentando-os aos linfócitos, e as células de Merkel, que são tidas como mecanoreceptores. Essas células caracterizam-se principalmente pela presença de grânulos citoplasmáticos elétrons-densos com 80nm de diâmetro, e em sua base notam-se terminações nervosas, algumas com forma de disco sem vesículas sinápticas, o que sugere que são de natureza sensorial, e que recebem impulso das células de Merkel (JUNQUEIRA, 2004; SEAL, 2001).



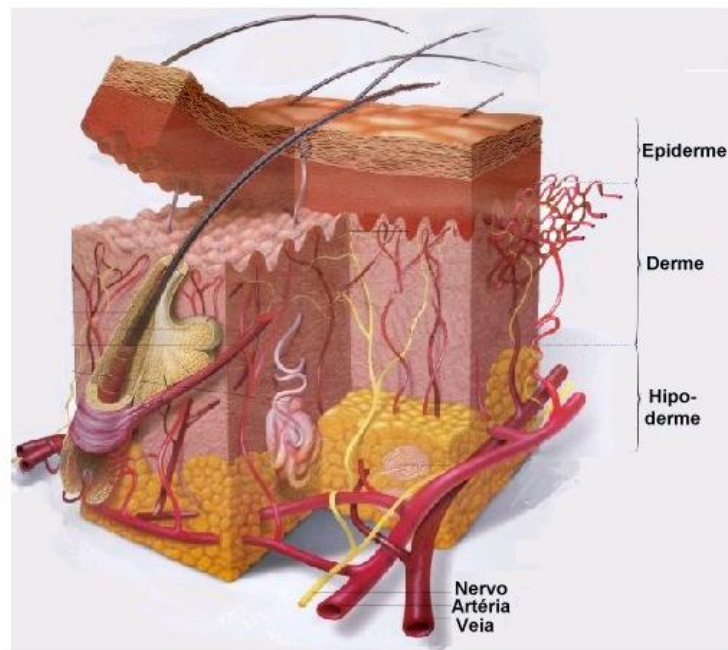
**FIGURA 3.8** - Composição do tecido epitelial

**FONTE** - SEAL, 2001. p. 153

Na planta do pé e na palma da mão a epiderme apresenta maior complexidade e é, vista da derme para a superfície, composta das camadas:

- basal, também chamada germinativa, que separa a epiderme da derme apresentando intensa atividade mitótica, sendo responsável pela renovação da epiderme;
- espinhosa, composta de células com expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas partindo de cada célula adjacente as quais se aproximam e se mantêm unidas através dos desmosomas, evidenciando um aspecto espinhoso, e onde as tonofibrilas e desmosomas são responsáveis pela resistência ao atrito;
- granulosa, caracterizada pela presença de células poligonais com núcleo central, nitidamente achatadas, em cujo citoplasma são observados grânulos grosseiros e basófilos, e esses grânulos de querato-hialina, que não são envolvidos por membrana que vão contribuir para a constituição do material interfilamento da camada córnea;
- lúcida, constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas, hialinas, cujos núcleos e organelas desapareceram e;
- córnea, que tem espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo, onde o citoplasma apresenta-se cheio de substância córnea, uma eletroproteína filamentosa birrefringente chamada queratina.

Na FIG.3.9 apresenta-se a derme que é o tecido conjuntivo sobre o qual se apóia a epiderme. Ela apresenta espessura variável de acordo com a região observada, atingindo um máximo de 3mm na planta do pé. Sua superfície externa é extremamente irregular, observando-se saliências que acompanham as reentrâncias correspondentes da epiderme, chamadas de papilas dérmicas, cuja função seja aumentar a zona de contato derme-epiderme, oferecendo maior resistência à pele. A derme se divide em duas camadas pouco distintas, que são a papilar, superficial, e a reticular, mais profunda.



**FIGURA 3.9** - Divisões do tecido epitelial

**FONTE** - <http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/histologia.htm>

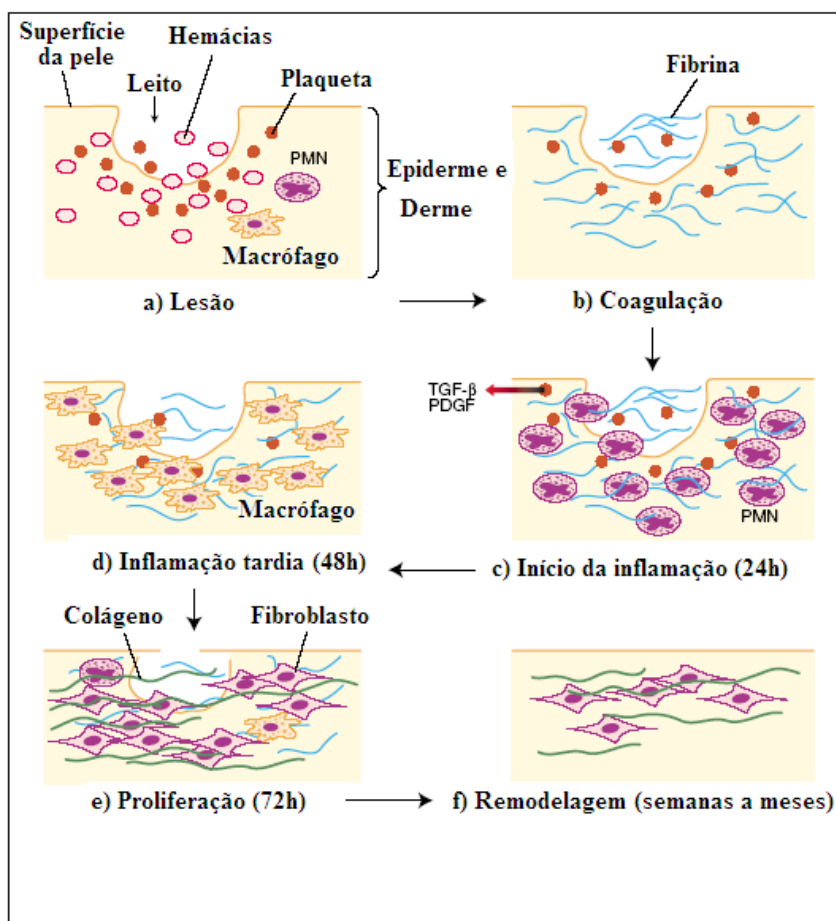
### 3.7.2 PROCESSO DE CURA DE LESÕES

O processo fisiológico de cura de lesões no entendimento atual normalmente é dividido em quatro passos – coagulação, inflamação, seguida pela migração e proliferação, e finalmente a fase de remodelagem. Estas fases não são exatamente distintas umas das outras, porque ocasionalmente se sobrepõem ou ocorrem simultaneamente.

Nas paredes dos vasos danificados as plaquetas - estimuladas por mediadores - imediatamente aderem ao colágeno exposto da parede do vaso. Os aglomerados de plaquetas parcialmente coalescem uns com os outros e liberam os fatores de plaqueta que iniciam o processo real de coagulação. Durante a coagulação uma rede de fibrina forma um tampão de plaquetas e finalmente preenche a abertura total da ferida. O propósito desta rede de fibrina ou primeira matriz extracelular é reter os componentes celulares do sangue, por exemplo eritrócitos, e assim formar um coágulo para hemóstase, fechamento de ferida e provisão de uma matriz para a montagem posterior de colágeno (MUZZARELLI, 1997; SCHMIDT, 2005).

A FIG. 3.10 apresenta as fases de reparo de lesões cutâneas e os principais processos celulares envolvidos: (a) Imediatamente após a lesão cutânea, extravasam elementos

vasoativos e aminas do sangue devido ao rompimento dos vasos sanguíneos dentro da derme. A permeabilidade vascular é aumentada temporariamente para permitir que neutrófilos [neutrófilos polimorfonucleares (PMNs)], plaquetas e proteínas de plasma infiltrem no leito da lesão. A vasoconstrição segue em resposta a fatores liberados por estas células.



**FIGURA 3.10** - As fases de reparo de lesões cutâneas. (a) Lesão, (b) coagulação, (c) Início da Inflamação, (d) Inflamação tardia, (e) Proliferação e (f) remodelagem. (Adaptado de BEANES, 2003)

(b) Coagulação sanguínea ocorre assim que as plaquetas se agregam com a fibrina e o coágulo ou matriz provisória é depositado na lesão seguindo sua conversão em fibrinogênio. (c) Plaquetas liberam vários fatores, incluindo fator de crescimento derivado de plaquetas - (PDGF) e fator de crescimento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que atrai PMNs à ferida, sinalizando o começo de inflamação (24h). (d) Depois de 48h,

macrófagos substituem o PMNs como a célula inflamatória principal. Juntos os PMNs e os macrófagos removem restos celulares, impurezas ou corpos estranhos da lesão; liberam fatores de crescimento, e começam a reorganizar a matriz extracelular. (e) A fase de proliferação começa em aproximadamente 72h com o recrutamento dos fibroblastos à ferida através de fatores de crescimento liberados pelas células inflamatórias e começa a síntese de colágeno. (f) Embora o índice de síntese de colágeno retarda depois de aproximadamente três semanas, a reticulação do colágeno e reorganização tecidual ocorrem durante meses após a ocorrência da lesão na fase de remodelação do reparo (BEANES, 2003; ANDERSON, 2001).

### **3.7.3 PELE ARTIFICIAL**

A atual pele artificial procura recriar a derme e a epiderme mas não leva em conta a regeneração da intrincada estrutura e funções de folículo capilar e glândulas sudoríparas e sebáceas, sensores mecânicos e térmicos

Várias abordagens são feitas no projeto de materiais para a regeneração de pele. Estas abordagens variam desde o desenvolvimento de substituição de toda a espessura da pele à substituição sub dérmica e epidérmica.

O corpo é capaz de regenerar sua própria epiderme desde que a derme permaneça intacta. Entretanto, vítimas severamente queimadas e pacientes com úlceras diabéticas, entre outros, freqüentemente não têm uma derme intacta. Atuais soluções envolvem enxertos de pele de cadáveres e xenoenxertos; ambas as abordagens são contaminadas com doenças transmissíveis e problemas de resposta imunológica. Cientistas, clínicos e engenheiros trabalham arduamente para desenvolver terapias que regeneram, ou ajudam o corpo a regenerar a derme, epiderme ou a espessura total da pele.

De forma ideal, os materiais de enxertos devem aderir ao sitio ferido, ser poroso o suficiente para conduzir a difusão de excreções (rejeitos), nutrientes e excesso de água, e prevenir a desidratação, além de ser barato, flexível, de fácil manuseio, de vida longa de prateleira, aplicados em intervenção única e duráveis (SHERIDAN, 1999). Alguma evaporação de água é essencial, entretanto, visto que uma completa falta de remoção de

água resultará em bolhas de sangue, que nas bordas causará a delaminação do material enxertado. O material também deve permitir a migração celular e ter propriedades mecânicas similares às daquelas da pele original. Finalmente, o enxerto necessita promover uma regeneração dérmica e epidérmica, para prevenir infecção bacteriana e degradar em uma taxa apropriada, igual porém oposta àquela do tecido em regeneração. Estes parâmetros propõem um enorme desafio a qualquer tipo de material (SEAL, 2001). Dentre os estudos nessa direção pode-se mencionar que: HUANG et al. (2005), estudaram o efeito da mistura quitosana/gelatina de pele de porco (MW=5kDa) sobre as propriedades de degradação cinética, propriedades de rigidez mecânicas e interação matriz/célula, concluindo que a adição de gelatina afeta a rigidez de matrizes 2D e 3D e facilita a manutenção da taxa de degradação na presença de lisozima. A avaliação da interação de adesão celular apresentou diminuição de espalhamento de células sobre as membranas de quitosana, acumulando actina e FAK (cinase de adesão focal) localizada dentro dos HUVECS (células endoteliais de cordão umbilical) em cultura estática.

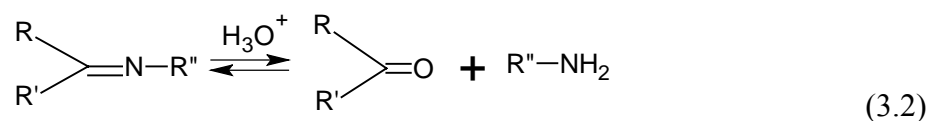
LI et al. (2005), construíram uma matriz híbrida de quitosana/alginato com porosidade de 92% e obtiveram módulo de compressão e limite de escoamento de 5,6MPa e 0,46MPa respectivamente, que são aproximadamente quatro vezes superior à quitosana pura. As células de osteoblastos semeadas sobre o híbrido e cultivadas sem meio osteogênico pareceram fixar e proliferar bem, além de promover a deposição mineral em muito pouco tempo. O substrato suporte de alginato/quitosana tem alta resistência mecânica e é estruturalmente estável devido a forte ligação iônica entre grupos amino da quitosana e os grupos carboxila do alginato.

YAMANE e colaboradores (2005), estudaram a hipótese de que o ácido hialurônico pode fornecer efeitos biológicos superiores sobre os condrócitos num sistema de cultura em 3D. Avaliou a adesão de condrócitos, proliferação e síntese de matriz extracelular em fibras de quitosana/ácido hialurônico para engenharia de tecido de cartilagem e concluiu que a fibra híbrida a base de quitosana ácido hialurônico serve como biomaterial ideal para construção de substrato suporte 3D.

IWASAKI et al. (2004), quantificaram o grau de adesão de condrócitos de coelho sobre o substrato de fibras de quitosana/alginato *in vitro* e ainda sugeriram que as fibras podem ser um biomaterial adequado a fabricação de substrato suporte 3D para engenharia de tecido de cartilagem.

MA et al. (2003), descreveram a fabricação de substrato poroso de colágeno com 10% de quitosana e até 0,25% de Glutaraldeído (GA) para aumentar a eficiência de ligações cruzadas e avalia a capacidade de expansão, bem como, a degradabilidade tanto *in vivo* quanto *in vitro* demonstrando citocompatibilidade, infiltração e crescimento de fibroblastos. Um detalhe da investigação foi que um firme aumento da bioestabilidade do substrato suporte de colágeno/quitosana foi obtido com concentração de GA menor que 0,1%, sendo então menos influenciada em concentrações mais altas de GA até 0,25%.

WANG et al. (2004), usaram quitosana e o PVA para formar uma rede polimérica semi-interpenetrada com o glutaraldeído como reticulante nas ligações cruzadas. A combinação da quitosana e do PVA na presença do glutaraldeído tem apresentado promissores atributos para aplicações práticas, tais como, alta taxa de retração e a expansão, alta sensibilidade ao pH e biodegradabilidade, e as propriedades físicas e químicas foram caracterizadas particularmente as sensíveis ao pH. A formação do hidrogel sensível ao pH é devido à reação de base de Schiff entre os grupos amino da quitosana, o polímero base e os grupos aldeídos do agente reticulante. A adição do PVA diminuiu a taxa e o tempo de gelificação e aumentou a resistência mecânica do hidrogel, especialmente em baixas concentrações de ligantes. Aumentando a concentração de reticulante diminui a taxa e o tempo de gelificação completa do hidrogel. Até a concentração de 25%, o PVA lixivia do hidrogel em pH=3 durante o tempo de expansão devido à hidrólise da base de Schiff. A equação (3.2) apresenta a forma genérica de hidrólise de uma base de Schiff.



onde R' e/ou R'' podem ser hidrogênio (SANTOS, 2004).

YILMAZ (2003), estudou a miscibilidade da quitosana e poli(óxido de etileno) (PEO) em soluções aquosas por viscosimetria, devido a importância tecnológica destes dois polímeros especialmente para aplicações biomédicas, farmacêuticas e cosméticas e utilizou a viscosimetria pelo fato de fornecer informações sobre miscibilidade em nível molecular, ser fácil, rápida e barata se comparada com outras técnicas. Uma mistura de quitosana/PEO 0,3/0,7, respectivamente, é imiscível em solução ácida diluída nas temperaturas de 25°, 30° e 35°C mas miscível no estado sólido.

CZAJA et al. (2006), apresentam uma série de produtos de celulose microbiana, pesquisados e desenvolvidos desde os anos 80, relacionados ao *Acetobacter xylinum* que consiste de uma classe de biopolímeros promissora devido ao fato de apresentar propriedades mecânicas e físicas únicas, além de sua pureza e uniformidade que permite aplicações desde membranas para áudio de alta qualidade e artigos eletrônicos a células de combustível e materiais médicos principalmente como bandagens de feridas e substitutos de pele. Suas propriedades resultam da nanoestrutura da membrana obtida.

Apesar da produção de substitutos de pele artificial ser um campo relativamente novo já existem alguns produtos e serviços disponíveis no mercado. A grande maioria destes produtos tem sido desenvolvida por companhias sediadas nos Estados Unidos da América (EUA), geralmente com a colaboração de renomados departamentos acadêmicos.

Dos produtos acima somente o Epicel é baseado em células autólogas (as células ou tecidos colhidos e subsequentemente aplicados na mesma pessoa), todos os demais são produtos alogênicos, isto é, as células são tiradas de doadores com característica geneticamente diferente porém da mesma espécie. As células de doadores podem fornecer fatores de crescimento mas elas não podem sobreviver e integrar-se.

## CAPÍTULO 4

## PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

## 4.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

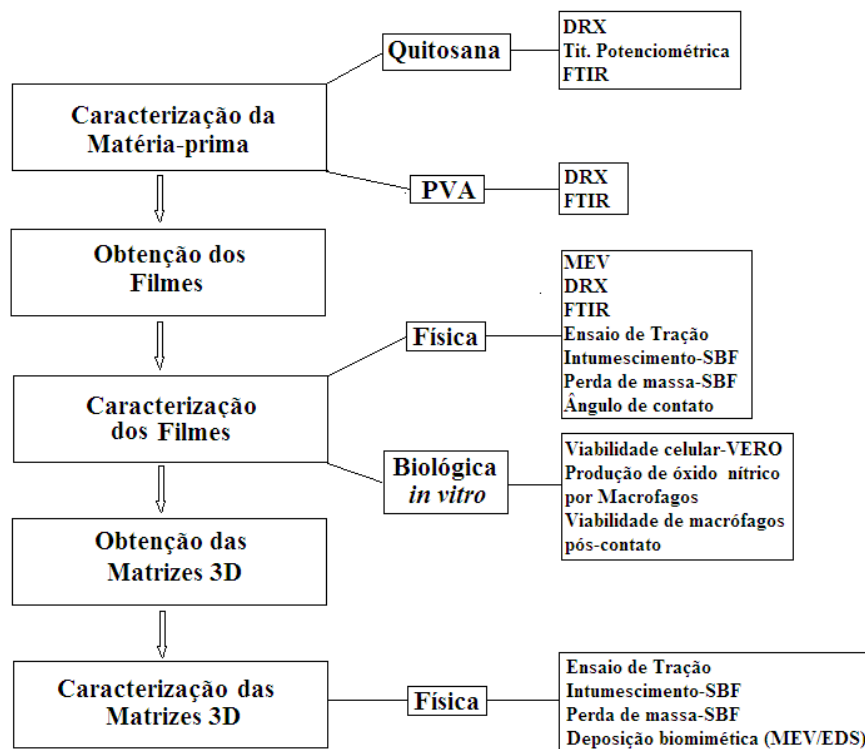


FIGURA 4.1 Fluxograma das etapas de trabalho

## 4.2 MATÉRIAS PRIMAS

Todos os sais e reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A.) e água Milli-Q foi utilizada em todas as soluções com resistividade mínima de (18,0MΩ.cm) a 25°C.

Quitosana em pó (Cat.#419419, Sigma-Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin, USA, massa molar (MW) = 161.000g/mol, GD=75,6%, viscosidade = 1406cP -1,0% em 1% de ácido acético)

Ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH - Cat.#49199, Sigma-Aldrich)

Poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila) PVA (GH=80% e massa molar(MW) de 9.000 a 10.000g/mol, Sigma-Aldrich, Cat.#360627).

Glutaraldeído (GA) ou 1,5 pentanodial (Cat.#49630, Sigma-Aldrich), agente reticulante (solução aquosa 25%).

#### 4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS

As matérias primas, quitosana e PVA, foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através das técnicas de análise Espectroscópica na região do Infravermelho usando os modos de transmitância e absorbância (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*), Difração de Raios-X (*XRD- X Ray Diffraction*), e Titulação potenciométrica.

A Fluorescência de Raios-X foi realizada a partir do material em pó, conforme fornecido, no equipamento PW9710mpd, da Philips (CuK $\alpha$ ,  $\lambda = 1,54056\text{\AA}$ ). Os experimentos de XRD foram conduzidos no material em pó no equipamento PW 1710, da Philips. A análise foi conduzida com  $2\theta$  variando de 3,01 a 90,00° com passo de 0,06°. O padrão de difração do PVA foi analisado com base na estrutura monoclinica para a célula unitária ( $a=0,781\text{nm}$ ;  $b=0,252\text{nm}$ ;  $c=0,551\text{nm}$  e  $\beta=91^\circ 42'$ ) (BUNN, 1948; CHO, 1999; RICCIARDI, 2003). A quitosana foi avaliada segundo a estrutura ortorrômbica ( $a=0,895\text{nm}$ ,  $b=1,697\text{nm}$  e  $c=1,034\text{nm}$ ) e monoclinica com  $\beta=88^\circ$ . Os picos evidenciados dentro da faixa de varredura foram identificados e confirmados por publicações anteriores na literatura (OGAWA, 2004; MAZEAU, 1994; OGAWA, 1991; CLARK, 1936).

A avaliação através de FTIR foi realizada em pastilha prensada do pó conforme fornecido misturado com KBr (1%, em peso de polímero em relação ao KBr)

empregando a técnica de reflectância difusa. Foi utilizado equipamento Spectrum 100, da Perkim Elmer, sendo feitas 32 varreduras entre 400 e 4000 $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$  e intervalos de 2 $\text{cm}^{-1}$ .

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada através de titulação potenciométrica: 0,2g de quitosana foi dissolvida em 20mL de solução padronizada de HCl 0,10(mol/L) e diluída com 10mL de água destilada. Em seguida, sob agitação constante titulou-se a solução com NaOH 0,01(mol/L) padronizado, obtendo-se a curva típica de titulação potenciométrica. Os valores obtidos foram levados na Eq. 4.1 (TAN, 1998) e Eq.4.2 (TORRES, 2005) para se comparar o grau de desacetilação da Quitosana fornecido pelo fabricante e as duas metodologias.

$$\text{GD}\% = \frac{\phi}{\frac{M - 161\phi}{204} + \phi} \times 100 \quad (4.1)$$

Onde:

$$\phi = \frac{N_A V_A - N_B V_e}{1000}$$

$N_A$  e  $N_B$  = [HCl] e [NaOH] (mol/L), respectivamente

$V_A$  e  $V_e$  = Volume de HCl e de NaOH no ponto final (mL), respectivamente.

$M$  = Massa da amostra (g)

161 e 204: Massa molecular dos monômeros 2-amino-2-desoxi-D-glicose e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicose (g/mol), respectivamente

$$\text{GD}\% = \frac{N_{\text{NaOH}} \times (V_2 - V_1) \times 161}{M} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde:

$N_{\text{NaOH}}$  : [NaOH] (mol/L)

$V_1$  : Volume de NaOH para neutralizar o excesso de HCl

$V_2$  : Volume de NaOH usados para neutralizar a amostra de quitosana protonada.

$M$ : Massa da amostra (g)

### 4.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

Uma solução de 1,0% (em massa) de quitosana foi preparada pela dissolução de 2,5g em 250mL de solução de CH<sub>3</sub>COOH 2% (em massa). Para a solubilização e homogeneização, a solução foi agitada magneticamente por um período 48h.

O hidrogel de PVA foi preparado pela dissolução de 5,0g de pó do polímero em 100mL de água Milli-Q, sob agitação magnética à temperatura de (70±2)°C. Após a solução ter sido resfriada à temperatura ambiente o pH foi corrigido para (2,00±0,05) com HCl 1,0(mol/L) (Sigma).

Diferentes quantidades da solução de PVA foram adicionadas a solução de Quitosana para obter as razões em massa de Quitosana/PVA de (0:1), (1:3), (1:1), (3:1) e (1:0) em pH (4,0±0,05), ajustado pela adição de NaOH 0,5(mol/L) (MERCK, Cat# 106498). Após a homogeneização (5minutos), o agente reticulante foi adicionado lentamente sob agitação constante. A concentração final de GA na solução precursora foi de 1% e 5% em relação à massa total de polímero. Posteriormente as soluções foram vertidas em placas plásticas e a secagem inicial se deu a temperatura ambiente por 48h. Na etapa final a secagem foi realizada em estufa a (40±2)°C por 24h (COSTA JR., 2007).

As amostras de Quitosana/PVA quimicamente reticuladas foram identificadas por Q/P/G(X:Y:Z) onde X corresponde ao teor de quitosana, Y ao teor de PVA e Z como glutaraldeído em porcentagem de massa de polímero (p%).

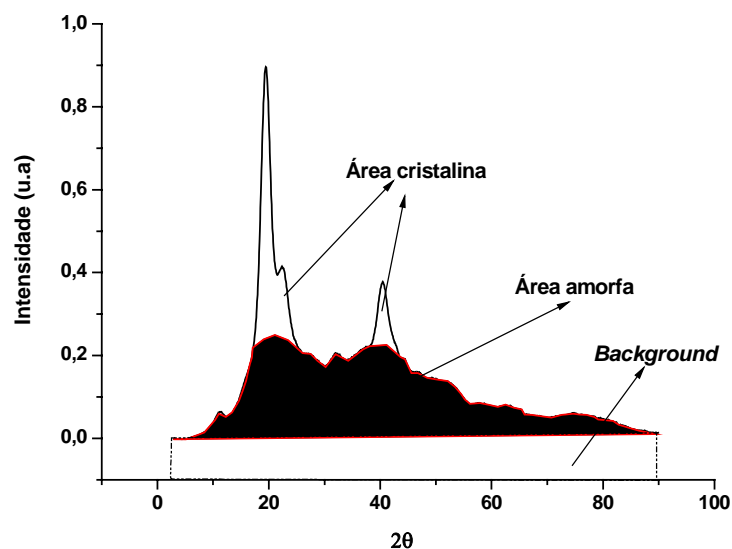
#### 4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL

A avaliação qualitativa e dimensional foram executadas através de observações visuais levando-se em conta a solubilidade, miscibilidade e segregação de fase nas blendas além de se verificar a espessura dos filmes que foi obtida com um micrômetro Mitotoyo (±10µm).

A morfologia dos filmes obtidos foram avaliadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) (JSM 6360LV, JEOL/Noran), microscópio acoplado a microsonda para Espectroscopia de Energia de Raios-X característicos (EDS – Electron Dispersive Spectrometry). As imagens foram obtidas utilizando tensão de aceleração de 10kV a 15kV. Antes do exame as amostras foram cobertas com fina camada de ouro por aspersão usando baixa taxa de deposição, refrigeradas e colocadas à máxima distância do alvo a fim de evitar danos às mesmas.

As técnicas de FTIR e XRD foram utilizadas para avaliação da presença de grupos químicos e cristalinidade dos filmes, respectivamente. Os espectros de FTIR foram obtidos pelo modo ATR (reflexão total atenuada) na faixa de número de onda de 4000 a 650 $\text{cm}^{-1}$  durante 64 varreduras, com resolução de 2 $\text{cm}^{-1}$  (Paragon 1000, Perkin-Elmer, USA). Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos. Para a avaliação os filmes foram recortados e secos em estufa a (40 $\pm$ 5) $^{\circ}\text{C}$  (MANSUR, 2006).

A partir dos difratogramas obtidos, a avaliação quantitativa da cristalinidade foi realizada dividindo-se o difratograma em três regiões (cristalina, amorfa e *background*) conforme FIG. 4.2 (MANSUR, 2007).



**FIGURA 4.2** - Modelo de divisão do difratograma em regiões

Resumidamente, as áreas do difratograma foram identificadas como fração cristalina ( $A_C$ ) e amorfa ( $A_A$ ) calculadas através do programa Microcal Origin<sup>®</sup> 7.0, o grau de cristalinidade (GC) foi estimado a partir da Eq.4.3.

$$GC = \frac{A_C}{(A_C + A_A)} \times 100 \quad (4.3)$$

O ensaio de tração foi realizado para avaliar o comportamento mecânico (tensão máxima de tração ( $\sigma$ ), deformação específica (DE), módulo de elasticidade (E) e tenacidade (T) dos filmes obtidos e foi executado em equipamento EMIC DL 3000, utilizando uma célula de carga de 50N, velocidade de ensaio de 5mm/min e corpos de prova na forma de tira com razão mínima de 8 entre a largura e a espessura. Foram obtidos valores médios de seis amostras conforme ASTM D882/02, temperatura de ensaio de  $(21 \pm 2)^\circ\text{C}$  e umidade relativa de  $(52 \pm 8)\%$ . As amostras usadas foram previamente inspecionadas e qualquer descontinuidade tal como bolha de ar, furos ou segregação com dimensão superior a 5% da espessura foram rejeitadas.

O grau de intumescimento foi obtido com fluido corporal simulado (SBF – *Simulated Body Fluid*) ou solução de KOKUBO (1990) que tem concentração iônica próxima da concentração do plasma sanguíneo humano, e foi preparado conforme COSTA (2006) à temperatura de  $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ . O SBF foi obtido dissolvendo os reagentes em grau analítico constantes da TAB. 4.1 em água deionizada e tamponado com tampão TRIS e HCl para obter o pH de  $(7,40 \pm 0,05)$ . A TAB. 4.1 apresenta as proporções para obter as concentrações iônicas do SBF em mmol/L e a comparação entre o SBF, o plasma sanguíneo e o tampão TRIS (OREFICE, 2000).

Para a determinação do grau de intumescimento (GI) as amostras em triplicatas foram secas em estufa a  $40^\circ\text{C}$  e pesadas após a estabilização do peso. Após a pesagem as amostras foram colocadas em recipientes com SBF obedecendo à relação entre a área superficial e o volume de solução =  $0,1\text{cm}^{-1}$  (OREFICE, 2000).

**TABELA 4.1** - Concentração iônica das soluções de SBF e Plasma Sanguíneo e TRIS

Ion	SBF	Plasma Sanguíneo	Tampão TRIS
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0	0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0	0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5	0
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5	0
Cl <sup>-</sup>	147,8	103,0	45,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2	27,0	0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0	0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5	0

As amostras foram mantidas a (37±1)°C em banho-maria. Após o período de tempo as amostras foram retiradas do recipiente e pesadas. A fim de retirar o excesso de fluido as amostras foram colocadas rapidamente (< 20s) sobre papel filtro e então pesadas em balança analítica. Após a pesagem as amostras foram secas novamente em estufa a 40°C até atingir a estabilização do peso. O GI foi obtido conforme a Eq.4.4,

$$GI = \frac{M_I - M_{sf}}{M_{sf}} \times 100 \quad (4.4)$$

onde  $M_I$  é a massa intumescida e  $M_{sf}$  a massa da amostra após a secagem final. Cada experimento foi repetido três vezes e o valor médio foi usado para validar os resultados (n=3).

Para a determinação do índice de degradação (ID) as amostras em triplicatas foram secas em estufa a (40±2)°C e pesadas após a estabilização do peso ( $M_{SI}$ ). Após a pesagem as amostras foram colocadas em recipientes com SBF obedecendo à relação entre a área superficial e volume de solução = 0,1cm<sup>-1</sup> (OREFICE, 2000). As amostras foram mantidas a (37±1)°C em banho-maria. Em seguida, foram retiradas do recipiente e secas em estufa a (40±2)°C, após atingir a estabilização do peso este foi registrado. O ID foi obtido conforme a Eq.4.5, onde  $M_{SI}$  é a massa seca inicial e  $M_{sf}$  a massa da amostra após a secagem final.

$$ID = \frac{M_{SI} - M_{sf}}{M_{SI}} \times 100 \quad (4.5)$$

A avaliação foi realizada para os tempos de: 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 24,0 e 96 horas (n=3).

A avaliação da evolução da tensão superficial com o teor de quitosana na blenda foi adaptada de MANSUR (2007) e feita através da medição do ângulo de contato entre a superfície do filme e a água deionizada (18MΩ.cm). A medição do ângulo foi realizada utilizando o software AutoCAD<sup>®</sup> 2000, a partir do tratamento da imagem digitalizada da gota (volume=50μL) depositada sobre a superfície do hidrogel com microseringa. Todas as fotos foram realizadas dentro do tempo máximo de 1 minuto usando uma câmera digital SAMSUNG<sup>®</sup> Digimax V4000. As medições foram conduzidas em condições constantes de (54±2)% de umidade relativa e temperatura ambiente de (24±3)°C. Foi utilizado como resultado a média de seis tratamentos independentes (n=6).

A análise estatística de todos os resultados obtidos das propriedades mecânicas e físicas foi realizada usando o *software* Microcal Origin<sup>®</sup> 7.0. Cada resultado foi registrado como média e desvio padrão considerando o número de replicatas característico de cada experimento. Para avaliar a influência do agente reticulante nas propriedades mecânicas, grau de intumescimento e índice de degradação foi usado ANOVA de fator único com nível de significância de 95%.

### **4.3.2 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS FILMES DE HIDROGEL *IN VITRO***

#### **4.3.2.1 PROCEDIMENTO DE NEUTRALIZAÇÃO**

Solução tampão de fosfato salino (PBS - *Phosphate Buffered Saline*) conforme TAB. 4.2, foi usada no procedimento de neutralização de grupos citotóxicos remanescentes do

glutaraldeído não reagido. Então, os filmes foram imersos em frascos de poli(etileno) com 75mL de solução com uma relação área/volume variando de 0,5 a 1cm<sup>-1</sup>. O frascos foram colocados dentro de um incubador com temperatura controlada de (37±1)°C por 2,5h. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água deionizada e secas a (40±2)°C por 48h.

**TABELA 4.2 – Relação de reagente do PBS**

Reagente	Massa(g)
NaCl	8,0
KCl	0,2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24
H <sub>2</sub> O (Milli-Q)	990,12

#### **4.3.2.2 BLOQUEIO DOS SÍTIOS NÃO REAGIDOS COM L-ARGININA**

O bloqueio dos sítios é necessário tendo em vista que alguns dos sítios aldeídos do agente reticulante, ainda podem estar reativos, com risco de provocar reações indesejáveis no meio de cultura. O procedimento para bloqueio foi conduzido através da imersão das amostras das blendas em solução de 1mg/mL de L-arginina (Cat.# A5006, Sigma-Aldrich) em PBS pelo período de 2,5h. Para cada grama de polímero neutra foi utilizada 80mL de solução. As amostras foram lavadas com água destilada e secas à temperatura ambiente durante 24h.

Todas as amostras submetidas ao ensaio de citotoxicidade foram previamente esterilizadas por vapor saturado de óxido de etileno.

#### **4.3.2.3 VIABILIDADE DE CÉLULAS VERO IN VITRO POR MTT**

A viabilidade celular foi analisada através da redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Cat.# M2128, Sigma), usando

monocamadas de células VERO (ATCC CCL-81 - células fibroblásticas de rim de Macaco Verde Africano) crescidas em placas de poliestireno de 96 poços tratada para cultura de células (TPP, 92096). As células (inóculo de  $5 \times 10^4$ ) foram incubadas a  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24h de incubação o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se a cada poço MTT diluído em meio mínimo de Eagle (*Minimum Eagle Medium* - MEM), incubando-se as células a  $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$  por 4h. Posteriormente, foi adicionada solução de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) SDS10%/ HCl 0,04 N e as placas foram re-incubadas por mais 14 a 16h e, 200 $\mu\text{L}$  foi transferido para uma placa de 96 poços onde foi lida a absorbância em 595nm usando um leitor de microplacas ASYS EXPERT PLUS. Para a análise todos os dados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 4 replicatas ( $n=4$ ). Os dados foram analisados no programa PRISM (version 4.00), sendo utilizado ANOVA seguido de pós-testes de comparação múltipla *Dunnnett* e *Neuman\_Keuls* com nível de significância de 95% (MANSUR, 2007, ASTM F813-01).

A morfologia da adesão e proliferação celular foi avaliada por MEV após o tempo de cultura de 24h. Para a microscopia eletrônica as amostras foram fixadas com Glutaraldeído 2% por 16h. Após a lavagem com PBS para remover o glutaraldeído residual, as células semeadas sobre os filmes de Quitosana/PVA foram desidratadas em uma série gradual de enxágües em etanol aquoso (10-100% em incrementos de 10%) por 20 minutos cada, antes de serem secos em reator com fluxo de nitrogênio por 4h e mantidos em dessecador a vácuo por 12h. Após a secagem atingir o ponto crítico as amostras foram cobertas com uma camada ultrafina de ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL/Noram) (COSTA, 2008)

#### **4.3.2.4 CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR POR PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO *IN VITRO***

A adição de células de macrófagos peritoneais murinos extraídas de camundongos de linhagem C57BL/6 de 6 a 10 semanas de idade se dá após o tratamento do material,

onde em cada poço foi semeado com 100.000 células em 200µl de meio RPMI 1640.<sup>1</sup> contendo 10% de soro fetal bovino (SFB). A placa foi mantida por 22h em estufa de CO<sub>2</sub> (5%) a 37°C. Além dos poços contendo as amostras, foram também semeados controles celulares para comparação no ensaio de Óxido Nítrico (NO) e de MTT. Um controle negativo – Hidroxiapatita (HA) também foi adicionado. Dos 8 poços contendo replicatas dos materiais testados, 4 receberam células apenas com meio RPMI 1640. Os demais receberam células com meio RPMI 1640 e com adição de interferon-gama (IFN-γ) (60U/mL) e lipopolissacarídeo (LPS) (0,2ng/mL), ambos estímulos para a produção de NO.

Após as 22h de cultivo, 100µL dos sobrenadantes de todos os poços foram recolhidos e transferidos para outra placa de 96 poços. Foi executada também uma curva padrão de NaNO<sub>2</sub> para quantificação do NO produzido pelas células (0-100nmol). Foi adicionado o reagente de Griess em todos os poços e 10 minutos após procedeu-se à leitura espectrofotométrica em comprimento de onda de 540nm.

A obtenção das células de macrófagos peritoneais murinos se deu atendendo ao protocolo N<sup>o</sup> 024/08 aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da UFMG em 13/06/2008.

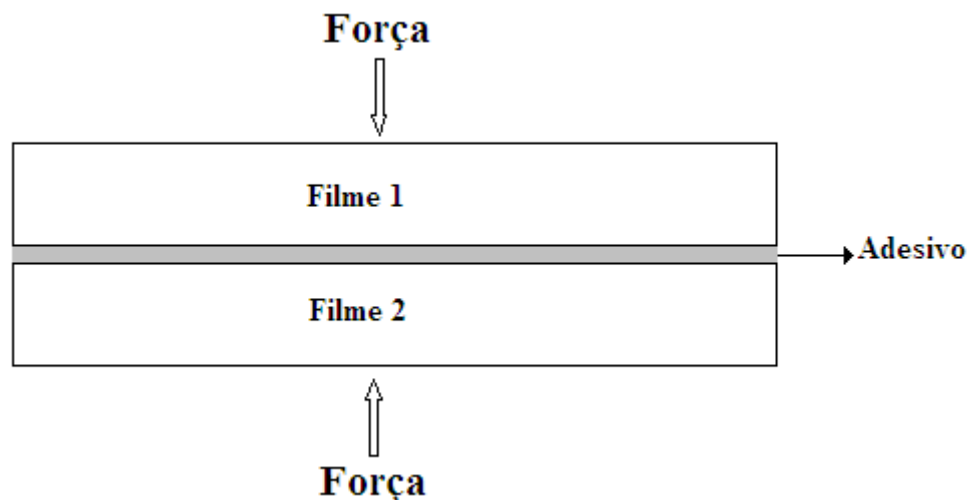
#### **4.4 PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DE HIDROGEL OBTIDOS (SCAFFOLDS 3D)**

Os filmes com 85mm diâmetro das blendas Q/P/G(1:3:0), Q/P/G(1:3:1) e Q/P/G(1:3:5) foram montados de forma justaposta, dois a dois, pela fixação superficial com glutaraldeído, de maneira a se obter os pares: Q/P/G(1:3:0) - Q/P/G(1:3:1); Q/P/G(1:3:0) - Q/P/G(1:3:5) e Q/P/G(1:3:1) - Q/P/G(1:3:5) (FIG. 4.2). A colagem se

---

<sup>1</sup> RPMI 1640 - Meio de cultura desenvolvido no Roswell Park Memorial Institute em 1966 por Moore seus colaboradores. Uma modificação do meio McCoy's 5A, foi formulada para suporte em suspensão de cultura de células limfoblastóides, mas desde então tem se mostrado como suporte para uma ampla variedade de células que dependem de ancoragem. Originalmente tinha a intenção de ser usado como suplemento ao soro, entretanto o RPMI 1640 tem se mostrado como suporte para linhagens celulares na ausência de soro. Ele tem sido amplamente usado em protocolos de fusão e crescimento de células híbridas (Sigma-Aldrich).

deu pelo pincelamento de solução aquosa de GA 25% em uma das superfícies dos filmes e após a montagem efetuou-se a prensagem em presa hidráulica com uma carga de 19.620N sobre uma placa de área de (150 X 250)mm<sup>2</sup>. Após a colagem os *scaffolds* foram acondicionados em dessecador a vácuo até a preparação das amostras e realização dos ensaios de caracterização.



**FIGURA 4.3** Esquema de obtenção da matriz 3D

#### 4.4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES DE HIDROGEL 3D

O procedimento para determinação do grau de intumescimento, do índice de degradação das matrizes e avaliação das propriedades mecânicas foi executado conforme descrito na seção 4.2.2.

A deposição biomimética de Ca-P através da imersão em SBF foi adaptada de COSTA (2006) e executada da seguinte forma: As amostras foram recortadas nas dimensões de (10 X 10)mm<sup>2</sup>, posteriormente foram secas em estufa a (40±2)°C até atingir peso constante. Então as amostras foram colocadas em fracos de polietileno.

Cada amostra foi imersa em 20mL de solução e deixada na temperatura de (36±1)°C em banho-maria. A rota de imersão consistiu em deixar o substrato em solução SBF por 7 dias. Então, o SBF foi substituído por 1,4SBF e, uma semana depois, a solução foi

substituída por nova solução de 1,4SBF. No final do período de imersão (21 dias) as amostras das matrizes foram removidas dos frascos, lavadas suavemente com água deionizada e secas a temperatura ambiente. A superfície das amostras tratadas biomimeticamente foi analisada através de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva de elétrons.

## CAPÍTULO 5

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS

## 5.1.1 QUITOSANA E PVA

## 5.1.1.1 DIFRAÇÃO DE RAIOS X

A FIG. 5.1 apresenta os difratogramas obtidos a partir dos pós tanto da Quitosana (a) quanto do PVA (b). O difratograma da quitosana evidencia dois picos, um de alta intensidade em  $19,8^\circ$  ( $d=0,448\text{nm}$ ) e um de menor intensidade em  $37,7^\circ$  ( $d=0,238\text{nm}$ ) o que caracteriza a presença de uma fase cristalina, e uma ampla faixa abaixo dos picos, variando de aproximadamente  $8^\circ$  a  $80^\circ$ , onde predomina a forma amorfa do material. Conforme célula unitária proposta por OGAWA (2004) os ângulos evidenciados pelo difratograma podem ser associados aos planos (2 0 0) e (1 2 4), respectivamente. Os difratogramas também não apresentam reflexões de  $10^\circ$  e  $15^\circ$  associadas a cristais hidratados e anidros, respectivamente (OGAWA, 1991). A partir do difratograma da matéria-prima em pó estimou-se a cristalinidade de 24% a 23% para a quitosana e PVA, respectivamente.

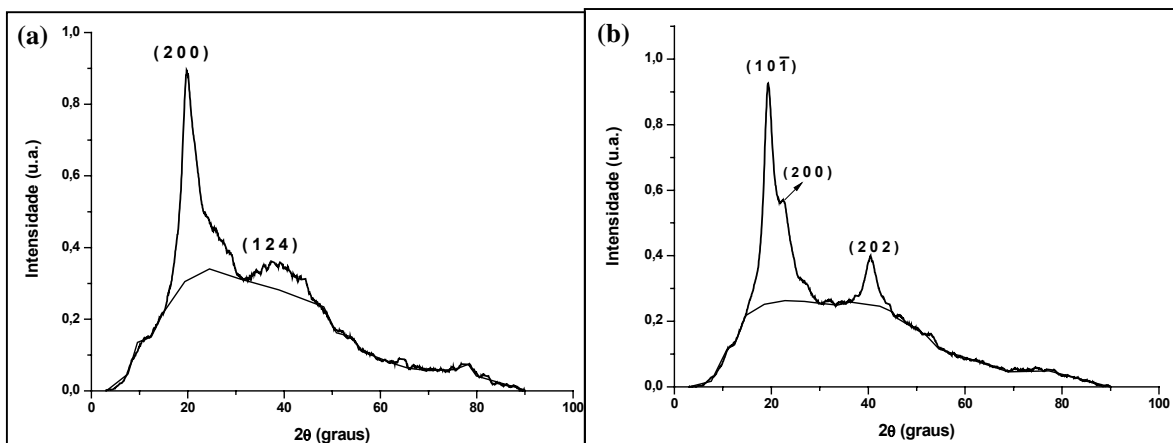
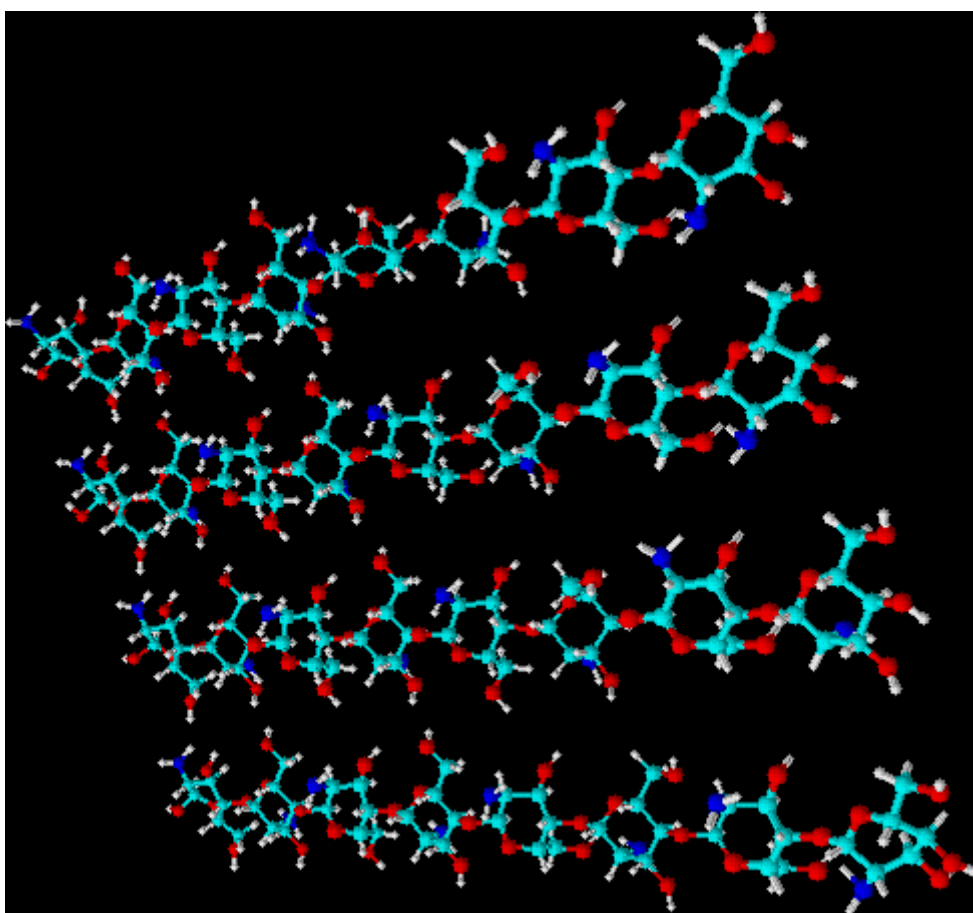


FIGURA 5.1 Difratogramas das matérias primas: Quitosana (a) e PVA (b)

Estes resultados são endossados pela literatura (ARVANITOYANNIS, 1999; OKUYAMA et al. 1999; OGAWA et al. 1992) onde a quitosana apresenta uma célula unitária ortorrômbica com cadeia de hélice dupla estabilizada por ligações de hidrogênio com orientação *gauche-trans*.

A FIG. 5.2 apresenta uma imagem 3D das fibras de quitosana simuladas *in silico* no software ACDlab<sup>®</sup> 10.0 evidenciando os impedimentos na conformação espacial.



**FIGURA 5.2** Estruturas tridimensional *in silico* das fibras de quitosana

CLARK e SMITH (1936) sugerem uma estrutura ortorrômbica com célula unitária com  $a=0,89\text{nm}$ ,  $b=1,025\text{nm}$  e  $c=1,70\text{nm}$  embora não excluam a possibilidade de uma estrutura monoclinica com  $\beta=88^\circ$ .

MAZEAU et al.(1994) apresentam uma célula unitária com  $a=0,807\text{nm}$ ,  $b=0,844\text{nm}$  e  $c=1,034\text{nm}$  (eixo da cadeia). Esta célula contém duas cadeias de quitosana antiparalelas,

cada molécula sendo localizada a duas voltas de hélice paralela ao eixo c, e não há molécula de água dentro da célula.

OGAWA et al. (2004) apresenta uma célula unitária com  $a=0,895\text{nm}$ ,  $b= 1,697\text{nm}$  e  $c=1,034\text{nm}$  também com uma estrutura em ziguezague e existem moléculas de água na célula unitária o que aumenta a dimensão “b” em relação a MAZEAU de aproximadamente duas vezes, porém sugere uma conformação tridimensional polimórfica onde a quitosana pode facilmente mudar sua conformação de hélice estendida de duas voltas para outra pela formação de sais com ácidos ou pelo tratamento térmico acima de  $200^{\circ}\text{C}$ .

O difratograma do PVA com grau de hidrólise de 80% apresentou três picos característicos de presença de fase cristalinidade em  $19,4^{\circ}$  ( $d = 0,457\text{nm}$ ) (alta intensidade),  $22,5^{\circ}$  ( $d = 0,395\text{nm}$ ) (menos definido) e  $40,3^{\circ}$  ( $d = 0,224\text{nm}$ ) (menor intensidade) e uma ampla faixa abaixo dos picos, variando de aproximadamente  $10^{\circ}$  a  $75^{\circ}$ , onde predomina a forma amorfa do material. A partir do difratograma estimou-se a cristalinidade de 22 a 24%.

BUNN in RICCIARDI et al. (2004) apresenta a célula unitária monoclinica com parâmetros:  $a=0,781\text{nm}$ ;  $b=0,252\text{nm}$ ;  $c=0,551\text{nm}$  e  $\beta=91,42^{\circ}$  que foi a célula utilizada para avaliar os resultados obtidos no ensaio de difração. Os planos sugeridos apresentam espaçamento planares muito semelhantes aos obtidos por nossos estudos, sugerindo que a estrutura também seja atática e a cadeia com conformação transplanar. A estrutura cristalina é composta de duplas camadas de moléculas ligadas por ligações de hidrogênio, enquanto fracas forças de Van der Waals atuam entre as camadas. Uma parte das estruturas da cadeia de PVA conduz a pequenas regiões ordenadas (cristalitos) espalhadas de forma desordenada numa matriz polimérica amorfa.

CHO et al., (1999) apresentam várias células unitárias função de diferentes sindiotaticidades e o PVA com 51,2% de grau de sindiotaticidade apresentou célula unitária monoclinica com parâmetros:  $a=(0,763\pm 0,002)\text{nm}$ ,  $b=(0,254\pm 0,001)\text{nm}$ ,  $c=(0,541\pm 0,001)\text{nm}$  e  $\beta=91,2\pm 0,1^{\circ}$  muito semelhante à célula de BUNN (1948).

### 5.1.1.2 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

A FIG. 5.3 apresenta o espectro de infravermelho da quitosana com GD=75,6% a partir de um disco de QUI/KBr e a Tabela 5.1 relaciona as bandas e a posição dos picos dos grupos químicos associados a estrutura química do polissacarídeo. O espectro apresenta a estrutura química do polissacarídeo parcialmente desacetilado, evidenciando as estruturas glicosamina e acetamido. A quitosana é uma amino glicose caracterizada por uma pequena porção de acetatos ligada à amida. O espectro de infravermelho apresenta um amplo pico de absorção em  $3435\text{cm}^{-1}$ , que está associado ao N-H, a ligação de hidrogênio e ao estiramento O-H.

Na banda do estiramento do C-H o pico de  $2922\text{cm}^{-1}$  (com menor intensidade) corresponde à vibração assimétrica e o pico de  $2879\text{cm}^{-1}$  (com maior intensidade) à vibração simétrica. Além disso na banda característica da deformação angular do  $\text{CH}_2$  (tesoura) aparece o pico de  $1423\text{cm}^{-1}$ .

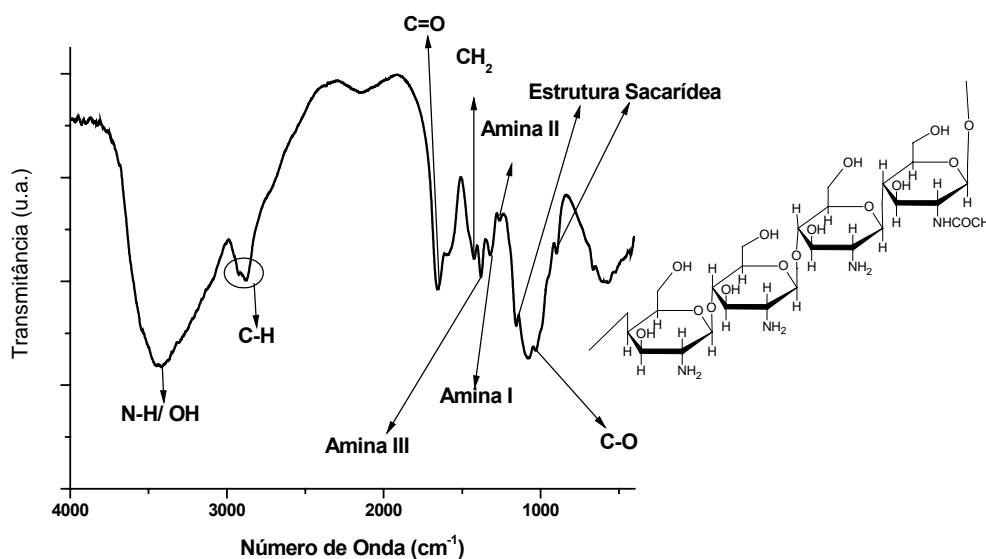


FIGURA 5.3 Espectro de FTIR e estrutura química da Quitosana com GD=75,6%

**TABELA 5.1** – Números de onda e grupos característicos da quitosana

MAT.	BANDAS (cm <sup>-1</sup> )	GRUPOS QUÍMICOS ASSOCIADOS	MAT.	BANDAS (cm <sup>-1</sup> )	GRUPOS QUÍMICOS ASSOCIADOS
QUI	3570 – 3200 3450	v OH ligado v N-H <sub>2</sub>	QUI	1321	v C-N (primária)
QUI	2955 – 2845 2922	v C-H (assimétrico)	QUI	1260	v C-N (secundária)
QUI	2878	v C-H (simétrico)	QUI	1154 e 896	v COC (estrutura sacarídea - β-1-4)
QUI	1900 – 1500 1658	Amida I: vC=O	QUI	1160 1154	v - ponte de oxigênio
QUI	1650 – 1550 1658 – 1630	δN-H (I)	QUI	1300 – 1000 1070	v C-O (cíclico)
QUI	1570-1515 1560	δ N-H (II)	QUI	1030	v C-O (cíclico)
QUI	1465 1423	δOH e CH <sub>2</sub> (tesoura)	QUI	897	v C-O
QUI	1340 – 1250 1379	δC-N (terciária)	QUI	1640 – 1690	v C=N (fraco) (Base .Schiff)

v=estiramento; δ= dobramento (deformação) (WANG, 2004; BRUGNEROTTO, 2001)

Devido ao grau de desacetilação da quitosana aparece o pico da ligação amida e o estiramento da ligação C=O em 1658cm<sup>-1</sup>. Os picos de 1321cm<sup>-1</sup>, 1260cm<sup>-1</sup>, 1379cm<sup>-1</sup> correspondem às fortes vibrações de dobramento da ligação N-H primária, secundária e terciária, respectivamente. As vibrações fora do plano da ligação C-H correspondente à estrutura sacarídea aparecem em 1154cm<sup>-1</sup> e 896cm<sup>-1</sup>.

BRUGNEROTTO e colaboradores (2001) apresentam um resumo sobre os métodos utilizados recentemente para avaliar o grau de desacetilação de quitina e quitosana a partir do espectro de infravermelho onde se verifica a utilização das bandas de referência como sendo as de: 3450cm<sup>-1</sup>; 2878cm<sup>-1</sup>; 1430cm<sup>-1</sup>; 1070cm<sup>-1</sup>; e 1030cm<sup>-1</sup> e as bandas características como as de: 1655cm<sup>-1</sup>; 1630cm<sup>-1</sup>, 1560cm<sup>-1</sup>, além de sugerir, que para qualquer GD de quitina ou quitosana, as bandas de 1420cm<sup>-1</sup> e 1320cm<sup>-1</sup>, como de referência e característica são mais estáveis independentemente da técnica, estado ou estrutura secundária (BRUGBEROTTO, 2001).

A partir da Eq. 5.1 e utilizando os valores de absorvância das bandas de  $1320\text{cm}^{-1}$  e  $1420\text{cm}^{-1}$  obtém-se o GD de  $(80 \pm 5\%)$  ( $n=3$ ) que corresponde a um desvio de 7% em relação ao valor fornecido pelo fabricante que é de 75,6%, evidenciando razoável aproximação.

$$\frac{A_{1320}}{A_{1420}} = 0,3822 + 0,03133 \times (100 - \text{GD}) \quad (5.1)$$

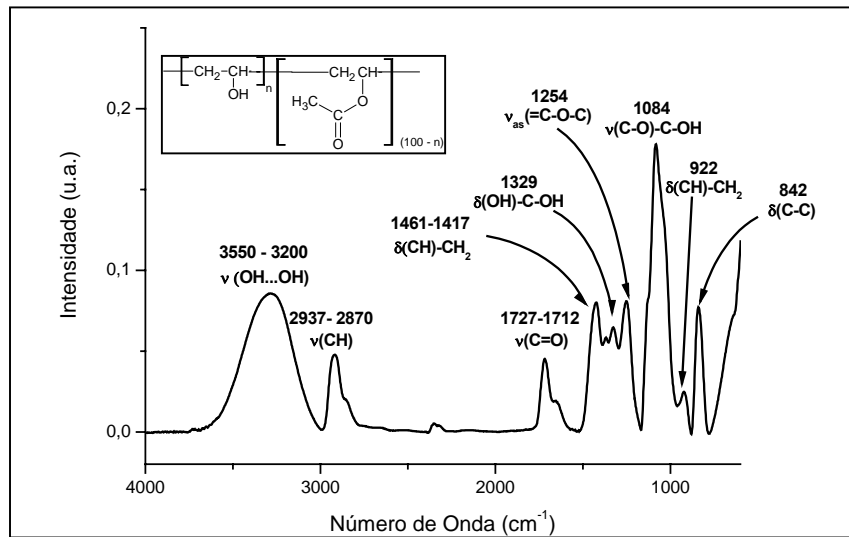
A FIG. 5.4 mostra a estrutura química e o espectro de FTIR típico do copolímero PVA/PVAc parcialmente hidrolisado. O grau de hidrólise foi estimado a partir da relação das bandas do espectro de FTIR associadas ao grupo C=O ( $\sim 1730\text{cm}^{-1}$ ) do acetato e ao estiramento do grupo C-H ( $\sim 2937\text{cm}^{-1}$ ), conforme MANSUR (2007) obteve-se um GH de 86% para o copolímero com desvio de 7,5% em relação ao apresentado pelo fabricante. Considerando uma variação associada à técnica da ordem de 4% o valor evidencia boa correlação.

A TAB. 5.2 apresenta as principais bandas de FTIR e grupos químicos usualmente associados ao copolímero PVA.

**TABELA 5.2** – Números de onda e grupos característicos do PVA e PVAc

MAT.	BANDAS ( $\text{cm}^{-1}$ )	GRUPOS QUÍMICOS ASSOCIADOS	MAT.	BANDAS ( $\text{cm}^{-1}$ )	GRUPOS QUÍMICOS ASSOCIADOS
PVA e PVAc	3550 – 3200	$\nu(\text{OH})$ $\text{OH}\dots\text{OH}$	PVA	1329	$\delta(\text{OH}) - \text{C-OH}$
PVA e PVAc	2937 – 2870	$\nu(\text{CH})$	PVA	1254	$\nu_{\text{ss}}(\text{=CO-C})$
PVAc	1727 – 1712	$\nu(\text{C=O})$	PVA	1084	$\nu(\text{C-O})-\text{C-OH}$
PVA e PVAc	1650 – 1630	$\delta(\text{OH})$ $\text{OH}\dots\text{OH}$	PVA e PVAc	922	$\delta(\text{CH}) - \text{CH}_2$
PVA	1461 – 1417	$\delta(\text{CH}) - \text{CH}_2$	PVA	842	$\nu(\text{C-C})$
PVA	1366	$\delta \text{CH} - \text{R-CH}_3$			

$\nu$ =estiramento;  $\delta$ = dobramento (deformação) (MANSUR, 2007; MANSUR, 2005a)



**FIGURA 5.4** Espectro de FTIR e estrutura química do PVA com GH=80

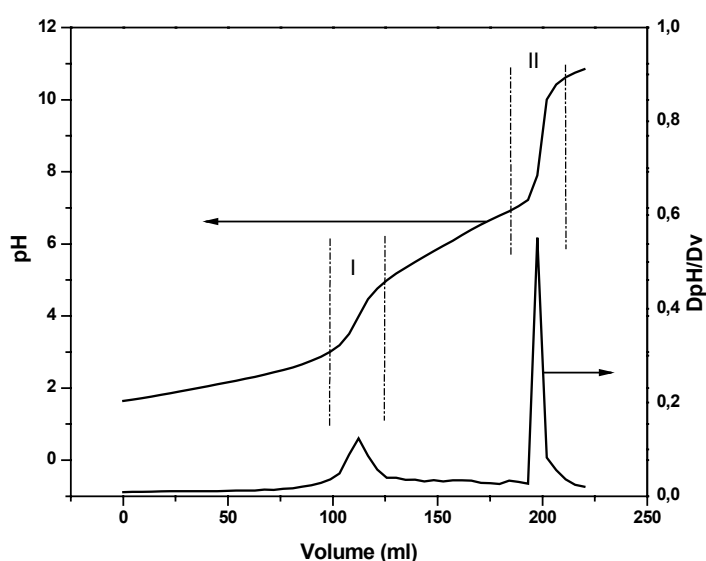
### 5.1.1.3 TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA

A FIG. 5.5 apresenta a curva de titulação potenciométrica obtida a partir da solução de quitosana. A diferença de volume entre os pontos de inflexão corresponde ao ácido consumido para a protonação dos grupos amina e permite a determinação do GD da quitosana (TOLAIMATE, 2000). Após a correção do valor da concentração de NaOH obtém-se o valor de 76% para o GD (TAN, 1998).

O grau de desacetilação exerce influência determinante no comportamento físico químico, mecânico e biológico do biopolímero, pois a relação entre o número de grupos glicosamina e N-acetilglicosamina presentes na quitosana controlam o grau de reticulação. Quanto mais alto o GD na quitosana maior será o grau de ligações cruzadas covalente independentemente da massa molar (GUPTA, 2006; DRAGET, 1996). O GD aumenta o número de grupos amino livres que modificam as interações hidrofóbicas com a água e ajudam a controlar o grau de reticulação na presença de qualquer tipo de agente reticulador.

GUPTA (2007) ainda observou que a hidrofobicidade apresentou uma tendência de aumento com o aumento do grau de ligações cruzadas. Além disso, quitosana com alto

GD (75%) é hidrofílica em comparação com quitosana de baixo GD (48%), mas essa característica se inverte quando reticulada com glutaraldeído. Devido a hidrofílicidade em maiores GDs a solubilidade em soluções aquosas ácidas é facilitada. Maiores GD também favorecem a maior índice de intumescimento e de difusão. Em GDs acima de 50% observa-se que a quitosana apresenta as propriedades: bacteriostáticas contato-dependente, adesão, espalhamento e proliferação celular notadamente em massas molares superiores a  $3,1 \times 10^5$  g/mol, embora a dependência sobre a massa molar é menos evidente (SARASAM, 2008; HSU, 2004; WENLING, 2005; SANO, 2002).



**FIGURA 5.5** Curva de Titulação Potenciométrica e derivada primeira da Quitosana – GD = 75,6%

WENLING (2005) relatou que, para massa molar constante igual a  $8,7 \times 10^5$  g/mol, quando o GD aumenta de 0 para 50% o teor de glicosamina aumenta, mas a regularidade química da cadeia diminui. Entretanto quando o GD aumenta de 50 a 100% tanto o teor de glicosamina quanto à regularidade da cadeia aumentam, isto implica diretamente no grau de cristalinidade do material. Daí o fato de que em relação às características mecânicas observa-se que o aumento do GD aumenta relativamente a tensão de ruptura e o módulo de elasticidade, e diminui a deformação implicando em maior fragilidade do material.

Quanto às características biológicas, MUZZARELLI (1997) ressalta que bandagens de ferida são despolimerizadas pela lisozima e N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase e que a ação

dessa enzimas permite a reabsorção da bandagem e liberação de N-acetilglicosamina, glicosamina e seus oligômeros que exercem ações benéficas tais como ativação de macrófagos e em parte são incorporadas em sulfato de dermatam, sulfato de condroitina e ácido hialurônico. Além disso a ação hidrolítica da lisozima, quitinase e N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase que produzem quitooligômeros onde a glicosamina, que é uma droga anti-inflamatória sintetizada no corpo humano a partir da glicose, é incorporada em glicosaminoglicanos e glicoproteínas. Esses quitooligômeros são ainda capazes de não somente ativar macrófagos e promover a deposição de colágeno, mas também serem incorporados dentro de componentes da matriz extracelular que parece ser a atividade chave exercida pela quitosana na reconstrução de tecidos fisiologicamente normais.

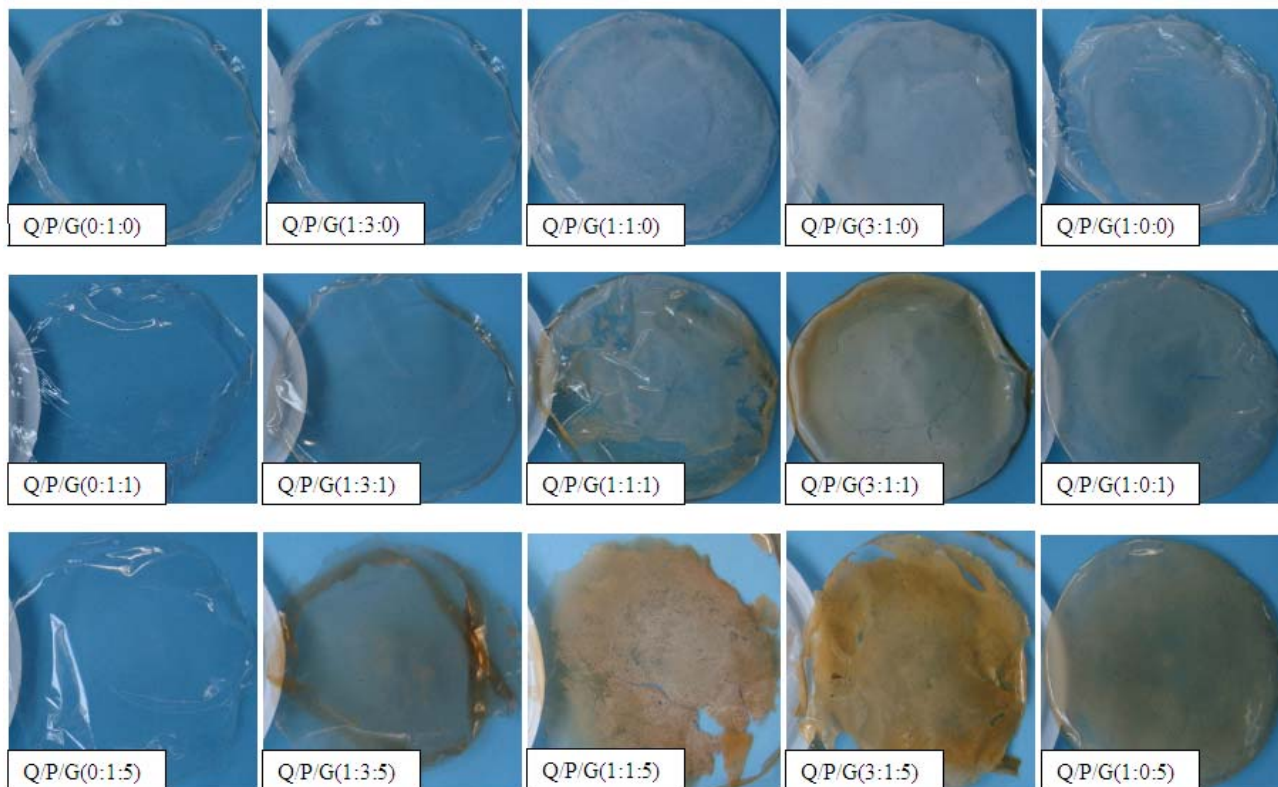
LI (2007) analisando a influência do GD e da massa molar (MW) sobre o efeito da degradação observa que relativamente menores GD apresentam maiores taxas de degradação enzimática inicial e em menores MW apresentam taxas mais rápidas de degradação.

Disso pode-se concluir a utilização de uma quitosana com GD de 75% e massa molar de  $1,6 \times 10^5$  g/mol favorecem a dissolução em soluções aquosas ácidas, apresenta propriedades de intumescimento e mecânicas médias, e características biológicas adequadas para utilização em engenharia de tecido pois a hidrólise pela lisozima é ineficaz em quitosana totalmente desacetilada e pouco efetiva na  $\alpha$ -quitina. Entretanto, os melhores resultados são em quitosana com GD de aproximadamente 80%.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL

### 5.2.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA

A FIG. 5.6 apresenta os filmes de quitosana e PVA puros, as blendas de QUI/PVA sem reticulação e reticulados com 1,0% e 5,0% de GA. Os filmes apresentaram-se com espessura de  $(75 \pm 25 \mu\text{m})$  mas ajustando-se o volume de solução no molde obteve-se espessuras finais variadas.



**FIGURA 5.6** Filmes das blendas de QUI/PVA, quitosana e PVA puros e reticulados com 1% e 5% de GA

**TABELA 5.3** - Avaliação qualitativa dos filmes moldados

Q/P/G	Observações	Esp.( $\mu\text{m}$ ) $\pm 10\%$
(0:1:0)	Transparente, flexível	50
(1:0:0)	Esbranquiçado, flexível, segregado	110
(1:3:0)	Transparente, flexível	110
(1:1:0)	Transparente, flexível, segregado	75
(3:1:1)	Transparente, flexível, pouco segregado	65
(0:1:1)	Transparente, flexível	50
(1:0:1)	Amarelo claro, segregado	80
(1:3:1)	Amarelo claro, pouco segregado	80
(1:1:1)	Amarelo claro, segregado	90
(3:1:1)	Amarelo claro, pouco segregado	90
(0:1:5)	Segregado, flexível	50
(1:0:5)	Amarelo escuro, segregado	95
(1:3:5)	Amarelo escuro, segregado	75
(1:1:5)	Amarelo escuro, segregado	80
(3:1:5)	Amarelo escuro, segregado	110

A TAB. 5.3 apresenta a avaliação qualitativa e dimensional das características observadas nos filmes moldados no que diz respeito coloração, flexibilidade e aspecto visual.

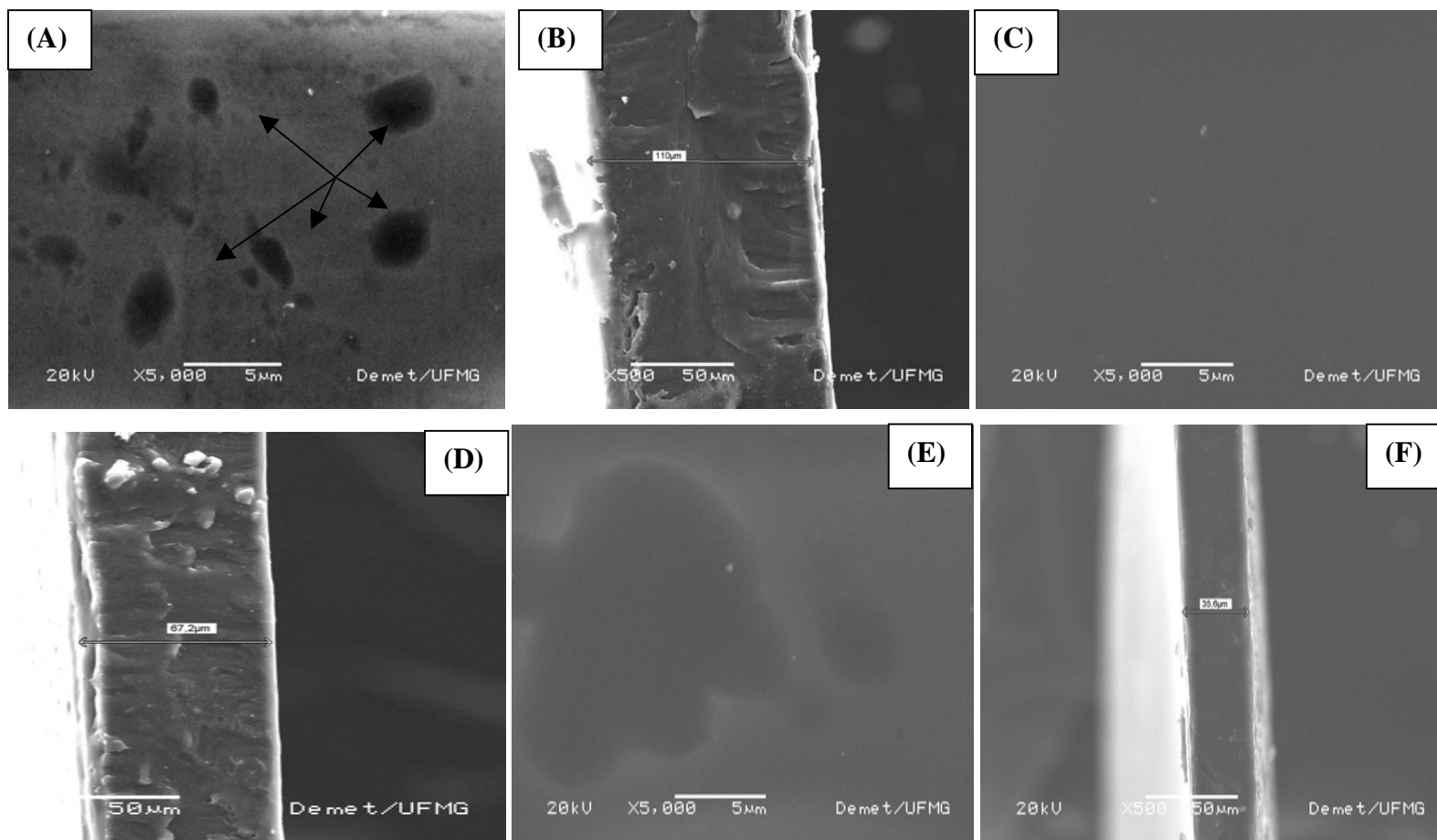
Ao avaliar as proporções de QUI/PVA nenhum desvio foi observado no que diz respeito à solubilidade, miscibilidade mas provavelmente devido ao processo de secagem lento ocorreram algumas regiões com aparência diferenciada que podem estar associadas à segregação de fases. Com o aumento de quitosana e GA os filmes se tornaram mais quebradiços devido a diminuição da mobilidade das cadeias poliméricas e amarelados o que está pode estar relacionado à presença do grupo C=N.

### **5.2.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**

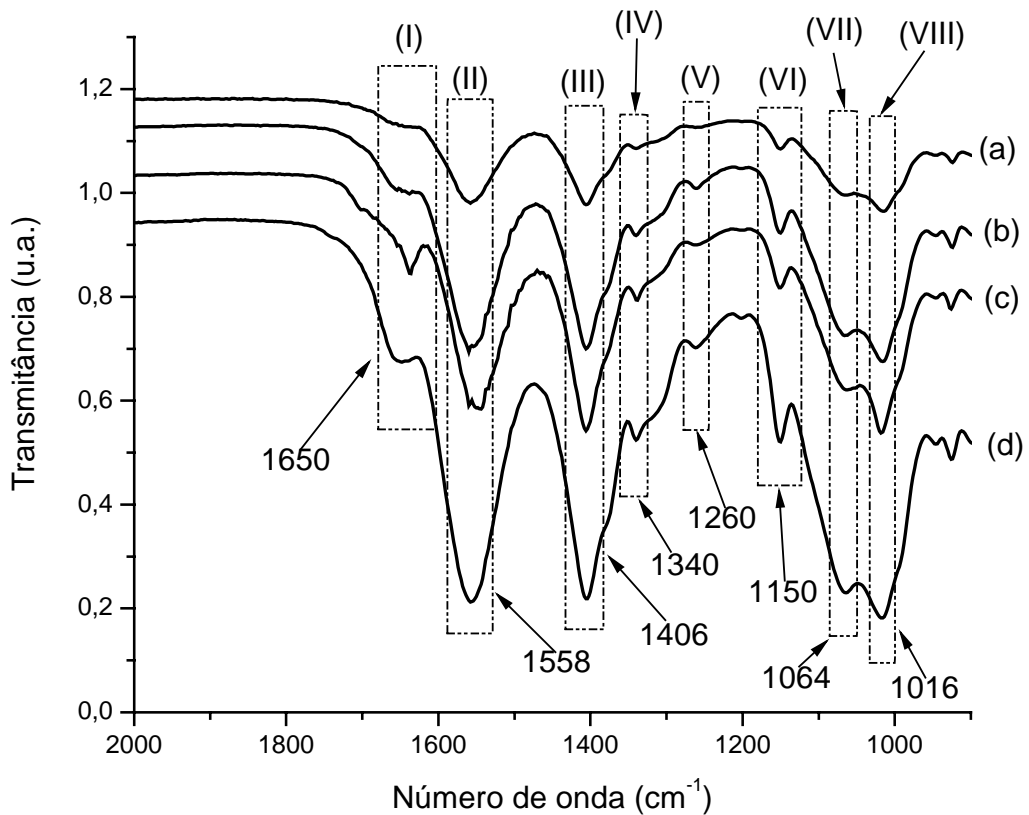
Os filmes foram analisados por MEV e a FIG. 5.7 apresenta as imagens típicas de superfície e da secção transversal obtidas das blendas. Foi observado na blenda Q/P/G(1:3:1) marcas escuras sugerindo a presença de vazios que surgiram durante o processo de secagem, provavelmente devido a separação de fase conforme mencionado por (DON, 2006), função da proporção QUI/PVA.

### **5.2.3 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO**

A FIG. 5.8 apresenta o grupo de espectros dos filmes de quitosana reticulados. A reticulação química da quitosana com o GA ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amino (-NH<sub>2</sub>) que reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água formando assim a ligação C=N (~1648cm<sup>-1</sup>), base de Schiff (WANG, 2004; ROKHADE, 2007).



**FIGURA 5.7** - Filmes de Q/P/G(1:3:1), vista superficial (A), seção transversal (B); Q/P/G(1:1:1), vista superficial (C), seção transversal (D); Q/P/G(3:1:1), vista superficial (E), seção transversal (F).

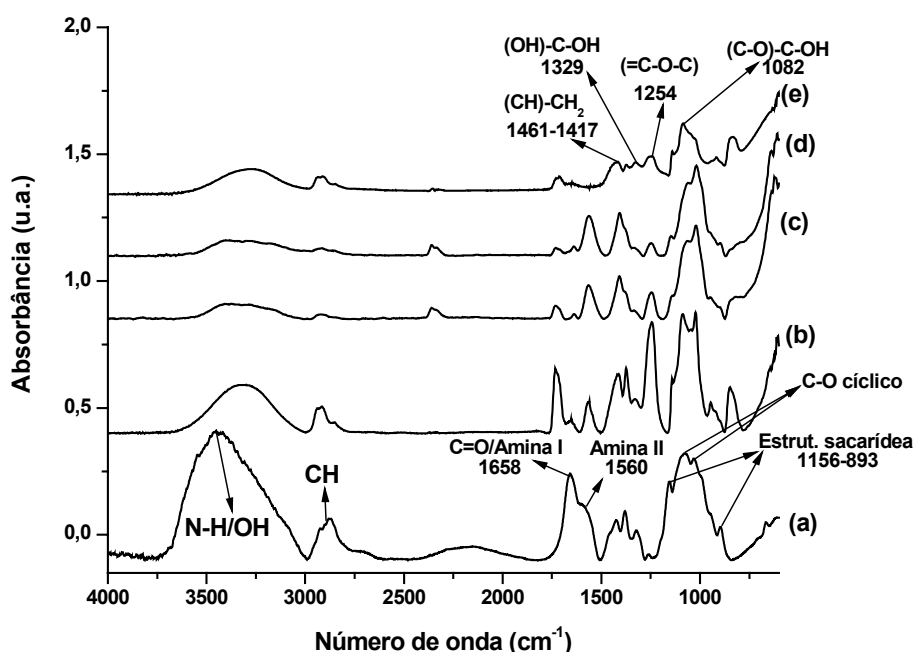


**FIGURA 5.8** Espectros de FTIR dos filmes Q/P/G(1:0:0) (a); Q/P/G(1:0:0,5) (b); Q/P/G (1:0:1) (c) e Q/P/G (1:0:5) (d).

A FIG. 5.9 apresenta o espectro de infravermelho da Quitosana e PVA puros, bem como, das blendas obtidas de QUI/PVA sem reticulação. Observa-se um alargamento na banda de  $3200\text{cm}^{-1}$  a  $3600\text{cm}^{-1}$  normalmente atribuída ao estiramento do OH, e ao  $\text{-NH}_2$ . Com o aumento do teor de quitosana na blenda também se observa um aumento na banda de  $1730\text{cm}^{-1}$ , normalmente atribuída ao estiramento da amida ( $\text{C=O}$ ), bem como a banda de  $1250\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuída à deformação do  $\text{-NH}_3^+$ , estiramento do CO e deformação do OH ocorrida devido à mistura dos polímeros. (WANG, 2004; RAO, 2006).

Em ambiente ácido, entretanto,  $\text{-NH}_3^+$  ( $1548\text{cm}^{-1}$ ) tem mais possibilidade de se formar, pois ele reduz significativamente a nucleofilicidade do nitrogênio, diminuindo a atividade da reação da base de Schiff (RAO, 2006; WANG, 2004).

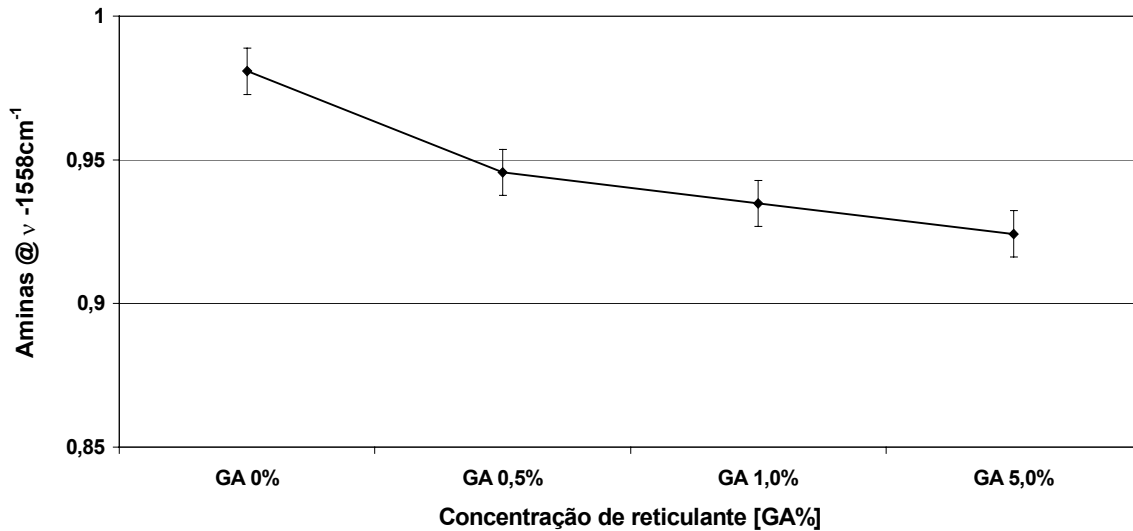
Semelhante ao obtido por MONTEIRO JR. (1999) e WANG e colaboradores (2004), comparando os espectros de FTIR, primeiramente observa-se a banda de  $1648\text{cm}^{-1}$ , atribuída à ligação imina ( $\text{C}=\text{N}$ ), e a segunda em  $1558\text{cm}^{-1}$  associada à ligação amina ( $-\text{NH}_2$ ). Na região de  $1720\text{cm}^{-1}$ , relacionada aos grupos aldeídos livres ( $-\text{CHO}$ ), não se observam variações com o aumento do teor de GA o que sugere que todo o GA foi ligado, possivelmente, em função da relação de grupos aminas disponíveis na quitosana e dos grupos carbonila do GA.



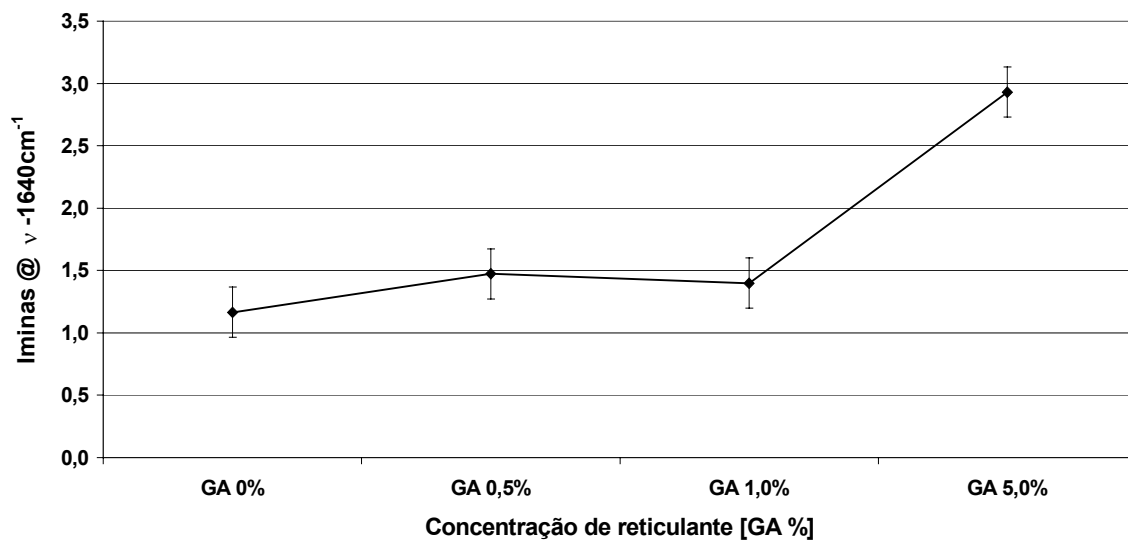
**FIGURA 5.9** Espectros de FTIR dos filmes de Q/P/G(1:0:0) (a); Q/P/G(3:1:0) (b); Q/P/G(1:1:0) (c); Q/P/G(1:3:0) (d) e Q/P/G(0:1:0) (e).

A partir dos espectros normalizados em relação à absorbância associada ao anel glicosídico observa-se que o aumento do teor de GA também causa um aumento na intensidade da frequência de  $1562\text{cm}^{-1}$  associada às ligações etilênicas; e o mesmo comportamento foi observado na frequência de  $2922\text{cm}^{-1}$  relativa ao estiramento dos grupos C-H. Este fato pode ser atribuído ao aumento das contribuições da molécula de GA na reação QUI-GA que promove o aumento na reticulação da cadeia. O aumento da intensidade das bandas relativas à ligação imina também sugere que a reticulação da quitosana pelo GA ocorre preferencialmente via base de Schiff no carbono 2 do anel glicosídico em detrimento da ligação com os grupos hidroxilas nos carbonos 3 e 6, as

FIG. 5.10 e FIG. 5.11 evidenciam essas observações (COSTA JR., 2008; COSTA JR., 2007).



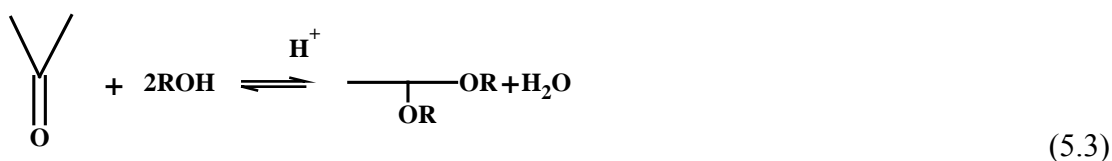
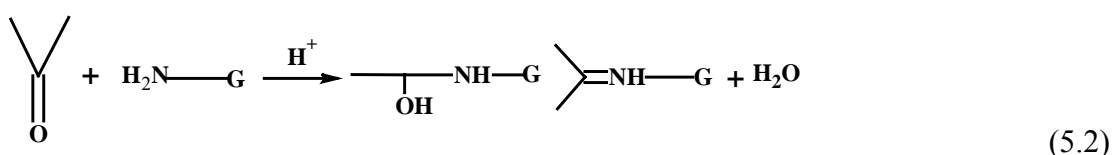
**FIGURA 5.10** Relação das intensidade das bandas da amina e a concentração de GA na quitosana.



**FIGURA 5.11** Relação entre a intensidade das bandas da imina e a concentração de GA na quitosana.

A TAB.5.4 apresenta o excesso de grupos reativos disponíveis por mol de polímero em relação aos grupos aldeídos do glutaraldeído considerando que as ligações entre aldeídos não ocorram e que não ocorra reação entre a Quitosana e o PVA, ou seja, a blenda seja uma rede interpenetrada com cadeias dos dois polímeros.

A reação do glutaraldeído com a amina em pH 4-5 é mais rápida e a energia de ligação da imina formada conforme a Eq.5.2 é de 615,5kJ e a ponte acetal formada conforme a Eq.5.3 tem grande reversibilidade em meio ácido e a energia de ligação entre o carbono e o oxigênio é de 358,0kJ, isso sugere que, no caso das blendas, a reação de reticulação entre a amina e o aldeído tem preferência e maior estabilidade nesse sistema (COSTA JR., 2008; PRASHANTH, 2007; SOLOMONS, 2006; <http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/bndenrgy.htm> acesso em 21/10/008).



**TABELA 5.4** – Excesso de grupos reativos por mol

Razão Qui/PVA	1% de GA	5% de GA
(0:1)	363,6	72,7
(1:3)	290,3	58,1
(1:1)	217,0	43,4
(3:1)	143,7	28,7
(1:0)	70,5	14,1

A FIG. 5.12 apresenta as formas de reticulação da Quitosana e PVA com a formação das ligações imina (a) a partir da base de Schiff e ponte acetal (b) obtida a partir da ligação C=O do aldeído com grupo OH do álcool.

A FIG. 5.13 apresenta o espectro típico de FTIR relativo às blendas nas proporções de 25% de quitosana e de 75% PVA (em massa de polímero) onde se observa os picos das bandas de  $1110\text{cm}^{-1}$ ,  $1650\text{cm}^{-1}$  e  $1638\text{cm}^{-1}$  associadas respectivamente à reticulação do PVA e à formação do grupo imina a partir da amina da quitosana (WANG, 2004; RAO, 2006) durante a reticulação pelo GA. A reação do PVA com o GA resulta em alterações

significativas nas bandas relativas ao O-H, normalmente associadas à formação de ponte acetal (MANSUR, 2007).

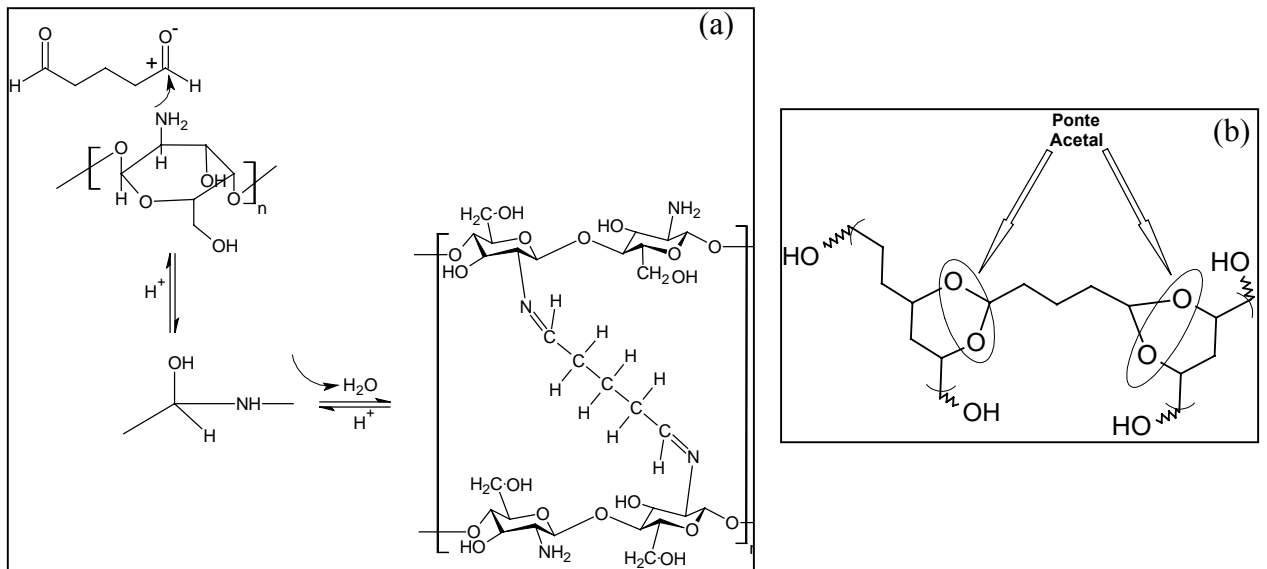


FIGURA 5.12 Reticulação da Quitosana (a) e PVA(b)

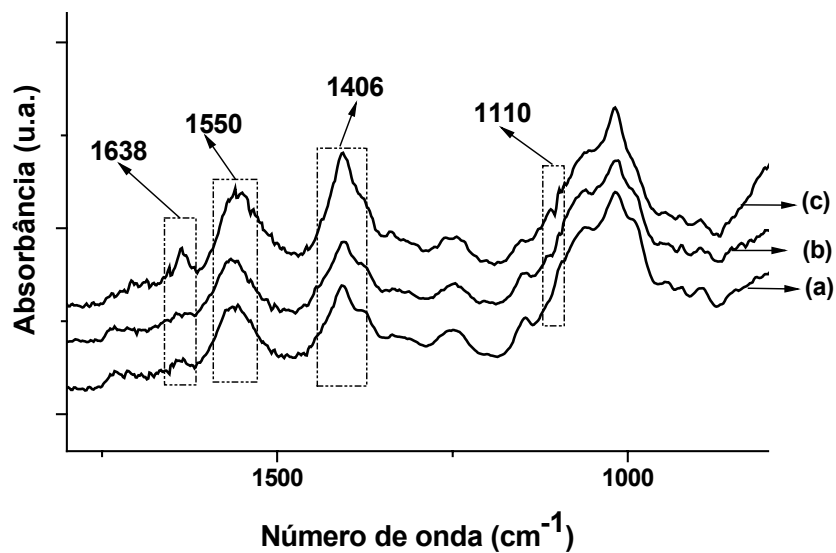
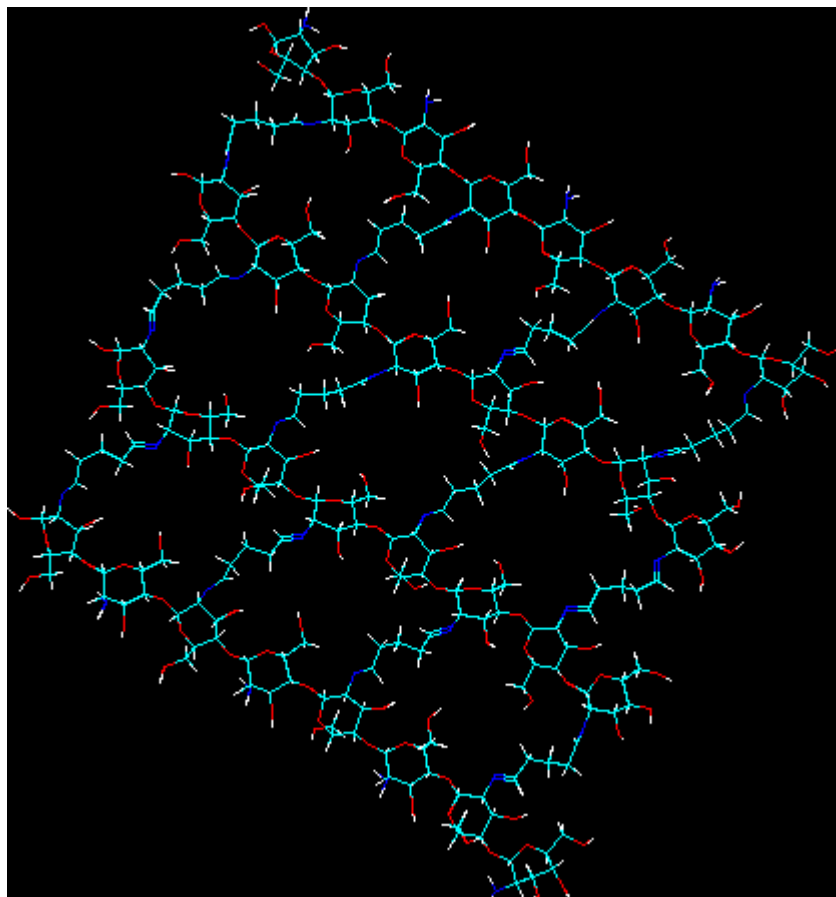


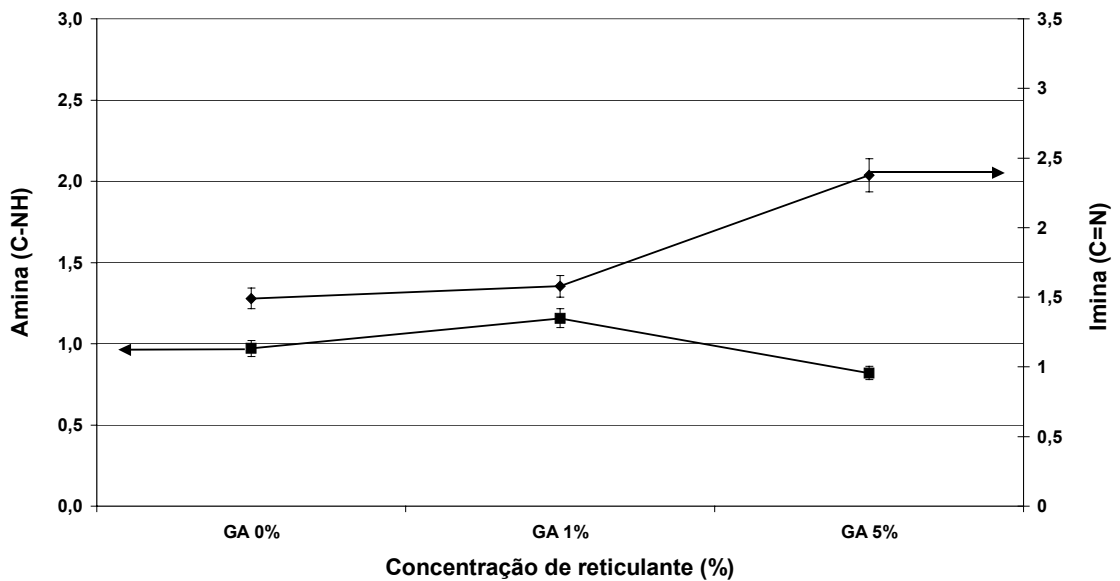
FIGURA 5.13 Espectro de FTIR das blendas de Q/P/G(1:3:0)(a), Q/P/G(1:3:1) (b) e Q/P/G(1:3:5) (c).

Na FIG. 5.14 observa-se a estrutura da quitosana tridimensional *in silico* reticulada com glutaraldeído.

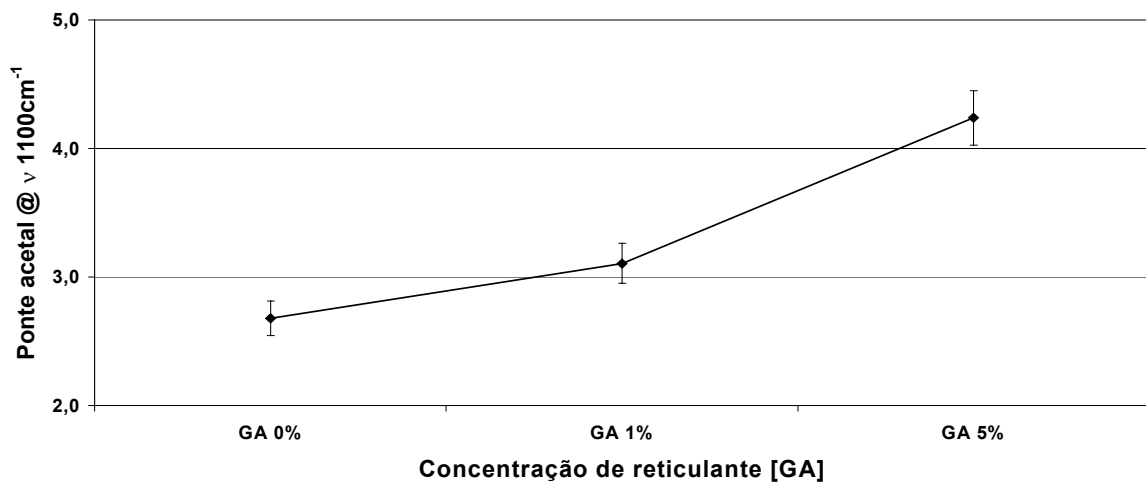


**FIGURA 5.14** Imagem 3D das fibras de quitosana reticuladas com Glutaraldeído

A FIG. 5.15 e a FIG. 5.16 apresentam a evolução da formação de iminas com a redução das aminas devido a reticulação da quitosana pelo GA, onde as absorbâncias foram normalizadas para a banda de  $3276\text{cm}^{-1}$  associada ao grupo C-H, e a evolução da banda de  $1100\text{cm}^{-1}$  devido reticulação do PVA formando pontes acetais entre o PVA e o GA. Observa-se claramente que com o aumento do agente reticulante ocorre o aumento de intensidade da banda relativa a imina com proporcional redução da banda associada ao grupo amina e o aumento da intensidade da banda de  $1100\text{cm}^{-1}$  associada a formação das pontes acetais com o PVA.



**FIGURA 5.15** Evolução das bandas de formação de Imina (C=N) e redução de Amina (NH<sub>2</sub>), durante a reticulação da quitosana pelo GA na blenda Q/P(1:3).

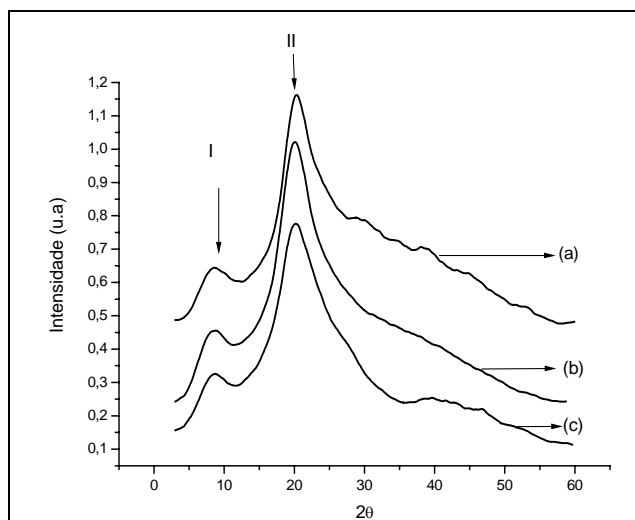


**FIGURA 5.16** Evolução da banda de 1110cm<sup>-1</sup> durante a reticulação do PVA

#### 5.2.4 DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

A cristalinidade apresentada pelo filme de Quitosana puro e com 1% e 5% de agente reticulante foi avaliada a partir do difratograma pela relação entre a área sobre o pico e a área total sobre a curva. O valor encontrado para a cristalinidade dos filmes variou de

18% a 23% que constitui uma diferença pouco significativa na influência sobre a ordenação cristalina no filme. Isso sugere que ligações podem estar ocorrendo nas regiões amorfas. O efeito da variação é observado no difratograma da FIG. 5.17.



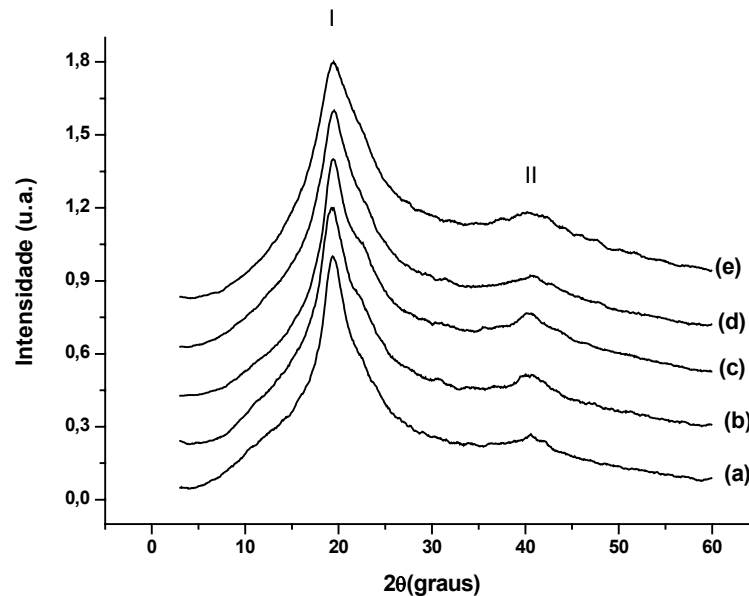
**FIGURA 5.17** Difratograma da quitosana pura e com [GA] de 1,0% e 5,0%, (a), (b) e (c), respectivamente.

Segundo a literatura os halos em torno de  $10,4^\circ$  (0,844nm),  $15^\circ$  (0,583nm),  $19,8^\circ$  (0,44nm), e  $26,3^\circ$  (0,338nm) e considerando a célula unitária proposta por OGAWA (2004) podemos associar às reflexões aos planos (0 2 0); (1 2 0); (2 0 0) e (2 0 2), respectivamente (BEPPU, 2007; OGAWA, 2004; OKUYAMA, 1999; OGAWA, 1991).

Em amostras tratadas termicamente observa-se o desaparecimento das reflexões do ângulo de  $10^\circ$  associadas ao plano (0 2 0) e o aumento da intensidade das reflexões em torno do ângulo de  $15^\circ$  associadas ao plano (1 2 0) (OGAWA, 1991). No nosso estudo a reticulação da quitosana pelo glutaraldeído induz a atenuação do pico que dependem exatamente da quantidade de água (0 2 0). Observa-se também que o GA também induz ao incremento do halo em torno de  $19,8^\circ$  associado ao planos (2 0 0) evidenciando alterações nas espécies que são responsáveis pelas ligações de água semelhante ao observado por BEPPU (2007).

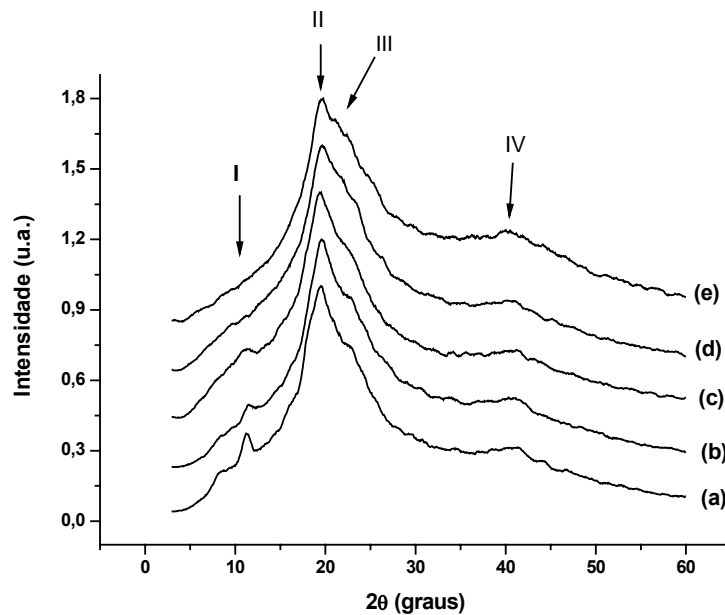
Já nos filmes de PVA observa-se pelo difratograma (FIG. 5.18) uma ligeira alteração no ombro relativo às reflexões do plano (2 0 0) e o alargamento das reflexões evidenciando

o pequena variação da região amorfa com o aumento do teor de reticulante presente no filme, entretanto os valores de cristalinidade variam de 23% a 23,8%, ou seja o agente reticulante exerce pouca influência na organização cristalina do PVA.



**FIGURA 5.18** – Difratograma dos Filme PVA – (a) Q/P/G(0:1:0); (b) Q/P/G(0:1:0,5); (c) Q/P/G(0:1:1); (d) Q/P/G(0:1:3); (e) Q/P/G(0:1:5)

No caso das blendas observa-se que a adição de GA promove relativa diminuição da região cristalina e alterações na regiões (I), (II), (III) e (IV) evidenciadas no difratograma da FIG. 5.19. Na região (I) associada ao halo relativo às ligações de água da quitosana apresentam uma redução com o aumento do teor de GA desaparecendo a partir da blenda com 3% de glutaraldeído. As regiões (II), (III) e (IV), onde se sobrepõem os halos principais tanto da quitosana quanto do PVA, apresentam um alargamento indicando o aumento da região amorfa da blenda. Como observado nos filmes de quitosana e PVA separadamente o agente reticulante parece não oferecer grandes alterações no arranjo cristalino da blenda pois o grau de cristalinidade variou de 22,2% a 24,5%, o que não caracteriza uma alteração significativa e sugere que as ligações de reticulação estejam ocorrendo principalmente na região amorfa do material.



**FIGURA 5.19** – Difratograma de filmes da Blenda de quitosana /PVA, (a) Q/P/G(1:3:0); (b) Q/P/G(1:3:0,5); (c) Q/P/G(1:3:1); (d) Q/P/G(1:3:3);(e) Q/P/G(1:3:5)

### 5.2.5 PROPRIEDADES MECÂNICAS

Todas as amostras foram preparadas com espessura média de  $(213\mu\text{m} \pm 106\mu\text{m})$  para assegurar uma seção transversal isenta de defeitos, a partir da mistura das soluções de quitosana e PVA nas proporções evidenciadas pela TAB. 1 e secas por evaporação do solvente após o ajuste do pH das soluções para  $(4,00 \pm 0,05)$ . A TAB. 5.5 apresenta os valores médios dos resultados obtidos nos ensaios de resistência mecânica a tração ( $n>4$ ).

A FIG. 5.20 apresenta um gráfico típico de um ensaio de tração do PVA GH=80%. O módulo de Elasticidade é estimado a partir inclinação da parte linear do gráfico e a deformação específica ( $DE$ ) corresponde a razão da variação de comprimento ( $\Delta\ell$ ) pelo comprimento inicial ( $\ell_0$ ) em porcentagem. A tenacidade corresponde à área sobre a curva até o colapso do corpo de prova (CDP).

**TABELA 5.5** – Valores de Tensão de tração, Deformação Específica, Módulo de Elasticidade e Tenacidade com Respetivos Desvios Padrão. (n>4)

Tensão de tração e desvio padrão (MPa)										
[GA]	Q/P(0:1)		Q/P(1:3)		Q/P(1:1)		Q/P(3:1)		Q/P(1:0)	
	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.
0	20,0	2,9	18,0	1,6	17,3	3,7	25,3	5,1	49,6	9,5
1	17,1	2,2	13,3	2,6	12,2	3,0	21,8	4,4	33,9	2,2
5	18,4	1,9	10,1	1,5	12,7	2,4	17,0	4,7	28,0	2,4

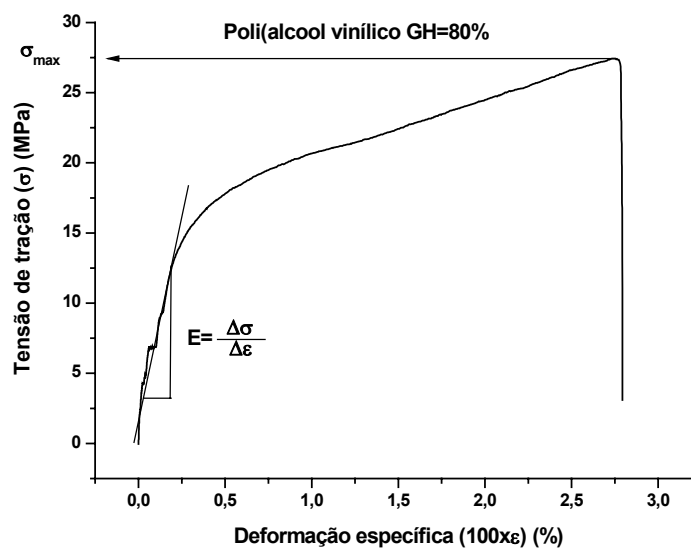
Deformação e desvio padrão (%)										
[GA]	Q/P(0:1)		Q/P(1:3)		Q/P(1:1)		Q/P(3:1)		Q/P(1:0)	
	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.
0	248	29	107	7	100	8	83	9	45	5
1	269	28	30	7	48	12	17	3	34	8
5	254	19	30	9	36	9	6	3	17	7

Tenacidade e desvio padrão (MJ/m <sup>3</sup> )										
[GA]	Q/P(0:1)		Q/P(1:3)		Q/P(1:1)		Q/P(3:1)		Q/P(1:0)	
	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.
0	34,2	7,2	14,8	6,9	8,9	3,1	14,0	4,1	16,8	3,0
1	30,5	5,4	2,9	1,2	2,4	1,7	1,6	1,3	8,4	3,8
5	27,4	4,3	1,9	0,7	3,4	1,3	1,4	1,3	3,8	1,7

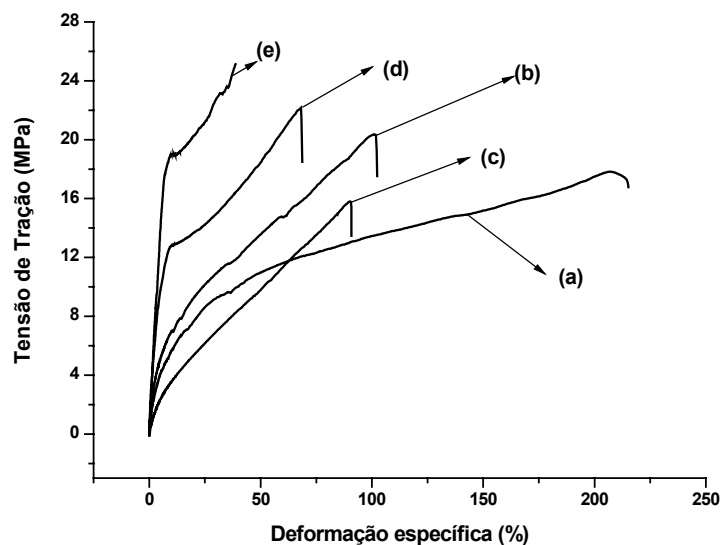
Módulo de elasticidade e desvio padrão (MPa)										
[GA]	Q/P(0:1)		Q/P(1:3)		Q/P(1:1)		Q/P(3:1)		Q/P(1:0)	
	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.	média	d.p.
0	74	15	118	56	96	28	441	131	829	357
1	75	17	149	15	75	10	634	215	1024	110
5	92	17	111	10	210	60	926	177	913	238

**FIGURA 5.20** Gráfico Típico de Tensão de tração X Deformação específica do PVA GH=80%

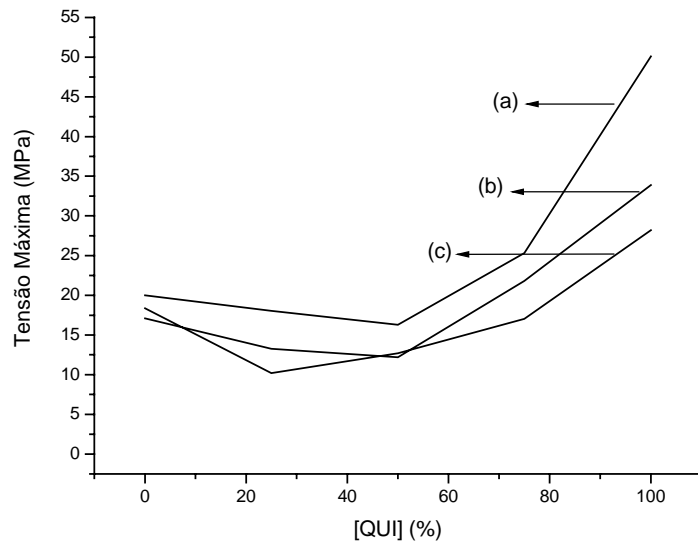
A FIG. 5.21 apresenta os gráficos de tração com as curvas de Q/P/G(0:1:0) (a), Q/P/G(1:3:0) (b), Q/P/G(1:1:0) (c), Q/P/G(3:1:0)(d) e Q/P/G(1:0:0) (e). Observa-se que as blendas apresentam propriedades mecânicas intermediárias entre os componentes puros.

O comportamento apresentado pelas blendas das curvas (b) e (c) onde se observa um desvio da idealidade, sugere uma transição dúctil-frágil provavelmente induzido pelo método de secagem dos filmes. Analisando o polimorfismo e a cristalinidade da quitosana OGAWA et al. (1992) observa que em menor peso molecular formam-se filmes contínuos, entretanto muito frágeis.

A FIG. 5.22 evidencia que o aumento do teor de quitosana nas blendas até a proporção de 50% para qualquer proporção de reticulante reduz a tensão máxima do filme e a partir do teor de 50% o aumento da razão de quitosana na mistura implica no aumento da tensão máxima de tração. Estudando blendas QUI/PEO apenas nas razões de 50/50 até 100/0 ZIVANOVIC (2007) também observou que o aumento de quitosana nas misturas aumentava a tensão tração.



**FIGURA 5.21** Gráfico de Tensão x Deformação apresentando as curvas dos filmes das blendas Q/P/G(0:1:0) (a), Q/P/G(1:3:0) (b), Q/P/G(1:1:0) (c), Q/P/G(3:1:0) (d) e Q/P/G(1:0:0) (e)



**FIGURA 5.22** Influência da concentração de quitosana na tensão máxima de tração. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c).

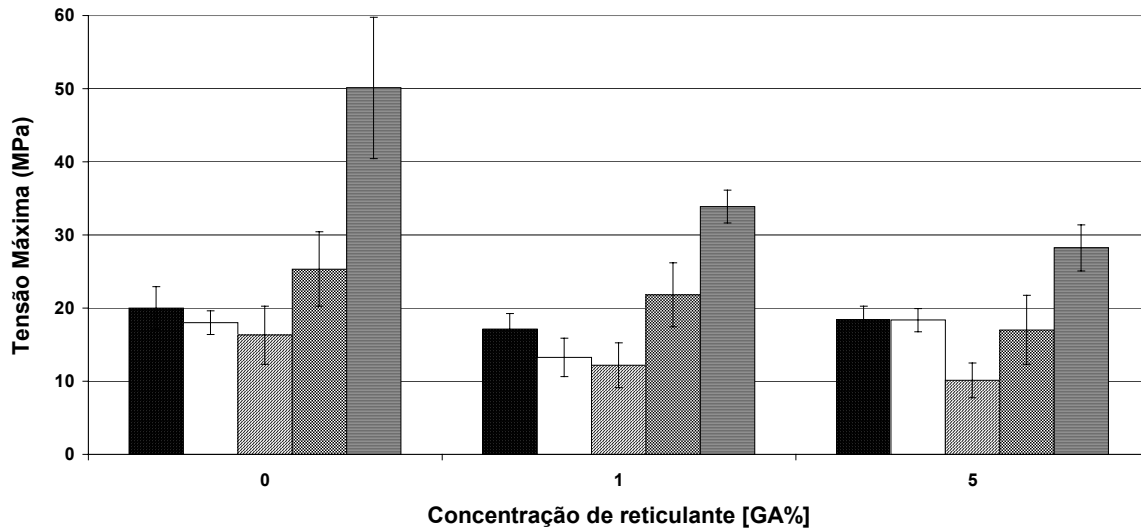
Os filmes de quitosana apresentaram valores de 50MPa e 45% para resistência máxima a tração e deformação específica, respectivamente. O resultado de tensão tração é mais elevado do que o publicado por CHEN (1996) que obteve resistência à tração de 23MPa. A diferença é atribuída aos detalhes de processamento durante a preparação do hidrogel, tais como, pH e temperatura de secagem que no nosso trabalho foi, respectivamente, de  $\text{pH}=(4,00\pm 0,05)$  e secagem a temperatura ambiente, enquanto com CHEN foi  $\text{pH}=4,5$  e temperatura de secagem de  $50^{\circ}\text{C}$ . Além do mais, o tempo de formação de sua membrana foi mais curto do que o usado no presente trabalho. Maior tempo de formação do filme tende a favorecer ao rearranjo molecular, como ocorre durante o processo de secagem, resultando na formação de uma estrutura mais ordenada que aumenta a cristalinidade e conseqüentemente a tensão máxima.

Assim, é importante apontar que alguns parâmetros de processamento como por exemplo, o grau de desacetilação da quitosana, o pH da solução, o perfil de secagem do solvente, o uso de plasticizante e o procedimento de mistura podem em conjunto influenciar todas as propriedades mecânicas como relatado na literatura onde os resultados de resistência a tração e deformação específica variam de 1,4 a 57,2MPa e de 3,5 a 115%, respectivamente (ARVANITOYANNIS, 1997; RAO et al. 2007; BAHRAMI et al. 2003; LIU et al. 2005; CHEN, 1996). Em resumo, no que diz respeito

às propriedades mecânicas os resultados obtidos para as blendas de QUI/PVA nesta pesquisa são convenientes para aplicação potencial como substituto de pele que tem valores típicos de tensão de tração na faixa de 2.5–16MPa (XU et al. 2008; CERVERA et al. 2004; BAHRAMI et al. 2003)

Na FIG. 5.23, exceto para a blenda de Q/P(1:3) onde, significativamente o aumento de [GA] (0, 1 e 5%) não altera o valor da tensão máxima, como observado também no PVA puro; todas as demais blendas inclusive a quitosana pura sofreram uma redução na tensão máxima. A inclusão do reticulante GA reduziu a tensão máxima das misturas contrariamente ao observado por BAHRAMI (2003) e ROKHADE (2007). Já SILVA (2004), analisando o efeito da reticulação da quitosana com o GA em amostras imersas em solução salina isotônica (NaCl 0,145M e pH=(7,4±0,02)), simulando condições com fluido corporal, à temperatura ambiente e a 37°C, observou que o módulo de tração diminui quando pequenas quantidades de GA são usadas como reticulante e que o mesmo aumenta para concentrações de GA acima de 10%, sugerindo ainda que a resistência mínima obtida para 1% de GA pode estar relacionada com o alto grau de hidratação alcançado pela amostra durante o ensaio de tração. Relata também que resultados similares foram obtidos para amostras ensaiadas na condição de ambiente seco. Além disso, BERGER e colaboradores (2004b) analisando hidrogéis de quitosana reticulados covalentemente, notou que a reação de reticulação pode induzir mudanças conformacionais da quitosana como observado por NMR quando reticulada com 1,1,3,3, tetrametoxipropano e GA.

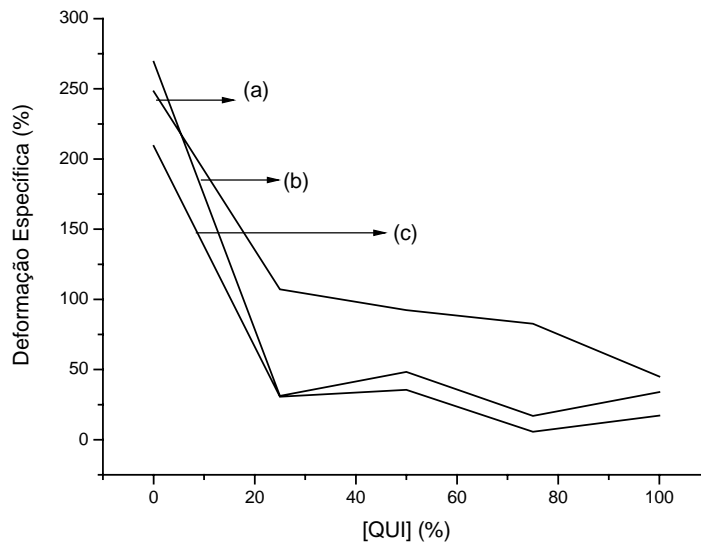
Nesse caso com a proporção de GA utilizado ocorre o aparecimento de tensões internas na estrutura das blendas tornando-as mais frágeis. Entretanto apesar da desordem cristalina provocada pela reticulação química, conforme evidenciado pelo ensaio de DRX, a redução na tensão máxima não é tão significativa devido ao aumento do número de ligações covalentes (C=N) evidenciados pelo FTIR.



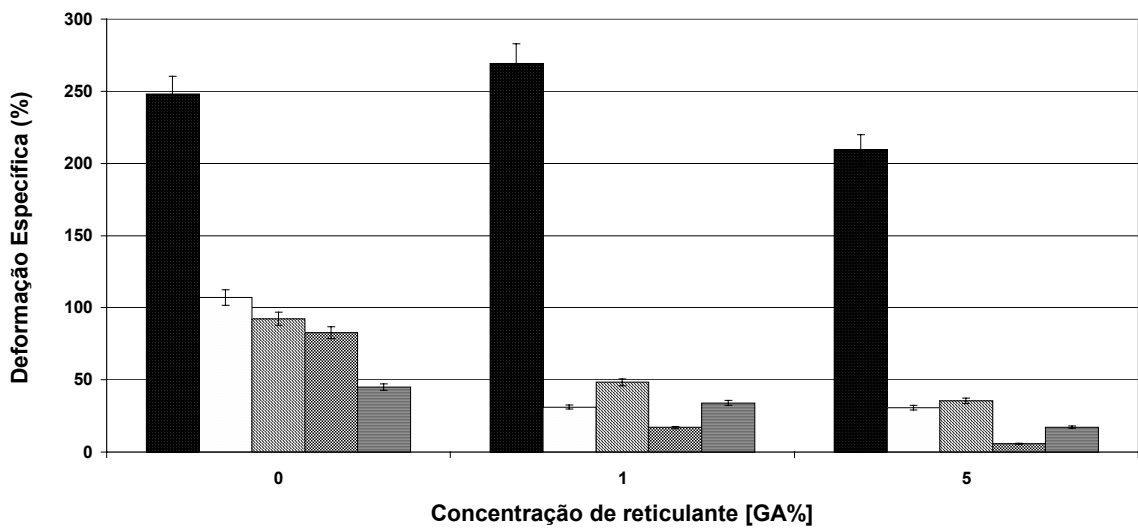
**FIGURA 5.23** Influência da concentração de GA na tensão máxima de tração. PVA (■), Q/P(1:3) (□), Q/P(1:1) (▨), Q/P(3:1) (▣), QUI (▤).

A FIG. 5.24 apresenta a relação entre a concentração de quitosana e a deformação específica e a FIG. 5.25 a relação entre a concentração de GA e a deformação específica. Observa-se a redução da deformação tanto com o aumento do teor de quitosana quanto com o aumento da concentração de reticulante, ou seja, a blenda se torna mais frágil. O PVA puro e o reticulado com [GA] de 5% apresentam deformação específica menor que o reticulado com [GA] de 1,0%. Todas as blendas e a quitosana pura apresentaram uma diminuição relativa de deformação específica com o aumento de [GA].

Como o pH utilizado para obtenção dos filmes foi  $(4,00 \pm 0,05)$ , podemos supor que a disponibilidade dos grupos amino da quitosana para reagirem com os aldeídos do GA é grande, favorecendo a um grau acentuado de reticulação e, conseqüentemente, deformando a estrutura interna aumentando as tensões no reticulado e a fragilização dos filmes (VACHOUD, 2001).

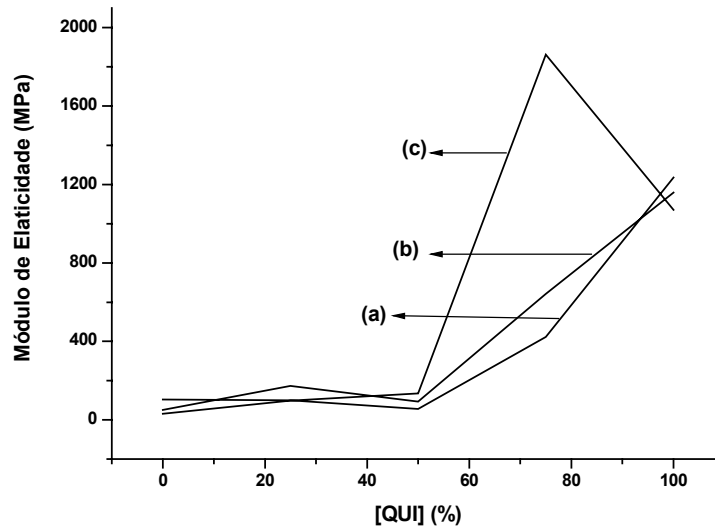


**FIGURA 5.24** Influência da concentração de quitosana na deformação específica das blendas. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c).

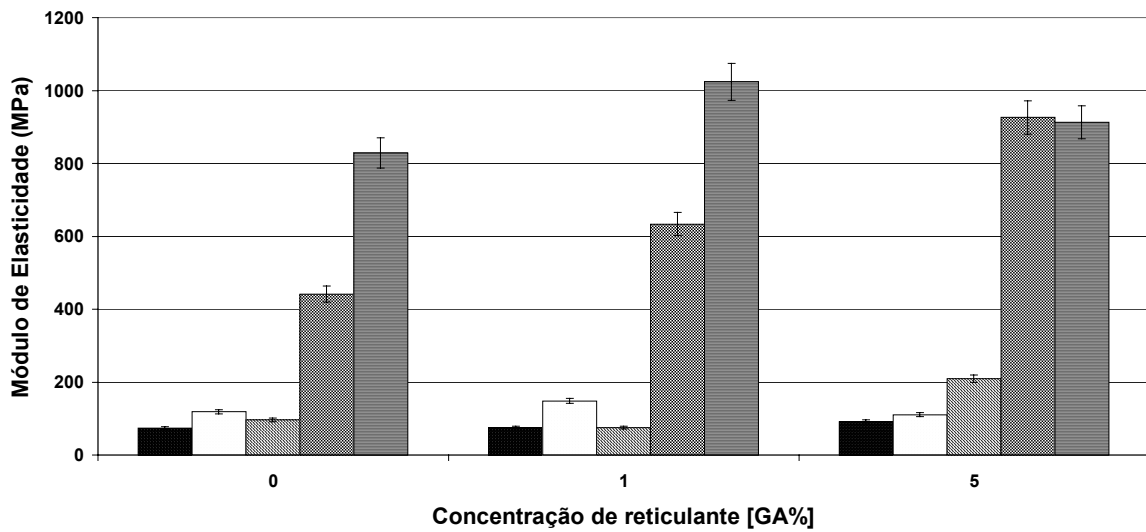


**FIGURA 5.25** Influência da concentração de GA na deformação específica das blendas. PVA ■, Q/P(1:3) □, Q/P(1:1) ▨, Q/P(3:1) ▩, QUI ▤

As FIG.5.26 e FIG. 5.27 apresentam a relação entre o Módulo de Elasticidade e a concentração de quitosana e a concentração de GA das blendas, respectivamente, onde se observa que o aumento do teor de quitosana na mistura aumenta o módulo de elasticidade da mesma, caracterizando um aumento na fragilidade, pois para uma mesma tensão a deformação diminui sensivelmente. Nesse aspecto nota-se ainda que o reticulante aumenta ainda mais o módulo acentuando a fragilidade.



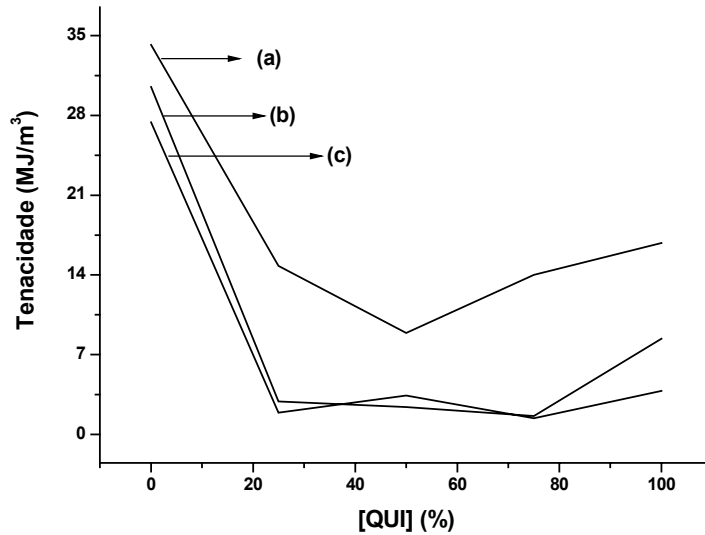
**FIGURA 5.26** Influência da concentração de quitosana no Módulo de Elasticidade das blendas. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c).



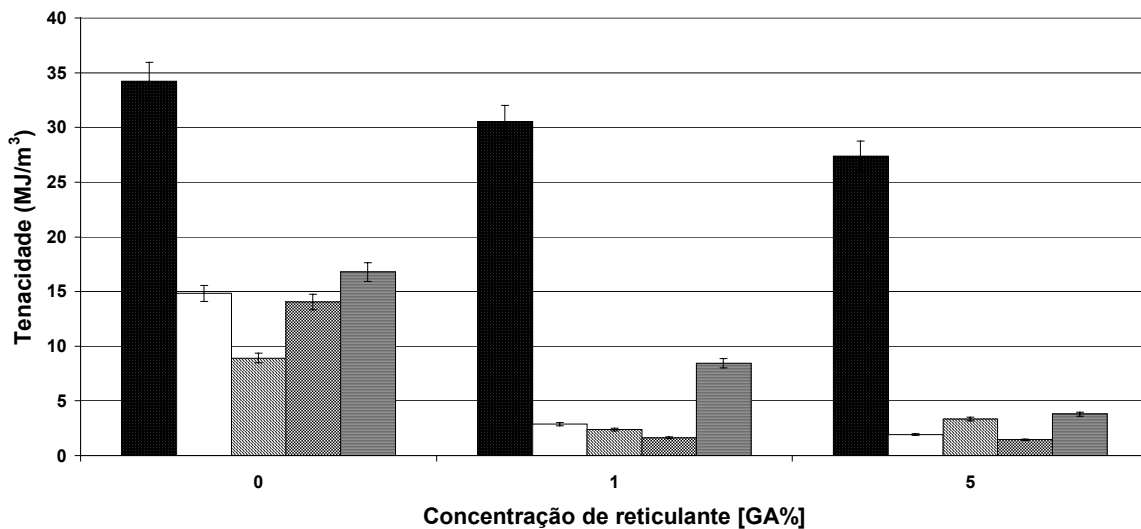
**FIGURA 5.27** Influência da concentração de GA no Módulo de Elasticidade das blendas. PVA ■, Q/P(1:3) □, Q/P(1:1) ▨, Q/P(3:1) ▩, QUI ▤.

Para o PVA puro ocorre uma redução no módulo de elasticidade com o aumento da [GA] embora a deformação específica se mantenha entre 250% e 275%. Nas blendas e a quitosana pura apresentaram uma variação máxima no módulo de Elasticidade para a [GA] de 1,0% sofrendo, praticamente, um retorno ao valor inicial na concentração de 5,0% de GA.

As FIG.5.28 e FIG. 5.29 apresentam a tenacidade (área sob a curva Tensão X Deformação até a fratura) observada nas blendas de QUI/PVA, bem como da QUI e PVA puros, em relação à variação do teor de quitosana e de GA, respectivamente.



**FIGURA 5.28** Influência da concentração de quitosana na Tenacidade das blendas. Sem GA(a), 1% de GA(b) e 5% de GA(c).



**FIGURA 5.29** Influência da concentração de GA na Tenacidade das blendas. PVA ■ , Q/P(1:3) □ , Q/P(1:1) ▨ , Q/P(3:1) ▩ , QUI ≡

Observa-se que a tenacidade apresenta uma redução com o aumento do teor de quitosana até 40% e, a partir daí até 100%, uma relativa recuperação. A reticulação com

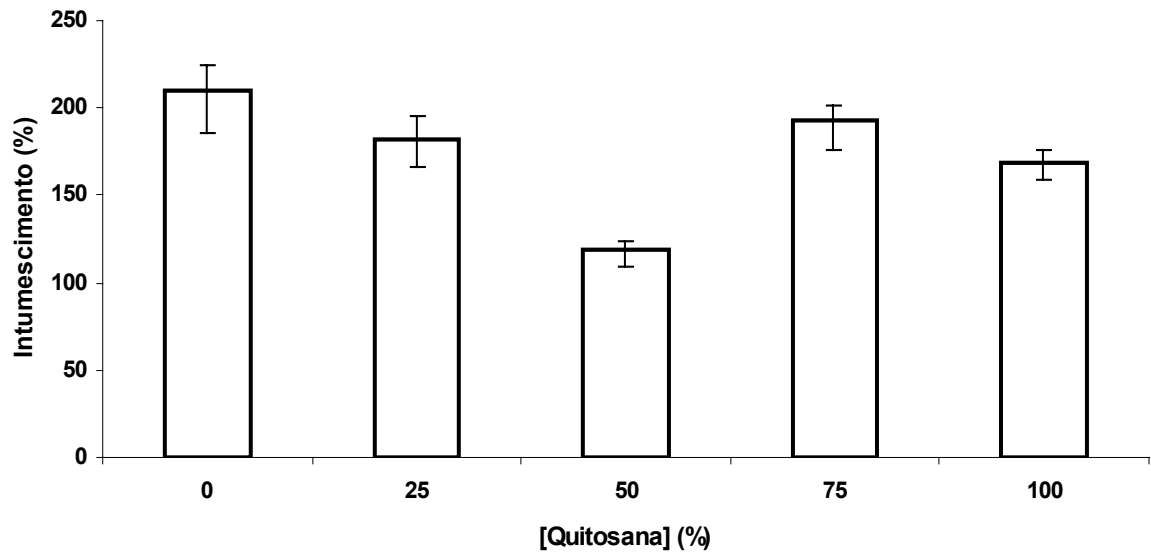
o GA também reduz a tenacidade acentuadamente nas blendas e quitosana pura, entretanto para o PVA puro essa redução não se apresenta tão significativa.

### 5.2.6 GRAU DE INTUMESCIMENTO

Os experimentos de intumescimento conduzidos nas blendas de quitosana/PVA com diferentes razões e graus de reticulação química apresentaram um padrão inicialmente rápido de absorção de massa usualmente em aproximadamente 30 minutos, seguido pela estabilização de massa num período superior a 192h. Ao exame visual as amostras também apresentaram apreciável aumento de volume. Os resultados revelaram forte influência de ligações cruzadas sobre o volume de fluido absorvido, de aproximadamente 700% para blenda sem reticulação reduzindo para 400% e 200% com 1% e 5% de agente reticulante, respectivamente. Tal fato é atribuído a maior rigidez da rede formada pelas reações ocorridas inter e intracadeias, reduzindo a flexibilidade e o número de grupos hidrofílicos do hidrogel o que é desfavorável à taxa de intumescimento. Estes resultados correspondem aos mecanismos do hidrogel. Antes da reação com o GA, as cadeias de PVA consistem de um emaranhado físico com as cadeias de quitosana formando uma rede. Na seqüência, quando o teor de GA aumenta, ocorre a reticulação química a partir das ligações covalentes entre cadeias, fixando e reduzindo a mobilidade do polímero que resulta em menor taxa de intumescimento, no caso, menos da metade da blenda sem reticulação química.

O efeito da razão quitosana/PVA também foi analisado e um resultado característico relativo a 5% de teor de agente reticulante por um período de 4h de imersão em SBF é apresentado na FIG. 5.30.

Verificou-se que o comportamento de intumescimento é influenciado pelo teor de quitosana na blenda onde a massa intumescida reduz com o aumento do teor de quitosana atingindo seu valor mínimo relativo ao valor de  $[QUI/PVA] = 50:50$ . O grau de intumescimento reduz de 200% (PVA puro) para 100% e então aumenta para aproximadamente 140% para blenda de  $[QUI/PVA] = 75:25$  e quitosana pura.

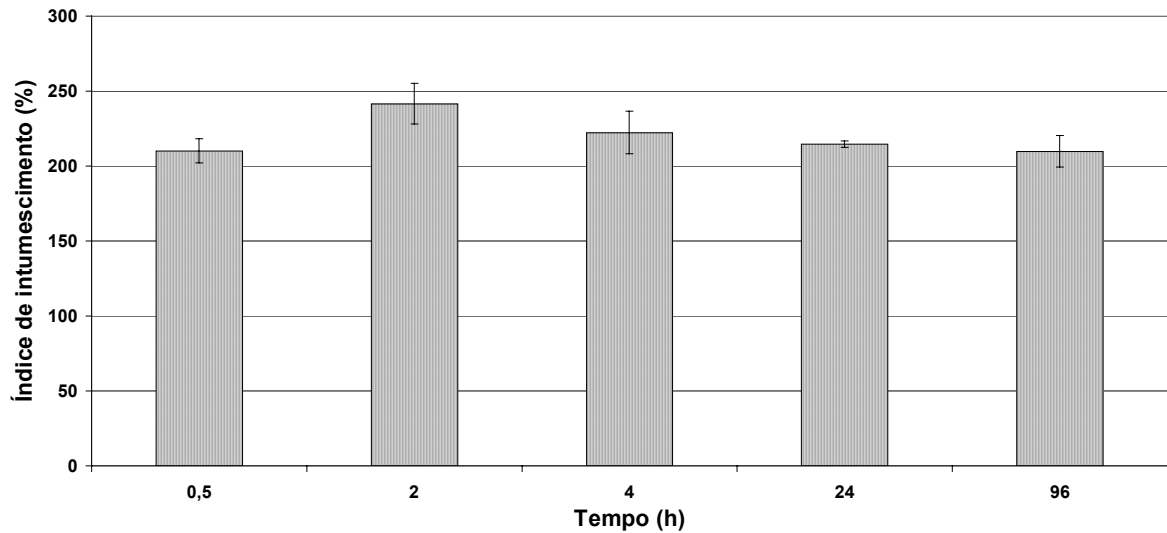


**FIGURA 5.30** Efeito do teor de quitosana nas blendas com 5% de GA em 4h de imersão em SBF.

Estes resultados têm suporte pelo entendimento da reação de reticulação que ocorreu nas blendas de hidrogel, onde os grupos amina da quitosana são mais reativos com o glutaraldeído que os grupos hidroxila do PVA. O valor mínimo apresentado pela blenda de 50:50 está provavelmente relacionado, sobretudo, ao balanço entre a reticulação das aminas e hidroxilas que é causado pela formação de uma estrutura mais rígida entre as cadeias de PVA e quitosana reduzindo drasticamente a possibilidade de absorção da solução. Apesar da presente pesquisa ser diferente de outros estudos da quitosana, tendência semelhante relativa ao comportamento de intumescimento do PVA e quitosana suportam estas observações, onde PVA tem grau de intumescimento de 500% e a quitosana de 200% dependendo é claro da solução do meio, pH, temperatura e assim por diante (ZHANG et al., 2007; WANG et al., 2004; GUPTA et al., 2006; CLAPER et al. 2007; BERGER et al., 2004a,b).

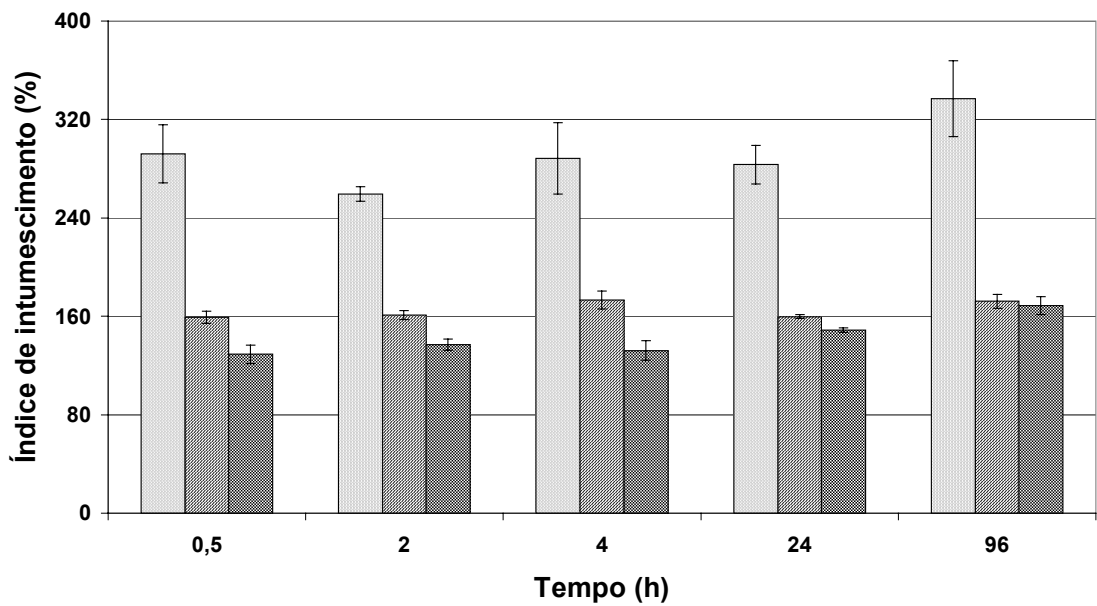
As amostras de PVA com grau de hidrólise de 80%, sem reticulação e com 1% de agente reticulante (GA), apresentaram dissolução completa em menos de 30 minutos no SBF a  $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ . Todas as avaliações foram tratadas estatisticamente com um nível de significância de 1%.

Na FIG. 5.31 tem-se o comportamento de intumescimento correspondente ao PVA com 5% de grau de reticulação. Observa-se que devido à rigidez da cadeia polimérica na conformação 3D, função da reticulação pelo glutaraldeído, praticamente não apresenta variação no limite estatístico do grau de intumescimento com o tempo.



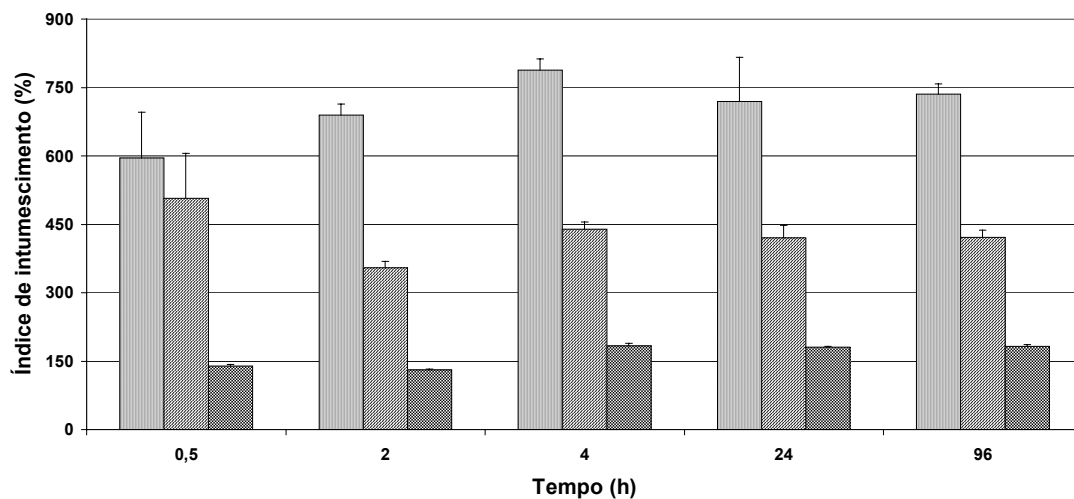
**FIGURA 5.31** Intumescimento em SBF pelo PVA com 5% de GA.

A FIG. 5.32 apresenta comportamento de intumescimento em SBF pela quitosana sem adição de agente reticulante, e com a adição de 1% e 5% em massa. Quanto maior o grau de reticulação menor o índice de intumescimento experimentado pela quitosana também devido a maior rigidez das cadeias poliméricas (BERGER, et al., 2004b; WANG, 2004).



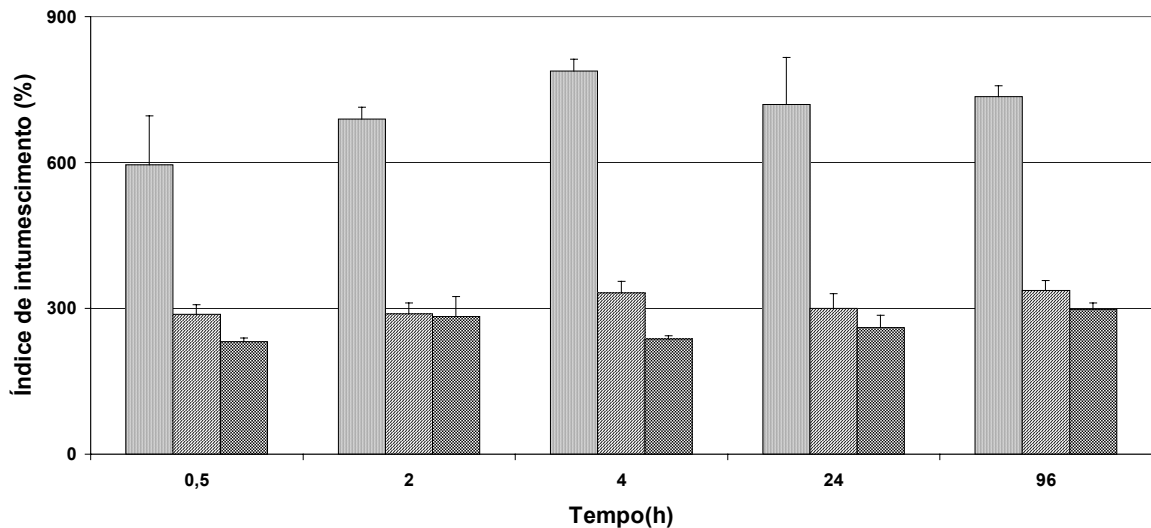
**FIGURA 5.32** Intumescimento em SBF pela quitosana sem reticulação ( ) e reticulada com 1% ( ) e 5% ( ) de GA.

Com relação às blendas em geral a FIG. 5.33 resume, como exemplo, o comportamento de intumescimento em SBF da blenda Q/P(1:3), sem adição de agente reticulante, e com a adição de 1% e 5% em massa.



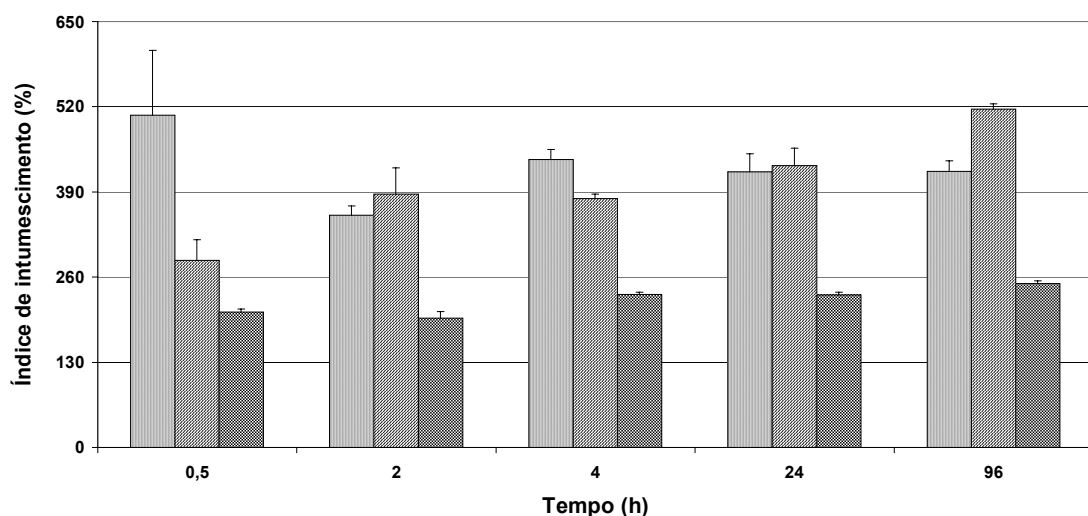
**FIGURA 5.33** - Intumescimento em SBF pela blenda Q/P(1:3) sem reticulação ( ) e reticulada com 1% ( ) e 5% ( ) de GA

A FIG. 5.34 apresenta o gráfico que resume o intumescimento em SBF pelas blendas Q/P(1:3), Q/P(1:1) e Q/P(3:1), sem adição de agente reticulante. Observa-se que para o aumento do teor de quitosana na blenda diminui o intumescimento.



**FIGURA 5.34** Intumescimento em SBF pelas blendas Q/P(1:3) (▨), Q/P(1:1) (▩), Q/P(3:1) (▧) sem reticulação

A FIG. 5.35 apresenta o gráfico de intumescimento em SBF pelas blendas Q/P(1:3), Q/P(1:1) e Q/P(3:1), com a adição de 1% de reticulante GA em massa. Observa-se que para esse teor de reticulante o aumento do teor de quitosana diminui o intumescimento.

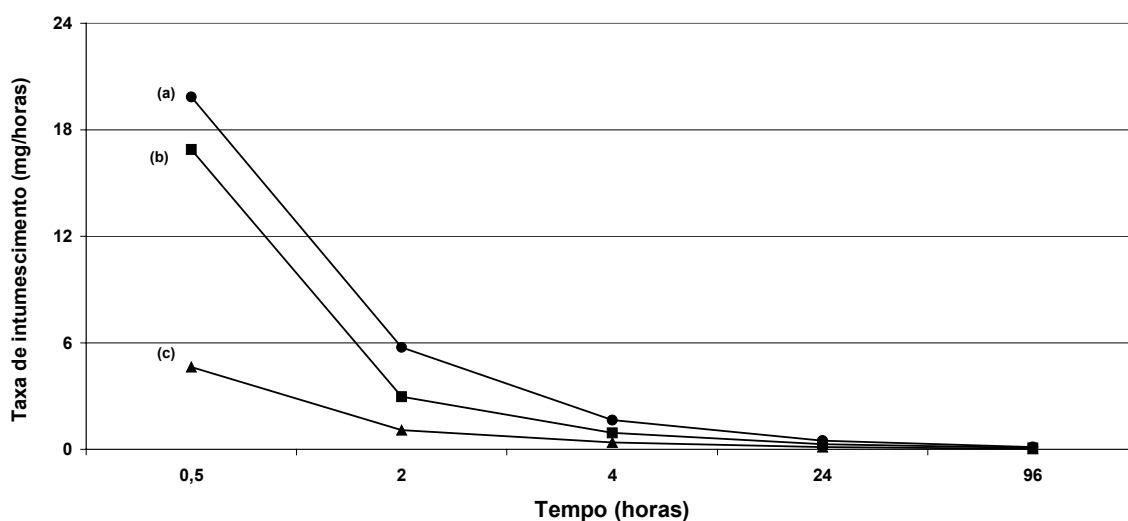


**FIGURA 5.35** Intumescimento em SBF pelas blendas Q/P(1:3) (▨), Q/P(1:1) (▩), Q/P(3:1) (▧) com 1% de agente reticulante.

A blenda Q/P(1:1) apresentou um ligeiro aumento do grau de intumescimento com o tempo se comparada com a blenda Q/P(1:3) que tem menor teor de quitosana. Esse comportamento pode também estar associado à segregação de fases.

Nas blendas Q/P(1:3), Q/P(1:1) e Q/P(3:1), com a adição de 5% de reticulante GA em massa. Devido, provavelmente, ao alto teor de reticulação do GA, não se observa influência determinante da quitosana no intumescimento em SBF.

Na FIG. 5.36 temos as isotermas de intumescimento para a blenda Q/P(1:3) onde se observa a absorção de fluido pelo filme diminuindo com o tempo. A forma não linear da curva de absorção plotada sobre o tempo apresenta um decaimento de segunda ordem, o qual esta de acordo com os princípios cinéticos de absorção. A redução da absorção com o aumento do teor de GA na blenda, torna claro a formação de uma rede com grande número de ligações cruzadas.



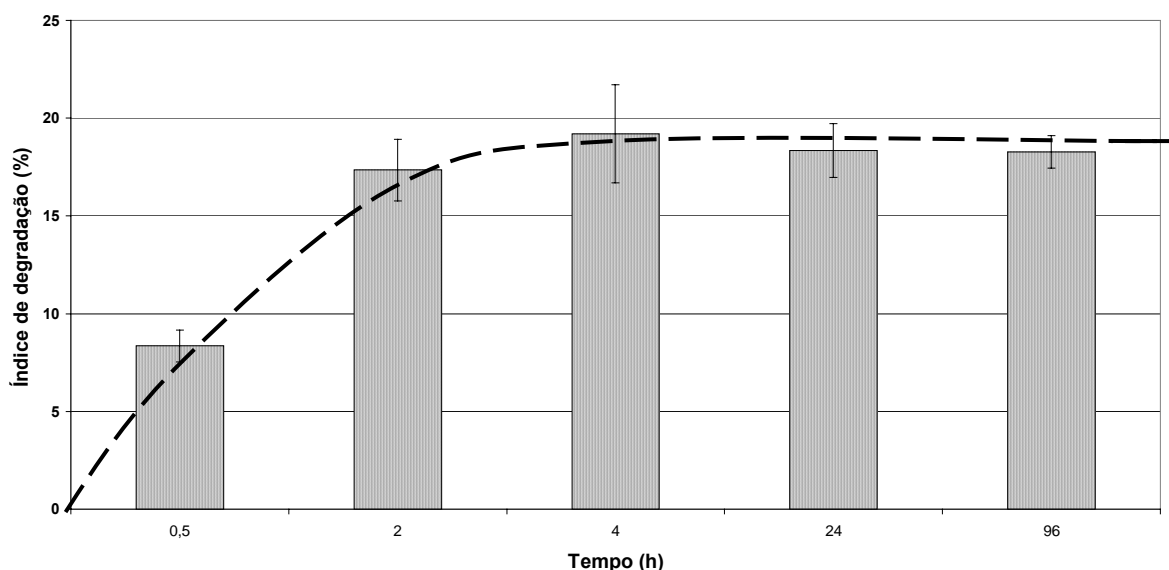
**FIGURA 5.36** Taxa de Intumescimento em SBF da blenda Q/P(1:3) sem reticulação (a) e reticulada com 1%(b) e 5% (c) de GA

### 5.2.7 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO *IN VITRO*

O termo degradação, amplamente usado, é o processo onde a deterioração nas propriedades do polímero toma lugar devido a diferentes fatores como, radiação,

químicos, térmicos, mecânicos, entre outros. Portanto a degradação pode ser o resultado de atividades químicas como solvatação, dessorção, dissociação, hidrólise, dissolução, oxidação, redução e fotólise, bem como, atividades físicas que podem erodir a matriz da blenda polimérica tais como difusão, abrasão, trincas, *peeling*, quebra mecânica, ou qualquer combinação dessas atividades físicas e químicas. Por esta razão, neste estudo, a perda de massa do polímero primeiramente ocorre por dois métodos, solvatação e despolimerização das cadeias. Essa premissa tem suporte nos resultados de FTIR que indicam a preferência de ligações cruzadas via  $\text{NH}_2$  (quitosana) em detrimento das hidroxilas (PVA), portanto é esperada uma mistura na cinética de degradação para as blendas, pois o PVA que se encontra fisicamente reticulado sofre rápida solvatação e a quitosana/PVA reticulados covalentemente têm degradação mais lenta via despolimerização.

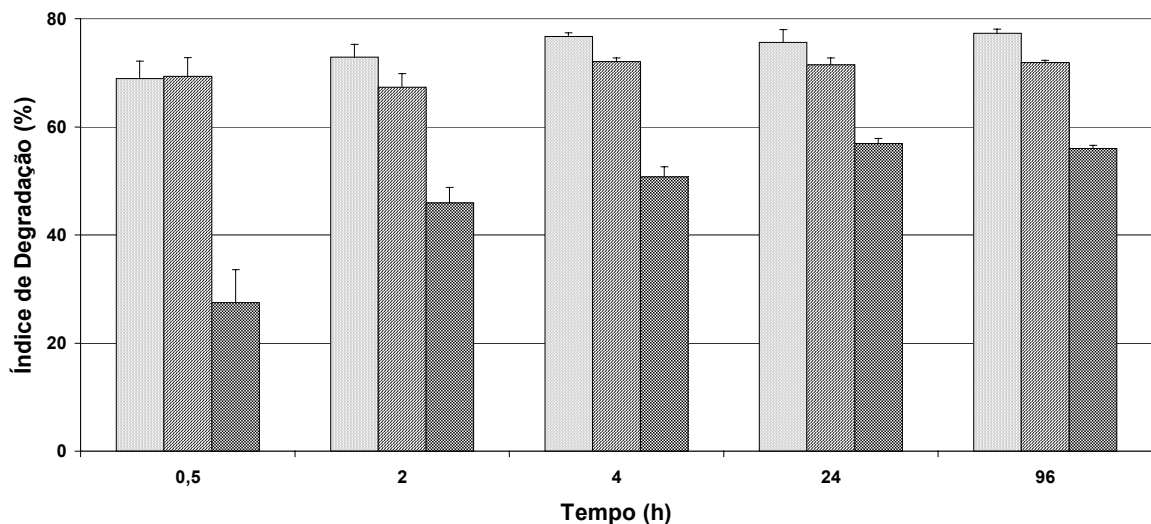
A FIG. 5.37 apresenta o comportamento de degradação correspondente ao PVA com 5% de GA como agente reticulante. Observa que, após as primeiras 4h onde há um incremento significativo no índice de degradação, o mesmo apresenta ligeira redução permanecendo praticamente constante considerando o desvio padrão do ensaio.



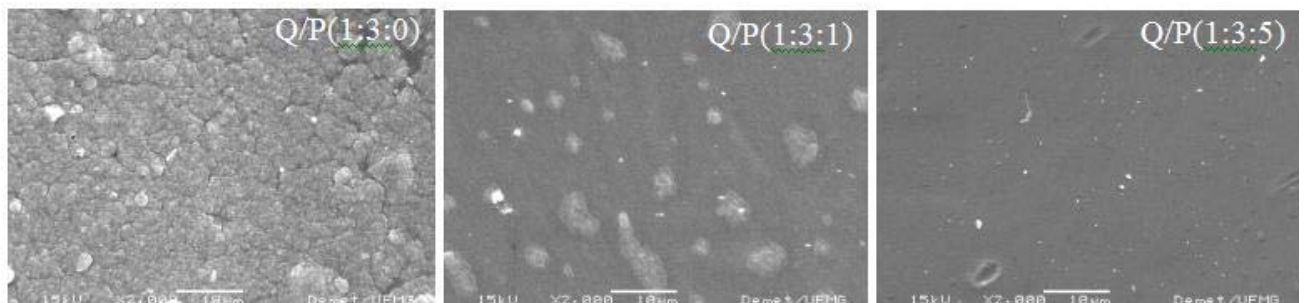
**FIGURA 5.37** Degradação do PVA com 5% de GA em SBF

A FIG. 5.38 apresenta o resumo do ensaio de degradação em SBF das blendas Q/P(1:3), sem adição de agente reticulante, e com a adição de 1% e 5% de GA em massa.

Observa-se claramente que quando o teor GA aumenta, a degradação em SBF diminui sugerindo maior rigidez das cadeias poliméricas na conformação 3D devido a alta densidade de ligações cruzadas entre as cadeias poliméricas (BERGER, et al., 2004b; WANG, 2004). Estes resultados são endossados pelas imagens de MEV (FIG. 5.39) que mostram que a degradação foi evidente na blenda sem reticulação e à medida que o grau de reticulação aumenta o efeito da degradação diminui pois a formação de ligações cruzadas covalentes são mais difíceis de se romper se comparadas com a reticulação física da rede. A maior rigidez também restringe a mobilidade das cadeias impedindo o acesso do fluido e a saída das entidades que ficaram aprisionadas fisicamente.



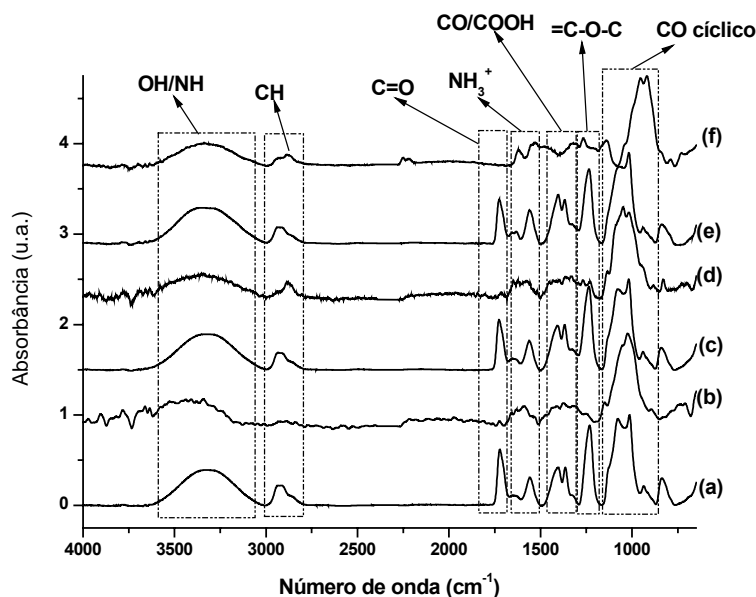
**FIGURA 5.38** Índice de Degradação da blenda Q/P(1:3) sem reticulação( ▨ ) e com 1% ( ▩ ) e 5% ( ▪ ) de GA.(n=3)



**FIGURA 5.39** Imagem de MEV da blenda Q/P/G(1:3:0), Q/P/G(1:3:1) , Q/P/G(1:3:5) após degradação em SBF.

A FIG. 5.40 apresenta os espectros de FTIR das blendas Q/P(1:3:0), Q/P(1:3:1) e Q/P(1:3:5) antes do ensaio de degradação (a), (c) e (e) e após (b, d, f) o período de degradação, respectivamente.

No nosso estudo a blenda Q/P(1:3) foi selecionada como representante do grupo estudado. Observa-se uma redução considerável na intensidade de absorbância das bandas do material após a degradação principalmente as devidas ao PVA, sugerindo que o PVA na blenda se mantém na sua maioria de forma interpenetrada (reticulação física) e o intumescimento pelo fluido favorece a mobilidade e lixiviação do mesmo. As intensidades das absorbâncias se mantêm mais acentuadas para as blendas com 5% de agente reticulante evidenciando menor degradação devido à retenção física (aprisionamento) das entidades não reticuladas quimicamente ou fracamente ligadas.



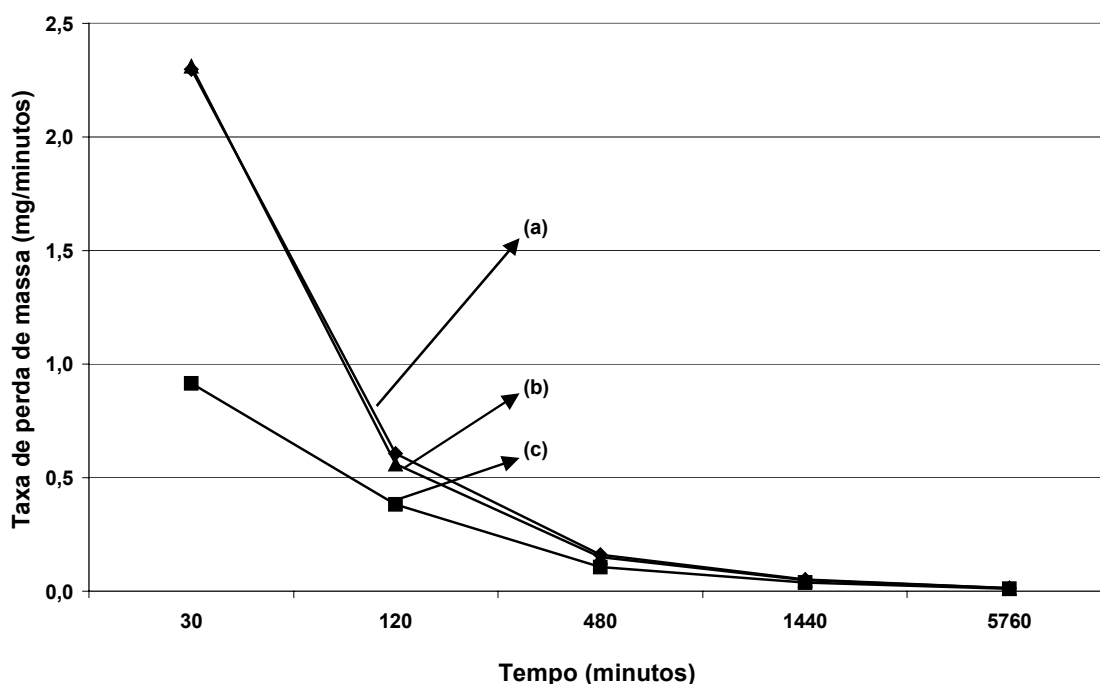
**FIGURA 5.40** - Espectros de FTIR das blendas Q/P/G(1:3:0), Q/P/G(1:3:1) Q/P/G(1:3:5) antes (a), (c) e (e) e após o período de degradação (b) (d) e (f), respectivamente

Nas blendas (b), (d) e (f) as bandas relativas ao OH/NH ( $2800\text{cm}^{-1}$  a  $3000\text{cm}^{-1}$ ), C=O ( $1630\text{cm}^{-1}$  a  $1750\text{cm}^{-1}$ ), ao duplete do CH ( $3000\text{cm}^{-1}$  a  $3600\text{cm}^{-1}$ ), ao  $\text{NH}_3^+$  ( $\sim 1550\text{cm}^{-1}$ ), ao CO/COOH ( $\sim 1400\text{cm}^{-1}$ ), =C-O-C ( $1150\text{cm}^{-1}$  a  $1250\text{cm}^{-1}$ ) e CO cíclico

( $1000\text{cm}^{-1}$  a  $1300\text{cm}^{-1}$ ) apresentaram diminuição de intensidade e alargamento da banda, provavelmente pela lixiviação do PVA.

Nas blendas (b) e (d), sem reticulação e com 1% de agente reticulante, respectivamente, exceto a banda relativa ao CO cíclico, as demais apresentaram diminuição de intensidade e alargamento da banda. Já a blenda (f) com 5% de agente reticulante as absorvâncias bandas relativas ao CO cíclico sofreram alteração mais determinante provavelmente devido ao grau de reticulação covalente (C=N) que aumenta a energia necessária à ruptura da ligação induzindo assim a abertura dos anéis glicosídicos da quitosana.

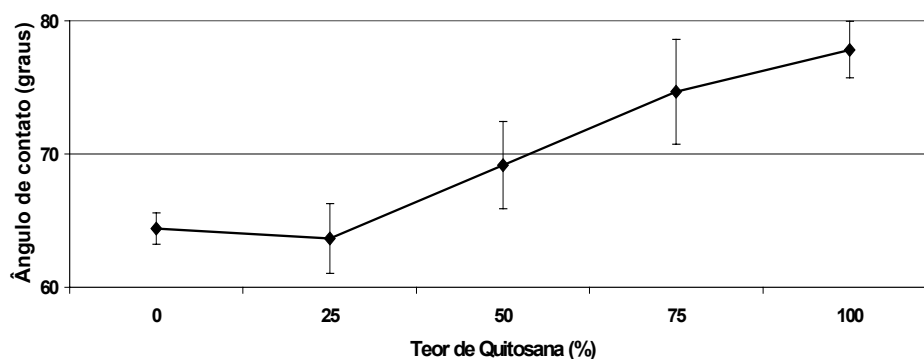
Em relação ao teor de quitosana as blendas tiveram comportamento de degradação semelhante. A FIG. 5.41 apresenta o gráfico evidenciando a taxa de perda de massa da blenda Q/P(1:3) imersa em SBF sem e com adição de 1% e 5% de agente reticulante. Observa-se que com o aumento do teor de agente reticulante ocorre a diminuição da taxa de degradação das blendas.



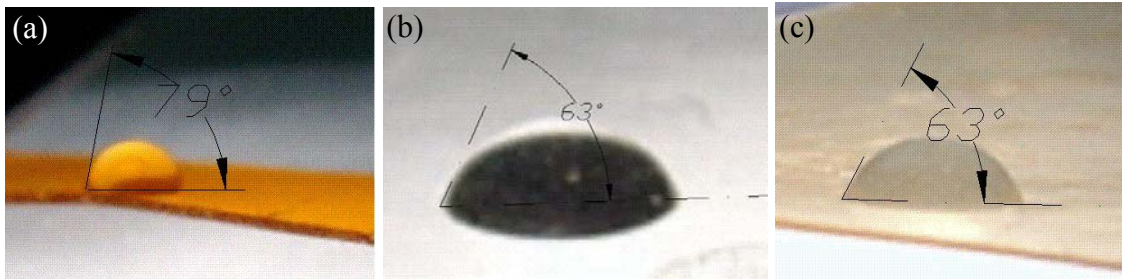
**FIGURA 5.41.** Taxa de degradação em SBF da blenda Q/P(1:3) sem reticulação (a) e reticulada com 1%(b) e 5% (c) de GA

### 5.2.8 MEDIÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO

A menor molhabilidade, ou seja, maior hidrofobicidade do filme de quitosana e das blendas em relação ao filme de PVA é confirmada pelo aumento do ângulo de contato com o crescente teor de quitosana (FIG. 5.42), pois o aumento do ângulo de contato indica um aumento na hidrofobicidade da superfície (JAYASEKARA et al., 2004). O ângulo de contato para o filme de PVA [ $\theta = (64,4 \pm 2,4)^\circ$ ] (FIG. 5.43b) é menor provavelmente devido ao maior teor de grupos C-O presentes na superfície do PVA, ou ainda devido à estrutura tridimensional na forma de duas voltas de hélice paralela da quitosana [ $\theta = (77,8 \pm 4,3)^\circ$ ] (FIG. 5.43a), nesse último caso os grupos polares na quitosana podem não ser capazes de se orientar na superfície e podem exibir forte ligação de hidrogênio intramolecular abaixo da superfície do filme, semelhante ao observado por JAYASEKARA para a blenda de amido / PVA. Por outro lado, o PVA é uma molécula linear e tem estrutura bidimensional (NAKANO, 2007; MANSUR, 2007; JAYASEKARA et al., 2004; RATNER, 1993). HAMILTON (2006) apresenta para a quitosana com GD de 76,1% e 78,7% ângulos de contato de  $(85,6 \pm 0,7)^\circ$  e  $(72,6 \pm 1,9)^\circ$ , respectivamente, razoavelmente semelhante ao obtido por nós considerando o GD da quitosana de 75,6%. A blenda Q/P/G(1:3:0) por ter maior teor de PVA incorporou a quitosana sem apresentar significativa alteração no valor do ângulo de contato (FIG. 5.43c).

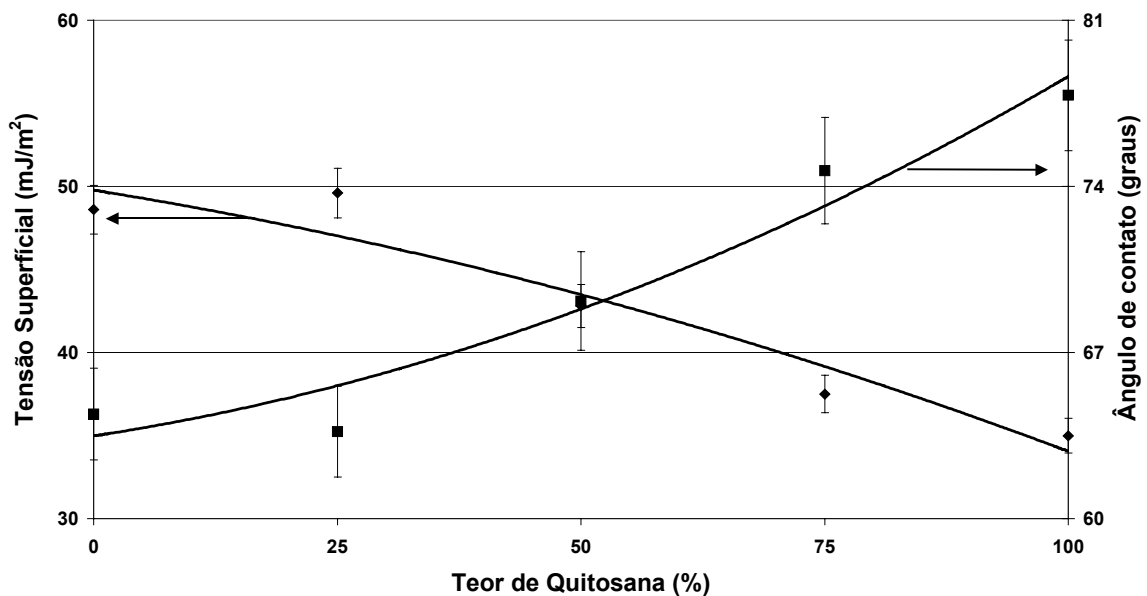


**FIGURA 5.42** Gráfico do ângulo de contato em relação ao teor de quitosana nos filmes obtidos



**FIGURA 5.43** Ângulos de contato quitosana (a), PVA (b) e blenda Q/P/G(1:3:0) (c).

A FIG. 5.44 apresenta uma estimativa da tensão superficial considerando do ângulo de contato das blendas conforme RATNER (1993) onde ele apresenta uma tensão superficial de  $37\text{mJ/m}^2$  para o PVA e nós obtivemos  $48,6\text{mJ/m}^2$ . Um fato importante que posteriormente necessita ser avaliado é a influência da rugosidade superficial dos filmes obtidos no ângulo de contato.



**FIGURA 5.44** Tensão superficial estimada a partir do ângulo de contato em função do teor de quitosana dos filmes obtidos.

QUEIROZ e colaboradores (2003) avaliando blendas de lactato de quitosana com PVA (100% hidrolisado) para utilização como agente de liberação controlada de fármaco, encontraram valores de energia superficial livre para solução fisiológica (pH=7,4 a  $37^\circ\text{C}$ ) de aproximadamente  $12\text{mJ/m}^2$  e  $35\text{mJ/m}^2$  para o lactato de quitosana e PVA, respectivamente. Semelhantemente observou que o aumento do teor de quitosana

implica numa diminuição da energia superficial e observou que superfícies com baixa energia livre favorecem a interação com tecidos biológicos.

### **5.3 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DOS FILMES DE HIDROGEL *IN VITRO***

#### **5.3.1 CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR *IN VITRO* POR MTT**

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio de redução do MTT. Este teste permite que seja mensurado o metabolismo celular perante a adição do MTT, uma vez que células viáveis absorvem o tetrazólio de metiltiazol e o metabolizam na mitocôndria utilizando enzimas ativas, onde se acumulam sob a forma de cristais de tetrazólio ou formazana; sendo assim quanto maior o valor da leitura no espectrofotômetro, maior é a taxa metabólica, sendo possível diferenciar células mais viáveis das menos viáveis. Nesse estudo o ensaio de viabilidade é mensurado no intervalo de 24h após a semeadura das células. A capacidade dos filmes de QUI/PVA (reticulados ou não) para dar suporte a viabilidade e proliferação mostrou que estas amostras exibiram comparável biocompatibilidade (FIG. 5.45). Além disso, é possível observar na FIG. 5.46 que o valor de viabilidade variou de aproximadamente 78% a 97% (comparado aos valores de absorbância obtidos para as células VERO controle – CC, que foi considerado como 100% de viabilidade), esta diferença não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ), e pode-se inferir que as blendas produzidas são promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*, uma vez que são biocompatíveis.

O teste de citotoxicidade usando cultura de células é considerado o primeiro passo na identificação de compostos ativos e como primeiro teste de biosegurança. Considerando ainda as blendas em relação ao CC observa-se que todas as amostras apresentaram um desempenho acima de 70%, superior aos 50% considerado como viabilidade mínima aceitável como biocompatível.

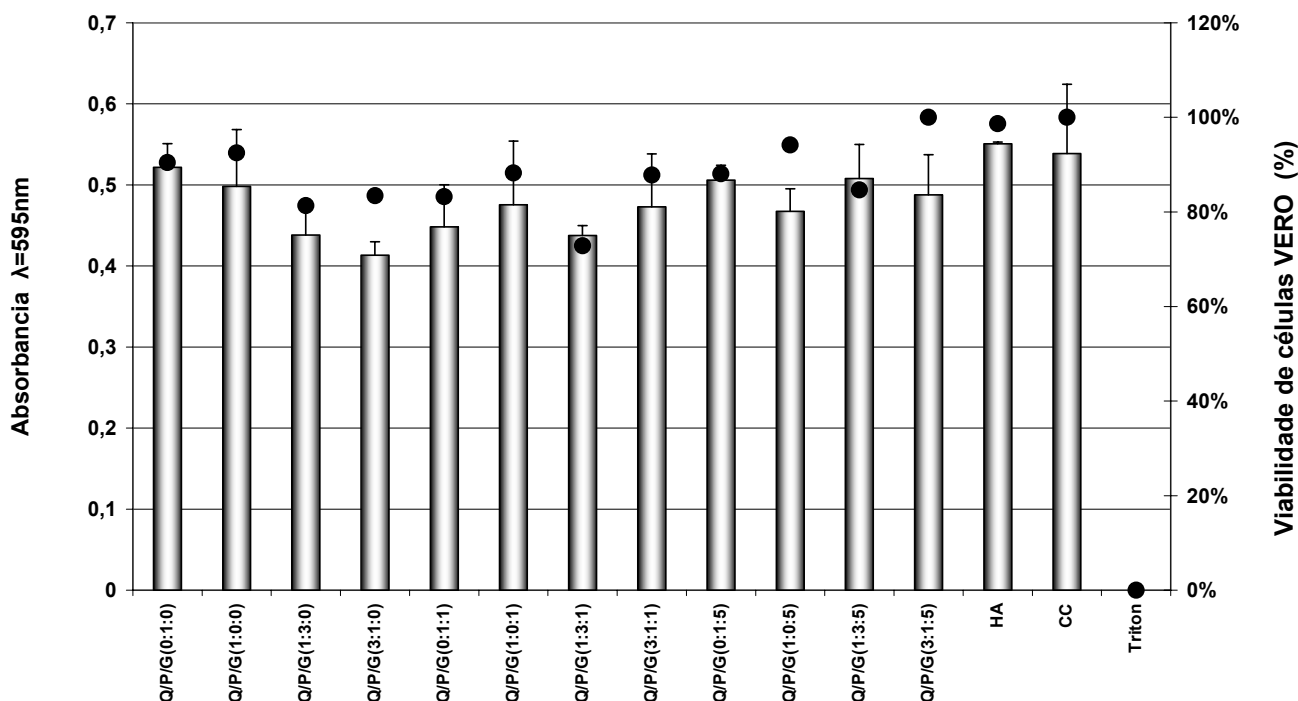
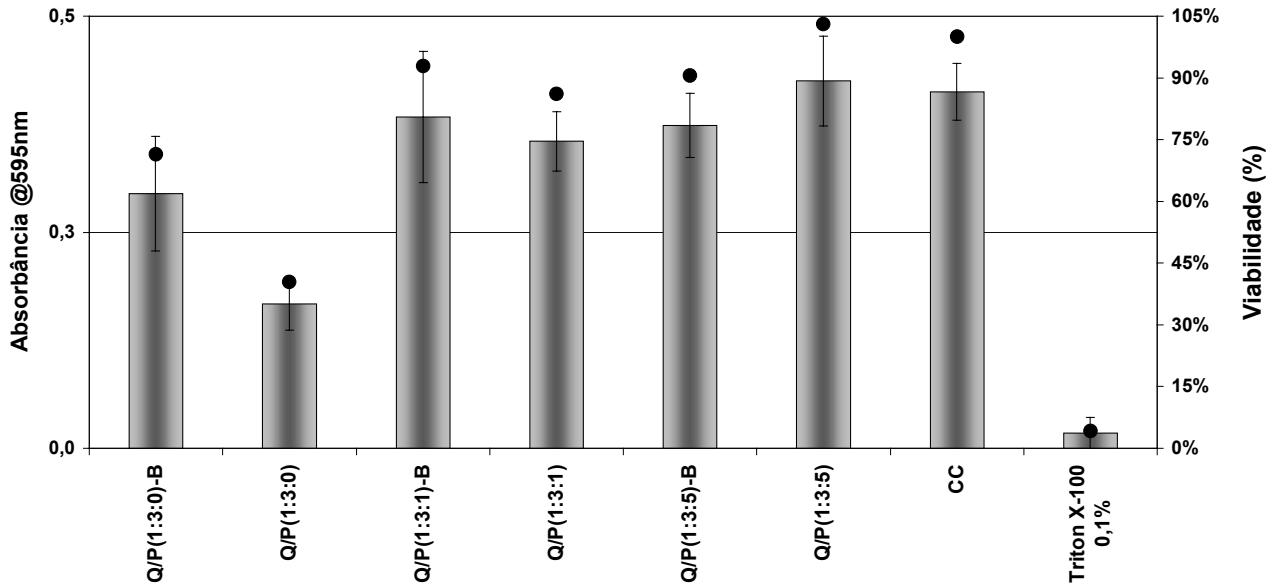


FIGURA 5.45 Viabilidade de células VERO analisadas com a metodologia de MTT.

Quanto ao tratamento de bloqueio com L-arginina (FIG. 5.47), identificado na blenda pela letra B, observa-se que exceto as blendas com 5% de agente reticulante todas apresentaram resposta positiva aumentando a viabilidade celular. Acredita-se que o agente reticulante dificultou a difusão da L-arginina no sentido de impedir que os sítios não reagidos disponíveis na blenda fossem bloqueados. Entretanto a viabilidade celular da blenda Q/P/G(1:3:5)B ainda foi superior a 85%.

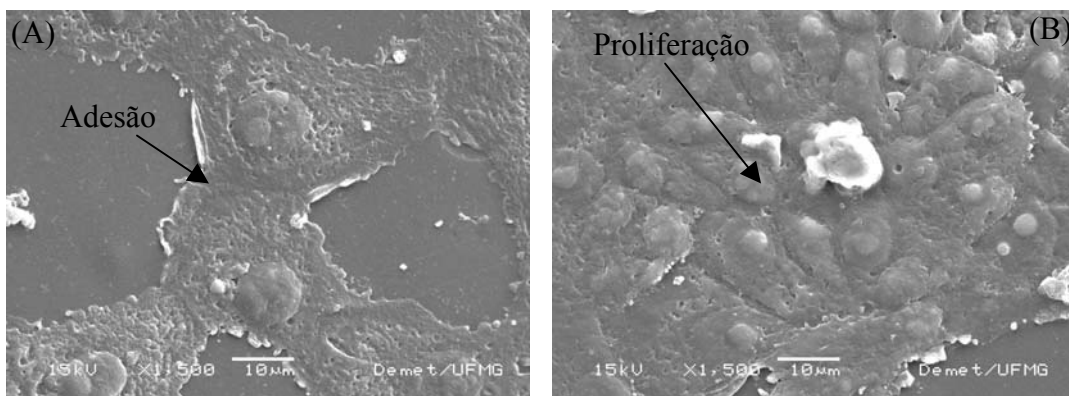
Atualmente, segundo WEI (2008), embora o glutaraldeído nativo seja considerado tóxico; vários substitutos sanguíneos reticulados com glutaraldeído estão disponíveis no mercado ou na avaliação clínica de fase III (Hemopure, Hemolink e PolyHeme), e nenhuma toxicidade óbvia foi encontrada. E ainda, que o resultado da degradação obtido da análise com fluorescência de raios-X mostrou que a base de Schiff (C=N), relativa ao glutaraldeído e a amina da quitosana durante reação de reticulação, é reduzida no fígado e no baço e se transforma em C-N que é estável *in vivo*, dificultando o retorno ao grupo aldeído. Tal biodegradação reduz os efeitos colaterais e confirma o

uso potencial do glutaraldeído como um reagente de ligação cruzada em aplicações clínicas (WEI, 2008).



**FIGURA 5.46** Viabilidade de células VERO com e sem bloqueio por L-arginina

As imagens de MEV (FIG. 5.48) obtidas da superfície dos filmes evidenciam as células VERO com morfologia característica. Em “A”, está evidenciada a adesão celular e em “B”, pode ser visto que as células estão viáveis e biologicamente ativas, uma vez que estão proliferando e cobrindo o substrato; o que pôde ser observado em vários campos avaliados.



**FIGURA 5.47** Imagens de MEV evidenciando morfologia, adesão e proliferação

A adesão celular está envolvida em vários fenômenos naturais tais como embriogênese, manutenção da estrutura dos tecidos, regeneração de tecidos lesionados, resposta imune, metástases e integração dos biomateriais com os tecidos (COSTA et al., 2008; MANSUR, 2008; DUNN et al., 1995)

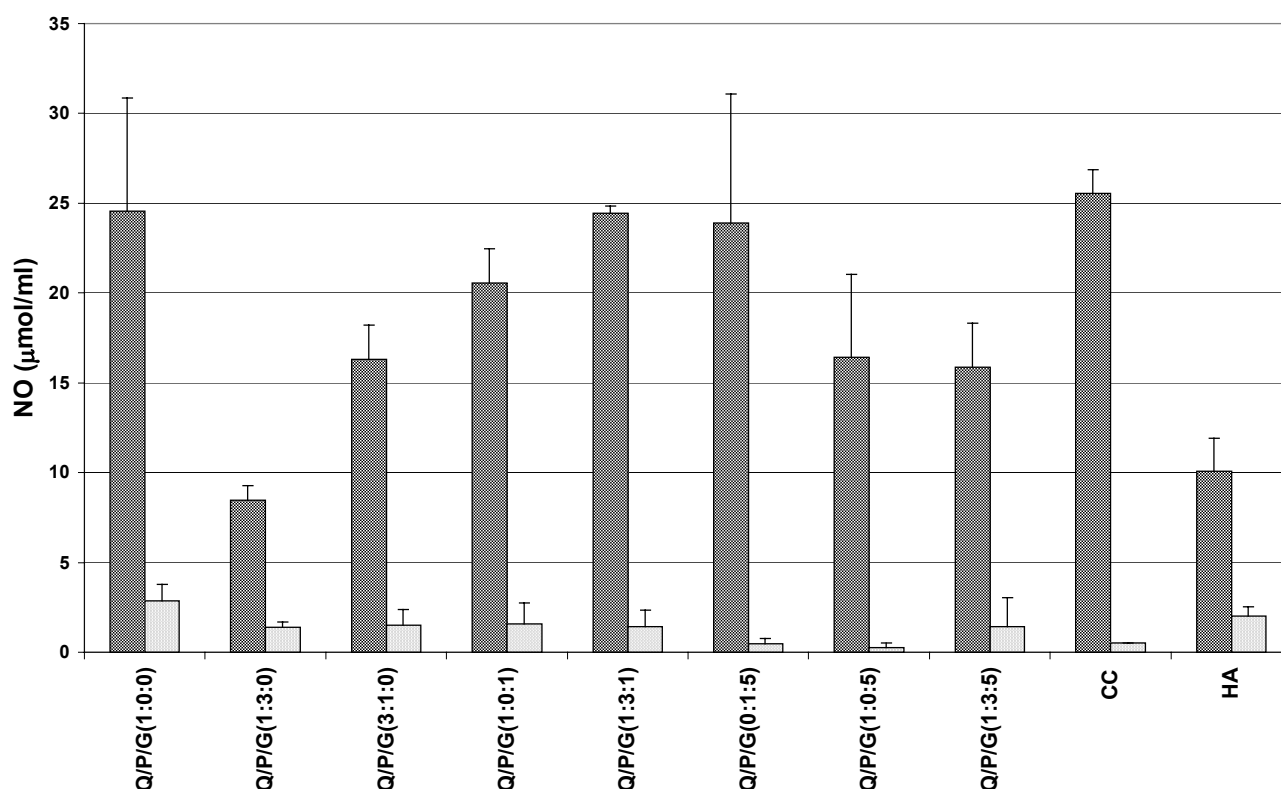
### **5.3.2 CITOTOXICIDADE E VIABILIDADE CELULAR POR PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO *IN VITRO***

As FIG. 5.49 e FIG. 5.50 apresentam os gráficos de produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados e não estimulados, cultivados em contato com diferentes blendas de quitosana/PVA com e sem agente reticulante. Na FIG. 5.49 os materiais identificados com a letra “B” foram bloqueados com L-arginina. A FIG 5.50 apresenta a viabilidade celular dos macrófagos submetidos ao contato com os materiais pela metodologia de redução do MTT.

Quando se analisa o papel dos macrófagos no reconhecimento dos materiais utilizados em enxertos e o patrulhamento das infecções e mesmo da tolerância, devem ser considerados dois aspectos: primeiro, o da produção de óxido nítrico pós-estímulo: esta molécula é o um potente anti-microbiano destas células de defesa inata ou inespecífica, portanto, o biomaterial não pode inviabilizar as células de defesa de produzi-la, com grande possibilidade da intercorrência de infecções durante a enxertia. E segundo, o biomaterial, por si só, deverá ser o mais compatível possível para evitar a indução de rejeição, por exacerbação desta resposta natural.

O óxido nítrico (NO) produzido pela atividade da enzima iNOS é de grande importância nos processos de regeneração epitelial e de implantes de biomateriais, e uma regulação precisa de sua concentração deve ser feita, uma vez que seus efeitos são dose dependentes (WU, 2007). Enquanto uma alta concentração de óxido nítrico nos locais de implante pode levar a uma rejeição do biomaterial (ACHARYA et. al., 2008), esta molécula também é extremamente importante no processo de regeneração do tecido epitelial, atuando como mediadora no processo de re-epitelialização (STALLMEYER et. al., 1999), agente antimicrobiano nas respostas inflamatórias - o que é fundamental

na descontaminação do local do implante (FRANK et. al., 2002) - e como reguladora da proliferação e da diferenciação de queratinócitos, evento também importante no processo de re-epitelialização (STALLMEYER et. al., 1999; KRISCHEL et. al. 1998). Além disso, o óxido nítrico também regula a secreção de colágeno por fibroblastos e influencia a resistência mecânica do novo tecido em formação (FRANK et. al., 2002).

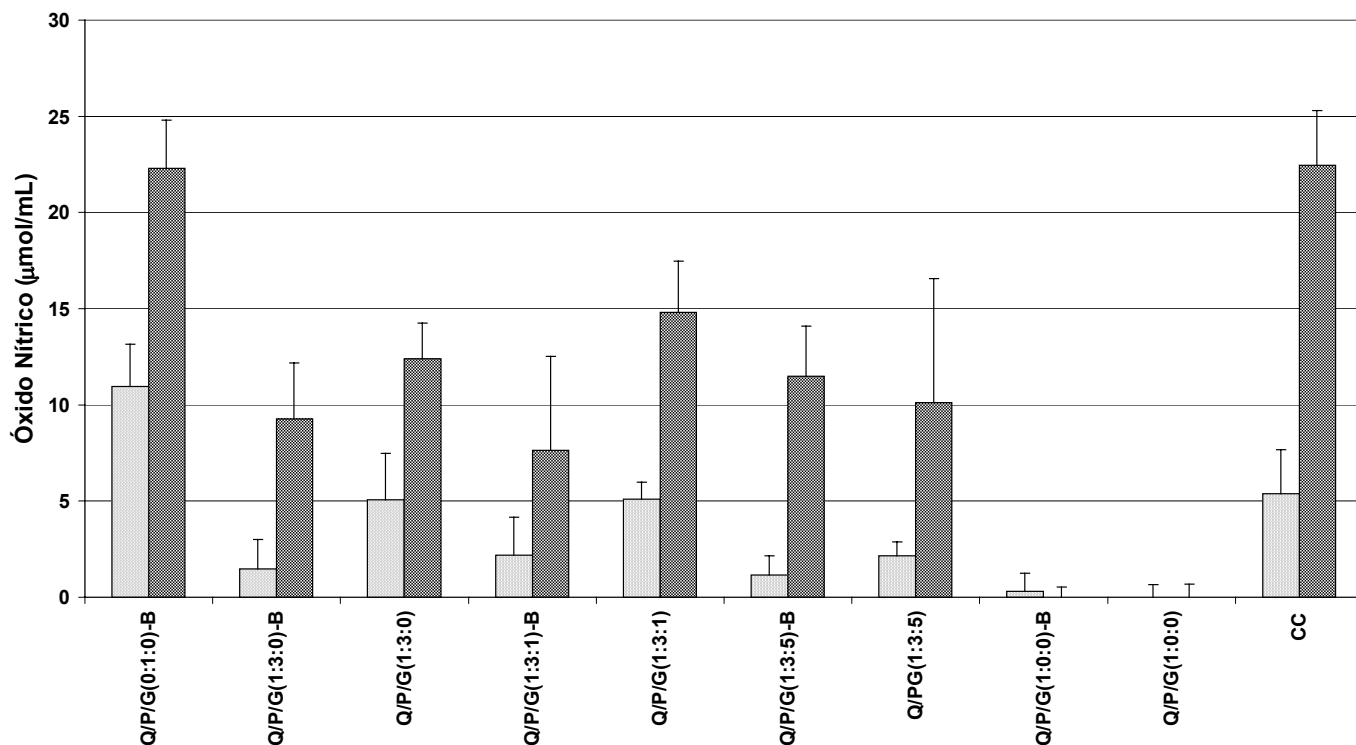


**FIGURA 5.48** Produção de Óxido Nítrico por macrófagos estimulados ou não em diferentes blendas de quitosana/PVA

É essencial então que os materiais produzidos com o intento de serem usados em transplantes de pele não estimulem a produção exacerbada de óxido nítrico, nem inibam sua síntese por células estimuladas, uma vez que ambos estes eventos levariam a um fracasso do implante em médio e longo prazo.

Os resultados obtidos apontam para um maior sucesso dos materiais puros, em detrimento das blendas formadas por híbridos de Quitosana/PVA, uma vez que estes

materiais, à exceção de Q/P/G(1:0:5) (Quitossana pura reticulada com 5% de Glutaraldeído), não apresentaram grande inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados, nem induziram uma reação inflamatória teoricamente danosa se comparada ao controle celular.



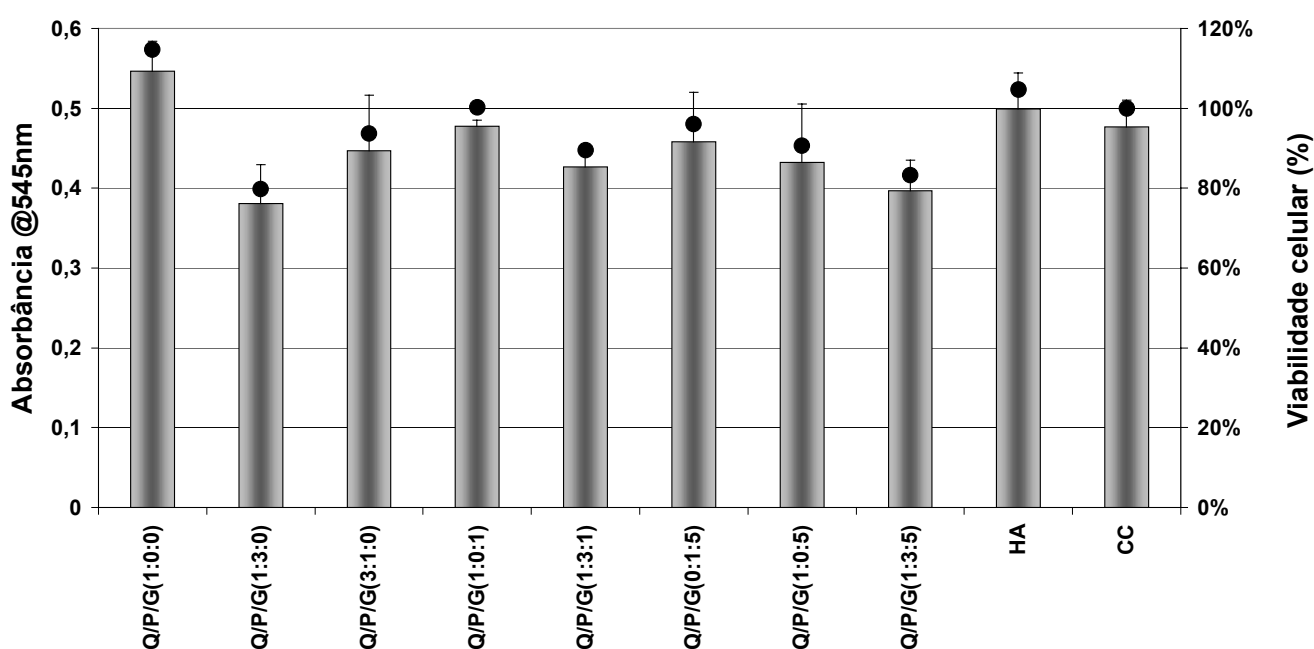
**FIGURA 5.49** Produção de Óxido Nítrico por macrófagos estimulados ou não em diferentes blendas de quitosana/PVA com (B) e sem bloqueio por L-arginina.

A blenda que apresentou resultados mais satisfatórios, sob o nosso ponto de vista, foi a do material Q/P/G(1:3:1) (Quitossana/PVA na proporção 1:3, reticulada com 1% de Glutaraldeído), comparável ao controle celular. A hidroxiapatita, mineral sabidamente biocompatível, não obteve um resultado bom no teste de produção de óxido nítrico. Acreditamos que o pó liberado pelas frações deste material cultivadas em meio líquido interfira de algum modo na interação dos macrófagos com o estímulo de LPS e IFN- $\gamma$ , reduzindo assim a eficiência desta célula em produzir este radical.

O PVA puro sem agente reticulante, Q/P/G(0:1:0), embora tenha mostrado boa viabilidade, induziu a produção exacerbada de óxido nítrico (barra pontilhada) na

ausência de estímulo, em comparação ao controle positivo, não sendo uma boa característica para uso em implantes.

Na FIG. 5.50 os macrófagos apresentaram viabilidade maior ou igual a 90%, em relação ao controle de células, em todos os grupos testados - dado verificado em teste de redução do MTT - à exceção de Q/P/G(1:3:0) (25% quitosana – 75% PVA) e Q/P/G(1:3:5) (mesma proporção de Quitosana/PVA, reticulada com 5% de Glutaraldeído), que mostraram as viabilidades de 80 e 83%, respectivamente.



**FIGURA 5.50** Viabilidade de macrófagos analisadas com a metodologia de MTT.

### 5.3.2.1 ANÁLISES DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PÓS-ESTÍMULO:

Os materiais Q/P/G(1:3:1), Q/P/G(0:1:5), Q/P/G(1:0:1) e Q/P/G(1:0:0) não apresentaram diferença estatística do controle celular ( $p > 0,05$ ), comprovando que os mesmos foram os materiais com melhor eficiência na metodologia utilizada. Ressaltamos que entre si, também não apresentaram diferença estatística. Já os materiais Q/P/G(1:3:0), Q/P/G(1:3:5), Q/P/G(3:1:0) e Q/P/G(1:0:5) apresentaram diferença estatística em relação ao controle celular ( $p < 0,001$ ,  $p < 0,01$ ,  $p < 0,05$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), e, foram assim, considerados os de menor desempenho.

### 5.3.2.2 ANÁLISES DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO SEM ESTÍMULO:

Nenhum dos biomateriais testados apresentaram diferença estatística ( $p>0,05$ ) em relação ao controle celular. Este resultado foi considerado por nós muito bom, uma vez que, embora os materiais devam permitir aos macrófagos a produção de NO pós-estímulo, não devem induzir a produção exacerbada de NO somente em um contato inicial, o que favoreceria a rejeição do enxerto.

Ressaltamos que, embora os testes tenham indicado um caminho da melhor blenda ou material puro, os resultados aqui apresentados mostram que todos os materiais trabalhados são promissores.

A seguir apresentamos o registro fotográfico da leitura de MTT por macrófagos cultivado em contato com os diferentes materiais. As setas vermelhas indicam as células vivas, enquanto as pretas, células mortas (FIG. 5.51).

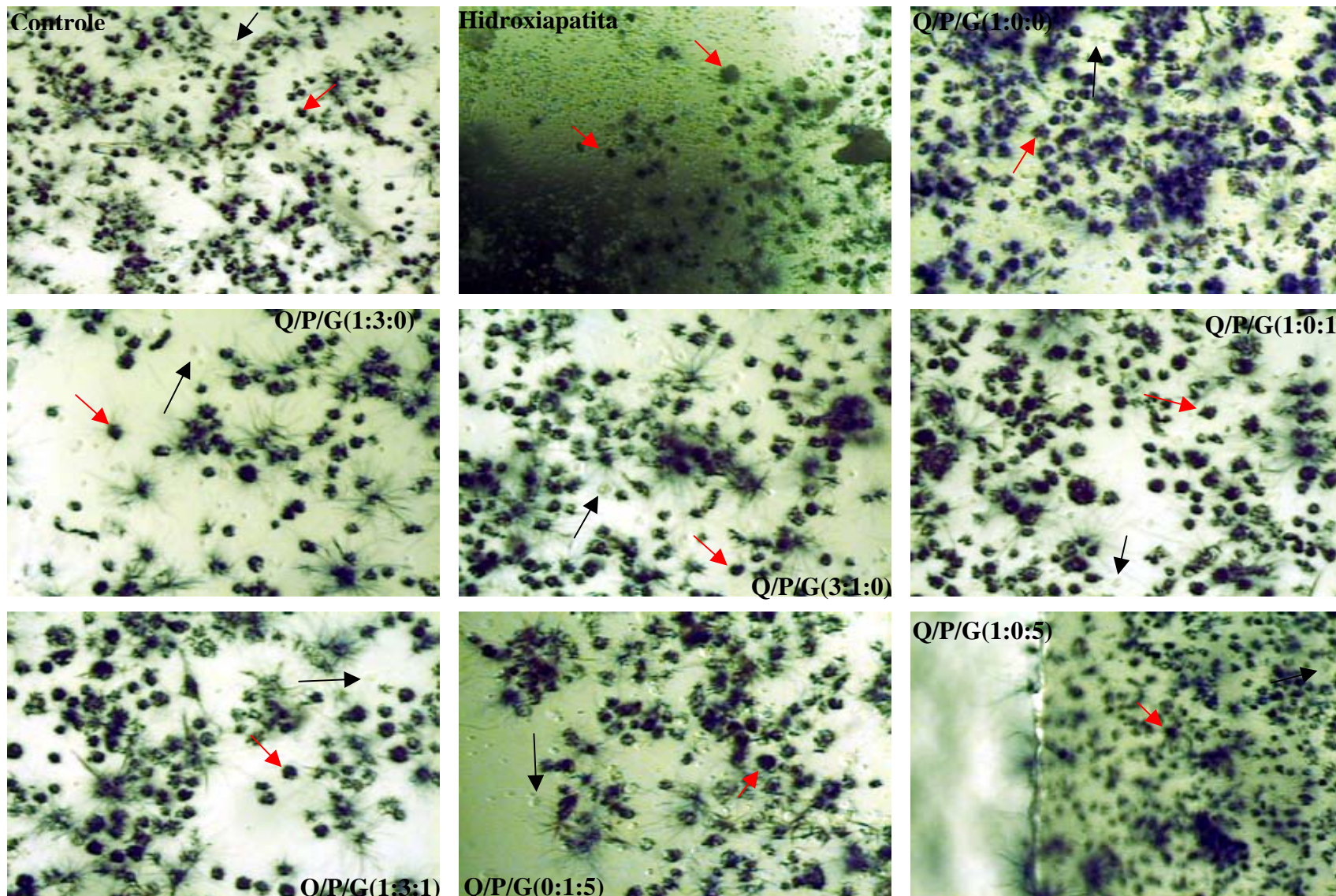


FIGURA 5.51 Registro fotográfico da leitura de MTT por macrófagos

## 5.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES 3D DE HIDROGEL

### 5.4.1 AVALIAÇÃO VISUAL QUALITATIVA

As matrizes tridimensionais de hidrogéis de quitosana/PVA com e sem reticulação foram identificadas pelos pares de filmes utilizados para sua confecção.

A FIG. 5.52 apresenta a imagem fotográfica obtida dos filmes das blendas Q/P/G(1:3:0) e Q/P/G(1:3:1) antes e após a colagem com glutaraldeído. Na observação visual, após a prensagem e secagem do adesivo aplicado aos filmes, verifica-se em todas as matrizes um aspecto de adesão uniforme.

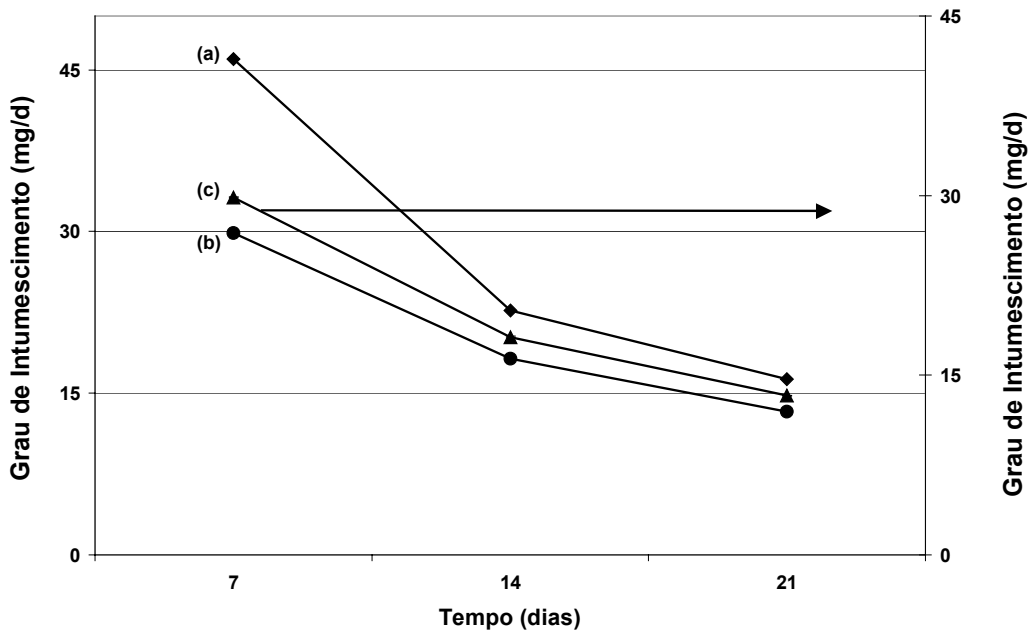


**FIGURA 5.52** Imagem fotográfica da matriz obtida Q/P/G(1:3:0)/ Q/P/G(1:3:1)

### 5.4.2 GRAU DE INTUMESCIMENTO

A FIG. 5.53 apresenta a avaliação do grau de intumescimento evidenciado pelas matrizes durante a imersão em SBF. A matriz com menor grau de reticulação mostrou um índice de intumescimento maior que as com as blendas de maior grau de reticulação.

O grau de intumescimento da blenda reticulada com 5% de glutaraldeído foi menor nas matrizes em que ela participou e também a forma não linear da curva de absorção plotada sobre o tempo apresenta um decaimento de segunda ordem, semelhante ao observado no filme da blenda sozinho.

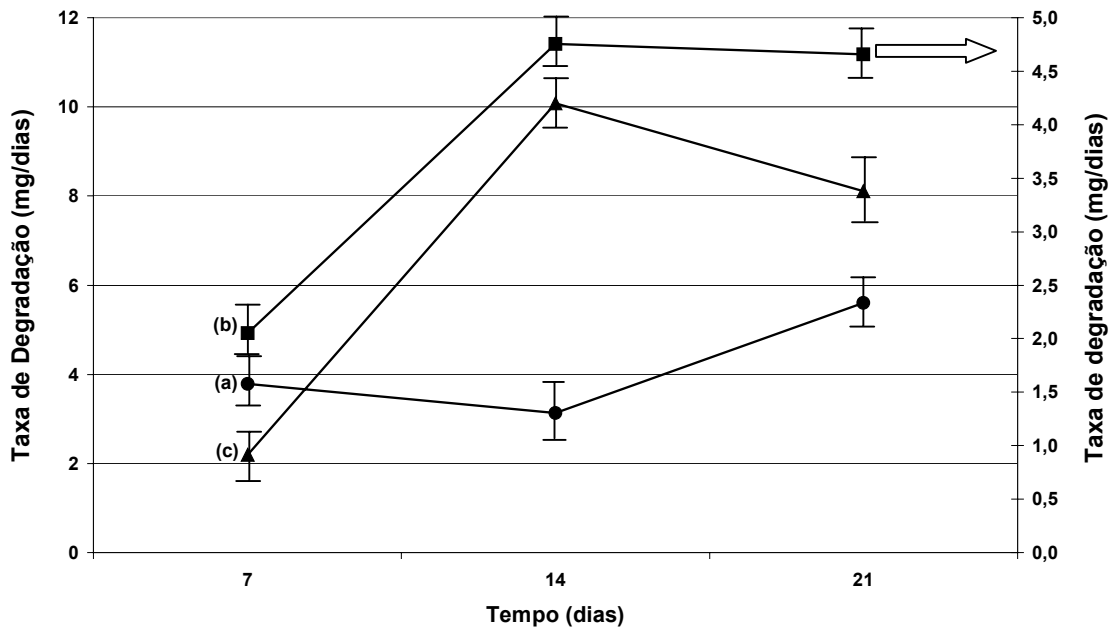


**FIGURA 5.53** Grau de intumescimento das matrizes 3D, Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1) (a); Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:5) (b) e Q/P/G(1:3:1)/Q/P/G(1:3:5) (c)

### 5.4.3 DEGRADAÇÃO DAS MATRIZES

A FIG. 5.54 apresenta a taxa de perda de massa das matrizes 3D durante a imersão em SBF. Com o aumento do tempo as matrizes que têm em sua composição a blenda com 5% de agente reticulante apresenta uma tendência de redução na taxa de degradação enquanto que a matriz que apresenta menor teor da agente reticulante tende a aumentar a taxa de degradação com o tempo. Isso provavelmente ocorre devido a maior energia necessária para despolimerização das cadeias de polímeros reticuladas (ligações cruzadas covalentes) em relação que apresentaram menor teor de agente reticulante.

As matrizes com maior teor de agente reticulante também apresentaram menor grau de intumescimento devido a menor interação do fluido com a cadeia polimérica e em função da variação de velocidade e mecanismos diferenciados de difusão em ambos os lados da matriz.



**FIGURA 5.54** Taxa de degradação das matrizes 3D – Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1) (a) ; Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:5) (b) e Q/P/G(1:3:1)/Q/P/G(1:3:5) (c)

#### 5.4.4 AVALIAÇÃO DAS PROPRIEDADES MECÂNICAS DAS MATRIZES

A FIG. 5.55 mostra a evolução do módulo de elasticidade em função do material. Como era de se esperar a montagem de filmes com maior grau de agente reticulante promove um aumento do módulo de elasticidade indicando uma composição mais frágil.

Na FIG. 5.56 a tenacidade da matriz diminui com a incorporação de filmes com maior teor de agente reticulante indicando menor absorção de energia até o colapso confirmando o aumento da fragilidade da matriz.

A tensão máxima e a deformação específica das matrizes apresentam valores relativos praticamente constantes com redução acentuada da deformação específica. Com o aumento do teor de agente reticulante ocorre a redução da mobilidade das cadeias de polímero em função do aumento de ligações cruzadas promovendo um conseqüente aumento da fragilidade da matriz.

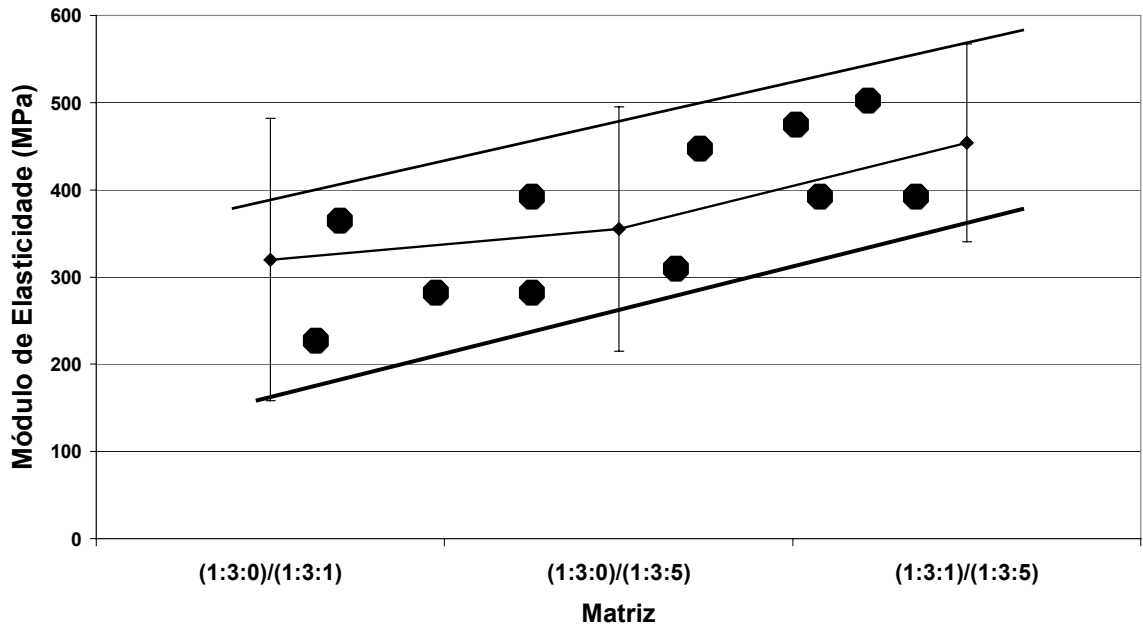


FIGURA 5.55 Evolução do Módulo de Elasticidades das Matrizes 3D

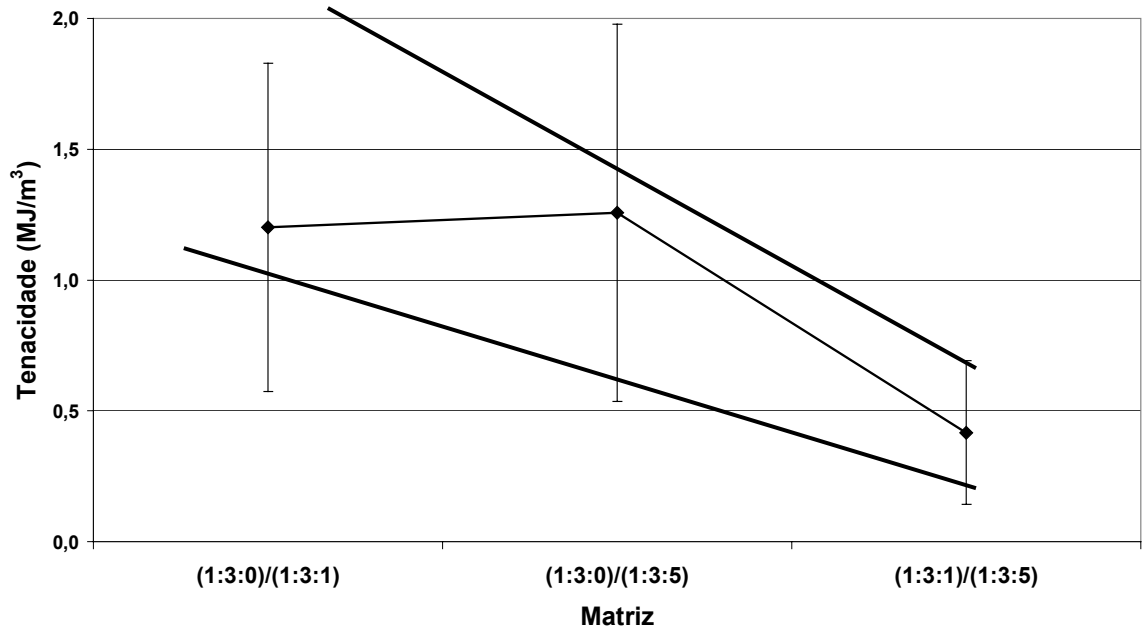
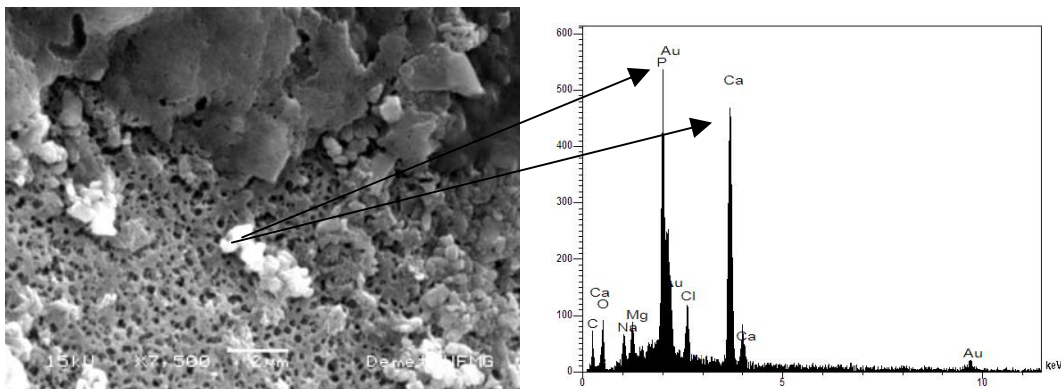


FIGURA 5.56 Evolução da Tenacidade das matrizes 3D

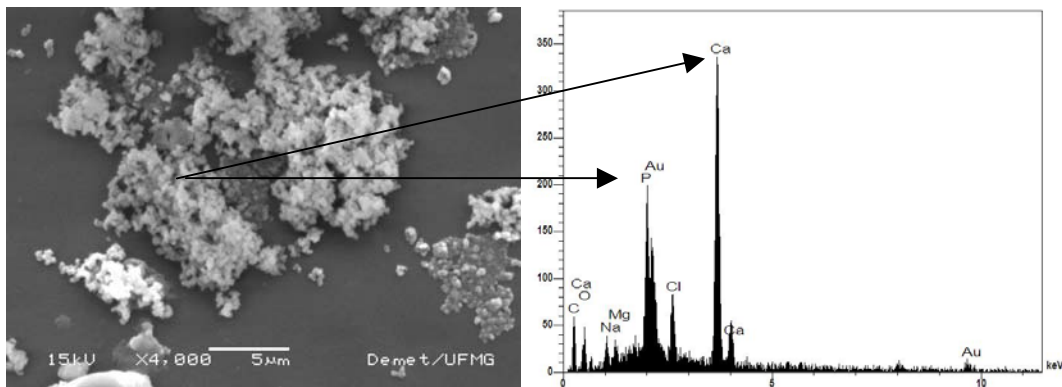
### 5.4.5 AVALIAÇÃO DA DEPOSIÇÃO BIOMIMÉTICA

A FIG. 5.57 e FIG. 5.58 apresentam as imagens de MEV com o respectivo gráfico de EDS da matriz Q/P/G(1:3:0)/ Q/P/G(1:3:1). Do lado do filme Q/P/G(1:3:0) (FIG. 5.57) onde se observa após 14 dias de imersão em SBF o início da deposição de fósforo e cálcio evidenciando a ocorrência de um processo de deposição biomimético, fato também observado no lado do filme Q/P/G(1:3:1) (FIG. 5.58).

Observou-se relativamente maior teor do “P” no lado do filme Q/P/G(1:3:0) que no lado do filme Q/P/G(1:3:1). Essa diferença pode estar associada à posição relativa do filme dentro do recipiente onde o filme Q/P/G(1:3:0) ficou voltado para cima ficando, estatisticamente, sujeito a maior número de interações com os sais do SBF.



**FIGURA 5.57** Imagem de MEV e gráfico de EDS da matriz Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1), lado do filme Q/P/G(1:3:0) (14 dias de imersão em SBF).



**FIGURA 5.58** Imagem de MEV e gráfico de EDS da matriz Q/P/G(1:3:0)/Q/P/G(1:3:1), lado do filme Q/P/G(1:3:1) (14 dias de imersão em SBF).

## CAPÍTULO 6

### CONCLUSÕES

Neste trabalho foram preparados filmes de novas blendas de Quitosana/PVA quimicamente reticuladas, e extensamente estudadas no sentido de caracterizar física, química, mecânica e biologicamente com vistas a utilização como biomaterial para utilização potencial em engenharia de tecido epitelial. Além disso, comparativamente, a presença do agente reticulante (glutaraldeído) nas blendas promove alterações significativas no comportamento do material e essas alterações são profundamente dependentes do pH das soluções precursoras, bem como, do número de amins disponíveis para reticulação da quitosana (grau de desacetilação ou teor de quitosana na blenda).

As matérias-primas utilizadas para a obtenção dos precursores das blendas foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho, difração de raios-X e titulação potenciométrica.

A técnica de espectroscopia de infravermelho evidenciou que nas blendas obtidas neste sistema (materiais, agente reticulante, pH, temperatura de secagem) a preferência da reticulação do glutaraldeído pela amina da quitosana a partir da formação do grupamento C=N em detrimento a formação de ponte acetal com o PVA.

Os resultados mostraram como a alteração das proporções de Quitosana e PVA, associadas a diferentes concentrações de agente reticulante modificam as propriedades dos filmes de hidrogel no que diz respeito, principalmente, ao intumescimento, degradação, propriedades mecânicas e biológicas.

Os sistemas investigados indicaram modulação no comportamento de intumescimento e degradação apresentando redução nesses parâmetros, tanto com o aumento do teor de quitosana, quanto com o aumento do teor de agente reticulante. Como consequência da reticulação química, do ponto de vista mecânico, a tenacidade diminuiu pela formação

de uma rede polimérica mais rígida. Além do mais, todos os sistemas avaliados se mostraram não tóxicos e biocompatíveis.

Em resumo, estas blendas baseadas em Quitosana/PVA oferecem uma ampla faixa de escolhas para potencialmente serem usadas em aplicações biomédicas, tais como, biomaterial, veículo de liberação controlada de drogas, e engenharia de tecido epitelial.

## 7 CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO

### 7.1 ARTIGOS COMPLETOS EM PERIÓDICOS

COSTA JR., E. S., MANSUR, H.S. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) Reticulados Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1460-1466, 2008.

COSTA JR, E. S., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2008. DOI 10.1007/s10856-008-3627-7

COSTA JR., E. S., BARBOSA-STANCIOLI, E.F., MANSUR, A. A. P., VASCONCELOS, W.L., MANSUR, H.S. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Chemically Crosslinked Blends for Biomedical Applications. **Carbohydrate Polymer**, 2008. doi:10.1016/j.carbpol.2008.11.015

### 7.2 TRABALHOS COMPLETOS EM CONGRESSOS INTERNACIONAIS

COSTA JR., E. S., MANSUR, H. S. Synthesis and Characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel films for skin tissue engineering application, In: International Symposium on Natural Polymer and Composites, 6, 2007, Gramado, RS. **Proceedings of XI International Macromolecular Colloquium and 6th International Symposium on Natural Polymers and Composites**, Gramado: Associação Brasileira de Polímeros, 2007. v.1

### 7.3 TRABALHOS COMPLETOS EM CONGRESSOS NACIONAIS

COSTA JR., E. S., MANSUR, H. S. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blend Chemically Crosslinked by Glutaraldehyde for Tissue Engineering Application, In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 9, 2007, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Associação Brasileira de Polímeros, 2007.

COSTA JUNIOR, E. ; MANSUR, H. S. . Degradação, citotoxicidade e viabilidade celular de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido, In: V Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB 2008 ), 2008, Ouro Preto. **Proceedings of COLAOB 2008**, 2008. v. 1

### 7.4 RESUMOS ESTENDIDOS

MANSUR, H. S. ; COSTA JUNIOR, E. ; STANCIOLI, Edel F. Barbosa . Preparation of ciprofloxacin hydrochloride-loaded chitosan/PVA blends film for drug delivery applications. In: VII Annual Meeting of the Brazilian Materials Research Society (SBPMAT 2008), 2008, Guarujá, São Paulo. **Proceedings of VII Annual Meeting of the Brazilian Materials Research Society**, 2008. v. 1

MANSUR, H. S. ; COSTA JÚNIOR, E. DE S. ; MANSUR, Alexandra Ancelmo Piscitelli ; STANCIOLI, Edel F. Barbosa . Synthesis and Characterization of Chitosan/PVA Hybrid Films Chemically Modified by Glutaraldehyde. In: VII Annual Meeting of the Brazilian Materials Research Society, 2008, Guarujá, São Paulo. **Proceedings of VII Annual Meeting of the Brazilian Materials Research Society**, 2008. v. 1.

### 7.5 RESUMOS EM CONGRESSO

MANSUR, H. S. ; COSTA JÚNIOR, E. DE S. . Synthesis and Characterization of Chitosan/poly(vinyl alcohol) Hydrogels Chemically Crosslinked for Tissue Engineering Applications. In: 8th World Biomaterials Congress 2008 (WBC2008), 2008, Amsterdam, Holanda. **Proceedings of 8th World Biomaterials Congress 2008 (WBC2008)**, 2008. v. 1. p. 937-937

COSTA JUNIOR, E. ; MANSUR, H. S. . Caracterização Morfológica e Espectroscópica de Blendas de Quitosana/PVA Reticuladas por Glutaraldeído. In: IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB 2006), 2006, Caxambú-MG. **Anais do IV Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais (COLAOB 2006)**, 2006. v. 1.

## TRABALHOS FUTUROS

Com relação ao desdobramento do presente estudo, pode-se destacar as seguintes sugestões de trabalhos futuros:

Considerando as possibilidades de aplicações biomédicas do sistema estudado o principal passo que consideramos é a avaliação *in vivo* da blenda no que diz respeito a biocompatibilidade e citotoxicidade, resposta inflamatória e degradabilidade durante a regeneração tecidual.

Avaliar o comportamento do sistema a partir da incorporação de fármaco para ser utilizado também como agente de liberação controlada.

Analisar comparativamente as características físicas, mecânicas e biológicas das membranas quando do uso de diferentes tipos de quitosana (massa molar e grau de desacetilação).

Avaliar o comportamento do sistema no que diz respeito ao intumescimento e a perda de massa em função da variação de pH do fluido.

Avaliar o sistema quanto à incorporação de outros agentes de reticulação na formulação dos biomateriais;

Alterar a metodologia de preparação do material no sentido de obter membranas porosas.

Além da L-arginina, utilizar outros agentes de bloqueio dos sítios não reagidos do agente reticulante a fim de comparar a efetiva influência e os mecanismos envolvidos.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, C., GHOSH, S. K., KUNDU, S. C. Silk fibroin protein from mulberry and non-mulberry silkworms: cytotoxicity, biocompatibility and kinetics of L929 murine fibroblast adhesion. **J. Mater. Sci: Mater. Med**, v.9, n.8, p.2827-2836, 2008.

ADEKOGBE, I., GHANEM, A. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, p.7241–7250, 2005.

AMERICAN STANDARD TESTING AND MATERIAL. **ASTM D882-02**: Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, New York, 2002

AMERICAN STANDARD TESTING AND MATERIAL. **ASTM D883-08**: Standard Terminology Relating to Plastics. ASTM International. 1-Mar-2008.

AMERICAN STANDARD TESTING AND MATERIAL. **ASTM F813-01**: Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices. ASTM International. 10-Oct-2001.

ANDERSON, J. M. Biological responses to materials. **Annual Review of Materials Research**, v.31, p.81-110, 2001.

ANSETH, K. S. et al. In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v.78, p.199-209, 2002.

ANUSAVICE, K. J. **Phillips-Materiais Dentários**. 10.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1998. 412p.

ARVANITTOYANNIS, I. S. et al. Physico-chemical studies of chitosan-poly(vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. **Carbohydrate Polymers**, v.34, p.9-10, 1997.

ARVANITTOYANNIS, I. S. Totally and partially biodegradable polymer blends based on natural and synthetic macromolecules: preparation, physical properties, and potential as food packaging material. **J.M.S.-Rev. Macromol. Chem. Phys.**, v.39, n.2, p.205-271, 1999.

ATCC- American Type Culture Collection. Disponível em: (<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-81&Template=cellBiology>). Acesso em 03/11/2008.

BAHRAMI, S. B. et al. Poly(vinyl alcohol) – chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties. **Iranian Polymer Journal**, v.12, n.2, p.139-146, 2003.

BEANES, S. R. et al. Skin repair and scar formation: the central role of TGF- $\beta$ . **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.5, 2003. DOI: 10.1017/S1462399403005817

BEPPU, M. M., ARRUDA, E. J., SANTANA, C. S. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.9, n.4, p163-169, 1999.

Beppu, M.M., Vieira, R.S., Aimoli, C.G., Santana, C.C.. Crosslinking of Chitosan Membranes Using Glutaraldehyde: Effect on Ion Permeability and Water Absorption. **J. Membr. Sci.**, v.301, p.126-130, 2007.

BERGER, J. et al. Structure and interaction in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.35-52, 2004a.

BERGER, J. et al. Structure and interaction in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.19-34, 2004b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Subchefia de Assuntos Parlamentares. **EM nº 00083/GM/MS**. Brasília, 26-10-2005.

BRUGNEROTTO, J., LIZARDI, J., GOYCOOLEA, F.M., MONAL, W.A., DESBRIÈRES, J., RINAUDO, M. An Infrared Investigation in Relation with Chitin and Chitosan Characterization. **Polymer**, v.42, p.3569-3580, 2001.

BUNN, C.W. Crystal Structure of Polyvinyl Alcohol. **Nature**, v.16, p.929-930, 1948.

BURDICK, J.A., CHUNG, C., JIA, X., RANDOLPH, M.A., LANGER, R. Controlled Degradation and Mechanical Behavior of Photopolymerized Hyaluronic Acid Networks. **Biomacromolecules**, v.6, p.386-391, 2005.

BUTLER, D.L., GOLDSTEIN, S.A., GUILAK, F. Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics. **J. Biomech. Eng.**, v.122, p.570-575, 2000.

CALS-GRIERSON, M. M., ORMEROD, A. D. Nitric oxide function in the skin. **Nitric Oxide**, v.10, p.179-193, 2004.

CAMPOS, M. G. N., GROSSO, C. R. F., CÁDENAS, G., MEI, L. H. I. Effects of neutralization process on preparation and characterization of chitosan membranes for wound dressing. **Macromolecular Symposian**, v.229, p.253-257, 2005.

CÁRDENAS, G. et al. Polymeric films based on chitosan composites As skin substitutes: Animal and human Applications. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 8, 2005, São Paulo, **Anais...** São Paulo. 2005. p.1387-1388.

CARREÑO-GOMEZ, B., DUNCAN, R. Evaluation of biological properties of soluble chitosan and chitosan microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v.148, p.231-240, 1997.

CELANESE CHEMICALS. Poly(vinyl alcohol). Disponível em: ([http://www.celanese.com/index/productsmarkets\\_index/products\\_markets\\_pvoh/pvoh\\_products\\_properties.htm](http://www.celanese.com/index/productsmarkets_index/products_markets_pvoh/pvoh_products_properties.htm)). Acesso em 10/11/2008.

CERQUEIRA, N. F., YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico. Revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.

CERVERA, M. F. et al. Solid-state and mechanical properties of aqueous chitosan-amylose starch films plasticized polyols. **AAPS Pharm. Sci. Tech**, v.5, n.1, art.15, 2004.

CHAE, S. Y. et al. Influence of molecular weight on oral absorption of water soluble chitosans. **Journal of Controlled Release**, v.102, p.383-394, 2005.

CHATELET, C., DAMOUR, O., DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v.22, p.261-268, 2001.

CHEN, R. H., HWA, H. D. Effect of molecular weight of chitosan with the same degree of deacetylation on the thermal, mechanical, and permeability properties of the prepared membrane. **Carbohydrate Polymers**, v.29, p.353-358, 1996.

CHEN, Xi-Guang, et al. Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial. **Biochemical Engineering Journal**, V27, p.269-274, 2006a.

CHEN, R. H. et al. Development of N,O-(Carboxymethyl)chitosan/collagen matrixes as a wound dressing. **Biomacromolecules**, v.7, p.1058-1064, 2006b.

CHIELLINI, E., CORTI, A., SOLARO, R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based blown films under different environmental conditions. **Polymer Degradation and Stability**, v.64, p.305-312, 1999.

CHIELLINI, E., CINELLI, P., IMAM, S. H., MAO, L. Composite films based on biorelated agro-industrial waste and poly(vinyl alcohol). Preparation and mechanical properties characterization. **Biomacromolecules**, v.2, p.1029-1037, 2001.

CHIELLINI, E., CORTI, A., D'ANTONE, S., SOLARO, R. Biodegradation of poly(vinyl alcohol) based materials. **Progress in Polymer science**, v.28, p.963-1014, 2003.

CHO, J. D., LYOO, W. S., CHVALUN, S. N., BLACKWELL, J. X-ray analysis and molecular modeling of poly(vinyl alcohol)s with different stereoregularities. **Macromolecules**, v.32, p.6236-6241, 1999.

CHO, Y. W., HAN, S. S., KO, S. W. PVA containing chito-oligosaccharide side Chain. **Polymer**, v.41, p.2033-2039, 2000.

CHOI, B. K. et al. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against *Actinobacillus actinomycetecomitans* and *Streptococcus mutans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.18, p.553-557, .2001

CLAPER, J. D., SKEIE, J.M., MULLINS, R.F., GUYMON, C.A. Development and Characterization of Photopolymerizable Biodegradable Materials from PEG-PLA-PEG Block Macromonomers, **Polymer**, v.48, p.6554-6564, 2007.

CLARK, G.L., SMITH, A.F. X-Ray Diffraction Studies of Chitin, Chitosan, and Derivatives, **J. Phys. Chem.**, v.40, p.863-879, 1936.

CORRELO, V. M. et al. Water absorption and degradation characteristics of chitosan-based polyesters and hydroxyapatite composites. **Macromolecular Bioscience**, v.7, p.354-363, 2007.

COSTA, H. S. **Fabricação de biocerâmicas de matriz porosa com estrutura em alumina, recobrimento superficial de fosfato de cálcio e zinco incorporado à superfície**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2006. 135p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Ciência e Eng. de Materiais).

COSTA, H. S., ROCHA, M. F., ANDRADE, G. I., BARBOSA-STANCIOLI, E. F., PEREIRA, M. M., ORÉFICE, R. L., VASCONCELOS, W. L., MANSUR, H. S. Sol-gel Derived Composite from Bioactive Glass-Polyvinyl Alcohol. **J. Mater. Sci.**, v.43, p.494-502, 2008a.

COSTA, H.S., OLIVEIRA, A.A.R., ORÉFICE, R. L., MANSUR, H. S., PEREIRA, M. M. Tailoring Mechanical Behavior of PVA-Bioactive Glass Hybrid Foams. **Key Engineering Materials**, v.361, p.289-292, 2008b.

COSTA, H. S., MANSUR, A. A. P., BARBOSA-STANCIOLI, E. F., PEREIRA, M. M., MANSUR, H.S. Morphological, Mechanical and biocompatibility Characterization of Macroporous Alumina Scaffolds Coated with Calcium Phosphate/PVA. **J. Mater. Sci.**, v.43, p.510-524, 2008c.

COSTA JR., E. S., MANSUR, H. S. Syntesis and Carachterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogel films for skin tissue engineering application, In: International Symposium on Natural Polymer and Composites, 6, 2007, Gramado. **Anais...** Gramado: Associação Brasileira de Polímeros, 2007a.

COSTA JR., E. S., MANSUR, H. S. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blend Chemically Crosslinked by Glutaraldehyde for Tissue Engineering Application, In: Congresso Brasileiro de Polímeros, 9, 2007, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Associação Brasileira de Polímeros, 2007b.

COSTA JR., E. S., MANSUR, H.S. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) Reticulados Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v.31, n.6, p.1460-1466, 2008a.

COSTA JR, E. S., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PVA and chemically crosslinked. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 2008b. DOI 10.1007/s10856-008-3627-7

COSTA JR., E. S., BARBOSA-STANCIOLI, E.F., MANSUR, A. A. P., VASCONCELOS, W.L., MANSUR, H.S. Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Chemically Crosslinked Blends for Biomedical Applications. **Carbohydrate Polymer**, 2008c. Aceito

COURY, A. J. et al. Degradation of materials in biological environment. In: RATNER B. D. **Biomaterials Science**; An introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996. cap.6, p.243-281

COWIN, S.C. How Is a Tissue Built? **Journal of Biomechanical Engineering**, v.122, p.553-569, 2000.

CZAJA, W. et al. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. **Biomaterials**, v.27, p.145-151, 2006.

DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, 2005. 211p. (Tese, Doutorado em Engenharia Química, Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos).

DAVIS, K. A., ANSETH, K.S. Controlled Release from Crosslinked Degradable Networks. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.19, n.4-5, p.385-423, 2002.

DEMERLIS, C. C., SCHONEKER, D. R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.319-326, 2003.

DENG, C. M. et al. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrate Polymers**, v.69, p.583-589, 2007.

DHANIKULA, A. B., PANCHAGNULA, R. Development and characterization of biodegradable chitosan films for local delivery of paclitaxel. **The AAPS Journal**, v.6, n.3, art.27, 2004.

DON, T.M. et al. Preparation and characterization of chitosan-g-poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. **Carbohydrate Polymers**, v.63, p.331-339, 2006.

DRAGET, K. I. Associating phenomena in highly acetylated chitosan gels. **Polymer Gels and Networks**, v.4, p. 143-151, 1996.

DRURY, J.L., MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering: Scaffold Design Variables and Applications. **Biomaterials**, v.24, p.4337-4351, 2003.

DUNN, G. A., ZICHA, D. Dynamics of Fibroblast Spreading, **Journal of Cell Science**, v.108, p.1239-1249, 1995.

EFSA, Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission related to the use of polyvinyl alcohol as a coating agent for food supplements. **The EFSA Journal**, v.294, p.1-15, 2005.

FAKHRY et al. Chitosan supports the initial attachment and spreading of osteoblasts preferentially over fibroblasts. **Biomaterials**, v.25, p.2075-2079, 2004.

FALCÃO, M. L. C. **Síntese e caracterização de estruturas porosas de quitosana pela técnica de separação de fase para aplicações biomédicas**. Itajubá: Universidade Federal de Itajubá, 2003. 135p. (Dissertação, Mestrado em Materiais para Engenharia – Biomateriais).

FIGURA 3.10 – Divisões do tecido epitelial, Disponível em:  
<<http://www.saudeparavoce.com.br/pintanapele/histologia.htm>>. em 03/02/2006.

FRANK, S., KÄMPFER, H., WETZLER, C., PFEILSCHIFTER, J. Nitric oxide drives skin repair: Novel functions of an established mediator. **Kidney International**, v.61, p.882-888, 2002.

GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.43-54, 2006.

GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H. Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Microspheres for Controlled Release of Centchroman, **Carbohydrate Research**, v.342, p.2244-2252, 2007.

HAMILTON, V. et al. Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.17, p.1373-1381, 2006.S

HOLLISTER, S. J. Porous scaffold design for tissue engineering. **Nature materials**, v.4, p.518-590, 2005.

HSU, S. et al. Chitosan as scaffold materials: effects of molecular weight and degree of deacetylation. **Journal of Polymer Research**, v.11, p.141-147, 2004.

HUANG, Y. et al. *In vitro* characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v.26, p.7616-7627, 2005.

IWASAKI, N. et al. feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. **Biomacromolecules**, v.5, p.828-833, 2004.

JAYASEKARA, R. et al. Preparation, surface modification and characterization of solution cast starch PVA blended films. **Polymer Testing**, v.23, p.17-27, 2004

JIA, X. et al. Preparation and properties of poly(vinyl alcohol)/silica nanocomposites derived from copolymerization of vinyl silica nanoparticles and vinyl acetate. **Macromolecular Nanotechnology**, v.43, p.1123-1131, 2007.

JUNQUEIRA L. C. U., CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.  
JUNQUEIRA, 2004.

KELLY, C. M. et al. Subchronic toxicity study in rats and genotoxicity tests with polyvinyl alcohol. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p719-727, 2003.

KHAN, T. A. et al. Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluation of chitosan films for dressing. **J. Pharm. Pharmaceut. Sci.**, v.3, n.3, p.303-311, 2000.

KIM, B. S., MOONEY, D. J. Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering. **Tibtech**, v.16, p.224-230, 1998.

KIM, B., PEPPAS, N. A. Synthesis and characterization of pH-sensitive glycopolymers for oral drug delivery systems **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v.13, n.11, p.1271-1281, 2002.

KOBYASHI, S. et al. Synthesis of artificial chitin: irreversible catalytic behavior state analogue substrate. **J. Am. Chem. Soc.**, v.118, p.13113-13114, 1996.

KOIDE, S.S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutrition Research**, v.18, n.6, p.1091-1101, 1998.

KOKUBO, T.; KUSHITANI, H.; SAKKA, S.; KITSUGI, T.; YAMAMURO, T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W. **J. Biomed. Mater. Res.**, v.24(6), p.721-734, 1990.

KONG, L. et al. A study on the bioactivity of chitosan/nano-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. **European Polymer Journal**, v.42, p.3171-3179, 2006.

KOYANO, T. et al. Surface states of PVA/chitosan blended hydrogels. **Polymer**, v.41, p.4461-4465, 2000.

KRAJEWSKA, Bárbara. Application of chitin-and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126–139, 2004.

KRISCHEL, V., BRUCH-GERHARZ, D., SUSCHEK, C., KRÖNCKE, K., RUZICKA, T., KOLB-BACHOFEN, V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. **J. Invest. Dermatol.** v.111, p.286-291, 1998.

KUMAR, M.N.V.R. MUZZARELLI, R.A.A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A.J. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. **Chemical Reviews**, v.104, n.12, p.6017-6084, 2004.

KURITA, K. Chemistry and application of chitin and chitosan. **Polymer Degradation and Stability**, v.59, p.117-120, 1998.

LABAT, B. CHEPDA T., J. Frey, RIEU J., AURELLE J., DOUET M., ALEXANDRE C., CHAMSON A. Practice of testing bench to study the effects of cyclic stretching on osteoblast-orthopaedic ceramic interactions. **Biomaterials**, v.21, p.1275-1281, 2000.

LAVIK, E. B., KLASSEN, H., WARFVINGE, K., LANGER, R., YOUNG, M. J. Fabrication of Degradable Polymer Scaffold to Direct the Integration and Differentiation of Retinal Progenitors. **Biomaterials**, v.26, p.3187-3196, 2005.

LEE, Y. M. et al. Pervaporation of water-ethanol through poly(vinyl alcohol) chitosan blend membrane. **Polymer Bulletin**, v.29, p.423-429, 1992.

LEE, Y. M., KIM, S. H., KIM, S. J. Preparation and characteristics of  $\beta$ -chitin and poly(vinyl alcohol) blend. **Polymer**, v.37, n.26, p.5897-5905, 1996.

LEE, W. F., YEH, Y. C. Studies on preparation and properties of NIPAAm/hydrophobic monomer copolymeric hydrogels. **European Polymer Journal**, v.41, p.2488-2495, 2005.

LEMONS, J.E. Ceramics: past, present, and future. **Bone**, v.19, n.1 supplement, p.121-128, 1996.

LI, Z., et al. Chitosan-alginate scaffolds for *in vitro* bone tissue regeneration. **Materials research society**, v.873E, p.K8.2.1-K8.2.6, 2005.

LI, J., DU, Y., LIANG, H. Influence of molecular parameters on the degradation of chitosan by a commercial enzyme. **Polymer degradation and Stability**, v.92, p.515-524, 2007.

LIMA, I. S. **Quitosanas e quitosanas química e morfológicamente modificadas com anidrido succínico – propriedades, adsorção e termoquímica.** Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2005. 145f. (Tese, Doutorado em Química Inorgânica,).

LIN, W.C. e. al. Blood compatibility of novel poly( $\gamma$ -glutamic acid)/poly(vinyl alcohol) hydrogels. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.47, p.43-49, 2006.

LIU, L. S. et al. Controlled of interleukin-2 for tumor immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres. **Journal of Controlled Release**, v.43, p.65-74, 1997.

LIU, W. G. et al. A chitosan-arginine conjugate as a novel anticoagulation biomaterial. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15, p.1199-1203, 2004.

LIU, H. et al. Porous poly(DL-lactic acid) modified chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomaterial Applications**, v.19, p.303-322, 2005.

MA, L. et al. Collagen/chitosana porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. **Biomaterials**, v.24, p.4833-4841, 2003.

MANSUR, H. S. et al. Characterization of poly(vinyl alcohol)/poly(ethylene glycol) hydrogels and pva-derived hybrids by small-angle x-ray scattering and ftir spectroscopy. **Polymer**, v.45, p.7193-7202, 2004.

MANSUR, A. A. P., MANSUR, H. Estimativa do grau de hidrólise do PVA através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier; In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 8, 2005, Águas de Lindóia. **Anais...**São Paulo: Associação Brasileira de Polímeros, 2005a, p.349-350.

MANSUR, A. A. P., OLIVEIRA, F., MANSUR, H. Influência do grau de hidrólise e da massa molar na cristalinidade do PVAL; In: CONGRESSO BRASILEIRO DE POLÍMEROS, 8, 2005, Águas de Lindóia. **Anais...**São Paulo: Associação Brasileira de Polímeros, 2005b, p.307-308.

MANSUR, H. S. Técnicas de caracterização de materiais. In: ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro; Cultura Médica, 2006. cap. 6, p.187-235.

MANSUR, H. S., SADAHIRA, C.M, SOUZA, A., MANSUR, A. A. P. FTIR spectroscopy characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. **Material Science and Engineering C**, v.28, p.539-548, 2007a.

MANSUR, A. A. P. **Mecanismo físico-químico de aderência na interface argamassa modificada com polímeros/cerâmica de revestimento**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2007b. 365p. (Tese, Doutorado em Engenharia Metalúrgica, Ciência e Eng. de Materiais).

MANSUR, H. S., COSTA, H.S. Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly(vinyl alcohol).chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications. **Chemical Engineering Journal**, v.137,p.72-83, 2008.

MAZEAU, K.; WINTER, W. T.; CHANZY, H. Molecular and crystal structure of a high-temperature polymorph of chitosan from electron diffraction data. **Macromolecules**, v.27, p.7606-7612, 1994.

McDONOUGH, L. A. **Microscopy and spectroscopy of water uptake in polymer photoresists**. Colorado: University of Colorado, 2004. 150p. (Tese, Doctor of Philosophy, Department of Chemistry and Biochemistry).

MEI, L. H. I. Polímeros biodegradáveis. In: ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M., MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro; Cultura Médica, 2006. cap. 6, p.175-184.

MESQUITA, I. C. **Lesão muscular induzido por bupivacaína em linhagens de camundongos predispostos a perfil distinto de citocinas**. Niterói: Instituto de Biologia da Universidade Federal Fluminense, 2007. 102p. (Dissertação, Mestrado em Neuroimunologia, Imunologia).

MI, F. L. et al. **The study of gelation, kinetics and chain-relaxation properties of glutaraldehyde cross-linked chitosan gel and their effect on microspheres preparation and drug release**. v.41, p.389-396, 2000 apud GUPTA, K.C., JABRAIL, F.H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymers**, v.66, p.43-54, 2006.

MINGYU, C. et al. Surface modification and characterization of chitosan film blends with poly-L-lysine. **Journal of Biomaterials Application**, v.19, p.59-75, 2004.

MINOURA, et al. Preparation, properties, and cell attachment/growth behavior of PVA/chitosan-blended hydrogels. **Materials Science and Engineering C**, v.6, p.275-280, 1998.

MONTEIRO JÚNIOR, O. A. C., **Preparação química e calorimétrica do biopolímero Quitosana**. Campinas: Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, 1999. 128f. (Tese, Doutorado em química).

MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan-based dietary foods. **Carbohydrate Polymers**, v.29, p.309-316, 1996.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, p.131-140, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. et al. *In vivo* and *in vitro* biodegradation of oxychitin-chitosan and oxypullulan-chitosan complexes. **Carbohydrate Polymers**, v.48, p.15-21, 2002.

NAKANO, Y. et al. Structure and mechanical properties of chitosan/poly(vinyl alcohol) blend films. **Macromol. Symp.**, v.258, p.63-81, 2007.

NEAMNARK, A. et al. *In vitro* biocompatibility of electrospun hexanoyl chitosan fibrous scaffolds towards human keratinocytes and fibroblasts. **European Polymer Journal**, v.44, p.2060-2067, 2008.

NETO, C. G. T. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, v.340, p.2630-2636, 2005.

NOCEK, J. E., ENGLISH, J. E. *In situ* degradation kinetics: evaluation of rate determination procedure. **J. Dairy Sci.**, v.69, p.77-87, 1985.

NOUSIAINEM, P. et al. Functional hybrid fibers of cellulose/microcrystalline chitosan. I. Manufacture of viscose/microcrystalline chitosan fibers. **Journal of Applied Polymer Science**, v.76, p.1725-1730, 2000.

OGAWA, K. Effect of heating an aqueous suspension of chitosan on the crystallinity and polymorphs. **Agric. Biol. Chem.**, v.55, n.9, p.2375-2379, 1991.

OGAWA, K. et al. Dependence on the preparation procedure of the polymorphism and crystallinity of chitosan membranes. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v.56, n.6, p.858-862, 1992.

OGAWA, K. et al. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.34, p.1-8, 2004.

OHYA, Y. et al. Graft polymerization of styrene on chitosan and the characteristics of the copolymers. **J.M.S.-Pure Appl.Chem.**, v.A36, n.3, p.339-353, 1999.

OKUYAMA, K. et al. Structural study of anhydrous tendon chitosan obtained via chitosan/acetic acid complex. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.285-293, 1999.

OREFICE, R. L. et al. *In vitro* bioactivity of polymer matrices reinforced with a bioactive glass phase. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.11, n.11, p.78-85, 2000.

OREFICE, R. L. et al. *In situ* evaluation of polymerization kinetics and corresponding evolution of the mechanical properties of dental composites. **Polymer testing**, v.22, p.77-81, 2003.

PAILLER-MATTEI, C., BEC, S., ZAHOUANI, H. *In vitro* measurements of the elastic mechanical properties of human skin by indentation tests. **Medical Engineering & Physics**, v.30, p.599-606, 2008.

PANEVA, D. et al. Degradation of chitosan in the presence of poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) by a crude enzyme complex from *trichoderma viride*. **e-Polymers**, v.19, p.1-9, 2003.

PEPPAS, N.A. Preface: Hydrogels in medicine and pharmacy, in: N.A. PEPPAS (Ed.), *Fundamentals*, v.1 CRC Press, 1986 apud BERGER, J. et al. Structure and interaction in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57, p.35-52, 2004.

PEPPAS, N. A., SAHLIN, J. J. Hydrogels as muoadhesive and bioadhesive materials: a review. **Biomaterials**, v.17, p.1553-1561, 1996.

PEPPAS, N. A., MONGIA, N. K. Ultrapure poly(vinyl alcohol) hydrogels with mucoadhesive drug delivery characteristics, **European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.43, p.51-58, 1997.

PEPPAS, N. A, et. al. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.50, p.27-46, 2000.

PRASHANTH, K. V. H, THARANATHAN, R. N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential-an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.117-131, 2007.

QUEIROZ, A. A. A., FERRAZ, H. G., ABRAHAM, G.A., FERNANDEZ, M. M., BRAVO, A. L., ROMÁN, J. S. Development of new hydroactive dressings based on chitosan membranes: characterization and *in vivo* behavior. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.64, p. 147-154, 2003.

QURESHI, A. A. et al. Langerhans cells express inducible nitric oxide synthase and produce nitric oxide. **The Journal of Investigative Dermatology**, v.107, n.6, 1996.

RAMOS, Rozenir **Análise histológica da integração da matriz de regeneração dérmica ao organismo. Estudo experimental em ratos.** Florianópolis: Ciências Médicas da Universidade Federal de Santa Catarina, 2004. 61p. (Dissertação, Mestrado em Ciências Médicas).

RANDAL, V. T., NUGENT, M. A. Biological response to a synthetic cornea. **Journal of Controlled Release**, v.53, p.205-214, 1998.

RAO, P. S. et al. Preparation and performance of poly(vinyl alcohol)/polyethyleneimine blend membranes for the dehydration of 1,4-dioxane by pervaporation: comparison with glutaraldehyde cross-linked membranes. **Separation and Purification Technology**, v.48, p.244-254, 2006.

RAO, P. S. et al. Pervaporative Separation of ethylene glycol/water mixtures by using cross-linked chitosan membranes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.46, p.2155-2163, 2007.

RATAJSKA, M., BORYNIEC, S. Physical and chemical aspects of biodegradation of natural polymers. **Reactive & Functional Polymers**, v.38, p. 35-49, 1998.

RATNER, B. D. Characterization of biomaterial surfaces. **Cardiovasc. Pathol.**, v.2, n.3, p.87s-100s, 1993.

RATNER, B. D. et al. **Biomaterials science**; An introduction to materials in medicine. San Diego: Academic Press, 1996. 494p.

RICCIARDI, R. et al. X-ray diffraction analysis of poly(vinyl alcohol) hydrogels, obtained by freezing and thawing techniques. 2004.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: properties and application. **Prog. Polym. Sci.**, v.31, p.603-632, 2006.

RODAS, A. C. D., **Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos**, São Paulo: Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares Autarquia associada à Universidade de São Paulo, 2004. 149p. (Tese, Doutorado em Ciências, Tecnologia Nuclear-Aplicações).

RODWELL, D. E. et al. Effects of polyvinyl alcohol administered in the diet to rats on fertility, early embryonic development, growth and development. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.729-737, 2003.

ROGERO, S. O. et al. **Toxicologia in vitro**. v.14, n.6, p.497-504, 2000 apud ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p.317-320, 2003.

ROKHADE, A. P. et al. Synthesis and characterization of semi-interpenetrating polymer network microspheres of acrylamide grafted dextran and chitosan for controlled release of acyclovir. **Carbohydrate Polymer**, v.67, p.605-613, 2007.

ROSA, D. S., FRANCO, B. L. M., CALIL, M. R. Biodegradability and mechanical properties of polymeric mixtures. **Polímeros**, v.11, n.2, p.82-88, 2001.

ROSA, D. S. et al. Avaliação da biodegradação de poli- $\beta$ -(hidroxibutirato), poli- $\beta$ -(hidroxibutirato-co-valerato) e poli- $\epsilon$ -(caprolactona) em solo compostado. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.12, n.4, p.311-317, 2002.

SADAHIRA, C. M. S. **Síntese, caracterização e avaliação do perfil de liberação in vitro de hidrogéis do álcool polivinílico pH sensíveis processados por métodos físico-químicos**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2007. 87p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica, Ciência e Eng. de Materiais)

SANO, H. et al. Effect of molecular mass and degree of deacetylation of chitosan on adsorption of *streptococcus sobrinus* 6715 to saliva treated hydroxyapatite. **Bull. Tokyo dent coll.**, v.43, n.2, p.75-82, 2002.

SANTOS, Jane L. **Determinantes moleculares da sensibilidade diferencial de IFN- $\gamma$  e LPS ou TNF- $\alpha$  para produção de óxido nítrico por macrófagos de**

**camundongos C57BL/6 e BALB/c**. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2002, 124f. (Tese, Doutorado em Bioquímica e Imunologia).

SANTOS, José E. **Preparação, caracterização e estudos termoanalíticos de bases de Schiff biopoliméricas e seus complexos de cobre**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 112f. (Tese, Doutorado em Química analítica).

SANTOS, C. et al. Acetylation and molecular mass effects on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. **European Polymer Journal**, v.42, p.3277-3285, 2006.

SAPALIDIS, A. A. et al. Preparation and characterization of novel poly-(vinyl alcohol)-*Zostera* flakes composites for packaging applications. **Composites: Part B**, v.38, p.398-404, 2007.

SARASAM, A. R. Antibacterial activity of chitosan-based matrices on oral pathogens. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v.19, p.1083-1090, 2008.

SCHIMIDT, R. **Topical delivery of  $\alpha$ 1-antichymotrypsin for wound healing**, München: Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians – Universität München, 2005. 192f. (Thesis, Doctor in Pharmaceutical Technology).

SEAL, B.L., OTERO, T.C., PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Material Science and Engineering**, v. 34, p.147-230, 2001.

SHE, H. XIAO, X., LIU, R. Preparation and characterization of polycaprolactone-chitosan composites for tissue engineering applications. **J. Mater. Sci.**, 2007. DOI 10.1007/s10853-007-1706-7

SHERIDAN, R. L., TOMPKINS, R.G. Skin substitutes in burns. **Burns**, v.25, p.97-103, 1999.

SHIBAYAMA, M. UESAKA, M. Swelling/shrinking kinetics of chemically cross-linked poly(vinyl alcohol) gels in the presence of borate ions. **J. Chem. Phys.**, v.105, n.10, p.4350-4357, 1996.

SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.18, p.237-242, 1996.

SHIROSAKI et al. In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes. **Biomaterials**, v.26, p.485-493, 2005.

SHIROSAKI et al. Synthesis and cytocompatibility of porous chitosan-silicate hybrids for tissue engineering scaffold application. **Chemical Engineering Journal**, v.137, p. 122-128, 2008.

SILVA, R. M. Preparation and characterization in simulated body conditions of glutaraldehyde crosslinked chitosan membranes. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.15, p.1105-1112, 2004.

SILVA et al. Functional nanostructured chitosan–siloxane hybrids. **Journal of Materials Chemistry**, v.15. p.3952-3961, 2005.

SMITH et al. Effect of Chitosan on Epithelial Cell Tight Junctions. **Pharmaceutical research**, v.21, n.1, p.43-49, 2004.

SOLOMONS, T. W., FRYHLE, C.B. **Química orgânica**. Tradução Robsom Mendes Matos et al. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, v.2., 2006.

SPERLING, L. H. **Introduction to physical polymer science**. 3. ed. Pennsylvania: Wiley Interscience, 2001. 671 p.

STALLMEYER, B., KÄMPFER, H., KOLB, N., PFEILSCHIFTER, J., FRANK, S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. **J. Invest. Dermatol.**, v.113, p.1090-1098, 1999.

SUH, J. K. F., MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. **Biomaterials**, v.21, p.2589-2598, 2000.

SUZUKI, D. et al. Comparison of various mixtures of *b*-chitin and chitosan as a scaffold for three-dimensional culture of rabbit chondrocytes, **J Mater Sci: Mater Med**, v.19, p.1307–1315, 2008.

TA et al. Injectable chitosan hydrogels for localized cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v.126, p.205-216, 2008.

Tabela de energias de ligação.  
<http://www.cem.msu.edu/~reusch/OrgPage/bndenrgy.htm> Acesso em 21/10/008

TAKAHASHI, T. IMAI, M. SUZUKI, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. **Biochemical Engineering Journal**, v.36 , p.43–48, 2007.

TAKASU, A. et al. Accelerated biodegradation of poly(vinyl alcohol) by a glycosidation of the hydroxyl groups. **Polymer**, v.43, p.227-231, 2008.

TAN, S.C. et al. The degree of deacetylation of quitosana: advocating the fist derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v. 45, p. 713-719, 1998.

TANG, Y. F. et al. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v.67, p.491–499, 2007.

TIGH, R. S. et al. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. **J Mater Sci: Mater Med**, v.18, p.1665–1674, 2007

TOLAIMATE, A. et al. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v.41, p.2463–2469, 2000.

TONG, X. et al. Swelling and mechanical behaviors of carbon nanotube/poly (vinyl alcohol) hybrid hydrogels. **Materials Letters**, v.61, p.1704–1706, 2007.

TORRES, M. A. et al. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n.4, p.306-312, 2005.

TRUNG, T. S. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. **Bioresource Technology**, v.97, p.659–663, 2006.

VACHOUD, L., DOMARD, A. Physicochemical properties of physical chitin hydrogels: modeling and relation with the mechanical properties. **Biomacromolecules**, v.2, p.1294-1300, 2001.

VARSHNEY, L. Role of natural polysaccharides in radiation formation of PVA–hydrogel wound dressing. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B** v.255, p.343–349, 2007.

VISTICA, D. T. et al. Tetrazolium-based assays for cellular viability: a critical examination of selected parameters affecting formazan production. **Cancer Research**, v.51, p.2515-2520, 1991.

WANG, T, et al. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable quitosana-poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v.53, p.911-918, 2004.

WEI, W. et al. Bioprocess of uniform-sized crosslinked chitosan microspheres in rats following oral administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.69, p.878–886, 2008.

WENLING, et al. Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and schwann cell affinity of chitosan films. **Journal of Biomaterials Applications**, v.20, p.157-177, 2005.

WILLIAMS, D.F. biocompatibility: performance in the surgical reconstruction of man, interdisciplinary. Science Reviews, v.15, p.20-33, 1990 apud RICH, Jaana. **In vitro characterization of bioresorbable polymers and composites for drug delivery and bone replacement**. 2002. 47f. Tese (Doutorado) Chemical Technology, Helsinki University of Technology, Espoo, 26 set. 2002.

WILLIAMS, D. F. To engineer is to create: the link between engineering and regeneration. **Trends In Biotechnology**, v.24, n.1, p.4-8, 2006.

WU, G. J. TSAI, G. J. Chitooligosaccharides in combination with interferon- $\gamma$  increase nitric oxide production via nuclear factor- $\kappa$ B activation in murine RAW264.7 macrophages. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.250–258, 2007.

WU, T., ZIVANOVIC, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v.73, p.248–253, 2008.

WULF, H. C. Et al. Skin aging and natural photoprotection. **Micron**, v.35, p.185–191, 2004.

XIA, Z., TRIFFITT, J.T. A review on macrophage responses to biomaterials. **Biomed. Mater.**, v.1, p.R1–R9, 2006.

XU, J. et al. Chitosan Film Acylation and Effects on Biodegradability. **Macromolecules**, v.29, p.3436-3440, 1996.

XU, F. et al. Skin biothermomechanics for medical treatments. **Journal of The Mechanical Behavior of Biomedical Materials**. v.1, p.172-187, 2008.

YAMANE, S. et al. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. **Biomaterial**, v.26, p.611-619, 2005.

YILMAZ, E., ERDENIZCI, N., YILMAZ, O. Miscibility of chitosan and poly(ethylene oxide) in dilute solution. **International Journal of Polymer Analysis and Characterization**, v.8, p.327-338, 2003.

ZENG, X., RUCKENSTEIN E. Control of pore sizes in macroporous chitosan and chitin membranes. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v.35, p.4169-4175, 1996.

ZHANG, H., NEAU S. H. In vitro degradation of chitosan by a commercial enzyme preparation: effect of molecular weight and degree of deacetylation. **Biomaterials**, v.22, p.1653-1658, 2001

ZHANG, Y. et al. Preparation of electrospun chitosan/poly(vinyl alcohol) membranes. **Colloid. Polym. Sci.**, v.285, p.855-863, 2007.

ZHU, X. et al. Enhancement of the mechanical and biological properties of a biomembrane for tissue engineering the ocular surface. **Annals Academy of Medicine**, v.35, n.3, p.210-214, 2006.

ZIVANOVIC, S. et al. Physical, mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. **Biomacromolecules**, v.8, p.1505-1510, 2007.