

Universidade Federal de Minas Gerais

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Tese de Doutorado

**“Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes
biocompatíveis de Quitosana-PVA”**

Autora: Viviane Mota Bispo

Orientador: Prof. Herman Sander Mansur
Dezembro /2009

Universidade Federal de Minas Gerais

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Viviane Mota Bispo

**“Estudo do Efeito da Reticulação por Genipin em suportes
biocompatíveis de Quitosana-PVA”**

**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

2009

Dedico esta dissertação a Deus,
minha paz, minha felicidade,
fonte de luz e de toda a graça,
verdadeiro bem. Em quem
sempre confio.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido Éder D. Oliveira por todo amor demonstrado, todo carinho e apoio. Por ser esta pessoa maravilha que traz muita alegria ao meu coração.

Ao Professor Herman Mansur pela orientação, oportunidade e por ser esta pessoa que procura sempre fazer o melhor.

Aos meus pais, Sueli e José Bispo por me proporcionaram muito afeto.

Aos meus irmãos pela amizade.

À meus amigos que fizeram minha vida repleta de contentamento.

A Alexandra Mansur por colaborar nessas pesquisas.

SUMÁRIO

| | | |
|--------------------------|--|-----------|
| <i>Lista de Figuras</i> | | vi |
| <i>Lista de Tabelas</i> | | xi |
| <i>Lista de Notações</i> | | xii |
| <i>Resumo</i> | | xv |
| <i>Abstract</i> | | xvi |
| 1 | Introdução | 1 |
| 2 | Objetivo | 5 |
| 2.1 | Objetivo Principal | 5 |
| 2.2 | Objetivos Específicos | 5 |
| 3 | Revisão Bibliográfica | 7 |
| 3.1 | Biopolímeros para Aplicações Biomédicas | 7 |
| 3.1.1 | Quitosana | 12 |
| 3.1.2 | Poli(Álcool Vinílico) | 15 |
| 3.2. | Blendas | 19 |
| 3.3 | Modificação de Biopolímeros ou Blendas | 21 |
| 3.3.1 | Formação da Estrutura Reticulada | 21 |
| 3.3.2 | Hidrogéis | 24 |
| 3.3.3. | Agente Reticulante Natural: Genipin | 25 |
| 3.4 | Aplicações de Biopolímeros | 29 |
| 3.4.1 | Suporte para Crescimento de Tecidos | 29 |
| 3.4.2 | Requisitos e Características Gerais | 31 |
| 3.4.3 | Filmes para Pele Artificial e suas Características | 34 |
| 3.5 | Estrutura do Tegumento (Pele) | 38 |
| 3.5.1 | Epiderme | 38 |
| 3.5.2 | Derme | 41 |
| 3.5.3 | Tecido Subcutâneo | 41 |
| 3.6 | A Cicatrização | 42 |
| 4 | Procedimento Experimental | 45 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.1 | Etapas de Desenvolvimento do Trabalho | 45 |
| 4.2 | Materiais | 47 |
| 4.21 | Caracterização das Matérias Primas | 47 |
| 4.3 | Preparação dos Filmes de Hidrogel por Evaporação de Solvente | 48 |
| 4.3.1 | Caracterização dos Filmes de Hidrogel | 50 |
| 4.3.1.1 | Caracterização Físico Química | 50 |
| 4.3.1.2 | Comportamento Mecânico | 50 |
| 4.3.1.3 | Grau de Intumescimento | 51 |
| 4.3.1.4 | Ângulo de Contato | 53 |
| 4.3.1.5 | Viabilidade de Células Vero <i>In Vitro</i> por Mtt | 53 |
| 4.3.1.6 | Adesão de Células Vero | 55 |
| 5 | Resultados e Discussão | 56 |
| 5.1 | Caracterização dos Materiais: Quitosana e PVA | 56 |
| 5.1.1 | Espectroscopia na Região do Infravermelho | 56 |
| 5.2 | Caracterização dos Filmes de Hidrogel | 61 |
| 5.2.1 | Avaliação Qualitativa | 61 |
| 5.2.2 | Caracterização dos Filmes Espectroscopia na Região do Infravermelho | 67 |
| 5.2.3 | Grau de Intumescimento | 75 |
| 5.2.4 | Ensaio Mecânico | 83 |
| 5.2.5 | Determinação do Ângulo de Contato | 91 |
| 5.5 | Quitosana / PVA Citocompatibilidade Ensaio com Culturas de Células Vero | 92 |
| 5.6 | Biocompatibilidade através do Ensaio de Adesão Celular e Espalhamento | 97 |
| 6 | Conclusão | 106 |
| 7 | Contribuições Originais ao Conhecimento | 108 |
| 8 | Trabalhos Futuros | 109 |
| | Referências | 110 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| FIGURA 3.1 | Planta gardênia (a) Flor da gardênia (b) Folhas da gardênia (c) Fruta da gardênia (d) Fruta da gardênia no estágio inicial (e) Flores da gardênia | 26 |
| FIGURA 3.2 | Fórmula estrutural do genipin. | 27 |
| FIGURA 3.3 | Lesões revestidas para cicatrização e lesões abertas | 37 |
| FIGURA 3.4 | Estrutura do tegumento. | 40 |
| FIGURA 3.5 | Estrutura da pele e o tecido subcutâneo | 42 |
| FIGURA 4.1. | Fluxograma das etapas do trabalho | 46 |
| FIGURA 5.1 | Fórmulas estruturais de (a) quitosana, (b)genipin e (c) PVA. | 57 |
| FIGURA 5.2 | Espectro de FTIR de quitosana com grau de desacetilação calculado em 80%. | 58 |
| FIGURA 5.3 | Espectro de FTIR de PVA com grau de hidrólise de 80%. | 60 |
| FIGURA 5.4 | Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (a) PVA (1:0:0); (b) quitosana (0:1:0); (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0.5); (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1); (e) PVA/Qui/Ge (1:1:0.5;) e (f) PVA/qui/Ge (1:1:1) fundo branco. | 62 |
| FIGURA 5.5 | Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (g) PVA (3:1:0); (h) quiitosana (3:1:0,5); (i) PVA/Qui/Ge (3:1:1) fundo branco. | 63 |
| FIGURA 5.6 | Intermediários formados na reação de genipin com grupamentos amina | 65 |

| | | |
|---------------------|---|----|
| FIGURA 5.7 | Intensidade das bandas dos filmes de quitosana; (a) filme de quitosana sem reticulante, (b) filme 0.5% de genipin com quitosana e (c) filme 1% de genipin com quitosana. | 68 |
| FIGURA 5.8 | Intensidade das bandas das amidas formadas pela reação de genipin cm quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes. | 69 |
| FIGURA 5.9 | Intensidade das bandas das amins formadas pela reação de genipin cm quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes. | 69 |
| FIGURA 5.10 | Reações de grupos amins de polímeros como quitosana com genipin. | 70 |
| FIGURA 5.11 | Blendas de quitosana e PVA sem reticulação PVA/Qui/Ge | 71 |
| FIGURA 5.12. | Blendas de quitosana e PVA com reticulação PVA/Qui/Ge. | 72 |
| FIGURA 5.13 | Intensidade das bandas das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$). | 73 |
| FIGURA 5.14 | Intensidade das bandas das amins formadas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana. | 74 |
| FIGURA 5.15 | Intensidade das bandas de acetato formadas pela reação hidrolítica entre PVA e o meio ácido da solução de genipin nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$). | 74 |

| | | |
|--------------------|--|----|
| FIGURA 5.16 | Blendas PVA / Qui / Ge a) 1:0:0 b) 1:0:0.5 c) 1:0:1. | 75 |
| FIGURA 5.17 | Grau de intumescimento de quitosana sem reticulante | 76 |
| FIGURA 5.18 | Efeito do teor de quitosana nas blendas sem reticulação | 79 |
| FIGURE 5.19 | Efeito do grau de intumescimento de blendas de PVA /Quit (3:1) sem reticulante | 82 |
| FIGURA 5.20 | Efeito da taxa de intumescimento de blendas de PVA /Quit (3:1) | 82 |
| FIGURA 5.21 | Tensão x deformação dos filmes | 84 |
| FIGURA 5.22 | A influência da concentração de quitosana na tensão máxima dos filmes | 85 |
| FIGURA 5.23 | Gráfico da influência da concentração do reticulante na tensão máxima de tração dos filmes PVA/Qui/Ge (0:1:0) com 0% genipin (a) e PVA/Qui/Ge (0:1:1) com 1% de genipin (b). | 86 |
| FIGURA 5.24 | A formação de aglomerados nos filmes de quitosana e PVA. | 90 |
| FIGURA 5.25 | Ângulo de contato em relação ao teor de quitosana nos filmes. | 91 |
| FIGURA 5.26 | Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) (0:1:0); (b) (1:0:0) (1:3:0,5); (c) (1:1:0), (d) (1:3:0),(e) (3:1:0) | 93 |
| FIGURA 5.27 | Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) Ge (a) (0:1:1); (b) (1:0:1) (1:3:1); (c) (1:1:1), (d) (1:3:1),(e) (3:1:1) | 93 |
| FIGURA 5.28 | Registro por MET de MTT do filme de quitosana (a) (0:1:0) sem genipin (b) (0:1:1) com genipin(100x). | 95 |

| | | |
|--------------------|--|-----|
| FIGURA 5.29 | Registro por MET de MTT do filme de PVA (a) (1:0:0) sem genipin (b) (1:0:1) com genipin 100x | 95 |
| FIGURA 5.30 | Registro por MET de MTT do filme de PVA (a) (1:1:0) sem genipin (b) (1:1:1) com genipin 100x. | 96 |
| FIGURA 5.31 | Viabilidade e disseminação de células do ensaio de biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada por células VERO semeado em matrizes de quitosana reticuladas sem genipin(a) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 250x; (b) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 400x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 800x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 1500x | 98 |
| FIGURA 5.32 | Viabilidade e disseminação de células do ensaio de biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada por células VERO semeado em matrizes de quitosana reticuladas com genipin (a) PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 500x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 2000x. | 99 |
| FIGURA 5.33 | Viabilidade e de disseminação de células VERO do ensaio de biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada por células VERO semeado em matrizes de PVA/Qui/Ge sem genipin(a) (1:3:0) aumento de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:0) aumento de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (1:3:0) aumento de 2000x. | 100 |

- FIGURA 5.34** Viabilidade e de disseminação de células VERO do 101
ensaio de biocompatibilidade para a viabilidade das
células foi realizada por células VERO semeado em
matrizes de PVA/Qui/Ge com genipin(a) (1:3:0) aumento
de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:1) aumento de 500x (c)
PVA/Qui/Ge (1:3:1) aumento de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge
(1:3:1) aumento de 2000x.
- FIGURA 5.35** Viabilidade e de disseminação de células VERO do 102
ensaio de biocompatibilidade para a viabilidade das
células foi realizada por células VERO semeado em
matrizes de PVA/Qui/Ge sem genipin (a) (3:1:0) aumento
de 100x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:0) aumento de 800x (c)
PVA/Qui/Ge (3:1:0) aumento de 1000x e (d) PVA/Qui/Ge
(3:1:0) aumento de 2500x.
- FIGURA 5.36** Viabilidade e de disseminação de células VERO do 103
ensaio de biocompatibilidade para a viabilidade das
células foi realizada por células VERO semeado em
matrizes de PVA/Qui/Ge (a) 1% Genipin (3:1:1) aumento
de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:1) aumento de 500x (c)
PVA/Qui/Ge (3:1:1) aumento de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge
(3:1:1) aumento de 2500x.

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| TABELA 3.1 | Grupos característicos no infravermelho para a quitosana | 15 |
| TABELA 3.2 | Grupos característicos no infravermelho do PVA | 18 |
| TABELA 3.2 | Grupos característicos do genipin por FTIR | 29 |
| TABELA 4.1 | Filmes produzidos | 49 |
| TABELA 4.2 | Concentração iônica das soluções de PBS, SBF, Plasma Sanguíneo e TRIS | 52 |
| TABELA 5.1 | Os principais grupos funcionais envolvidos nas transições vibracionais no infravermelho da quitosana encontradas no espectro da Figura 5.2. | 59 |
| TABELA 5.2 | Com as principais grupos funcionais do PVA representados no espectro da Figura 5.3. | 60 |
| TABELA 5.3 | Avaliação visual das blendas | 64 |
| TABELA 5.4 | Tensão máxima (MPa) e desvio padrão(dp) | 89 |
| TABELA 5.5 | Deformação total (elástica e plástica) (%) e desvio padrão | 89 |
| TABELA 5.6 | Módulo de elasticidade e desvio padrão | 89 |

LISTA DE NOTAÇÕES

| | |
|------|---|
| 3D | Tridimensional |
| ASTM | <i>American Society Testing and Materials</i> |
| ATR | Attenuated total reflection |
| C | Colágeno |
| CC | Controle celular |
| cP | Centipoise |
| DE | Deformação específica |
| DH | Grau de hidrólise |
| DMF | Dimetilformamida |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| E | Módulo de elasticidade |
| FDA | Food and Drug Administration |
| FTIR | Fourier Transform Infrared Spectroscopy |
| GAG | Glicosaminoglicano |
| GD | Grau de desacetilação |
| Ge | Genipin |
| GI | Grau de intumescimento |

| | |
|------------|---|
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LTI | Tiisocianato de lisina |
| M.M | Massa molar |
| MEM | Mínimo eagle medium |
| MEV | Microscopia eletrônica de varredura |
| mi | Massa intumescida |
| ms | Massa seca |
| MTT | brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio |
| n | Número de amostras |
| PBS | (Phosphate buffered saline) – Tampão fosfato salino |
| PEG | Poli(etilenoglicol) |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pKa | Constante de acidez |
| PMN | Leucócitos polimorfonucleares |
| PVA | Poli (álcool vinílico) |
| PVA/Qui/Ge | PVA/ Quitosana/Ge |
| PVAc | Poli(acetato de vinila) |
| PVP | Polivinil pirrolidona |
| PVP-I | Polivinilpirrolidona Iodo |
| Qui | Quitosana |
| SBF | Simulated body fluid – Fluido corporal simulado |
| SDS | Dodecil sulfato Sodio |
| SFB | Soro fetal bovino |
| T | Temperatura |
| t | Tempo |

| | |
|---------------|---|
| UV | Ultravioleta |
| V | Volume |
| VERO | Linhagem celular oriunda de rim de macaco verde africano |
| X | Proporção de PVA na blenda |
| Y | Proporção de quitosana na blenda |
| Z | Proporção de genipin em relação a massa total de polímero |
| α | Absorção |
| δ | modo vibracional de dobramento |
| θ | Ângulo de contato |
| μm | Micrometro |
| ν | modo vibracional de estiramento |
| σ | Tensão de tração |

RESUMO

O tegumento humano, mais conhecido como pele, é formado por camadas distintas, unidas entre si. As suas principais funções são a proteção dos tecidos subjacentes, a regulação da temperatura somática e ainda contém terminações nervosas sensitivas. Este órgão está sujeito aos mais diversos tipos de solicitações e lesões provocadas por agentes físicos e químicos. Por sua importância, a pele vem sendo alvo de inúmeras pesquisas no sentido de compreender suas propriedades e produzir materiais que melhorem e acelerem o processo reparo.

O mercado mundial apresenta um crescimento em relação à demanda por biomateriais para tratamento epitelial. Isto ocorre, em parte, por causa dos riscos decorrentes de xenoinxertos e aloinxertos. Portanto, este trabalho objetivou o estudo de membranas de PVA e quitosana com e sem reticulação de genipin. O genipin foi escolhido como agente de reticulação pois é um reticulante natural, que vem se mostrando promissor em inúmeras pesquisas para desenvolvimento de biomateriais. Foram investigados os parâmetros para a preparação dos filmes e suas características físico-químicas, propriedades mecânicas e sua biocompatibilidade.

Os filmes produzidos neste trabalho, apresentaram resultados promissores para a preparação de biomateriais substituintes do tecido epitelial. Os materiais apresentaram resistência a tração compatível com os valores do tecido epitelial e biocompatibilidade necessária para biomateriais.

ABSTRACT

The human integument, known as skin, is made up of distinct layers, joined to each other. Its main functions are to protect the underlying tissues, regulate body temperature, and uphold somatic nerve endings. This human organ is subject to several types of effort and injuries caused by physical and chemical agents. By its importance, the skin has been the subject of many studies aimed at understanding their properties and produce materials that improve and speed its healing process.

The world market is growing due the demand for biomaterials to treat epithelial or skin wounds. This is partially because of the risk from xenografts and allografts. Thus, the goal of this work was to study membranes of PVA and chitosan with and without crosslinking of genipin. The genipin was chosen as the crosslinking agent because it is a natural crosslinker which has been showing promising in many studies for developing biomaterials. We examined the parameters to prepare the films and their physical and chemical characteristics, mechanical properties and their biocompatibility.

The films produced in this study showed promising results for preparing biomaterial substitutes of epithelial tissue. The materials presented tensile strength compatible with the values of epithelial tissue and biocompatibility necessary for biomaterials.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Os biomateriais vêm ganhando relevância e proporcionando a geração de inúmeras pesquisas com diversos tipos de substâncias. O grande destaque em tratamentos com estes materiais, no mundo todo, tem ocorrido principalmente por causa do sucesso que vêm conferindo às respostas terapêuticas. Estima-se que existam cerca de 300.000 produtos denominados de biomateriais são utilizados na área de saúde. Anualmente, nos Estados Unidos da América cerca de 5.000.000 de implantes são necessários e mais de 3.000.000 são solicitados anualmente na Europa. Calcula-se que o mercado mundial para biomateriais movimente aproximadamente 35 bilhões de dólares todo ano. Além disso, este mercado apresenta crescimento de 11% ao ano, o que demonstra a grande necessidade por este tipo de produto. Embora sejam largamente empregados, ainda precisam ser aperfeiçoados para fins terapêuticos. Isto se torna evidente quando se faz um paralelo entre o desempenho dos biomateriais com o dos órgãos ou partes do corpo que eles devem substituir. Porém, os biomateriais melhoram significativamente a qualidade de vida de milhões de pessoas, que de outra forma, estariam condenadas às limitações no desempenho de atividades ou até mesmo, em última análise, à morte (Nilson *et al.*, 2003; Soares, 2005; Onuki *et al.*, 2008).

A finalidade de alguns biomateriais é o de crescimento de tecidos e a ocorrência do desenvolvimento deste se deve tanto às características genéticas das células quanto do material de suporte onde ocorre seu desenvolvimento. Para que o suporte tenha aplicação prática alguns requisitos devem ser levados em consideração como permeabilidade a água, afinidade a proteínas, biodegradabilidade, disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com tecido vivo e para modificações químicas, hidrofília, capacidade de promover o desenvolvimento tissular e facilidade no preparo (Bispo, 2004; Buckley e O’Kelly, 2004; Costa JR. e Mansur *et al.*, 2009).

Atualmente, no estudo das matrizes para crescimento de tecidos, o foco tem-se concentrado, entre os vários parâmetros citados, na biodegradação do material, já que esse

fator influenciará a resposta celular imediata. Para a biodegradação controlada, torna-se preponderante o entendimento de fatores como a proliferação celular e a porosidade do material, visto que estes a influenciam grandemente. O progresso do crescimento de tecidos depende então de estruturas adequadas para os arranjos tridimensionais das células, requerendo, portanto, a síntese de materiais apropriados. A estrutura define formas para o tecido em crescimento e até guia a sua formação (Lenza *et al.*, 2002; Silva, 2007).

Suportes para o crescimento de tecidos têm sido produzidos de vários materiais. A escolha de um ou mais polímeros como componentes de um biomaterial é importante, levando-se em consideração principalmente, as propriedades finais requeridas. Muitas pesquisas foram desenvolvidas com polímeros sintéticos, especialmente sobre o poli(álcool vinílico) (PVA). O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia, quando na forma de uma membrana, é biocompatível e biologicamente inerte. O PVA é um polímero obtido por polimerização do acetato de vinila, seguido pela reação de hidrólise do poli(acetato de vinila) (PVAc) em Poli(álcool vinílico - co-acetato de vinila) (PVA). A relação existente entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total de acetatos é o grau de hidrólise (DH) do PVA. O grau de hidrólise é importante para caracterizar as propriedades dos polímeros que irão influenciar a citocompatibilidade. Um aumento do DH resulta também em queda da solubilidade em água e aumento da viscosidade e resistência à tração. O PVA não é mutagênico, nem citotóxico e não tem atividade carcinogênica (Sung *et al.*, 1999; Berger *et al.*, 2004; Isenberg e Wong, 2006; Costa JR. e Mansur, 2007).

A quitosana também tem ganhado importância como um polímero constituinte de matrizes para o desenvolvimento de tecidos. A quitosana tem sido objeto de vários estudos devido as suas diversas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, afinidade notável às proteínas, aceleração na recuperação de lesões, diminuição do colesterol no sangue, hemostática, além de suas características bacteriostáticas e fungicidas (Sung *et al.*, 1999; Kaihara *et al.*, 2000; Shen *et al.*, 2000; Mao e Zhao, 2003; Berger *et al.*, 2004; Shin *et al.*, 2004; Isenberg e Wong, 2006; Li *et al.*, 2009). Todas estas características tornam a quitosana adequada para uso em matrizes para a engenharia de tecidos. No

entanto, existem propriedades de difícil controle, tais como propriedades mecânicas. Sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas principalmente para aplicação em bandagens. Por isso, a utilização da quitosana em blendas é uma forma para controlar e melhorar as propriedades requeridas. Uma outra forma de aperfeiçoar essas propriedades é o uso de substâncias chamadas agentes reticuladores. Estes reticuladores irão reagir com os polímeros formando redes com maior estabilidade para o material. Entre os reticuladores, o glutaraldeído tem sido amplamente utilizado. No entanto, esta substância tem efeitos citotóxicos. Num trabalho de Sung e colaboradores (Sung *et al.*, 1999), constataram que genipin é um reticulante 10.000 vezes menos citotóxico do que o glutaraldeído. As propriedades mecânicas de filmes de quitosana foram melhoradas com genipin. Genipin, que é encontrada na tradicional medicina chinesa e faz parte de inúmeros trabalhos científicos na área de saúde, é extraído da fruta da Gardênia. O genipin é comumente usado para reagir com amino ácidos. Este reagente natural, dado a sua baixa citotoxicidade, é uma substância que pode ser usada para preparação de filmes e matrizes para o desenvolvimento de células e tecidos (Sung *et al.*, 1999; Kuijpers *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2003; Bigi *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2004; Lima, 2005; Craecker *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2006; Darea *et al.*, 2009; Mansur *et al.*, 2009).

As pesquisas para a elaboração de materiais biocompatíveis, que serão utilizados para a regeneração de pele, são importantes para aprimorar o tratamento de pacientes no mundo todo. Como o maior órgão do corpo, a pele é exposta a agentes químicos, físicos e biológicos de diversos tipos (Craecker *et al.*, 2008). O trauma à pele pode ser causado por agentes químicos, físicos, energia térmica, elétrica, nuclear, entre outras. Doenças como diabetes, que diminuem a circulação sanguínea, também causam sérias lesões ao tegumento. Cerca de 2,6 milhões de pacientes, anualmente, são acometidos por lesões da pele com difícil cicatrização somente nos Estados Unidos. Cerca de 1,5 milhões de lesões são relacionadas a queimaduras (Sung *et al.*, 1998; Kaihara *et al.*, 2000; Shen *et al.* 2000; Seal *et al.*, 2001; Mao e Zhao, 2003; Shin *et al.*, 2003; Berger *et al.*, 2004; Isenberg e Wong, 2006; Costa JR., 2008; Li *et al.*, 2009).

Estima-se que no Brasil, em 2001, aconteceram cerca de 1.000.000 acidentes por queimadura (Seal *et al.*, 2001). Para grandes queimaduras, o transplante de pele é indicado. O procedimento de retirada e o processamento de pele para o transplante, são técnicas utilizadas pela rede pública de saúde na atualidade. Além de diminuir o sofrimento dos pacientes, é uma terapia que pode aumentar a sobrevida. Estes tratamentos ganham maior importância pelo fato de as queimaduras extensas serem muito prevalentes em crianças (Seal *et al.*, 2001; Costa JR., 2008; Ministério da Saúde, 2009).

A evolução dos tratamentos médicos depende do desenvolvimento dos biomateriais. Polímeros como quitosana e PVA, por apresentarem várias propriedades apropriadas para a produção de suporte de desenvolvimento de tecido epitelial, vêm sendo modificados e pesquisados. O controle das propriedades dessas blendas pode ser conseguido por alterações nas concentrações dos polímeros e por reticulação com agentes como genipin. O genipin é alvo de várias pesquisas como agente de reticulação para biomateriais. Sendo um reticulante natural e de baixa citotoxicidade, pode ser utilizado para integrar produtos que modulem o crescimento tecidual. Para o tratamento de lesões cutâneas, como queimaduras ou diabetes que exigem um número elevado de intervenções, o suporte contribuiria para o aumento da qualidade de vida do paciente, diminuindo o período de internação e diminuindo o custo global da terapia (Sung *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 1999; Butler e Pudney, 2003; Jin *et al.*, 2004, Onuki *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de blendas biocompatíveis de PVA e quitosana modificadas por reticulação com genipin para utilização potencial como tecido epitelial artificial. A produção das blendas de quitosana e PVA, com o agente de reticulação genipin, visa melhorar as propriedades destes materiais e aprimorar o entendimento do processo envolvido na fabricação das blendas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterização das matérias primas: quitosana e PVA através de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.
2. Utilizar o agente químico reticulante genipin para a formação das blendas de quitosana e PVA.
3. Definir os parâmetros de síntese, como proporção de polímeros e concentração de reticulante, para a produção das blendas de quitosana e PVA, usando evaporação de solvente.
4. Caracterização das blendas obtidas por análises físico-químicas e por ensaios de propriedades mecânicas para avaliação das características dos materiais.
5. Avaliação da biocompatibilidade por ensaios biológicos do material, por brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e espalhamento celular.

6. Avaliar o intumescimento e a hidroflicidade através de ensaio de absorção de solvente, *in vitro* do substrato suporte em solução de fosfato tampão (PBS).

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOPOLÍMEROS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Os biomateriais podem ser definidos como sendo todos os materiais destinados a possuir uma interface com os sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo. Assim, os biomateriais podem ser uma substância ou uma mistura de substâncias produzidas por interação física ou por reações químicas, que atuam nos sistemas biológicos (tecidos, órgãos) parcial ou totalmente podendo ser de origem natural ou sintética (Galletti e Brecher, 1962; Edmunds, 1985; Ratner *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2009).

Outra propriedade complementar e essencial para a ciência dos biomateriais, é a biocompatibilidade, que pode ser definida como a capacidade do material ter uma resposta apropriada numa aplicação específica, minimizando reações alérgicas, inflamatórias ou tóxicas, quando em contato com os tecidos vivos ou fluidos orgânicos. A biocompatibilidade compreende as interações dos tecidos humanos e fluidos, incluindo sangue, com um implante ou material. As interações podem ser da ação do material no corpo ou do meio fisiológico sobre o material. Um biomaterial deve ser biocompatível numa aplicação específica, assim, as especificações da biocompatibilidade devem incluir as condições de utilização (Galletti e Brecher, 1962; Akutsu, 1972; Edmunds, 1985; Ratner *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009).

Polímeros têm sido empregados em biomateriais (produtos que atuam no sistema biológico) devido às várias características que apresentam e que os tornam muitas vezes essenciais para desempenhar funções específicas nestes materiais. Dentre suas características importantes, apresentam-se as propriedades físico-químicas, sua versatilidade estrutural, que permite adequá-los a cada aplicação específica, baixo custo de fabricação de dispositivos, a diversidade de polímeros sintéticos e naturais, a relativa facilidade de

obtenção. Estas propriedades os tornam de grande valor em aplicações biomédicas. Existe ainda a possibilidade de alterar um ou outro grupamento químico pertencente à arquitetura macromolecular das cadeias, para viabilizar, por exemplo, o estabelecimento de alguma interação específica entre o biomaterial e o tecido hospedeiro. Além de serem funcionalmente ativos, ou seja, cumprirem com sucesso suas funções dentro do corpo, os polímeros usados como biomateriais devem ser biocompatíveis (Galletti e Brecher, 1962; Akutsu, 1972; Edmunds, 1985; Oréfice *et al.*, 2005; Ratner *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009).

A biocompatibilidade de polímeros envolve normalmente quatro fenômenos: processos de concentração de biomacromoléculas junto à superfície dos materiais (adsorção), logo após a implantação destes no corpo; resposta local do tecido à presença do biomaterial (observada na forma de respostas inflamatórias e imunológicas); efeito do ambiente corpóreo no material que pode ser visualizado, por exemplo, pelo estabelecimento de processos de degradação do polímero; resposta do corpo como um todo à presença do biomaterial que pode ser percebida através do aparecimento de tumores, alergias, imperfeições generalizadas, etc (Jin *et al.*, 2004; Ratner *et al.*, 2005; Darea *et al.*, 2009).

Todo tipo de material provoca algum tipo de resposta por parte do tecido anfitrião. Polímeros tradicionalmente usados em implantes para terapias, como o polietileno, poli (tereftalato de etileno) e o silicone, que são sintéticos, quando inseridos no corpo, provocam uma reação inflamatória que é resolvida através do encapsulamento do material por uma camada fibrosa rica em colágeno. A espessura da camada, em geral, é reduzida, mas depende das condições de implantação, forma de implante e procedimentos cirúrgicos (Sharma, 2001; Hondurilla *et al.*, 2002; Orban *et al.*, 2002; Ratner *et al.*, 2005).

Mais recentemente, alterações químicas nos polímeros têm sido propostas visando permitir maior adesão entre células e tecidos e a superfície dos polímeros. Tais alterações incluem a inserção de grupos peptídeos na superfície dos materiais, pois estes grupos seriam reconhecidos por células que seriam fixadas e estimuladas a expressarem sinais químicos capazes de provocar migração, diferenciação e reprodução celular (Mikos *et al.*, 1993; Ignácio *et al.*, 2002; Oréfice *et al.*, 2005). Em outras estratégias, fatores de crescimento e

outros mediadores celulares seriam incorporados nos polímeros e depois liberados durante a implantação (Mikos *et al.*, 1993; Carvalho *et al.*, 2001; Ayres, 2002; Nuttelman *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2009; Darea *et al.*, 2009).

Os polímeros biodegradáveis são aqueles que apresentam uma redução da massa molar quando em contato com o ambiente corpóreo. A degradação pode ser vista como um conjunto de processos, estimulados por agentes externos, que levam a modificações da estrutura dos polímeros, as quais trarão alterações também nas propriedades do material. As degradações podem ser originadas tanto da atuação de entidades biológicas como de células, microorganismos, enzimas, como do ataque de espécies iônicas, radicais livres ou água. Em meio biológico, as formas mais comuns de degradação são a hidrólise e a degradação por enzimas. A degradação por enzimas pode ser altamente variável de pessoa para pessoa, pois os níveis enzimáticos podem diferir bastante. Os polímeros biodegradáveis tem sido extensivamente pesquisados e utilizados em materiais, visto que não precisam ser removidos e não causam indesejáveis efeitos em longo prazo. Existem várias aplicações para estes tipos de biopolímeros: suturas, dispositivos para liberação de fármacos, fixação de dispositivos ortopédicos, vasos sanguíneos temporários e matriz para engenharia de tecidos. Eles devem ser um meio adequado para o crescimento dos tecidos, guiando a resposta tissular, favorecendo a fixação e proliferação celular e controlando a resposta inflamatória e imunológica (Mikos *et al.*, 1993; Anseth *et al.*, 2002; Boccafoschi *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009, Darea *et al.*, 2009).

A escolha de um determinado polímero biodegradável, para a produção de um material, deve levar em conta o tipo de degradação ao qual o mesmo é mais susceptível. Na escolha de um determinado polímero, o mecanismo degradativo de escolha deveria ser preferencialmente a hidrólise, já que todos os indivíduos possuem água em excesso no organismo (Langer, 2004). Caso a degradação não seja controlada e não prevista, esses processos podem causar comprometimentos no desempenho do biomaterial (Langer, 2004, Ratner, 2005, Chan *et al.*, 2009):

1. Aumento da duração dos processos inflamatórios

2. Alteração dimensional dos dispositivos
3. Redução das propriedades mecânicas
4. Produção de produtos de massa molar tóxicos e móveis, etc.

Existem várias situações onde materiais são projetados para biodegradarem, ou seja, exibirem alterações controladas em sua estrutura que acabem por reduzir a massa do material. Polímeros biodegradáveis são programados especialmente para se degradar quando expostos a ambientes corpóreos, através de mecanismos físico-químicos e biológicos (Ratner *et al.*, 2005; Darea *et al.*, 2009). Os sinais mais comuns deste fenômeno são a deterioração das propriedades mecânicas, alteração da cor e outras propriedades ópticas. A degradação pode ser originada por causas físicas (térmica, mecânica, ou radiação) ou por causas químicas (oxidação, hidrólise ou ozonólise) (Langer, 2004, Ratner *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009).

Pesquisadores, no mundo todo, estudam os polímeros naturais derivados de proteínas e vegetais, que são processados e usados em aplicações biomédicas. Apesar de haver também inúmeros estudos com polímeros sintéticos, os polímeros naturais tem ganhado grande destaque em pesquisas recentes. O colágeno, por exemplo, depois de purificado é usado em implantes cardiovasculares e como matriz para crescimento de tecidos. A celulose modificada é utilizada na imobilização e desenvolvimento de células e a quitosana também vem sendo utilizada para matrizes de engenharia de tecido. Isto se dá porque muitos destes polímeros naturais tem conseguido aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos (Anseth *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2002; Boccafoschi *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009; Darea *et al.*, 2009).

Os polímeros sintéticos também são alvo de vários trabalhos que visam a fabricação de biomateriais. Como a produção de filmes e espumas de poliuretano. As espumas de poliuretano são altamente porosas, biodegradáveis, permitem a infiltração celular e

formação de tecido novo, degrada-se a produtos não-citotóxico, e provocam inflamação mínima. São elastoméricos e podem promover o contato profundo com os limites da ferida. Filmes de poliuretano também são estudados e existem de várias tipos. Alguns desses filmes existem no mercado na espessura de 0,2 mm, sendo semipermeáveis, flexíveis, com fácil adaptação aos contornos do corpo. Entretanto só podem ser utilizados em ferimentos superficiais (Lee *et al.*, 2001; Hafeman *et al.*, 2008).

Na técnica de preparação de espuma de poliuretano, por exemplo, utiliza-se um pré-polímero de isocianato, como o tolueno diisocianato ou tiisocianato de lisina (LTI) e um poliálcool como o polietileno glicol (Lee *et al.*, 2001; Hafeman *et al.*, 2008). Na aplicação desta técnica, geralmente as espumas são formadas por meio da mistura de soluções de agentes surfactantes. Os agentes surfactantes são os responsáveis pela formação da espuma atuando na diminuição da tensão superficial da solução, o que favorece o surgimento da interface água-ar. Os agentes surfactantes podem ter diferentes estruturas químicas, entretanto os surfactantes iônicos (aniônicos e catiônicos) são os que apresentam características mais indicadas para a produção de espumas estáveis. Exemplos de agentes surfactantes são os catiônicos (quaternário de amônio com cadeia alquílica linear ou com cadeia ramificada) e aniônicos (uma olefina sulfonada e um alquil benzeno sulfonado) (Lee *et al.*, 2001; Salvini *et al.*, 2006; Hafeman *et al.*, 2008).

Outro polímero sintético muito estudado para aplicação em biomateriais é o PVA. O PVA é a resina sintética de maior produção no mundo. Possui boas características mecânicas, como sua maleabilidade. Tem sido utilizado como adesivo, emulsificante, na indústria de papel e tintas, na obtenção de membranas anfífilas. Dentre suas aplicações, destaca-se sua utilização em biomateriais. Tem sido aplicado como carreador de medicamentos, devido sua não citotoxicidade. Em aplicações médicas também tem sido usado na produção de córnea sintética, gel para liberação de drogas, matriz para desenvolvimentos tissular. Em cosméticos tem sido produzido como filme e usado como agente surfactante. O PVA pode ser moldado de diversas formas, é solúvel em água, de preparo fácil, não sendo utilizados monômeros tóxicos como ocorre com a preparação do poliuretano, não é carcinogênico,

nem antigênico, o que justifica a possibilidade de seu uso em biomateriais (Berger *et al.*, 2004; Isenberg e Wong, 2006; Costa *et al.*, 2008).

3.1.1 QUITOSANA

Dentre os polímeros naturais, a quitosana é citada na literatura para a produção de materiais terapêuticos. Quitosana vem sendo extensivamente pesquisada porque possui características que a faz apropriada para uma grande variedade de aplicações. A quitosana é um polímero produzido à partir da quitina. A quitina é de origem natural e renovável, encontrada no exoesqueleto de artrópodes. Estas propriedades fazem a quitosana apropriada para ser utilizada em um grande número de aplicações biomédicas, incluindo pele artificial, regeneração de tecidos e sistema de liberação controlada de medicamentos. Entretanto, suas propriedades mecânicas ainda não são controláveis. Como resultado disso, a aplicação de quitosana como um material biomédico está limitada a determinadas áreas. Mas, apesar disso, a quitosana possui outras propriedades importantes como ser biodegradável e biocompatível. Além disso, ela é formada por unidades contendo acetilglicosamino e unidades com N-glicosamino que reagem com agentes reticulantes para produzir uma estrutura interconectada com propriedades diferenciadas e muitas vezes melhoradas no material final. Em relação à solubilidade, a quitosana é solúvel em soluções aquosas diluídas, contendo ácidos orgânicos e inorgânicos (Campana e Signini, 2001; Butler e Pudney, 2003).

A quitosana, que ocorre de forma natural em alguns fungos, é geralmente obtida pela desacetilação da quitina (existente em crustáceos), polissacarídeo encontrado abundantemente na natureza e que constitui os exoesqueletos de insetos e crustáceos. A desacetilação da quitina raramente é completa, pois quitosana é obtida quando a extensão da reação atinge cerca de 60% (ou mais) e o prolongamento da reação, que gera produtos mais completamente desacetilados, também provoca severa degradação das cadeias poliméricas. Assim, condições muito severas de reação tais como as empregadas na desacetilação da quitina por fusão alcalina ou o emprego de soluções alcalinas concentradas, por tempos prolongados e à temperaturas elevadas são evitadas quando o

objetivo é a obtenção de quitosana de massa molar elevada. A prática industrial mais comum, e que também é bastante empregada em laboratórios de pesquisa, é aquela na qual a desacetilação da quitina é realizada em suspensão de solução aquosa de hidróxido de sódio, sendo que a concentração dessa solução, o excesso de álcali, o tempo e a temperatura da reação são variáveis, conforme o procedimento adotado. Entretanto, é reconhecido que os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características das quitosanas obtidas são a temperatura, o tempo de reação, a concentração da solução de álcali, a adição de diluente (alcoóis de cadeia curta e cetonas são empregados), a razão quitina/álcali, o tamanho das partículas de quitina, a atmosfera da reação e a presença de agentes que evitem a despolimerização (Campana e Signini, 2001).

Na preparação de soluções de quitosana, deve-se observar não somente o grau médio de desacetilação, mas também a distribuição dos grupos acetil, além da massa molar do polímero. A análise da protonação da quitosana na presença de ácidos e seus efeitos sobre a sua solubilidade mostraram que o grau de ionização depende do pH e do pK do ácido. A solubilização de quitosana, com alto grau de desacetilação e grau de ionização médio em torno de 0,5, em solução aquosa diluída de ácido clorídrico, resulta geralmente em uma solução com um pH entre 4,5 e 5 (Rinaudo e Domard, 1989).

Devido às suas propriedades, quitosana vem sendo utilizada em medicina. A quitosana permite o sangue coagular rapidamente, e ganhou aprovação recentemente nos EUA para uso em bandagens e outros agentes hemostáticos. Quitosana purificada do exoesqueleto de camarão é usada em um produto hemostático feito por *Medtrade Biopolymers Inc.* O produto reduz perda de sangue em comparação à gaze e aumenta a sobrevivência do paciente. Estes produtos foram vendidos ao Exército dos Estados Unidos o qual já fez uso das bandagens. A quitosana é hipoalergênica, e tem propriedades antibacterianas naturais. Entre as aplicações, vem sendo utilizada também em membranas de hemodiálise (Marconi *et al.*, 1997; Rinaudo e Domard, 1989; Sohn *et al.*, 2009).

A quitosana também é utilizada em suportes para a imobilização de enzimas as quais são produzidos à base de quitina e quitosana na forma de pós, flocos ou géis de diferentes

configurações geométricas. Os pós e flocos de quitina e quitosana estão disponíveis como produtos comerciais da Sigma-Aldrich, Fluka, Polymar, entre outros. Quitosana em pastilha gel (quitopérolas) é produzida pela Fuji Spinning Co. Ltd. (Tóquio, Japão). Géis de quitosana são fáceis de fabricar pelo fato de a mesma dissolver prontamente em soluções diluídas da maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético, tartárico e ácidos cítricos, formando soluções viscosas, que se precipitam com o aumento do pH ou pela formação de complexos ionotrópicos insolúveis em água a partir da adição de polieletrólitos aniônicos. Desse modo, podem ser fabricados géis de quitosana na forma de membranas, matrizes, cápsulas, fibras e esponjas (Marconi *et al*, 1997; Campana e Signini, 2001).

Alguns trabalhos científicos tentaram melhorar as propriedades mecânicas da quitosana. A modificação das propriedades mecânicas pode ocorrer por meio da formação da reticulação ou ligações cruzadas. A ligação cruzada ou reticulação pode melhorar as propriedades físicas de polímeros. A mistura de quitosana e poli(óxido de polietileno) (C₂H₄O)_n, por exemplo, podem também melhorar as propriedades mecânicas (Campana e Signini, 2001).

A Tabela 3.1 apresenta as vibrações (encontradas pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier) correspondentes aos principais grupos químicos da quitosana, conforme descrito na literatura (Lima, 2005; Lin *et al.*, 2006; Costa JR., 2008).

TABELA 3.1 - Grupos característicos no infravermelho para a quitosana (Lima, 2005; Lin *et al.*, 2006; Costa JR., 2008)

| Material | Bandas (cm ⁻¹) | Função | Grupos Associados |
|----------|----------------------------|-----------------------------|--|
| Qui | 890 | Alcanos e Amina | C-N: v e C-C: v |
| Qui | 1154 e 896 | Anel sacarídeo | C-O-C: v |
| Qui | 1260 | Amina (secundária) | C-N: v |
| Qui | 1321 | Amina (primária) | C-N: v |
| Qui | 1340-1250 e 1379 | Amina (terciária) | C-N: δ |
| Qui | 1406 | Alcanos ligados a Carbonila | -CH ₂ -C=O |
| Qui | 1465 e 1423 | Alcoóis e alcanos | O-H: δ e CH ₂ : δ |
| Qui | 1570-1515 | Amina | N-H: δ |
| Qui | 1658-1630 | Amina | N-H: δ |
| Qui | 2878 | Alcano | C-H v (simétrico): v |
| Qui | 2955-2845 | Alcano | C-H (assimétrico): v |
| Qui | 3000-3200 | Amina | -NH:v |
| Qui | 3570-3100 | Álcool | OH ligado: v |

3.1.2. POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)

Conforme mencionado anteriormente, poli(álcool vinílico) (PVA) é uma resina sintética, solúvel em água, de maior produção em volume no mundo. Foi obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Haehnel (Marten, 1985), a partir da hidrólise do poli (acetato de vinila), e é a forma de obtenção comercial utilizada até hoje. Em 1961, Staudinger pesquisou a transformação reversível entre o poli(álcool vinílico) e o poli(acetato de vinila) por meio das reações de esterificação e saponificação (Marten, 1985).

As propriedades do poli (álcool vinílico) estão relacionadas ao grau de polimerização e ao grau de hidrólise. Por causa de suas propriedades, o PVA tem sido utilizado em um grande número de aplicações industriais. Este polímero é um excelente adesivo, possui boa resistência a solventes, óleos e graxas e sua resistência à passagem de oxigênio é superior a de qualquer polímero conhecido (Marten, 1985). É um dos poucos polímeros semicristalinos solúveis em água, e apresenta boas características interfaciais e mecânicas. O PVA tem sido usado em processamento de papel e fibras e como estabilizante de emulsão, além de ser importante como matéria-prima para filmes (Marten, 1985; Okaya *et al.*, 1999; Isenberg e Wong, 2006).

O PVA tem sido amplamente usado como fibras em aplicações na indústria têxtil, como protetor de colóide na indústria de papel (Okaya *et al.*, 1999), na obtenção de membranas anfífilas para imobilização de enzimas (Aranha e Lucas, 2001) e na obtenção do poli(vinil butiral) (Marten, 1985; Liu *et al.*, 1997; Batyrbekov *et al.*, 1998; Okaya *et al.*, 1999; Aranha e Lucas, 2001; Isenberg e Wong, 2006). Em estudos recentes, o PVA tem sido utilizado como carreador de medicamento, devido às suas propriedades de degradabilidade e não toxicidade (Costa JR., 2008; Basaki e Adhikari, 2009; Schwall e Banerjee, 2009).

O grande número de aplicações do PVA levou conseqüentemente a uma variedade de produtos comerciais. Estes produtos são classificados, quanto ao grau de hidrólise, em parcialmente hidrolisados e completamente hidrolisados; e quanto ao grau de polimerização, em baixa viscosidade (5 cP ou menor), média viscosidade (20-30 cP) e alta viscosidade (40-50 cP) (Finch, 1973; Mansur *et al.*, 2007; Mansur e Mansur, 2009).

Quanto à solubilidade, o poli (álcool vinílico) é solúvel em solventes altamente polares e hidrófilos, tais como acetamida, glicóis, dimetilsulfóxido (DMSO), dimetilformamida (DMF), sendo a água o melhor solvente. As soluções de PVA em misturas DMSO-água são instáveis e tornam-se túrbidas em repouso. Usando-se 3g/L de PVA em DMSO-água (6:4) a 30°C, a taxa de crescimento da turvação é proporcional ao grau de polimerização e é dependente da regularidade estrutural do PVA. A solubilidade em água depende do grau

hidrólise, do grau de polimerização e da temperatura da solução (Finch, 1973; Liu *et al.*, 1997; Isenberg e Wong, 2006).

Além disso, o efeito da temperatura na solubilidade está associado à quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogênio são rompidas diminuindo-se as forças intra- e intermoleculares no polímero e com isso, a solubilidade aumenta. Por outro lado, o aumento da temperatura pode quebrar também as ligações de hidrogênio com a água, diminuindo a solubilidade (Liu *et al.*, 1997, Oliveira *et al.*, 2002). O PVA 98% hidrolisado, a solubilidade aumenta com a diminuição do grau de polimerização. Para o PVA parcialmente hidrolisado (88%), a solubilidade é relativamente independente do grau de polimerização. Para o PVA 80% hidrolisado, a solubilidade a baixa temperatura é muito maior que para o 88% hidrolisado, mas decresce rapidamente a partir de 30°C (Liu *et al.*, 1997; Okaya *et al.*, 1999; Isenberg e Wong, 2006).

A hidrólise reduz o número de grupamentos acetato nos polímeros. Os grupos acetato e hidroxila, existentes no PVA, são relacionados a bandas características que podem ser verificados por espectroscopia de infravermelho. As vibrações correspondentes aos grupos químicos principais do PVA encontram-se descritas na literatura e são listadas na Tabela 3.2 (Aranha e Lucas, 2001; Mansur, 2007; Mansur *et al.*, 2007; Costa JR., 2008):

TABELA 3.2 - Grupos característicos no infravermelho do PVA (Mansur, 2007; Costa JR., 2008).

| Material. | Bandas (cm^{-1}) | Função | Grupos Associados |
|-----------|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| PVA | 842 | Alcano | (C-C): ν |
| PVA | 922 | Alcano | (CH) – CH ₂ : δ |
| PVA | 995 | Álcool primário | (C-OH): δ |
| PVA | 1019 | Acetato e Alcano | (C-O/C-C): ν |
| PVA | 1084 | Acetato | (C-O): ν |
| PVA | 1254 | Acetato | (C-O): ν |
| PVA | 1142-1144 | Acetato e Álcool | (C-O) / δ (OH): ν |
| PVA | 1084 | Acetato | (C-O): ν |
| PVA | 1329 | Alcoóis secundários | C-OH: δ |
| PVA | 1366 | Alcanos | CH – R-CH ₃ : δ |
| PVA | 1461 – 1417 | Alcanos | (CH) – CH ₂ : δ |
| PVA | 1650 – 1630 | Álcool | OH: δ |
| PVA | 1750 – 1712 | Acetato | C=O: ν |
| PVA | 2937 – 2870 | Alcano | (CH): ν |
| PVA | 3550 – 3200 | Alcoóis primários, secundários, terciários e aromáticos | (OH)-R ... OH: ν |

3.2. BLENIDAS

Blendas poliméricas por definição são misturas físicas de homopolímeros ou copolímeros com diferentes estruturas químicas. No equilíbrio, uma mistura de dois polímeros deve existir como uma simples fase, segmentos intimamente misturados dos dois componentes. Esta blenda então é dita ser homogênea do ponto de vista microscópico e é considerada miscível do ponto de vista da termodinâmica. Quando uma mistura de polímeros separa-se em duas fases distintas cada uma com seus respectivos componentes individuais, esta blenda é dita heterogênea do ponto de vista microscópico e é considerada imiscível do ponto de vista da termodinâmica. Assim, em uma mistura polimérica miscível, a existência de interações entre as cadeias dos diferentes polímeros reduz a possibilidade de rotação das cadeias em torno das ligações covalentes e limita os movimentos segmentares dos grupamentos atômicos modificando assim sua transição vítrea. Uma vantagem da utilização destes materiais é que eles podem ser quimicamente modificados de modo a permitirem controle do padrão de degradação, de intumescimento, modulação de propriedades mecânicas, hidrofílicidade. A mistura de polímeros também fornece maior capacidade de deformação, muitas vezes necessária para aplicação em tecidos humanos (Santos, 2005; Costa JR., 2008).

Blendas poliméricas têm sido produzidas e pesquisadas para a produção de materiais biocompatíveis e biodegradáveis por diversos cientistas com as mais variadas finalidades. Iwasaki e colaboradores (2004) analisaram uma blenda à base de quitosana e alginato como suporte para a adesão de condrócitos de coelho que apresentou melhores resultados em comparação com as fibras de alginato (Iwasaki *et al.*, 2004).

Quitosana e poli(vinilpirrolidona) (PVP) foram utilizadas para preparar redes semi-interpenetrantes das blendas. Os hidrogéis foram reticuladas por genipin. Propriedades de intumescimento (expansão) destes hidrogéis foram estudadas em meios de diferentes concentrações hidrogeniônicas e temperaturas. O comportamento de intumescimento dos hidrogéis foi dependente da temperatura e do pH. O conteúdo total de água nos hidrogéis aumenta com aumento do teor de PVP. Este parâmetro estudado é importante para a

modulação de comportamento de biomateriais. De modo geral, os resultados obtidos dos materiais sugerem que possuem potencialidade para várias aplicações como biomaterial, por exemplo, matrizes poliméricas para liberação controlada de fármacos, curativos para ferimentos mais leves, entre outros (Brant, 2008).

Blendas de quitina e quitosana foram produzidas por Kuo e Lin (2006) em várias porcentagens de agente reticulante (genipin) sob diferentes temperaturas e secas posteriormente. A finalidade foi a produção de matrizes de engenharia de tecidos via liofilização. Os resultados experimentais revelaram que uma temperatura mais baixa de liofilização ou um maior peso porcentual de quitina na blenda de quitina e quitosana, produziria matrizes com menor diâmetro dos poros. Observou-se uma boa adesão celular em seus experimentos (Kuo e Lin, 2006).

Rodas (2004) avaliou a mistura de três polímeros: poli(álcool vinílico) e poli(vinilpirrolidona) com a quitosana para a obtenção de produtos demo-epidérmicos, 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 glutaraldeído, porém não apresentaram boas características mecânicas à manipulação (Rodas, 2004).

Yamane (2005) obteve fibras poliméricas híbridas à base de quitosana e ácido hialurônico que resultaram no desenvolvimento de colágeno tipo I e II pelas células. Foi avaliado como um excelente biomaterial para criar suporte tridimensional (3D) com o objetivo de aplicar em grandes lesões de cartilagem e numa variedade de doenças como osteoartrites e artrites reumáticas (Yamane, 2005).

Dallan (2005) analisou a influência da concentração da solução de quitosana nas características físicas, mecânicas e biológicas de membranas densas, bem como, do efeito da substituição de parte da quitosana por quitina 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 (Dallan, 2005).

A fim de conseguir boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e desenvolvimento das células, Kong e colaboradores produziram uma matriz com multicamadas, imitando a estrutura do osso. Uma matriz composta de quitosana e hidroxiapatita porosa foi feita, com uma camada de quitosana compacta. Comparado com a matriz porosa uniforme a matriz com multicamada de mesmo tamanho tem um aumento na força mecânica e maior tamanho de poro no centro. Além disso, mais células são observadas crescendo no centro da matriz em multicamadas que em uma matriz uniforme porosa sobre as mesmas condições. Finalmente, as matrizes foram implantadas em um defeito de fíbula de coelho a avaliar a osteocondutividade da matriz. Em 12 semanas após a operação, houve a formação de vasos sanguíneos e de tecido ósseo (Kong *et al.*, 2007).

3.3 MODIFICAÇÕES DE BIOPOLÍMEROS OU BLENDA

3.3.1 FORMAÇÃO DA ESTRUTURA RETICULADA

A polimerização em solução, a polimerização no próprio monômero, e a reação do polímero com agentes reticulantes são geralmente as formas utilizadas para se produzir um gel. O termo vem do latim, *gelare*, que quer dizer coagular, resfriar, congelar, cristalizar. Ao longo de muitas décadas, muitos cientistas procuraram definir apropriadamente o termo, dessa forma é possível concluir que existem numerosas definições. Aplicando uma definição básica sugerida por Gehrke (2000), o gel pode ser entendido como uma estrutura macroscópica contínua, com características sólidas, exibindo inclusive resposta elástica à força aplicada sobre sua superfície. Os géis podem ser entendidos também como compostos de polímeros ligados em uma estrutura de rede por interações químicas ou físicas. Essas interações incluem forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de Van der Waals (não específicas ou hidrofóbicas), cristalitos insolúveis, emaranhados formados fisicamente, ligações químicas. Em geral, esses géis têm algumas regiões de ordem local

embora elas não ocorram em grande extensão (Flory, 1953; Gehrke, 2000; Peppas e Lustig, 1986).

A obtenção de géis por polimerização no próprio monômero (polimerização em massa) pode ser realizada se outros reagentes, agente reticulante ou de ligação cruzada e iniciadores forem também nele solúveis. Na polimerização em solução, o monômero, o agente reticulante e os iniciadores são todos solubilizados em um solvente em comum, formando apenas uma fase. A formação de uma estrutura reticulada, com um polímero através de utilização de agente reticulante, é feita geralmente em solução contendo um solvente em comum para os reagentes (Billmeyer, 1984; Gehrke, 2000; Peppas e Lustig, 1986; Bispo, 2004).

Iniciadores químicos têm sido muito usados para a síntese de hidrogéis. Os hidrogéis são produzidos por radicais gerados, seja por ativação térmica, interação com o solvente, raios gama ou elétrons de alta energia. A quebra das cadeias ocorre por homólise gerando um elétron não compartilhado. Esse elétron é extremamente instável e, na busca de estabilidade, procura interagir com um elétron de outro átomo. Vários iniciadores podem ser usados incluindo compostos tais como peróxidos, fotoiniciadores e agentes oxidantes. Iniciadores comumente usados para a síntese de hidrogéis são a azo-*bis*-isobutironitrila, o peróxido de benzoíla, di-isopropil percarbonato e persulfato de amônio. O iniciador é incorporado à rede como a primeira ligação da cadeia. Diferentes iniciadores causam diferenças de um gel para outro embora isto seja difícil de ser previsto (Gehrke, 2000). A preocupação mais importante é, entretanto, a taxa de polimerização induzida por uma dada concentração de iniciador. Reações de polimerização são altamente exotérmicas, uma taxa de iniciação rápida pode conduzir a um rápido aumento de temperatura. Então, as taxas de iniciação e de polimerização aumentam com a temperatura e o processo se torna autocatalítico (Billmeyer, 1984; Gehrke, 2000). Se a taxa de reação for muito alta, géis muito frágeis são formados. Entretanto, se a taxa de reação for muito lenta, ocorre também a formação de géis mecanicamente pouco resistentes (Gehrke, 2000). A escolha de um iniciador apropriado é de importância inegável, assim também como sua concentração para a obtenção de um gel de uma boa qualidade e homogêneo, pelo menos no que diz respeito à

observação macroscópica. No entanto, a escolha de um iniciador é feita geralmente de forma empírica (Gerhke, 2000).

A concentração de agente reticulante por peso ou mols de polímero também é essencial para se obter uma estrutura de rede macroscopicamente uniforme e com a flexibilidade apropriada para as várias aplicações a que são destinados os hidrogéis. Outros fatores que entram na decisão para a escolha de um iniciador são a segurança, o custo, a solubilidade, a facilidade da iniciação e o controle da reação (Oliveira, 1992; Gerhke, 2000; Oliveira, 2000; Oliveira *et al.*, 2003).

O solvente pode também ser usado para variar as características do gel sintetizado, isto é as propriedades do gel vão depender do tipo, quantidade e qualidade do solvente escolhido para a síntese. Um gel homogêneo e transparente é obtido se o solvente for compatível com o monômero e com o polímero. Ao contrário, um gel opaco e heterogêneo é formado quando o solvente é pouco compatível com o polímero, este efeito é resultante de separação de fases (Gerhke, 2000).

Quando a cadeia polimérica é iniciada, ela tende a crescer independentemente. Quando a reação procede, as diferentes cadeias são conectadas umas às outras. Num dado momento da reação, compreendida como conversão crítica, há a formação da rede polimérica tridimensional. Este momento é chamado de ponto gel ou transição sol-gel. Com o decorrer da reação, as cadeias tornam-se bastante conectadas formando uma estrutura de rede, que é o que denominamos de gel. Uma quantidade substancial de monômeros não está ainda interligada à rede. Estas espécies são chamadas de sol e contrastam com a rede já sintetizada. Com o desenrolar da reação a quantidade de sol declina à medida que ele é incorporado dentro da rede. Quando a reação cessa, uma quantidade significativa de sol pode ainda permanecer na rede. A significância prática de tudo isso é que o tempo de reação irá influenciar pronunciadamente as propriedades do gel resultante (Billmeyer, 1984; Gehrke, 2000). Quando o módulo de cisalhamento e, conseqüentemente, as eficiências de formação de ligação cruzada são baixas, o grau de expansão se torna alto, para géis que tiveram a reação cessada no ponto gel, em comparação a aqueles que tiveram o prosseguimento na síntese (Gehrke, 2000). Um fato muito interessante é que os mais

diversos tipos de géis apresentam uma grande similaridade entre si no ponto de gel. É verificado experimentalmente que a eficiência de reticulação se torna mais alta para soluções mais concentradas em monômeros e para grandes taxas de agente reticulante por monômero (Gehrke, 2000; Nguyen *et al.*, 2009).

Os polímeros lineares são geralmente interligados de modos diferentes. Muitos polímeros hidrofílicos têm grupos hidroxilas livres. A técnica mais versátil usa reagentes que podem ligar estes grupos e conectar diversas cadeias de polímeros (Gerhke, 2000). Aminas primárias são, semelhantemente, suscetíveis à reticulação. Esses grupos são mais reativos do que os grupos hidroxilas (Gerhke, 2000, Oliveira *et al.*, 2002). Radiação ionizante pode também ligar covalentemente vários polímeros por meio da formação de radicais livres nas cadeias, as quais recombina aleatoriamente, conduzindo à formação da rede. Interações físicas de muitos tipos diferentes podem também conduzir à formação de géis estáveis e elásticos, quando interações covalentes estão ausentes (Gerhke, 2000; Oliveira *et al.*, 2003; Nguyen, 2009).

3.3.2 HIDROGÉIS

Hidrogéis são conhecidos como uma classe especial de géis poliméricos, eles possuem uma forte afinidade pela água e a maioria das soluções aquosas. Hidrogéis podem ser sintetizados via monômeros bifuncionais e com agentes reticulantes multifuncionais. Qualquer polímero pode, a princípio, ser usado para se sintetizar uma rede polimérica, isto inclui polímeros biológicos como polissacarídeos e proteínas. Polímeros lineares solúveis em água podem ser usados para produzir um gel. A ligação cruzada pode ocorrer por meio de reação química, radiação ionizante (gerando radicais livres que podem-se recombinar formando junções entre as cadeias de polímeros) ou através de interações físicas como emaranhados e cristalitos. Deve-se apenas observar que esses géis devem ser suficientemente hidrofílicos para absorver certa quantidade de água. A hidrofilicidade vem da inclusão na rede de grupos como hidroxila, sulfonato, carboxilato e outros grupos que interagem suficientemente bem com a água. Um hidrogel pode ser convertido também de um tipo a outro através de reações químicas em seus grupos funcionais. Desse modo,

podemos obter uma infinidade de hidrogéis para todas as mais variadas características que desejarmos (Peppas e Lustig, 1986; Gehrke e Lee, 1990; Gehrke, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2009).

Hidrogéis para revestimentos de lesões são disponíveis comercialmente como membranas, gazes, ou mesmo na forma original. Os hidrogéis proporcionam um efeito calmante e refrescante às regiões lesadas. Eles são excelentes para a criação ou manutenção de um ambiente hidrofílico e são utilizados em ulcerações com baixos níveis de drenagem. Géis são aplicados diretamente sobre a lesão, não aderem à ferida, e geralmente são cobertos com um curativo secundário de espuma ou gaze, por exemplo, para manter o nível de umidade necessária para promover a cicatrização (Ovington, 2002; Sipos, 2004; Nguyen *et al.*, 2009). Podem ser citadas algumas marcas de hidrogéis para tratamento de lesões na pele: Carrasyn Hydrogel Wound Dressing (Carrington Laboratórios), Curasol Hydrogel (Healthpoint) Tegagel (3M Health Care) (Ovington, 2002; Sipos *et al.*, 2004; Nguyen *et al.*, 2009).

3.3.3 AGENTE RETICULANTE NATURAL: GENIPIN

Genipin tem sido utilizado como agente de reticulação (formador de ligação cruzada) de quitosana há alguns trabalhos (Butler e Pudney, 2003; Kuo e Lin, 2006). Genipin é um produto hidrolítico do geniposídeo que é achado na fruta da Gardênia. Gardênia é um gênero de cerca de 250 espécies de plantas da família do café, *Rubiaceae*, nativa das regiões tropicais e subtropicais da África, sul da Ásia, Austrália e Oceania. A planta é mostrada na Figura 3.1. A fruta de *Gardenia jasminoides Ellis* foi usada na tradicional medicina chinesa para tratar irritabilidade, doenças febris, icterícia, conjuntivites agudas, hematemese e úlceras da pele (Butler e Pudney, 2003; Kuo e Lin, 2006).

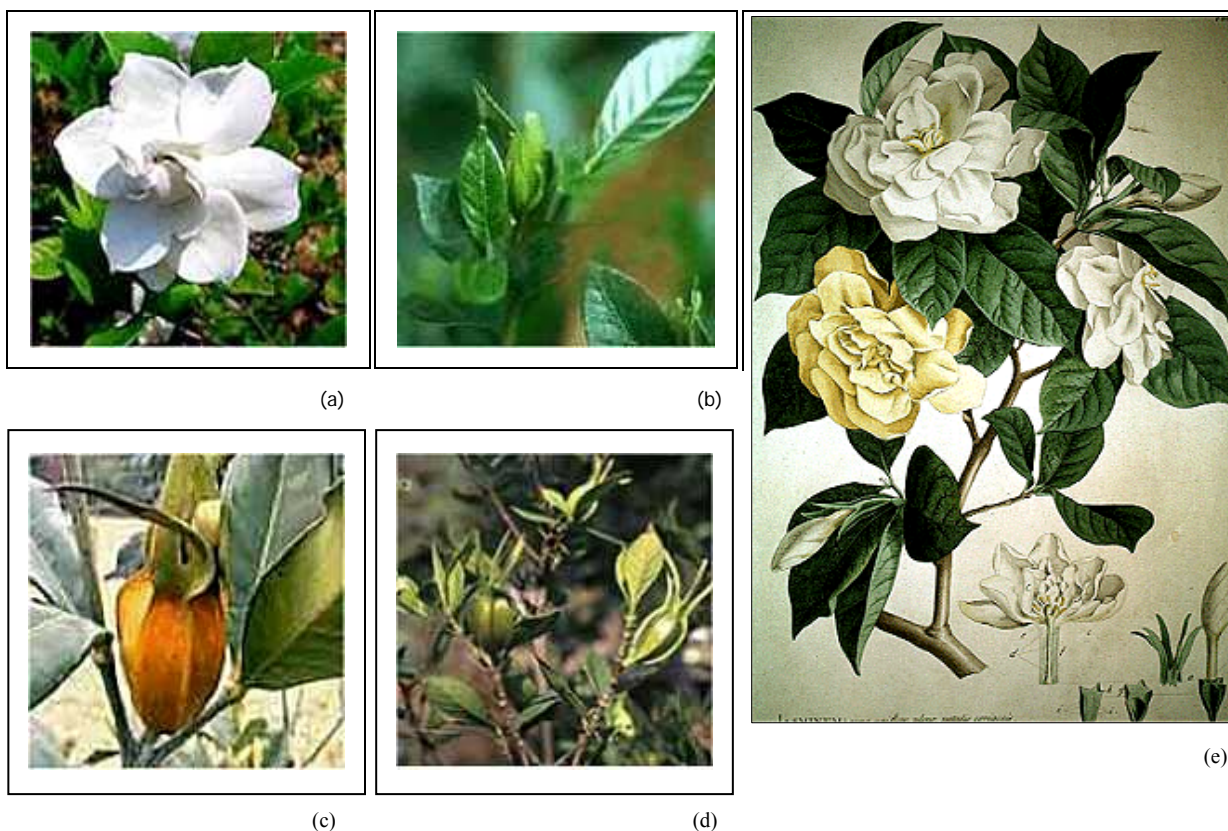


FIGURA 3.1 - Gardênia: (a) Flor (b) Folhas (c) Fruta (d) Fruta no estágio inicial (e) Flores da gardênia (Dharmananda, 2003).

É utilizado também como um corante azul por indústrias de comida na Ásia Oriental. A estrutura do genipin foi descoberta em 1960, como mostrado na Figura 3.2. Por ser uma substância natural, e é uma molécula biodegradável com baixa citotoxicidade, o genipin tem sido investigado, como um agente reticulante a ser usado em aplicações biológicas. Recentes estudos usando gelatina reticulada por genipin obtiveram bons resultados. A finalidade desses estudos era usar o produto formado pela reticulação como bioadesivo no tratamento de ferimentos e como substituto de tecido ósseo. O agente de reticulação mais utilizado nas pesquisas, que envolvem biomateriais, é o glutaraldeído. Entretanto, por causa de preocupações sobre sua toxicidade, estão sendo testadas substâncias novas como genipin. Glutaraldeído tem sido utilizado comumente para reticulação de colágeno e é descrito em trabalhos de quitosana. Entretanto, como mostrado pela literatura, o glutaraldeído é tóxico. Sung e colaboradores testaram o genipin como agente de reticulação

do colágeno. Neste trabalho, verificou-se que o genipin era 10 000 vezes menos citotóxico que glutaraldeído, o que justifica seu uso em biomateriais (Sung *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2004).

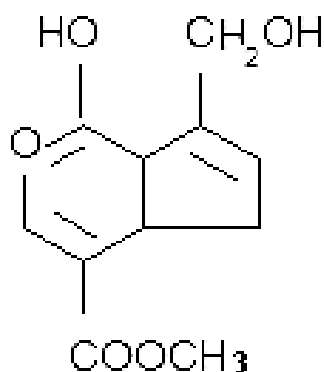


FIGURA 3.2 - Fórmula estrutural do genipin.

O mecanismo de reticulação do genipin com a quitosana e moléculas que contêm aminas primárias não é bem entendido, até o presente momento, e ainda está sob investigação. Dois esquemas são propostos na literatura para explicar este tipo de reação. Foi observado que compostos contendo grupamentos amina, a quitosana por exemplo, num ataque nucleófilo, irão se ligar ao carbono dos grupos éster do genipin. Ocorre a troca do grupo éster pelo grupo amida desta reação (Butler e Pudney, 2003; Kuo e Lin, 2006).

Uma outra reação foi proposta, no segundo mecanismo para a reação de genipin com grupos amina. Neste mecanismo, a reação acontece por um ataque nucleofílico da amina primária no carbono C3 do genipin mostrado na Figura 3.2, formando um aldeído intermediário. Isto causa uma abertura do anel heterocíclico do genipin. Um ataque no grupo do aldeído intermediário formado, pelo grupo da amina secundária formada, segue-se então. Um composto heterocíclico ligado ao grupo amina é formado. Forma-se uma estrutura interconectada devido às reações entre os grupos amina e o genipin (Butler e Pudney, 2003; Kuo e Lin, 2006).

O mecanismo de reação, proposto com genipin por Butler e Pudney (2003), é supostamente o mecanismo de reação de genipin com moléculas que contêm um grupo amina primária. Isto indica que genipin pode ser usado para formar reticulação intermolecular (Butler e Pudney, 2003).

No estudo de Liu e colaboradores, descreveu-se o uso de genipin para preparar uma matriz feita com gelatina. Uma outra matriz foi preparada com colágeno para regeneração de tecidos. Após seis semanas de implantação de células nervosas em gelatina reticulada com genipin, correu a regeneração de células nervosas em 80% e para matriz feita de colágeno a regeneração chegou a 90%, em animais empregados nos experimentos, enquanto, no grupo de controle, apenas ocorreu regeneração em 30%. Para a gelatina, os agentes reticulantes mais requisitados são aquecimento térmico, radiação ultravioleta e reticulantes químicos, como por exemplo, formaldeído e glutaraldeído. Entretanto esses agentes reticulantes sintéticos, como dito antes, são altamente citotóxicos. Assim, genipin foi utilizado como agente de reticulação biológico com resultados promissores (Liu *et al*, 2004).

Quitosana também foi utilizado no trabalho de Jin e colaboradores. Foram formados filmes empregando-se quitosana pura e blendas de quitosana e polietileno. O estudo demonstrou que as blendas de quitosana/PEO reticuladas apresentavam propriedades mecânicas melhores. Genipin produziu redes que eram insolúveis em meio ácido e em meio alcalino, mas foram capazes de se expandir em meio aquoso. O grau de expansão dos filmes mudou ao alterar o pH e a temperatura do meio onde se encontravam (Jin *et al*, 2004).

Para um melhor entendimento da molécula de genipin e de sua reatividade com outros compostos, os principais grupos funcionais desse composto por espectroscopia de infravermelho foram estudados e as bandas dos grupos associados são apresentados na Tabela 3.3 (Mi *et al.*, 2000; Butler e Pudney, 2003).

TABELA 3.3 - Grupos característicos do genipin por FTIR (Mi *et al.*, 2000; Butler e Pudney, 2003).

| Material | Bandas (cm ⁻¹) | Função | Grupos Associados |
|----------|----------------------------|--|---|
| Ge | 1000-1060 | Álcool primário -C-OH | -OH: δ |
| Ge | 1050-1150 | Éter cíclico | C-O: ν |
| Ge | 1200-1270 | Éster C-O-C | C-O: ν |
| Ge | 1170-1300 | Éter C-O-C | C-O: ν |
| Ge | 1300-1530 | Anel Heterocíclico Alcoóis e Alcanos | δ OH/ δ CH ₂ : (ν) /N-H: δ |
| Ge | 1400-1450 | Ésteres (íons carboxilatos) | C-H/ OH/C=O: ν |
| Ge | 1406 | Alceno | C=C ν |
| Ge | 1600-1700 | Alceno | C=C ν |
| Ge | 1750-1700 | Éster | C=O ν |
| Ge | 2750-3000 | Alceno | C=C ν |

3.4. APLICAÇÕES DE BIOPOLÍMEROS

3.4.1 SUPORTE PARA CRESCIMENTO DE TECIDOS

Materiais com a finalidade de tratar doenças ou deficiências têm sido produzidos para restaurar ou melhorar a função de tecidos ou órgãos danificados, seja por doenças ou acidentes (Shin *et al.*, 2003; Weinand *et al.*, 2006). Esses materiais são na atualidade fundamentais, principalmente ao que se refere a terapias em medicina regenerativa. Assim, estes produtos são considerados biomateriais. O mercado potencial de biomateriais é estimado em cerca de 100 bilhões de dólares ao ano. Dessa forma, estes produtos possuem

relevância econômica, médica e social, o que demonstra em parte a vantagem em promover pesquisas voltadas para o desenvolvimento desses materiais (Soares, 2005).

Não se pode deixar de reconhecer a importância do conhecimento para a reconstrução de tecidos. O desenvolvimento de produtos como filmes ou matrizes para o crescimento de células, passa, na maioria das vezes, pelo entendimento do papel da interação do material com o meio biológico que definirá se haverá formação de tecidos. Também existem algumas exigências ou propriedades que podem se tornar importantes (Chan e So, 2005; Weinand *et al.*, 2006). Desse modo, com o entendimento de como as propriedades de determinadas substâncias e materiais irão atuar no sistema biológico de interesse, procura-se a restauração das funções de órgãos ou tecidos em pacientes. Pacientes com suas funções comprometidas ou mesmo com risco de vida podem retornar às suas funções normais, sem maiores ônus para a sociedade, por meio do desenvolvimento de células em suportes feitos de material biocompatível (Chan e So, 2005; Soares, 2005; Weinand *et al.*, 2006).

Existe uma grande importância na escolha de um material para confeccionar a membrana ou matriz, que deve levar em conta as propriedades que mais irão influenciar no crescimento das células, o tipo de tecido e reparo necessário a este. Isto ocorre por causa da influência do material na proliferação das células e dessa forma, na reconstrução de um tecido. A seleção do material leva em consideração tanto o tipo local da lesão quanto sua extensão (Soares, 2005; Weinand *et al.*, 2006).

Os polímeros têm sido muito utilizados em matrizes biocompatíveis pois são fáceis de produzir e apresentam características mecânicas semelhantes à dos materiais biológicos. Desde 1960, biomateriais confeccionados com polímeros bioreabsorvíveis ganharam uma importância grande na área médica, sendo utilizados, em um amplo número, em aplicações para tratamentos de pacientes (Harsh, 1992; Gehrke, 2000; Barbanti, 2005).

O material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, no organismo hospedeiro. O polímero é remodelado pela degradação *in vivo*, numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é

proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua reabsorção completa (Barbanti, 2005).

Os biomateriais têm sido desenvolvidos para gerarem respostas químicas e biológicas específicas que venham a ser esperadas (Brandl *et al.*, 2007). De acordo com a literatura, na última década, muitos avanços têm sido alcançados na área de regeneração de tecidos para propósitos terapêuticos por causa dos avanços conseguidos por pesquisas nessa área. Estes suportes para crescimento de tecidos podem ser produzidos de uma maneira geral na forma de espumas, hidrogéis, e membranas, como acontece com a pele artificial (Weiguel *et al.*, 2006; Weinand *et al.*, 2006; Brandl *et al.*, 2007).

3.4.2 REQUISITOS E CARACTERÍSTICAS GERAIS

As propriedades intrínsecas dos materiais, tais como comportamento térmico e mecânico, são importantes na utilização para o desenvolvimento de tecidos e também tem conseguido uma atenção especial (Weiguel *et al.*, 2006). Visando melhorar as propriedades dos biomateriais, podem ser incorporadas fibras, por exemplo, microesferas ou estruturas planas para adequá-los às diversas aplicações em engenharia de tecidos (Mercier *et al.*, 2005; Weiguel *et al.*, 2006).

Dentre os vários requerimentos para suportes de tecidos, ressalta-se a sua morfologia a fim de favorecer o crescimento de células e transporte do fluxo de alimentos e nutrientes. Além disso, suas superfícies devem ser capazes de permitir a adesão das células, e a biodegradabilidade deve estar em sincronia com o crescimento tecidual. (Harris *et al.*, 2002).

Recentemente, a otimização das propriedades de superfície de biomateriais, como grau de pureza, rugosidade, porosidade e degradabilidade, tem sido explorada para melhorar suas propriedades. Muitas alterações têm sido propostas, como as técnicas que inserem materiais

bioativos em polímeros, levando a formação de híbridos e compósitos (Harris *et al.*, 2002).

O biomaterial colocado no corpo pode se unir ao tecido vizinho. Este mecanismo está diretamente relacionado ao tipo de resposta tecidual que ocorre na interface tecido/biomaterial. Nenhum material implantado em tecidos vivos pode ser chamado de inerte, porque todos os materiais provocam algum tipo de resposta dos tecidos, por menor que possa ser. Há quatro tipos de respostas teciduais possíveis em consequência à presença de um material (Ratner *et al.*, 2005):

1. Se o material é tóxico, o tecido vizinho morre;
2. Se o material é não-tóxico e dissolve ou é decomposto, o tecido vizinho o substitui;
3. Se o material é não-tóxico e biologicamente inativo, uma cápsula fibrosa se forma em torno do material implantado;
4. Se o material é não-tóxico e biologicamente ativo há a formação de uma interface contínua entre o tecido e o material implantado.

No quarto caso, o material poderia ser considerado bioativo, o que significa que ele é capaz de formar uma ligação interfacial entre os tecidos vivos e o material sem a presença de uma cápsula fibrosa entre eles (Ratner *et al.*, 2005).

Um substrato pode ser considerado ideal quando mimetiza a matriz extracelular do tecido hospedeiro de forma que ele possa agir como um guia tridimensional para promover ataque, multiplicação, migração e função por parte das células. Dentre as características importantes, ressalta-se que o substrato deve ser biocompatível ou bioativo, deve ser biodegradado à medida que o processo de reparação ou regeneração acontece, deve ser poroso e permeável para permitir uma difusão apropriada, deve possuir um tamanho de

poro adequado para o crescimento do tipo celular a que se destina, deve possuir adequada propriedade mecânica para o meio a que se destina, deve oferecer uma superfície condutiva para a aderência celular (Ratner *et al.*, 2005; Brandl *et al.*, 2007).

Quando se desenha biomateriais apropriados para a engenharia de tecidos, parâmetros biológicos e químicos são normalmente levados em conta. Porém, parâmetros físicos, tais como propriedades mecânicas, têm recebido menor atenção (Brandl *et al.*, 2007).

Considerado de forma integrada, tanto sob o aspecto da engenharia de materiais, o tipo de tecido e o reparo necessário, o primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido visa a seleção das características do suporte para as células. Depois de produzido um suporte com características adequadas, poderá ocorrer o crescimento tissular neste. Sua função é, conforme mencionado, proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto mecânico e estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua bioreabsorção completa. O suporte é dimensionado com propriedades mecânicas e tempo de degradação adequados para a inoculação das células até a sua inserção. Por exemplo, num bioreator, onde poderá ocorrer a formação do tecido maduro. Estas matrizes podem ser feitas de vários materiais (por exemplo, polímeros e cerâmicas), podendo também ser utilizados materiais compósitos a fim de se alcançar as melhores características. Isto ocorre para que o suporte possa se adequar à finalidade que se deseja (Choi e Ma, 2001).

3.4.3 FILMES PARA PELE ARTIFICIAL E SUAS CARACTERÍSTICAS

Em artigos publicados em 1980, Yannas e Burke descreveram os princípios do seu conceito de *wound healing* ou pele artificial. A idéia era dividir o tratamento dos pacientes queimados em dois estágios. No estágio 1, o objetivo era o fechamento das feridas, eliminando-se o risco de infecção ou perda de líquido. Utilizavam um material à base de colágeno-glicosaminoglicano (C-GAG) para cobrir a ferida. As propriedades da matriz foram escolhidas para que a mesma se desintegrasse na medida em que as células proliferassem. No primeiro dia de aplicação do C-GAG, uma "epiderme" de Silastic®

(materiais do grupo dos compostos de silicone) era colocada sobre a matriz, protegendo-a até que os queratinócitos e melanócitos cultivados em laboratório, a partir de biópsias cutâneas do próprio paciente, estivessem prontos para a semeadura (o estágio 2 do processo). Os queratinócitos são células diferenciadas do tecido epitelial e melanócitos são células que produzem melanina, substância pigmentar que envolve a célula, protegendo seu núcleo dos raios solares (Bell *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1981; Beumer, 1994).

O cultivo destas células é feito por técnicas que foram elaboradas na década de 80 por pesquisadores da Harvard Medical School, chefiados pelo Dr. Howard Green. A técnica de Green consiste em semear queratinócitos humanos em uma camada de fibroblastos derivados de rato, deixando o restante do trabalho por conta do próprio corpo. É possível que a técnica funcione por imitar o que ocorre na pele verdadeira, cuja camada inferior (a derme) é composta predominantemente de fibroblastos (cuja principal função é produzir o colágeno e a elastina que dão sustentação à pele). Para assegurar que apenas os queratinócitos cresceriam na malha, Green irradiou os fibroblastos, interrompendo seu processo de divisão. O produto resultante de todo o processo, batizado de Epicel™, atualmente encontra-se licenciado para tratamento de queimaduras e úlceras vasculares e de estase. A estase vascular acontece quando o fluxo sanguíneo vem a diminuir, podendo haver eventual e completa estagnação (Bell *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1981; Beumer, 1994; Dallan, 2005).

Burke e Yannes acreditavam que, apesar da abordagem inicial com epiderme de Silastic® ser útil, seria preferível aplicar a camada celular epidérmica simultaneamente à camada de C-GAG – hipótese esta confirmada em seus próprios estudos em animais (Burke *et al.*, 1981).

Uma composição muito utilizada desta pele é composta por uma camada de colágeno em forma de gel misturada com células de tecidos. Esta primeira camada constituída de colágeno protege a segunda contendo células. Outro método emprega polímeros sintéticos, moldados e posicionados em áreas onde há falta de tecido. Neste caso, células adjacentes invadem os polímeros, que se degradam e são absorvidos. Estes polímeros ou materiais

biodegradáveis também podem ser misturados a células cultivadas em laboratório (Bell *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1981; Beumer, 1994). As características relevantes da pele artificial, é que devem ser isentas de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja, o material deve ser não-tóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico (Hondurilla *et al.*, 2002, Dallan, 2005).

A pele artificial atual avançou no sentido que se 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. A pele é um órgão com funções e propriedades complexas, assim na elaboração de pele artificial é preciso um estudo físico-químico para a produção de material que possua características semelhantes aos tecidos vivos e para a compreensão de seu funcionamento e interação quando em contato com o corpo (Costa JR., 2008; Harris, 2009).

O corpo tem a capacidade de regenerar a epiderme desde que a derme permaneça intacta. Porém, vítimas severamente queimadas e pacientes que sofrem com úlceras diabéticas, freqüentemente têm uma derme lesionada. Atuais soluções envolvem enxertos de pele. Mas existe o risco de contaminação e de rejeição do tecido. De forma ideal, os materiais de enxertos devem aderir ao sitio ferido, ser poroso o suficiente para conduzir a difusão de excreções (rejeitos), nutrientes, prevenir a desidratação, deve ser barato, flexível e de fácil manuseio. O material deve permitir a migração celular e ter propriedades mecânicas semelhantes àquelas da pele original, promover uma regeneração dérmica e epidérmica, para prevenir infecção bacteriana. Estes parâmetros propõem um enorme desafio a qualquer tipo de material (Sheridan e Tompkins, 1999; Seal *et al.*, 2001).

Os pesquisadores Choi e Ma, por exemplo, prepararam uma matriz composta de gelatina e hialuronato de sódio. Devido a sua forma estável, a matriz mostrou-se capaz de resistir às mudanças que ocorrem durante o processo de cicatrização. Os resultados foram promissores e proporcionaram um aumento de cura das lesões (Choi e Ma, 2001).

Foram estudados por Huang e colaboradores (2005), o efeito da mistura quitosana/gelatina em tecido epitelial animal sobre as propriedades de degradação cinética, propriedades de rigidez mecânicas e interação entre a matriz e as células, concluindo que a adição de gelatina afeta a rigidez de matrizes e facilita a manutenção da taxa de degradação na presença de lisozima. A avaliação da interação de adesão celular indicou uma diminuição de espalhamento de células sobre as membranas de quitosana (Huang *et al.*, 2005).

Grande variedade de revestimentos para cura de lesões estão disponíveis. Décadas de pesquisa têm revelado que quanto mais o nível de umidade da ferida é semelhante a de uma pele saudável, maior é a chance de a mesma se curar. Este conceito é chamado de cicatrização úmida da lesão (Hondurilla *et al.*, 2002).

Embora pareça o contrário, ao se mater um curativo no local por vários dias, o processo de cura ocorrerá mais cedo, porque a lesão é deixada intacta. Isto é importante porque proporciona um ambiente úmido, bem como mantém à temperatura do corpo, condições necessárias para promover a cicatrização. As freqüentes mudanças de curativos esfriarão a temperatura de uma úlcera por exposição ao ar. Isso retarda o processo de cicatrização até que o corpo pode re-aquecer a área. Assim, curativos trocados com menor freqüência ajudam no processo de cicatrização. Figura 3.3 mostra lesão revestida e sem revestimento (Mandelbaum *et al.*, 2003).

A Figura 3.3 mostra porque os tecidos lesionados que são mantidos úmidos tem o processo de cura acelerado. O ambiente úmido (à esquerda) permite que as células da epiderme se movam facilmente em toda a superfície, levando conseqüentemente a cicatrização do tecido afetado. Em um ambiente de lesão aberta e seca (à direita), as células epidérmicas ficam a um nível de altitude diferenciada da parte lesada e secretam enzimas para formar uma crosta e alcançar a distância da superfície da ferida, antes de as células poderem começar migrar e a permitir que ocorra a cicatrização (Mandelbaum *et al.*, 2003).

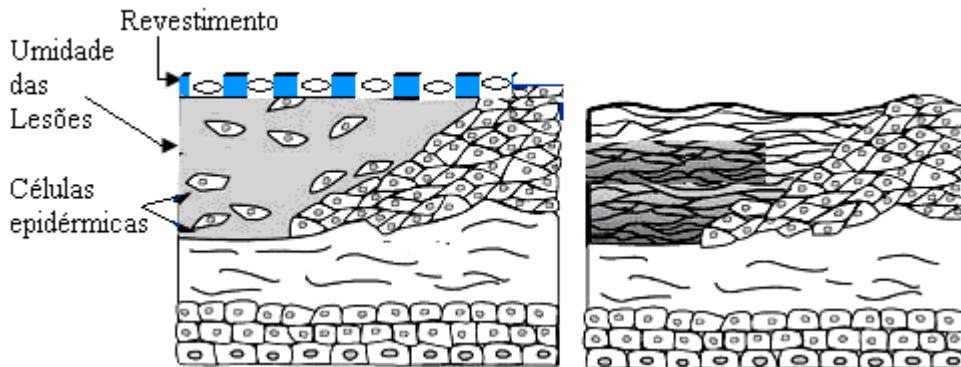


FIGURA 3.3 - Lesões revestidas para cicatrização e lesões abertas.

Para a produção de pele artificial, se faz necessário o entendimento da sua constituição, da organização, da função dos componentes, das propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas. À partir deste entendimento, é possível produzir um biomaterial possuindo similaridade tanto funcional quanto estrutural com os tecidos vivos, que vise substituir ou tratar com eficiência o tecido epitelial, enquanto um novo tecido é formado. Este biomaterial deve ser biocompatível, minimizando as respostas inflamatórias (Burke *et al.*, 1981; Beumer, 1994; Harris, 2009).

3.5. ESTRUTURA DO TEGUMENTO (PELE)

O tegumento humano, mais conhecido como pele, é formado por camadas distintas, unidas entre si: a epiderme, a derme, a hipoderme. As suas principais funções são a proteção dos tecidos subjacentes, a regulação da temperatura somática e ainda contém terminações nervosas sensitivas com funções distintas. A pele é constituída de biopolímeros contendo 72% de colágeno e 2% de elastina. Além destes compostos da pele, compõem a matriz extracelular os glicosaminoglicanos que são poliânions contendo sulfatos e carbonatos, os quais atraem água e cátions que ajudam na manutenção da arquitetura estrutural. Os glicosaminoglicanos são um gel hidrófilico, semifluido que permite a circulação de nutrientes, gases e hormônios. A pele é um material complexo e pode ser descrito como material com propriedades elásticas, viscosas e plásticas. O colágeno confere resistência à pele e a elastina extensibilidade. As propriedades mecânicas da pele são determinadas principalmente pela camada da derme. A tensão máxima na ruptura vai de 2,5 a 16 MPa

para o tecido epitelial. O módulo de Young para a pele vai do valor de $4,2 \times 10^5 \text{ N.m}^{-2}$ para os jovens e $8,5 \times 10^5 \text{ N.m}^{-2}$ para os indivíduos mais velhos, sendo observada esta propriedade mecânica em pessoas com idade de 3 a 89 anos (Agache *et al.*, 1980; Bear *et al.*, 2008; Harris, 2009).

3.5.1. EPIDERME

A epiderme é um epitélio multiestratificado, constituído por várias camadas (estratos) de células achatadas (epitélio pavimentoso) justapostas. A epiderme pode ser visualizada na Figura 3.4. A camada de células mais interna, denominada epitélio germinativo, é formada por células que se multiplicam continuamente; dessa maneira, as novas células geradas empurram as mais velhas para cima, em direção à superfície do corpo. À medida que envelhecem, as células epidérmicas tornam-se achatadas, e passam a fabricar e a acumular dentro de si uma proteína resistente e impermeável, a queratina. As células mais superficiais, ao se tornarem repletas de queratina, morrem e passam a constituir um revestimento resistente ao atrito e altamente impermeável à água, denominado camada queratinizada ou córnea (Bear *et al.*, 2008).

A superfície cutânea está provida de terminações nervosas capazes de captar estímulos térmicos, mecânicos ou dolorosos. Essas terminações nervosas ou receptores cutâneos são especializados na recepção de estímulos específicos. Alguns podem captar estímulos de natureza distinta. Porém na epiderme não existem vasos sanguíneos. Os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme (Bear *et al.*, 2008; Harris, 2009).

Nas regiões da pele providas de pêlo ocorrem terminações nervosas específicas, nos folículos capilares, e outras chamadas terminais ou receptores de Ruffini. As primeiras, formadas por axônios que envolvem o folículo piloso, captam as forças mecânicas aplicadas contra o pêlo. Os terminais de Ruffini, com sua forma ramificada, são receptores térmicos de calor. Localizados no tecido subcutâneo, são ovais e consistem em bainhas no

interior das quais as fibras nervosas dividem-se em numerosos ramos. (Bell *et al.*, 1981; Bear *et al.*, 2008; Harris, 2009).

Na pele sem pêlo e também na que está coberta por ele, encontram-se ainda três tipos de receptores nervosos comuns (Bear *et al.*, 2008):

1. **Corpúsculos de Paccini:** captam principalmente estímulos vibráteis e táteis. São formados por uma fibra nervosa cuja porção terminal, amielínica, é envolta por várias camadas que correspondem a diversas células de sustentação. A camada terminal é capaz de captar a aplicação de pressão, que é transmitida para as outras camadas e enviada aos centros nervosos correspondentes.

2. **Discos de Merkel:** para sensibilidade tátil e de pressão. Uma fibra aferente costuma estar ramificada com vários discos terminais destas ramificações nervosas. Estes discos estão englobados em uma célula especializada, cuja superfície distal se fixa às células epidérmicas por um prolongamento de seu protoplasma. Assim, os movimentos de pressão e tração sobre epiderme desencadeiam o estímulo.

3. **Terminações nervosas livres:** são sensíveis aos estímulos mecânicos, térmicos e principalmente aos dolorosos. São formadas por um axônio ramificado envolto por células de Schwann sendo, por sua vez, ambos envolvidos por uma membrana basal.

Na pele desprovida de pêlo encontram-se, ainda, outros receptores nervosos específicos:

4. **Corpúsculos de Meissner:** São corpúsculos sensitivos responsáveis pelo tato. Estão presentes nas saliências da pele sem pêlos (como nas partes mais altas das impressões digitais). São formados por um axônio mielínico, cujas ramificações terminais se entrelaçam com células acessórias.

5. **Bulbos terminais de Krause:** receptores térmicos de frio. São constituídos por uma fibra nervosa cuja terminação possui forma de clava. Situam-se nas regiões limítrofes da pele com as membranas mucosas (por exemplo: ao redor dos lábios e dos genitais).

Nas terminações nervosas livres, a sensação recebida refere-se principalmente à dor. Além das terminações nervosas, existem nas camadas inferiores da epiderme os melanócitos, células que produzem **melanina**, pigmento que determina a coloração da pele e protegem o núcleo (Bear *et al.*, 2008; Harris, 2009).

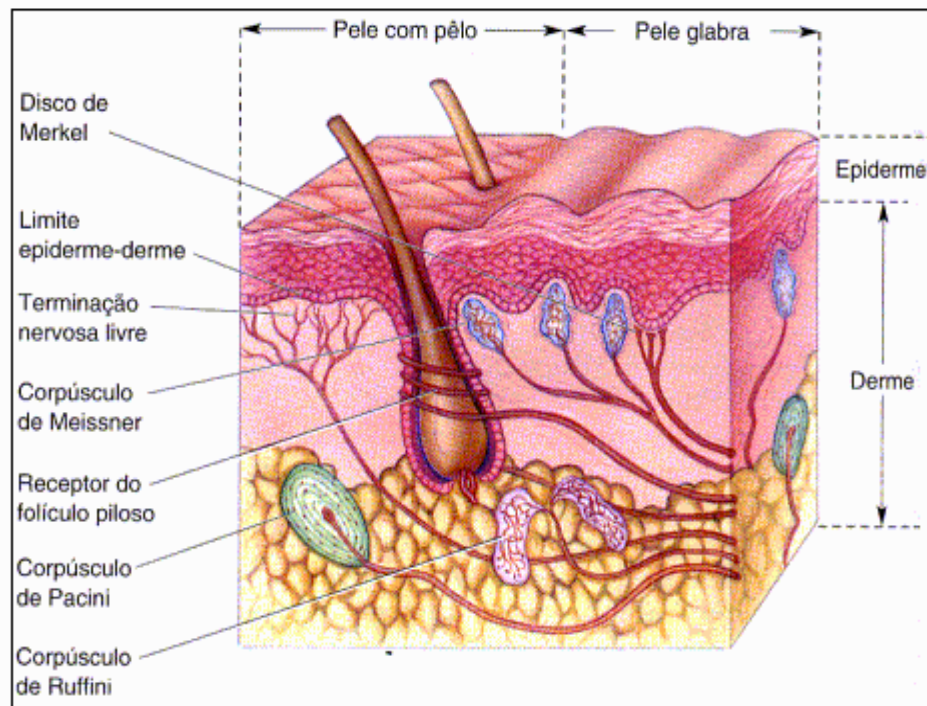


FIGURA 3.4 - Estrutura do tegumento (Bear *et al.*, 2008).

As glândulas anexas – sudoríparas e sebáceas – encontram-se mergulhadas na derme, embora tenham origem epidérmica. O suor (composto de água, sais e um pouco de uréia) é drenado pelo ducto das glândulas sudoríparas, enquanto a secreção sebácea (secreção gordurosa que lubrifica a epiderme e os pêlos) sai pelos poros de onde emergem os pêlos. A transpiração ou sudorese tem por função refrescar o corpo quando há elevação da

temperatura ambiental ou quando a temperatura interna do corpo sobe, devido, por exemplo, ao aumento da atividade física (Bear *et al.*, 2008).

3.5.2 DERME

A derme está localizada imediatamente sob a epiderme, é um tecido conjuntivo que contém fibras protéicas, vasos sangüíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas. As principais células da derme são os **fibroblastos**, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a **substância amorfa**, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados (Bear *et al.*, 2008; Harris, 2009).

A epiderme penetra na derme e origina os folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Na derme, encontramos ainda: músculo eretor de pêlo, fibras elásticas (elasticidade), fibras colágenas (resistência), vasos sanguíneos e nervos (Bear *et al.*, 2008; Harris, 2009).

3.5.3 TECIDO SUBCUTÂNEO

Sob a pele (epiderme e derme), existe uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo mostrado na Figura 3.5, rico em fibras e em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada **hipoderme**, atua como reserva energética, proteção contra choques mecânicos e isolante térmico (Bear *et al.*, 2008).

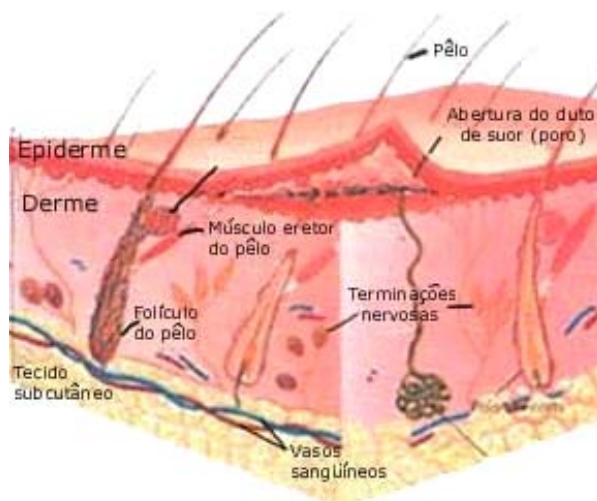


FIGURA 3.5 - Estrutura da pele e o tecido subcutâneo (Bear *et al.*, 2008).

3.6 A CICATRIZAÇÃO

A cicatrização de um ferimento consiste em uma perfeita e coordenada cascata de eventos celulares e moleculares que agem conjuntamente para que ocorra a repavimentação e a reconstituição do tecido. Como consequência da cicatrização, ocorre a perda tecidual, que pode atingir a derme completa ou incompletamente, ou mesmo atingir todo o órgão. A cicatrização depende de vários fatores locais e gerais, como: localização anatômica, tipo de pele e a idade (Nitz *et al.*, 2006, Harris, 2009).

Diversas classificações didáticas são usadas para facilitar o entendimento de um processo totalmente dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização. Aqui dividiremos o processo em 5 principais fases (Fazio *et al.*, 2000; Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006):

1. Coagulação: inicia-se imediatamente após o surgimento da ferida. Depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases. A formação do coágulo serve não apenas para captar as bordas da ferida, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz

provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006).

2. Inflamação: depende, além de inúmeros mediadores químicos, das células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares (PMN), os macrófagos e os linfócitos. Os PMN chegam no momento da injúria e são responsáveis pela fagocitose das bactérias. O macrófago é a célula inflamatória mais importante nessa fase. Fagocita bactérias, desbrida corpos estranhos e direciona o desenvolvimento do tecido de granulação. Os linfócitos não têm papel bem definido, porém sabe-se que, com suas linfocinas, têm importante influência sobre os macrófagos. Além das células inflamatórias e dos mediadores químicos, esta fase conta com o importante papel da fibronectina. Sintetizada por uma variedade de células como fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela adere, simultaneamente à fibrina, ao colágeno e a outros tipos de células, funcionando assim como “cola” para consolidar o coágulo de fibrina, e as células e os componentes de matriz. Além de formar essa base para a matriz extracelular, tem propriedades quimiotáticas e promove a opsonização e a fagocitose de corpos estranhos e bactérias (Fazio *et al.*, 2000; Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006).

3. Proliferação: Caracteriza-se pelo aparecimento do tecido conectivo ou conjuntivo composto principalmente por uma proteína que recebe o nome de colágeno. O colágeno é produzido pelos fibroblastos, cuja estrutura lembra o entrelaçado de uma corda. O colágeno proporciona resistência e tensão à ferida, retraindo-a e diminuindo sua superfície. A proliferação é dividida em 3 subfases, é responsável pelo “fechamento” da lesão:

3.1 – Reepitelização: Faz-se a migração dos queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais. Fatores de crescimento são os prováveis responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio. Sabe-se que o plano de movimento dos queratinócitos migrantes é determinado também pelo conteúdo de água no leito da ferida.

3.2 – Fibroplasia e formação da matriz: extremamente importante na formação do tecido de granulação, que é uma coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno. A formação do tecido de granulação depende do

fibroblasto, que longe de ser apenas produtor de colágeno, produz também elastina, fibronectina, glicosaminoglicanase e proteases, estas últimas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006; Harris, 2009).

3.3 – Angiogênese: essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a cicatrização (Fazio *et al.*, 2000; Mandelbaum *et al.*, 2003).

4. Contração da ferida: é o movimento centrípeto das bordas (Fazio *et al.*, 2000; Mandelbaum *et al.*, 2003).

5. Remodelamento: Dura meses e é responsável pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. O processo de remodelamento da ferida implica no equilíbrio entre a síntese e a degradação do colágeno, ocorre a redução da vascularização e da infiltração de células inflamatórias, até que se atinja a maturação da ferida. Nesta fase ocorre também a reabsorção de água. Estes são eventos que permitem a ocorrência do aumento da tensão da ferida e diminuição de sua espessura. Além disso, ocorre a substituição do colágeno tipo III pelo colágeno tipo I e o aumento do número de ligações cruzadas entre si, evoluindo para uma ferida mais resistente. No fim dessa fase, geralmente, a cicatriz terá aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, será plana e não volumosa (Fazio *et al.*, 2000; Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006; Harris, 2009).

CAPÍTULO 4

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram realizadas etapas de síntese e caracterização dos polímeros formadores dos filmes. Os filmes foram produzidos com e sem reticulação por genipin para aplicação potencial como pele artificial e também foram caracterizados por análises físicas, químicas, mecânicas e biológicas. Procurou-se com estes testes o conhecimento das propriedades dos materiais sintetizados e a verificação da similaridade com as propriedades do tecido epitelial. A Figura 4.1 apresenta as etapas desenvolvidas neste trabalho.

Os hidrogéis ou filmes de polímero reticulados e não reticulados por genipin, com um conteúdo maior de água assemelham-se aos tecidos vivos e assim testes de grau de intumescimento (grau de expansão) podem ser usados para a verificação da quantidade de água nesses materiais. Este teste também avalia a reticulação de maneira indireta. Sabe-se que os polímeros reticulados com maior quantidade de agentes reticulantes apresentam, geralmente, um menor grau de expansão, em relação aos sintetizados com menor quantidade de agente reticulante e preparados a partir de soluções poliméricas menos concentradas. Assim, pode-se verificar indiretamente a reticulação pela expansão dos materiais (Oliveira *et al.*, 2002; Harris, 2009).

Os testes por espectroscopia de infravermelho são utilizados para a verificação dos grupos funcionais existentes nos materiais. Através desses testes verificou-se o grau de desacetilação da quitosana e as reações e interações envolvidas entre os polímeros e o reticulante genipin (Mi *et al.*, 2000; Lima, 2005).

Testes mecânicos foram realizados para se determinar a tensão máxima na ruptura, módulo de elasticidade e tenacidade dos materiais. Estes foram comparados com as propriedades

mecânicas da pele, com a finalidade de verificar sua viabilidade para uso como tecido epitelial artificial.

Os testes que verificam a biocompatibilidade dos filmes produzidos são os testes biológicos de viabilidade de células VERO (células fibroblásticas de rim de Macaco Verde Africano) *in vitro* por MTT e o teste de adesão celular das células VERO. Estes testes são aceitos como sendo primeiro passo para se verificar a citotoxicidade de um material. Assim, utilizou-se estes procedimentos experimentais para a preparação de biomateriais e para analisa-los qualitativa e quantitativa. Observou-se então as propriedades de interesse dos filmes poliméricos, reticulados e não reticulados com genipin para potencial aplicação em pele artificial.

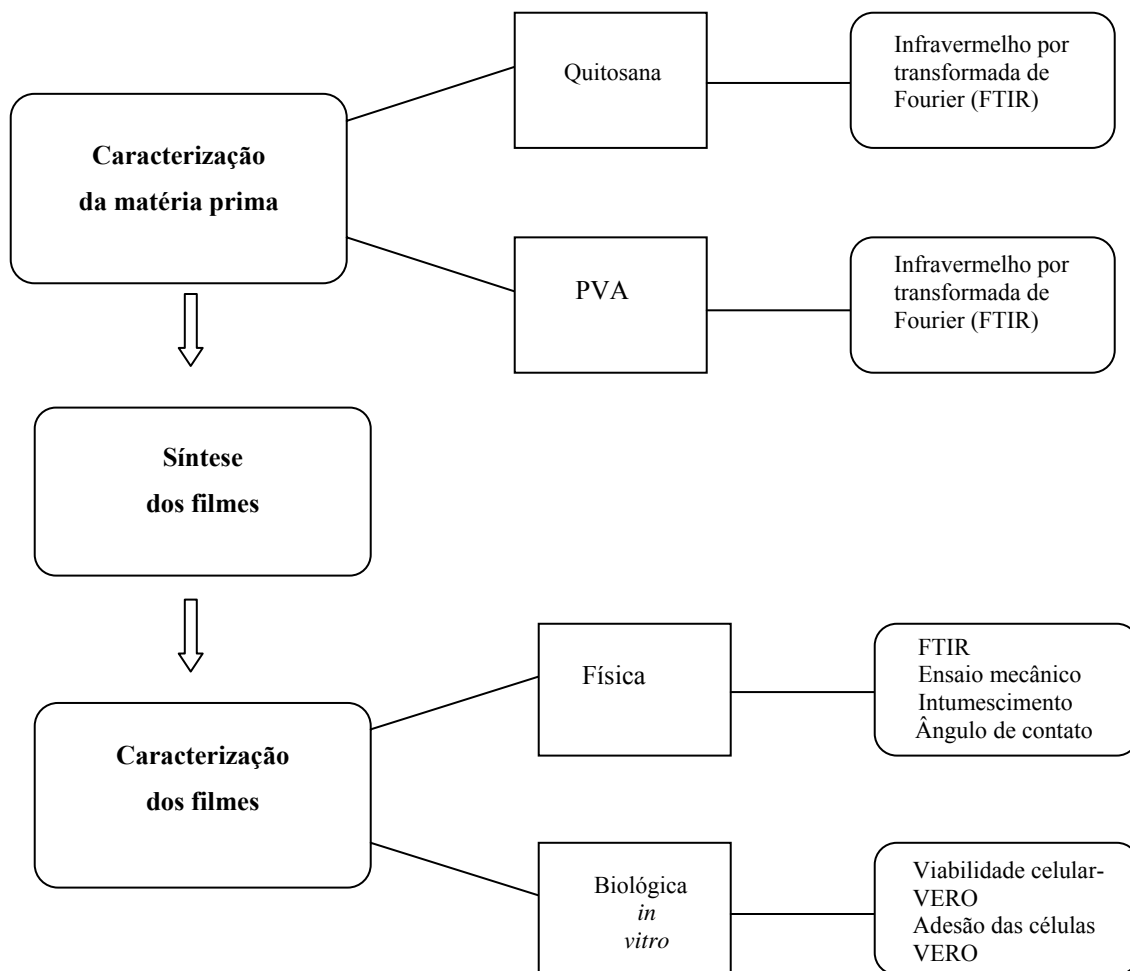


FIGURA 4.1 - Fluxograma das etapas do trabalho.

4.2 MATERIAIS

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. Foram empregados para a preparação das membranas (filmes), os reagentes que são listados a seguir. Quitosana em pó (Cat.#419419, Sigma-Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin, USA, massa molar (MM) = 161.000g/mol, grau de desacetilação (GD) =75,6%, viscosidade = 1406cP -1,0% em 1% de ácido acético). Poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila) PVA (GH=80% e massa molar (MM) de 9.000 a 10.000g/mol, Sigma-Aldrich, Cat.#360627). Genipin (ou nome da IUPAC: Metil-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclonona-4,8-dieno-5-carboxilato, Ge, pureza > 98% analisado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC-*Hight Performance Liquid Chromatography*), Challenge Bioproducts, Taiwan) foi o agente reticulante químico. Ácido acético (CH₃COOH - Cat.#49199, Sigma-Aldrich). Ácido clorídrico (HCl-Cat.#H9892, Sigma-Aldrich). Hidróxido de sódio (NaOH - Cat# 106498, MERCK) foram empregados sem purificação posterior.

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATÉRIAS PRIMAS

As substâncias, quitosana e PVA, foram caracterizadas do ponto de vista físico-químico através das técnicas de espectroscopia na região do infravermelho usando os modos de transmitância e absorbância por espectroscopia de infravermelho (FTIR – *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*).

A avaliação através de FTIR foi realizada em pastilha prensada do reagente conforme fornecido, misturado com KBr (1%, em massa de reagente em relação àquela de KBr) empregando a técnica de reflectância difusa. Foi utilizado equipamento Spectrum 100, da Perkin Elmer, sendo feitas 32 varreduras entre 400 e 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹ e intervalos de 2cm⁻¹.

A determinação do grau de desacetilação (G.D) da quitosana foi realizada também através de FTIR. A partir das intensidades das bandas de infravermelho nas frequências 1655 e 3450 cm^{-1} (α_1 e α_2 na Equação 1, respectivamente), foi calculado o grau de desacetilação médio deste polímero (Lima, 2005).

$$\text{GD} = \left[97,67 - \left(\frac{\alpha_1}{\alpha_2} \right) \right] \quad (1)$$

4.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

Uma solução contendo 1,0% (m/v) de quitosana foi preparada pela dissolução de 2,5g em 250mL de solução aquosa de ácido acético a 2% (m/m). Para a solubilização e homogeneização, a solução foi agitada magneticamente por um período 48h.

A solução de PVA foi preparada pela dissolução de 5,0g de pó do polímero em 100mL de água Milli-Q, sob agitação magnética à temperatura de $(70 \pm 2)^\circ\text{C}$, por 2 horas. Após a solução ter sido resfriada à temperatura ambiente o pH foi corrigido para $(2,00 \pm 0,05)$ com a adição de solução de ácido clorídrico 1,0 mol/L.

Diferentes proporções da solução de PVA foram adicionadas à solução de Quitosana (Qui) para obter as razões em massa de PVA/Qui de (0:1), (1:3), (1:1), (3:1) e (1:0) em pH $(4,0 \pm 0,05)$, ajustado pela adição de solução de soda cáustica 0,5 mol/L. Após a homogeneização (5 minutos), o agente reticulante foi adicionado lentamente sob agitação constante. A concentração final de genipin na solução precursora foi de 0,5% e 1% em relação à massa total de polímero. Posteriormente, as soluções foram vertidas em placas plásticas e a secagem inicial se deu à temperatura ambiente por 48h. Na etapa final, a secagem foi realizada em estufa a $(40 \pm 2)^\circ\text{C}$ por 24h.

As amostras de filmes de polímero sintetizadas foram identificadas por meio da notação: (PVA/Qui/Ge) ou (X:Y:Z). Sendo X e Y a porcentagem de PVA e Qui, respectivamente,

em relação a massa total de polímero, e Z a porcentagem da massa de Ge, também em relação à massa total de polímero.

A Tabela 4.1 apresenta as diferentes composições empregadas para se produzir os filmes poliméricos.

TABELA 4.1 - Filmes Produzidos.

| Identificação | PVA | Quitosana (Qui) | Genipin (Ge) |
|---------------|------|-----------------|--------------|
| (0:1:0) | 0% | 100% | 0% |
| (3:1:0) | 75% | 25% | 0% |
| (1:1:0) | 50% | 50% | 0% |
| (1:3:0) | 25% | 75% | 0% |
| (1:0:0) | 100% | 0% | 0% |
| (0:1:0,5) | 0% | 100% | 0,5% |
| (3:1:0,5) | 75% | 25% | 0,5% |
| (1:1:0,5) | 50% | 50% | 0,5% |
| (1:3:0,5) | 25% | 75% | 0,5% |
| (1:0:0,5) | 100% | 0% | 0,5% |
| (0:1:1) | 0% | 100% | 1% |
| (3:1:1) | 75% | 25% | 1% |
| (1:1:1) | 50% | 50% | 1% |
| (1:3:1) | 25% | 75% | 1% |
| (1:0:1) | 100% | 0% | 1% |

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL

Os hidrogéis poliméricos reticulados e não reticulados com genipin, depois de preparados pelo método de evaporação de solvente, foram analisados através de caracterizações físico-químicas, mecânicas e ensaios de biocompatibilidade. Estas análises tiveram como objetivo o conhecimento das propriedades dos materiais sintetizados. Estes procedimentos são descritos neste capítulo.

4.3.1.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA

Análises qualitativa relativa a homogeneidade ou heterogeneidade dos filmes e dimensional (tamanho e espessura das amostras) foram executadas através de observações visuais, levando-se em conta a solubilidade, miscibilidade e segregação de fase nas blendas, no primeiro caso, e a determinação do tamanho e espessura dos filmes no último, obtida com o auxílio de um micrômetro Mitotoyo ($\pm 10\mu\text{m}$). Técnicas de FTIR também foram utilizadas para avaliar a presença de grupos químicos dos filmes. Os espectros de FTIR foram obtidos pelo modo ATR (reflexão total atenuada) na faixa de número de onda de 4000 a 650cm^{-1} durante 64 varreduras, com resolução de 2cm^{-1} (Paragon 1000, Perkin-Elmer, USA). Os espectros de FTIR foram normalizados e as bandas de vibração foram associadas aos principais grupos químicos. Para estes ensaios, os filmes foram recortados no tamanho aproximados de 1 cm^2 e secos em estufa a $(40\pm 5)^\circ\text{C}$.

4.3.1.2 COMPORTAMENTO MECÂNICO

O ensaio de tração foi realizado para avaliar o comportamento mecânico (tensão máxima de tração (σ), deformação específica (DE), módulo de elasticidade (E) e tenacidade (T) dos filmes obtidos e foi executado em equipamento EMIC DL 3000, utilizando-se 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 da amostra. Foram obtidos valores médios de seis amostras conforme o requerimento da norma ASTM D882/02. A temperatura de ensaio foi mantido em $21\pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa em aproximadamente em $52\pm 8\%$. As

amostras ensaiadas foram previamente inspecionadas e aquelas apresentando qualquer descontinuidade, tais como bolha de ar, furos ou segregação com dimensão superior a 5% da área foram rejeitadas. A análise estatística dos resultados obtidos no ensaio mecânico foi realizada, através das médias e desvios padrões dos grupos de medidas, pela análise estatística ANOVA. As decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de 0,05 (95%) (ASTM D882/02).

4.3.1.3 GRAU DE INTUMESCIMENTO

O grau de intumescimento foi obtido colocando as amostras dos filmes em contato com solução de fosfato tampão (PBS), preparada à temperatura de $(36\pm 1)^{\circ}\text{C}$. O PBS foi obtido dissolvendo-se reagentes em grau analítico formando íons constantes da Tabela 4.2 em água deionizada e tamponado com tampão TRIS e HCl para obter o pH de $(7,40\pm 0,05)$. A tabela 4.2 apresenta as proporções para se obter as concentrações iônicas do PBS em mmol/L e a comparação entre o PBS, o plasma sanguíneo, o tampão TRIS e a fluido corporal simulado (SBF – *Simulated Body Fluid*) ou solução de Kokubo, que tem concentração iônica próxima da concentração do plasma sanguíneo humano. Todas as soluções da Tabela 4.2 possuem pH no valor aproximado de 7.4.

TABELA 4.2 - Concentração iônica das soluções de PBS, SBF, Plasma Sanguíneo e TRIS

| Íon | PBS | SBF | Plasma Sanguíneo | Tampão TRIS |
|--------------------------------|-------|-------|------------------|-------------|
| Na ⁺ | 347,0 | 142,0 | 142,0 | 0 |
| K ⁺ | 11,0 | 5,0 | 5,0 | 0 |
| Mg ²⁺ | 0 | 1,5 | 1,5 | 0 |
| Ca ²⁺ | 36,0 | 2,5 | 2,5 | 0 |
| Cl ⁻ | 231,0 | 147,8 | 103,0 | 45,0 |
| HCO ₃ ⁻ | 0,0 | 4,2 | 27,0 | 0 |
| HPO ₄ ²⁻ | 15,0 | 1,0 | 1,0 | 0 |
| SO ₄ ²⁻ | 0 | 0,5 | 0,5 | 0 |

Para a determinação do grau de intumescimento (GI), as amostras, em triplicatas, foram secas em estufa a 40°C e pesadas após a estabilização da massa. Após a pesagem as amostras foram colocadas em recipientes com PBS, obedecendo-se à relação entre a área superficial e o volume de solução de 0,1cm⁻¹.

As amostras foram mantidas a (37±1)^oC em banho-maria. Após um período de tempo estabelecido as amostras foram retiradas do recipiente e pesadas. A fim de se 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^o C até atingir a estabilização do peso. O GI foi obtido conforme a Equação 2.

$$GI = \left(M_i - \frac{M_s}{M_s} \right) \times 100\% \quad (2)$$

sendo M_i é a massa intumescida e M_s a massa da amostra após a secagem final. Cada experimento foi repetido três vezes e o valor médio foi usado para validar os resultados. Para avaliar a influência do agente reticulante no grau de intumescimento, foi usado a análise estatística ANOVA de fator único com nível de significância de 95%.

4.3.1.4 ÂNGULO DE CONTATO

A avaliação da evolução do ângulo de contato com o teor de quitosana na blenda foi adaptada de Mansur (2007) e feita entre a superfície do filme e a água deionizada (18M Ω .cm). A medição do ângulo foi realizada utilizando-se o software IMAGEJ® 2006, a partir do tratamento da imagem digitalizada da gota (volume=50 μ L) depositada sobre a superfície do hidrogel com microseringa. Todas as fotos foram realizadas dentro do tempo máximo de 1 minuto, empregando-se uma câmera digital Sony® Cyber-Shot. As medições foram conduzidas em condições constantes de (54 \pm 2)% de umidade relativa e temperatura ambiente de (24 \pm 3) $^{\circ}$ C. Foi utilizado como resultado a média de seis tratamentos independentes.

Cada resultado foi registrado como média e desvio padrão considerando o número de replicatas característico de cada experimento. A análise estatística dos dados foi, novamente, realizada pelo método ANOVA com nível de significância de 95%.

4.3.1.5 VIABILIDADE DE CÉLULAS VERO *IN VITRO* POR MTT

No caso de dispositivos que ficarão em contato com a pele, como é a membrana (filmes) em estudo, a norma ISO 10993 contém um guia para avaliação de testes iniciais de biocompatibilidade. Nesta norma, para a seleção apropriada dos testes iniciais de avaliação para cada material e seu tempo de contato, é apresentada uma tabela de orientação. A tabela de orientação recomenda o ensaio *in vitro* de citotoxicidade. A técnica utilizada neste trabalho com a finalidade de determinar a porcentagem da viabilidade celular é o MTT. Este teste realiza ensaios quantitativos para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica presente no ambiente biológico estudado. Este ensaio quantifica a

atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazólio MTT, utilizando, neste estudo, as células VERO. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da enzima succinato desidrogenase, fornecendo então uma medida de função mitocondrial (ISO10993).

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. Dessa forma, quanto maior o valor da leitura no espectrofotômetro, maior é a taxa metabólica, podendo diferenciar células viáveis de não viáveis. As leituras da absorbância dos cristais de formazana, são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis e foram realizados em 595 nm, por meio da técnica de espectroscopia de absorção na região do visível.

A viabilidade celular foi então analisada através da redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-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 e tratadas em cultura de células (TPP, 92096). As células foram incubadas a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida contendo 5% de 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 quatro horas. Posteriormente, foi adicionada uma solução contendo dodecil sulfato de sódio (SDS) e ácido clorídrico (SDS10%/ HCl 0,04 N). As placas foram re-incubadas por mais 14 a 16h e, 200 μL foi transferido para uma placa de 96 poços onde foi lida a absorbância em 595 nm, então usando-se 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 Dunnett e Neuman_Keuls com nível de significância de 95% (ASTM F813-01).

A correlação direta entre as medidas de densidade óptica é assegurada porque em todos os casos, as amostras têm o mesmo tamanho e a área livre para a adesão das células em superfícies boas é sempre a mesma.

4.3.1.6 ADESÃO DE CÉLULAS VERO

A morfologia da adesão e proliferação celular foi avaliada por MEV após o tempo de cultura de 24h. Para o ensaio de 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 PVA/Qui, reticulados e não reticulados, foram desidratadas em uma série gradual de enxágües com 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).

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS: QUITOSANA E PVA

Os polímeros quitosana e PVA foram caracterizados por espectroscopia de infravermelho. Esta análise fornece dados referentes à composição química dos materiais. As informações foram analisadas e discutidas no primeiro tópico deste capítulo, visando o entendimento das estruturas químicas e análises referentes a potenciais interações entre os reagentes.

5.1.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

As fórmulas estruturais da (a) quitosana, (b) genipin e (c) PVA estão mostradas na Figura 5.1. É possível observar as estruturas dos copolímeros (polímero formado de meros ou unidades diferentes) de PVA e quitosana. Tanto a quitosana quanto o PVA, utilizados neste trabalho, possuem unidades com e sem acetatos.

O espectro de infravermelho obtido a partir da quitosana em forma de pó, 80% desacetilada está mostrado na Figura 5.2. Nesta curva, as intensidades das absorções são apresentadas, com picos de absorção em 1321 cm^{-1} que corresponde à amina primária, em 1260 cm^{-1} relacionada à amina secundária, em 1379 cm^{-1} que é relacionada à presença de amina terciária. As principais vibrações relacionadas a quitosana estão apresentadas no espectro de infravermelho da Figura 5.2. Os detalhes sobre os principais grupamentos verificados por este método, podem ser observados na Tabela 5.1. As vibrações relacionadas a ligação C-H correspondentes à estrutura sacarídea em 1154 cm^{-1} e 896 cm^{-1} podem ser também verificadas neste espectro. Observam-se, ainda, absorções entre 1100 e 1500 cm^{-1} . Elas são muito discutidas pela literatura e representam o estiramento C-N presente no carbono 2 do anel glicopiranosídeo (Mi *et al.*, 2000; Lima, 2005).

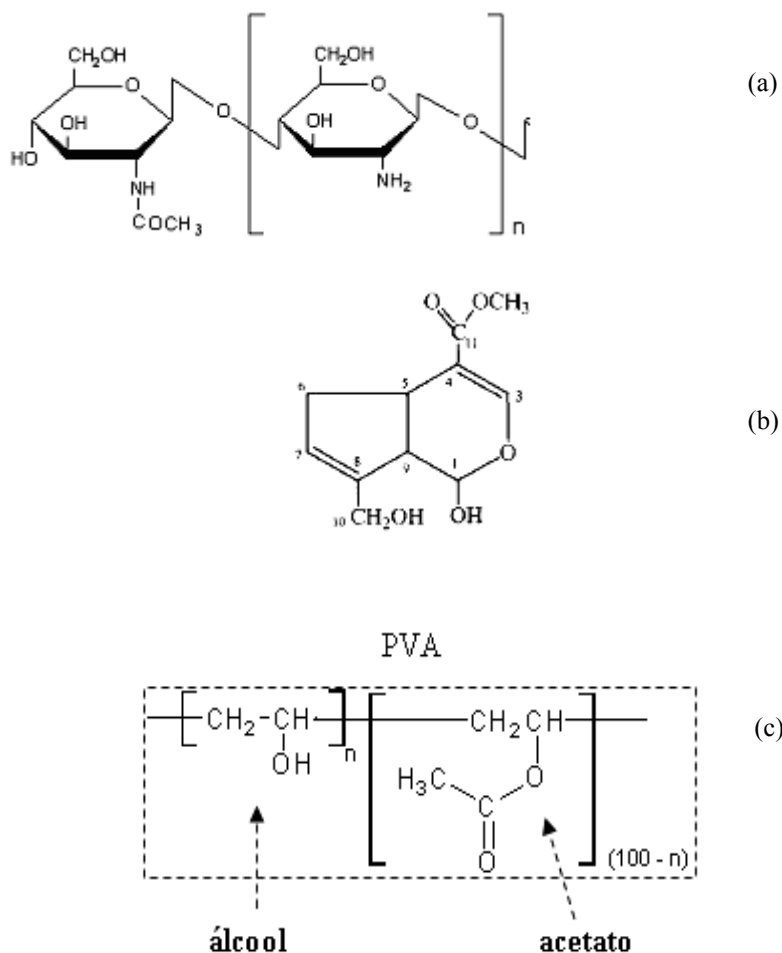


FIGURA 5.1 - Fórmulas estruturais de (a) quitosana, (b) genipin e (c) PVA.

A partir das intensidades das bandas de infravermelho da quitosana em pó, nas frequências 1655 e 3450 cm^{-1} , correspondem respectivamente a α_1 e α_2 na Equação (1), foi calculado o grau de desacetilação médio deste polímero, sendo obtido o valor de $(80 \pm 4)\%$, pelo método de espectroscopia de infravermelho proposto por Lima (2005). Este resultado apresenta-se relativamente similar ao fornecido pelo fabricante, que foi 76% de grau de desacetilação. Existem várias técnicas recomendadas para verificar o grau de desacetilação. Entre essas, cita-se, por exemplo, titulometria, potenciometria, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Entretanto, a espectroscopia de infravermelho tem sido a técnica mais aceita. É muito importante verificar o grau de desacetilação, pois ele exerce influência determinante no comportamento físico-químico, mecânico e até biológico do polímero. A relação existente entre o número de grupos glicosamina e N-acetilglicosamina presentes na quitosana controlam, entre outras coisas, o grau de reticulação. Independente

da massa molar, quanto mais grupos aminos disponíveis maior será a possibilidade de formação de ligações cruzadas no material. O GD afeta as interações hidrofóbicas e hidrofílicas, pois dele dependem o número de grupos amino disponíveis para as reações de reticulação e interações inter e intra moleculares com água e outras substâncias (Gupta, 2007). A quitosana com alto GD (75%) é hidrofílica em comparação com quitosana de baixo GD (48%). Esta característica pode ser modulada também através de reações com agentes reticulantes nos grupamentos químicos referentes as amins. Maiores graus de desacetilação influenciam a interação com moléculas de água, aumentam assim a hidrofílicidade e a solubilidade em soluções aquosas ácidas é facilitada. Maiores valores de GD também favorecem o maior índice de intumescimento e de difusão. O grau de desacetilação também afeta outras características. Com graus de desacetilação acima de 50% verifica-se propriedades bacteriostáticas contato-dependente, adesão, espalhamento e proliferação celular, principalmente em quantidades de massas molares superiores a $3,1 \times 10^5$ g/mol (Sano, 2002; Hsu, 2004; Wenling, 2005; Sarasam, 2008).

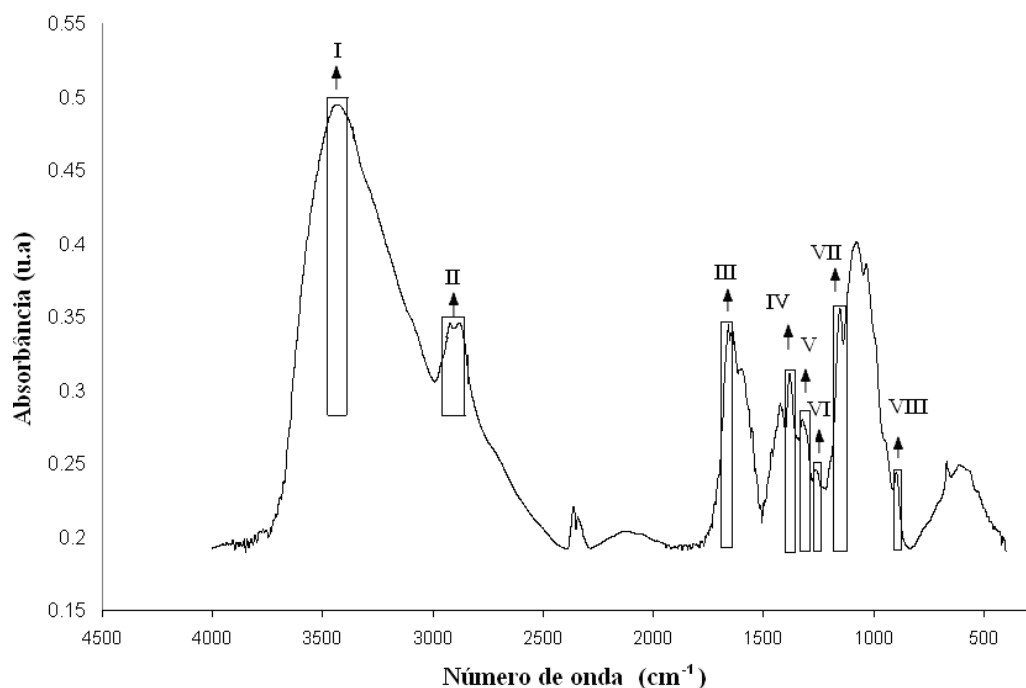


FIGURA 5.2 - Espectro de FTIR da quitosana no modo de absorbância com grau de desacetilação calculado em 80%.

TABELA 5.1 - Os principais grupos funcionais envolvidos nas transições vibracionais no infravermelho encontradas no espectro da quitosana na Figura 5.2.

| Números indicados no espectro de FTIR da quitosana | Grupos funcionais envolvidos nas transições vibracionais |
|--|--|
| I | Amina, hidroxila |
| II | alcano |
| III | carbonila |
| IV | Amina |
| V | Amina terciária |
| VI | Amina primária |
| VII | Estrutura sacarídea |
| VIII | Estrutura sacarídea |

O espectro de infravermelho da Figura 5.3 corresponde ao polímero PVA com GH de 80%. Adicionalmente, a Tabela 5.2 mostra os principais grupos funcionais envolvidos nas transições vibracionais, para o PVA utilizado na produção dos filmes. Os números indicados por I, II, III, IV, V, VI no espectro estão relacionados aos grupos funcionais na Tabela 5.4. Podem ser verificados no espectro, grupos químicos como hidroxilas e também grupos acetatos que são de extrema importância no comportamento desse polímero. A presença de uma quantidade adequada de grupos acetato aumenta a solubilidade em água, a frio (Finch, 1973). O PVA 80% hidrolisado, como o utilizado neste trabalho, possui maior solubilidade em água que o 100% hidrolisado. Este comportamento é explicado porque o PVA totalmente hidrolisado requer temperaturas elevadas para solubilizar em água. O efeito da temperatura na solubilidade está associado à quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogênio são rompidas diminuindo as forças intra e intermoleculares e, com isso, a solubilidade aumenta. O PVA completamente hidrolisado, possui elevado número de hidroxilas que leva à formação de ligações de hidrogênio fortes entre grupos hidroxilas intra- e intermoleculares, reduzindo sua solubilização em água. Isto explica porque o PVA completamente hidrolisado é

insolúvel a frio. Por outro lado, os grupos acetato residuais no PVA parcialmente hidrolisado são essencialmente hidrófobos e enfraquecem as ligações intra e intermoleculares dos grupos hidroxilas vizinhos. Assim, podem ser produzidos materiais solúveis em meio aquoso controlando-se essas interações na molécula e isto é importante em várias aplicações biomédicas (Aranha e Lucas, 2001).

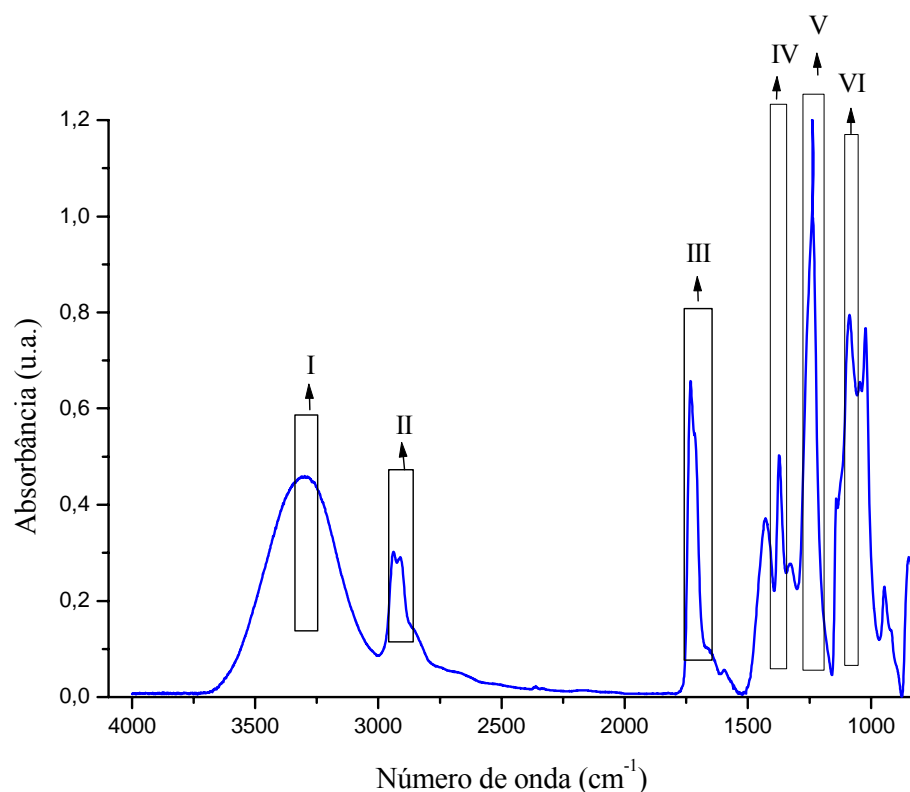


FIGURA 5.3 - Espectro de FTIR de PVA com grau de hidrólise de 80%.

TABELA 5.2 - Principais grupos funcionais do PVA associados ao espectro da Figura 5.3.

| Números indicados no espectro de infravermelho de PVA | Grupos funcionais envolvidos nas transições vibracionais |
|---|--|
| I | hidroxila |
| II | alcano |
| III | acetato |
| IV | alcano |
| V | acetato |
| VI | acetato |

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL

Os filmes produzidos foram analisados por avaliação qualitativa, por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, intumescimento, ensaio mecânico, ângulo de contato e testes de biocompatibilidade. Os resultados são analisados e discutidos nos itens a seguir, visando aprimorar o entendimento e a modulação das propriedades dos materiais produzidos.

5.2.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA

Neste estudo, genipin, um reagente reticulante natural e não tóxico, foi usado como reticulante da quitosana. Os filmes de 25-75 μ m espessura e uniformes foram investigando, considerando a solubilidade, miscibilidade e segregação de fases das blendas PVA/Qui, em diferentes proporções dos polímeros foram visualmente inspecionadas. Em geral, filmes muito uniformes foram obtidos. Os filmes de PVA puro são opticamente transparentes à luz visível. Os filmes de quitosana pura apresentam tonalidades amareladas e com o genipin, eles se tornaram coloridos. Além disso, a intensidade da cor mudou como é possível visualizar nas Figuras 5.4 e 5.5. Pode-se verificar que a cor depende da concentração de genipin. Assim, a reação entre genipin e as misturas de PVA/Qui foram monitoradas qualitativamente, detectando as mudanças ópticas das misturas. A cor foi intensificada com o aumento da concentração de genipin (reticulante). As Figuras 5.4 e 5.5 apresentam fotografias de amostras produzidas de redes poliméricas constituídas de PVA puro (a), quitosana pura (b) e filmes de blendas reticuladas com genipin (c, d, e, f, g, h, i).

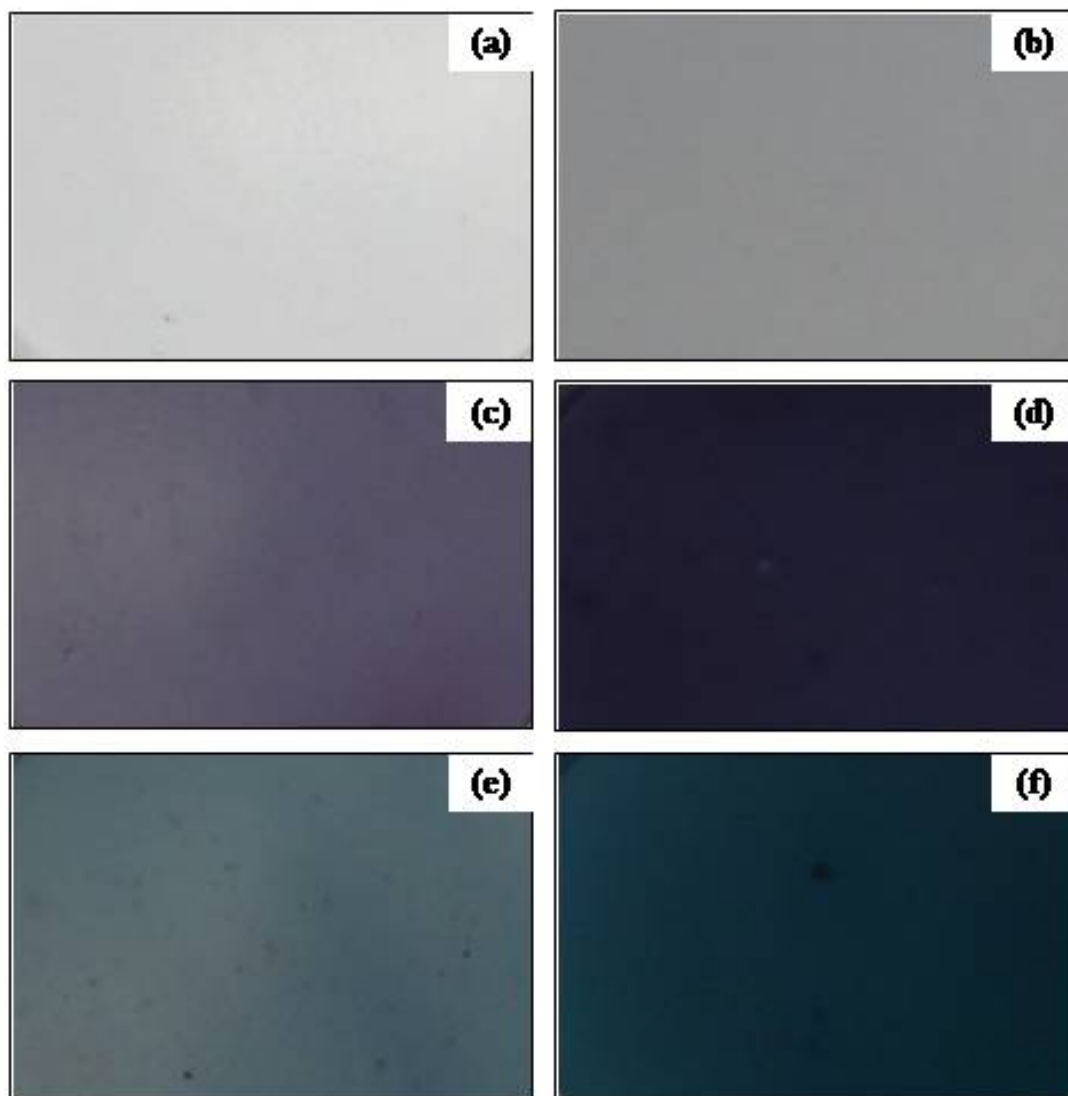


FIGURA 5.4 - Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (a) PVA (1:0:0); (b) quitosana (0:1:0); (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0,5); (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1); (e) PVA/Qui/Ge (1:1:0,5) e (f) PVA/qui/Ge (1:1:1) fundo branco.

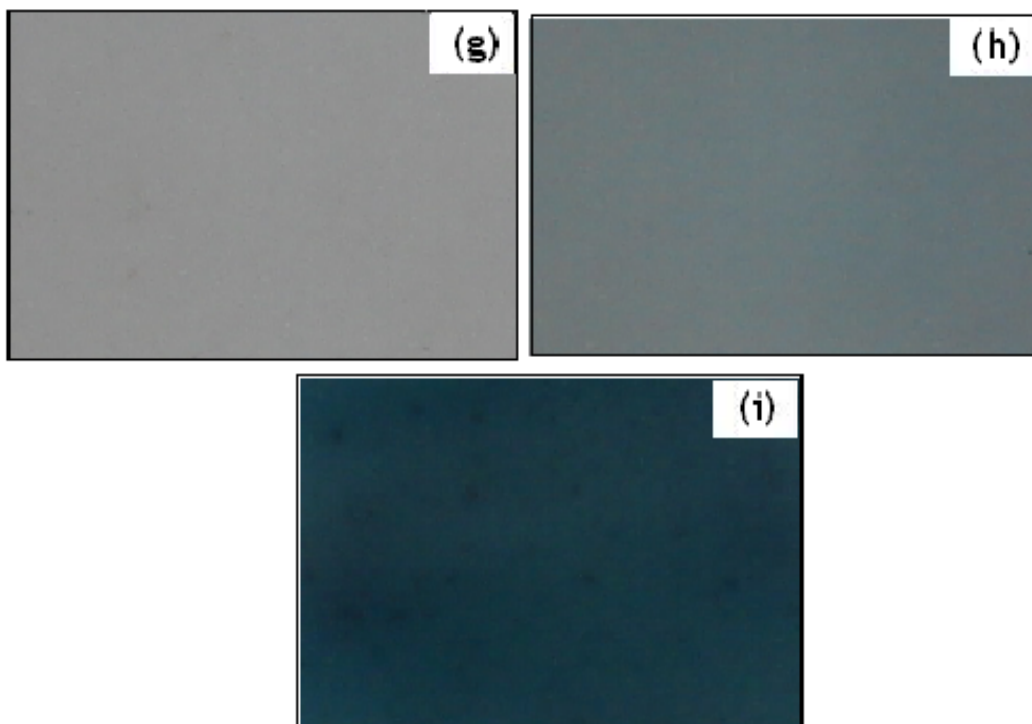


FIGURA 5.5 - Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (g) PVA (3:1:0);
(h) quitosana (3:1:0,5); (i) PVA/Qui/Ge (3:1:1) fundo branco.

TABELA 5.3 - Avaliação visual das blendas

| PVA/Qui/Ge | Observações |
|-------------------|--|
| (1:0:0) | Transparente, flexível |
| (0:1:0) | Transparente e amarelado |
| (0:1:0,5) | Transparente, coloração clara uniforme |
| (0:1:1) | Coloração intensa e uniforme |
| (1:1:0,5) | Coloração clara e homogênea |
| (1:1:1) | Coloração escura e homogêneo |
| (3:1:0) | Transparente e flexível |
| (3:1:0,5) | Transparente e coloração clara |
| (3:1:1) | Coloração escura e homogêneo |

A cor de substâncias orgânicas é atribuída às ligações insaturadas. Em moléculas orgânicas, geralmente é a conjugação de ligações duplas e simples que gera a cor nestas substâncias. É exatamente a estrutura química da molécula que determina a cor de um composto. Estas ligações geram fenômenos que ajudam na formação da cor, como a absorção em certos comprimentos de onda da luz, podendo levar à ocorrência de reflexão de uma parte da luz em outros comprimentos de onda, por exemplo (Guaratini e Zanoni, 2000; Duff, 2001).

A absorção em comprimento de onda maior que 185 nm é limitado a um número de grupos funcionais chamados de cromóforos, que contém elétrons de valência com energia de excitação relativamente baixas. Ocorre que muitos compostos orgânicos ao reagirem com o

fóton tem como resultado a excitação eletrônica. Assim, os elétrons não compartilhados (não-ligante) ou elétrons compartilhados, entre dois átomos (ligantes), em um orbital π são excitados para um orbital π^* (antiligante) de maior energia. Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π . As energias necessárias para esses processos situam-se na região espectral de 200 a 700nm (Guaratini e Zanoni, 2000; Duff, 2001; Skoog, 2002).

As reações que levam compostos formados por reação de genipin com grupos amina a apresentarem mudança de coloração foram estudados por Toyuama (1994). Para entender a formação desses compostos, são apresentadas etapas para a formação dos corantes. O genipin depois de atacado pelo reagente nucleófilo, por exemplo uma amina, forma os intermediários 1 e 2 (Figura 5.6) (Toyuama, 1994).

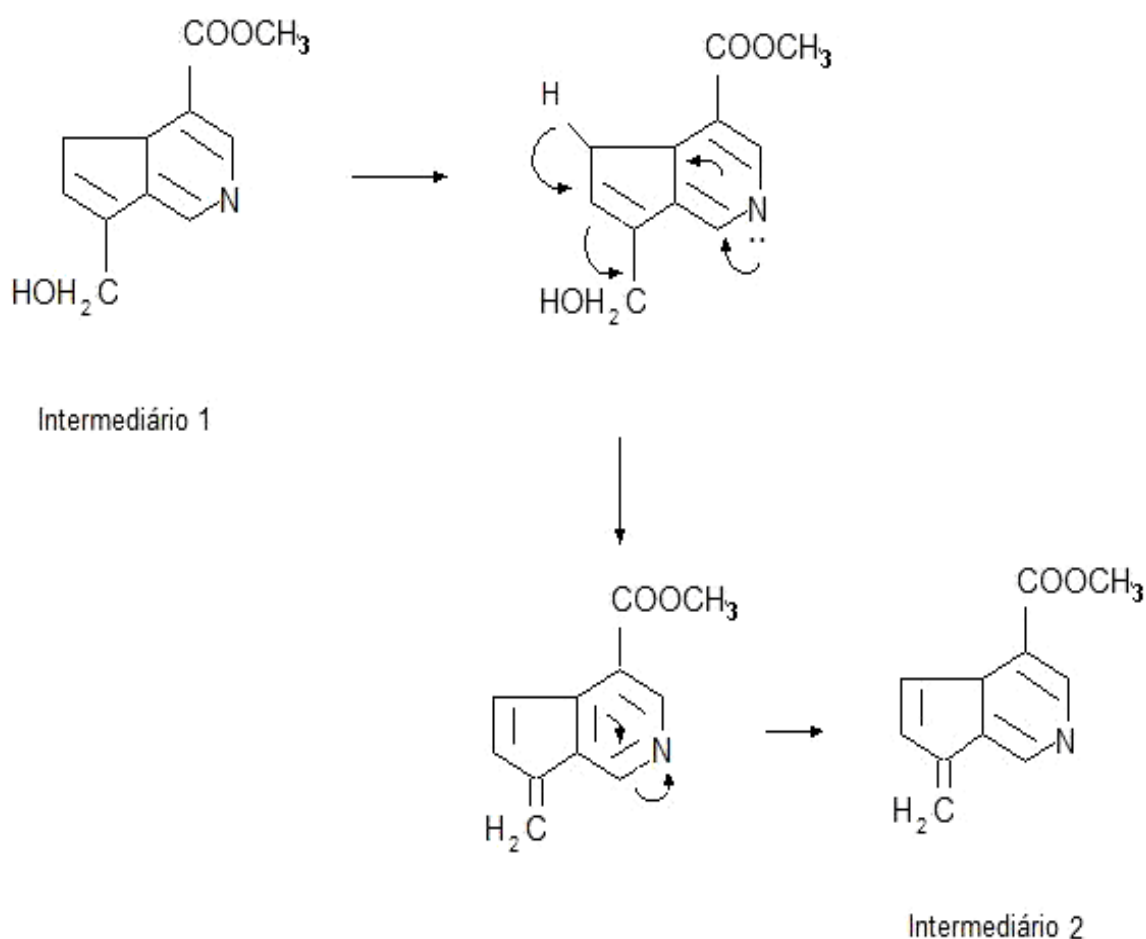


FIGURA 5. 6 - Intermediários formados na reação de genipin com grupamentos amina.

De acordo com Toyuama (1994) e Mi e colaboradores (2000), o intermediário 1 reage com o intermediário 2 e forma um dímero, podendo também formar oligômeros. A oxidação destes compostos faz com que o corante na forma de oligômeros a polímeros passe de uma cor marrom avermelhada para tons de azul e violeta. Forma-se polímeros com uma cor diferente daquela do reagente inicial (marrom avermelhado), à partir da polimerização induzida por radicais oxigênio destes oligômeros, conforme Toyuama (1994). A reação de polimerização não foi proposta pelos autores, que apresentaram apenas os oligômeros de genipin (pigmentos marrom antes de oxidar). Estas reações de compostos orgânicos com oxigênio são estudadas e relatadas na literatura. Em seu estado fundamental a molécula de oxigênio (de mais baixa energia) apresenta dois elétrons desemparelhados nos seus orbitais moleculares de mais alta energia. A molécula de radical oxigênio, por sua vez, apresenta dois elétrons emparelhados que podem estar num mesmo orbital ou em orbitais diferentes. Trata-se de uma molécula extremamente reativa que pode ser gerada de forma indireta pela transferência de energia por luz visível ou ultravioleta. Os radicais oxigênio podem reagir com hidrogênios, por exemplo, e formar peróxidos. Os peróxidos podem reagir com hidroxilas podendo levar a polimerização dos compostos orgânicos, gerando moléculas maiores, com maior número de unidades monoméricas (Greenwood e Earnshaw, 1998; Steudel, 1998; Binde, 1999; Breuer, 2000; Puzari e Baruah, 2000; Lane, 2003; Wiberg, 2007; MacPherson, 2008).

Durante as reações com oxigênio, é observado o fato de os hidrocarbonetos saturados serem menos reativos aos agentes oxidantes, o mesmo não acontece com os hidrocarbonetos não saturados, isto é, os alquenos e os alquinos, os quais são oxidados por esses reagentes. Estes agentes também reagem com alcóois primários e secundários, bem como aldeídos. O fato dos compostos com alcóois serem facilmente oxidados, enquanto o alcanos não o são, mostra que a presença de oxigênio na molécula a torna susceptível de passar a um estado mais oxidado (Fieser e Fieser, 1967; Greenwood e Earnshaw, 1998).

5.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Nos espectros apresentados na Figura 5.7, pode-se observar o aumento da intensidade de absorção da banda em 1650 cm^{-1} associadas com o aumento do número do grupo amida ao se passar da curva (a) para a curva (c) resultante do aumento do número de ligações cruzadas. A banda em 1060 cm^{-1} é um resultado do estiramento de C-O e da banda em 1406 cm^{-1} resultado estiramento do anel da molécula de genipin (C = C). A vibração na faixa de 1540 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} é devida aos grupos amina protonados e ao grupo ácido carboxílico da molécula de ácido acético. O estiramento do anel da amina heterocíclica aparece em 1340 cm^{-1} e ocorre com aumento de absorção, para maiores concentrações de genipin (Mi *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2005; Lima, 2005) O perfil típico de polissacarídeo é mantido em 1150 cm^{-1} , característica de estiramento C-O-C (Butler e Pudney, 2003; Costa *et al.*, 2008). A Figura 5.7 mostra que com o aumento de genipin dos espectros (a) para (c), ocorre mudanças na transmitância e conseqüentemente na absorbância das amostras. Com o aumento de genipin as reações ocorrem em maiores proporções, o que pode ser comprovado pelas Figuras 5.8 e 5.9 normalizadas pela banda 1450 cm^{-1} do $\delta\text{ CH}_2$ de acordo com o trabalho de Beppu e colaboradores (Beppu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2005; Lima, 2005).

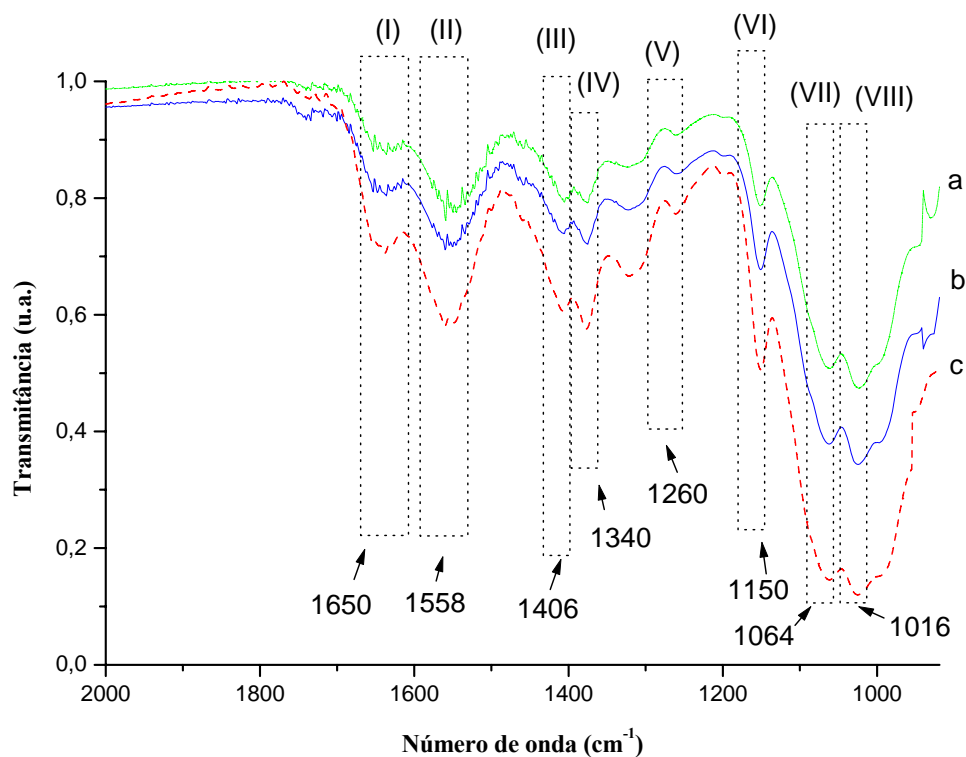


FIGURA 5.7 - Intensidade das bandas dos filmes de quitosana; (a) --- filme de quitosana sem reticulante, (b) — filme 0,5% de genipin com quitosana e (c)..... filme 1% de genipin com quitosana.

A Figura 5.8 mostra o aumento na intensidade da absorção associada aos modos vibracionais das amidas em 1650 cm^{-1} e a Figura 5.9 o aumento das aminas terciárias, com aumento do agente reticulante. As absorções foram normalizadas em relação à banda em 1450 cm^{-1} associada ao grupo C-H (Beppu *et al.*, 1999). Estes resultados mostram que as reações de reticulação estão ocorrendo. Tanto na formação de amidas, produzidas da reação do éster do genipin com amina da quitosana. Também está ocorrendo a formação de aminas terciárias no anel heterocíclico. Estes resultados estão de acordo com as reações apresentadas na Figura 5.10 descritas na literatura (Butler e Pudney, 2003).

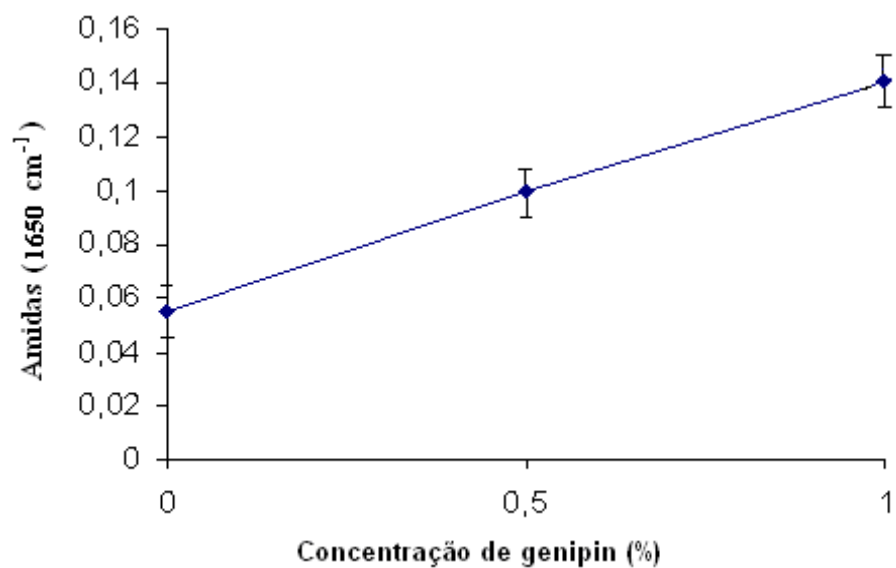


FIGURA 5.8 - Intensidade da absorbância associada aos modos vibracionais das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes.

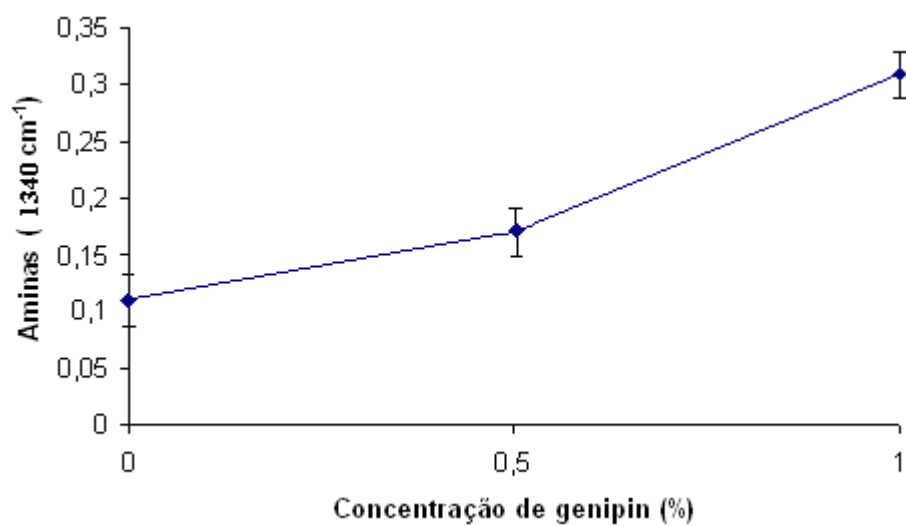


FIGURA 5.9 - Intensidade da absorbância associada aos modos vibracionais das aminas formadas pela reação de genipin com quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes.

Levando em consideração estes resultados e a investigação dos mecanismos de reação em meio ácido, feitas por Butler e Pudney (2003), a síntese de quitosana reticulada por genipin pode ser representada conforme mostrado na Figura 5.10 onde as bandas aminas do polímero reagem com o genipin formando amidas. Também é formada uma amina terciária no anel. Na Figura 5.10, a amida formada é indicada pelo número romano I e amina terciária formada é indicada pelo número .

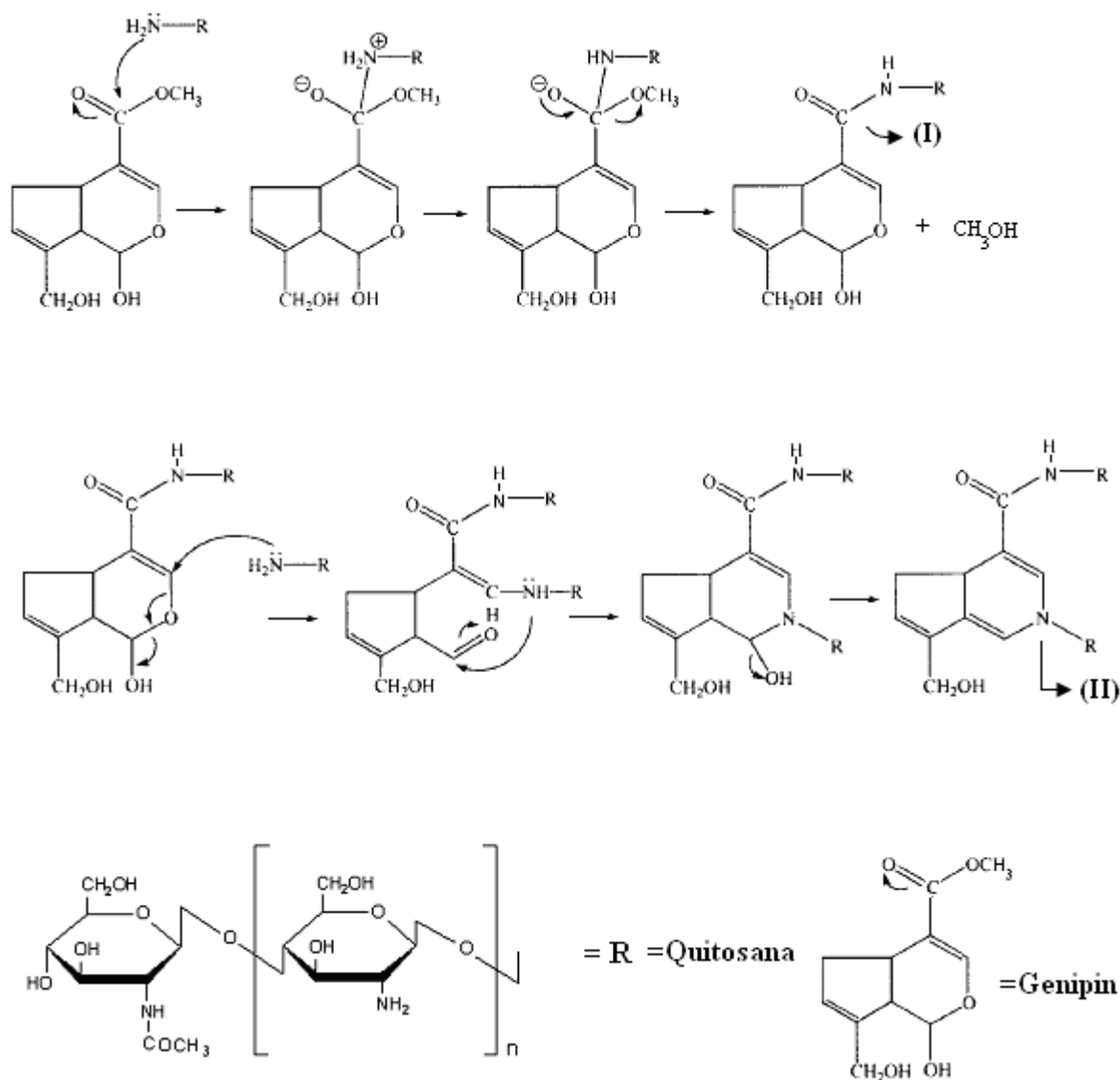


Figura 5.10 - Reações de grupos aminas de polímeros como quitosana com genipin.

Além do estudo dos filmes de quitosana reticulados e sem reticulação, foram realizados os estudos das blendas e também do PVA reagido com genipin. Na Figura 5.11, nos espectros obtidos das blendas, curvas (b), (c) e (d), é possível observar a banda em 1250 cm^{-1} , correspondente à deformação do NH_3^+ , estiramento do CO e deformação do OH ocorrida devido à mistura dos polímeros (Mi *et al.*, 2000; Butler e Pudney, 2003). Este pico em 1250 cm^{-1} é praticamente ausente na quitosana pura. O pico largo em 3290 cm^{-1} é devido à hidroxila. Esta banda é importante porque indica a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio nas amostras. As ligações de hidrogênio podem aumentar a resistência do material e diminuem a solubilidade em água (Mi *et al.*, 2000; Butler e Pudney, 2003).

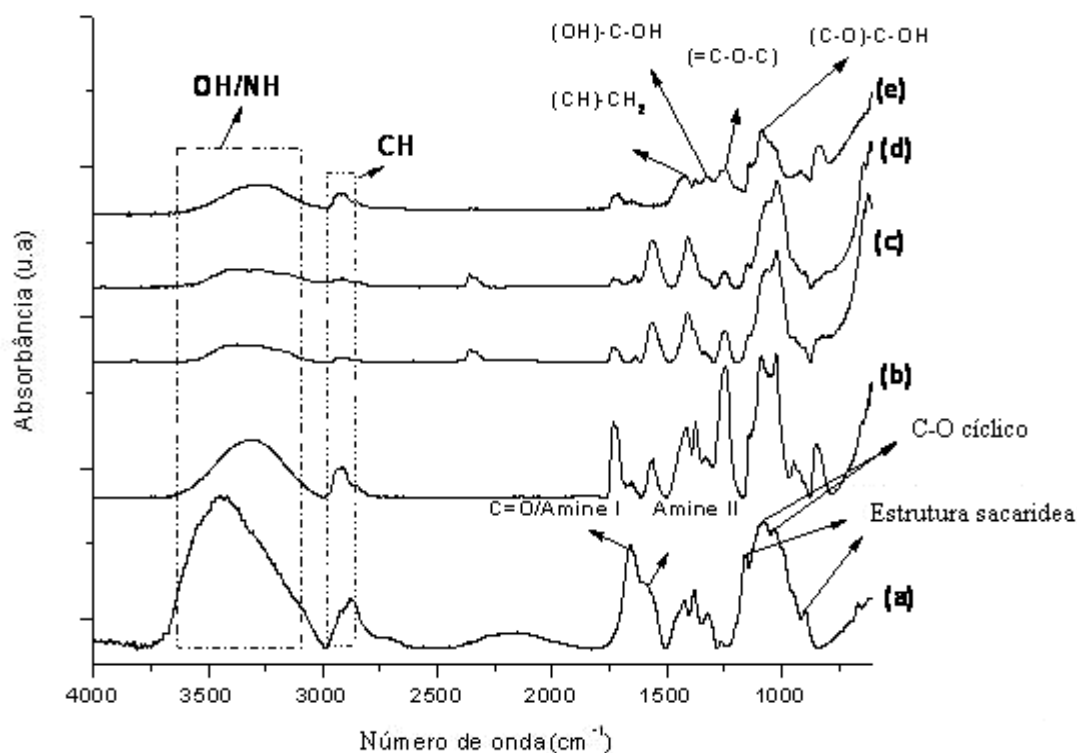


FIGURA 5.11 - Blendas de quitosana e PVA sem reticulação PVA/Qui/Ge (a) PVA/Qui/Ge (0:1:0); (b) PVA/Qui/Ge (1:3:0); (c) PVA/Qui/Ge (1:1:0); (d) PVA/Qui/Ge (3:1:0) and (e) PVA (1:0:0).

Figura 5.12, é possível verificar uma diminuição considerável da banda em 1720cm^{-1} na blenda reticulada com 1% de genipin representada pela curva (c) no espectro. Esta banda está associada aos grupos acetato do PVA. Outra banda relacionada ao acetato, em 1260cm^{-1} , também diminuiu na blenda com 1% de reticulação.

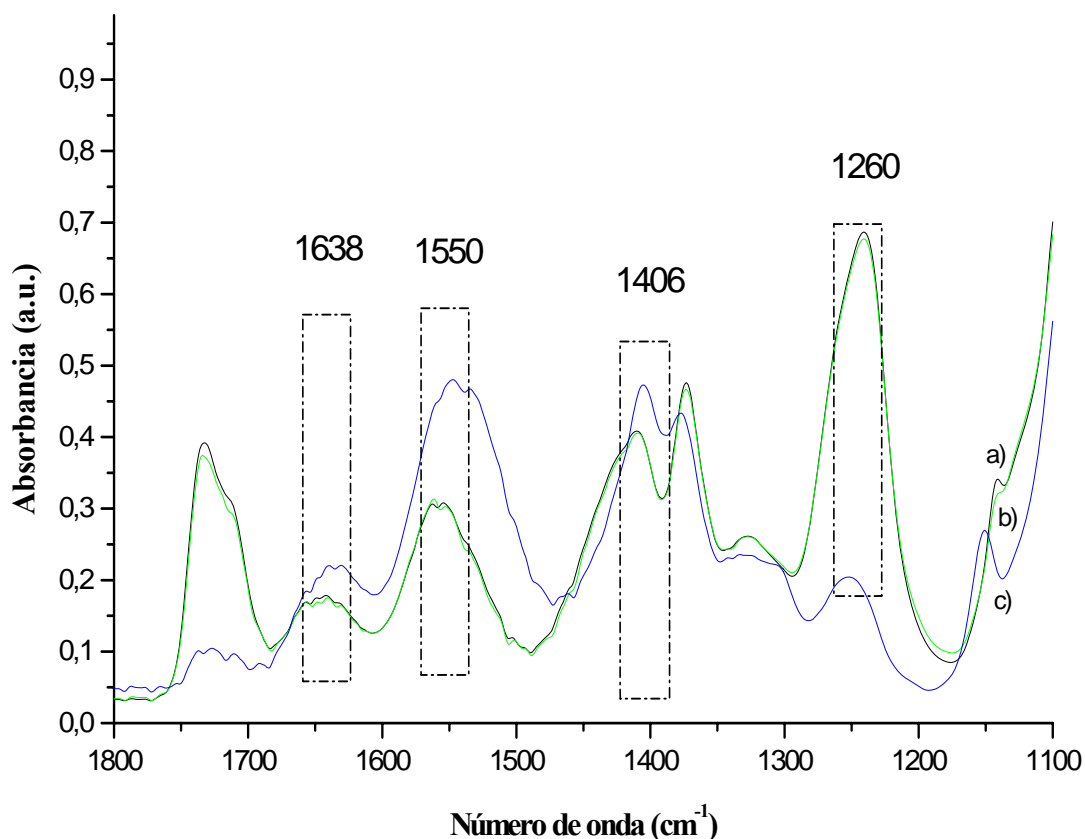


FIGURA 5.12 - Blendas de quitosana e PVA com reticulação PVA/Qui/Ge.(a)75% PVA 25%QUI 0%genipin. (b) 75% PVA 25%QUI 0,5%genipin.(c) 75% PVA 25%QUI 1%genipin

Como mostrado na Figura 5.13 as bandas relacionadas às amidas também aumentam nas blendas reticuladas, indicando a formação de amidas entre genipin e quitosana, produzindo uma reação que resultaria no aumento das bandas em 1650cm^{-1} . Na figura 5.14, verifica-se a diminuição da intensidade das aminas primárias, relacionadas às aminas da quitosana na blenda, que foram consumidas na reação com genipin. Na figura 5.15 verifica-se grande redução da banda dos acetatos. Para a redução do acetato existe a possibilidade de

diferentes reações estarem ocorrendo em proporções diversas. Pode estar ocorrendo também a hidrólise ácida do PVA com a conseqüente diminuição dos grupos acetatos no polímero, pois durante a preparação dos filmes o pH das soluções de polímero é ajustada para 4.

Várias reações podem estar ocorrendo entre os reagentes. Entre as reações possíveis, pode ocorrer entre genipin e PVA a reação de transesterificação. Além disso, pode estar ocorrendo entre o PVA e a quitosana a reação de formação de amida, a partir da carboxila do PVA e a amina primária da quitosana. Ocorre também a reação, anteriormente citada, entre o éster do genipin e a amina da quitosana, e também a reação entre o oxigênio do heterociclo do genipin e a amina da quitosana (Solomons, 2001; Butler e Pudney, 2003; Gil *et al.*, 2005).

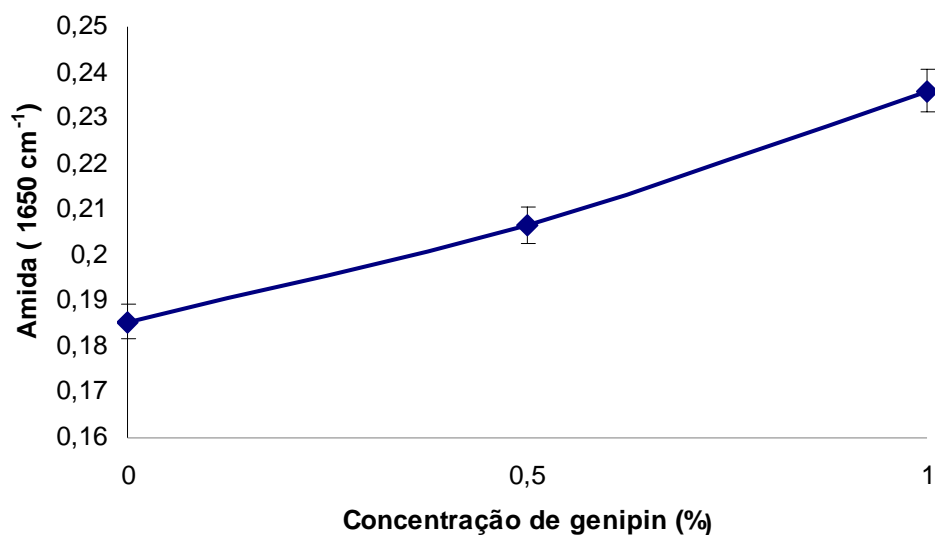


FIGURA 5.13 - Intensidade da absorvância associada aos modos vibracionais das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm⁻¹ (δ CH₂).

As absorvâncias mostrads nas Figuras 5.13 a 5.15 também foram normalizadas em relação à banda em 1450cm^{-1} associada ao grupo C-H (Beppu *et al.*, 1999).

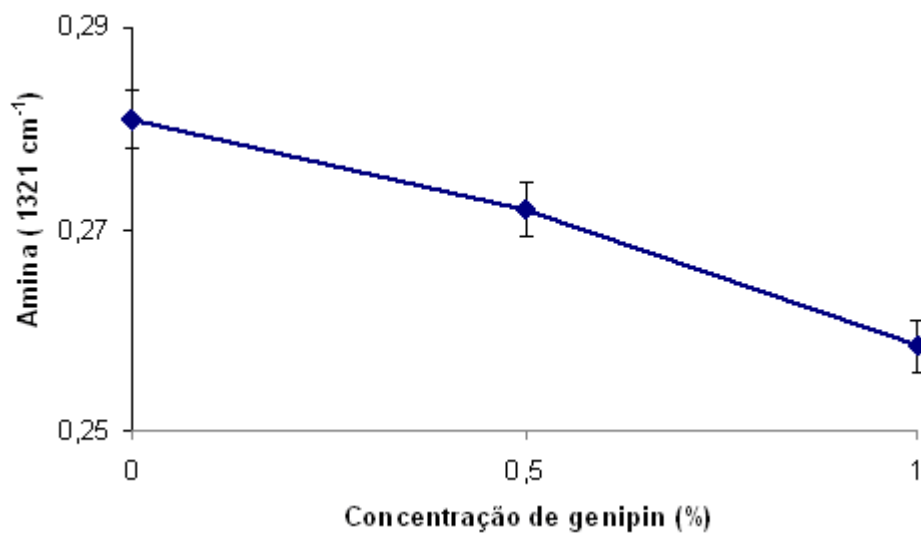


FIGURA 5.14 - Intensidade da absorvância associada aos modos vibracionais das aminas consumidas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana.

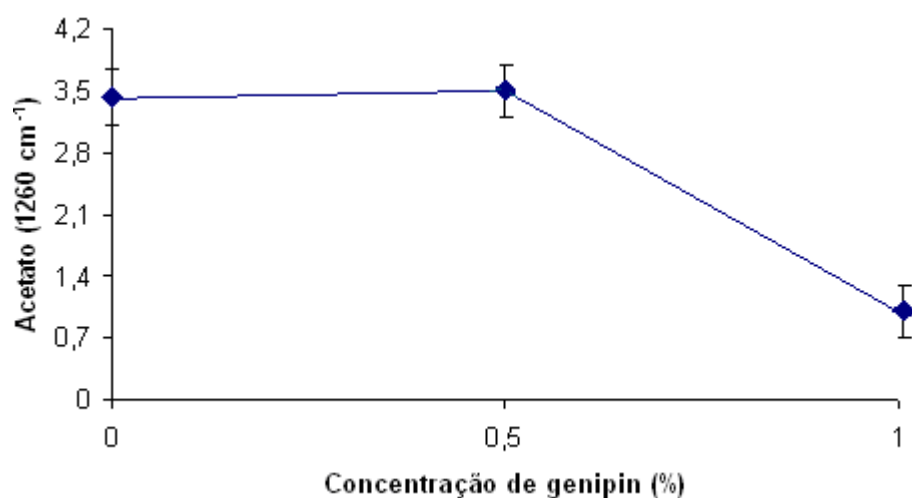


FIGURA 5.15 - Intensidade da absorvância associada aos modos vibracionais de acetato nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$).

Os espectros de infravermelho de PVA puro e os reticulados com 0,5% e 1% de genipin são mostrados na Figura 5.16. Entre 1300 a 1500 cm^{-1} , pode-se observar a presença de bandas que pode ser associada ao anel heterocíclico existente no genipin. Em 1750 cm^{-1} o pico de estiramento C=O para PVA sem reticulação é semelhante ao que tem 0,5% e 1% de genipin. Os espectros dos filmes sem reticulação e reticulados com 0,5% e 1% de genipin encontram-se sem grandes alterações em suas bandas quando comparadas umas com as outras. (Skoog *et al.*, 2002; Butler e Pudney, 2003).

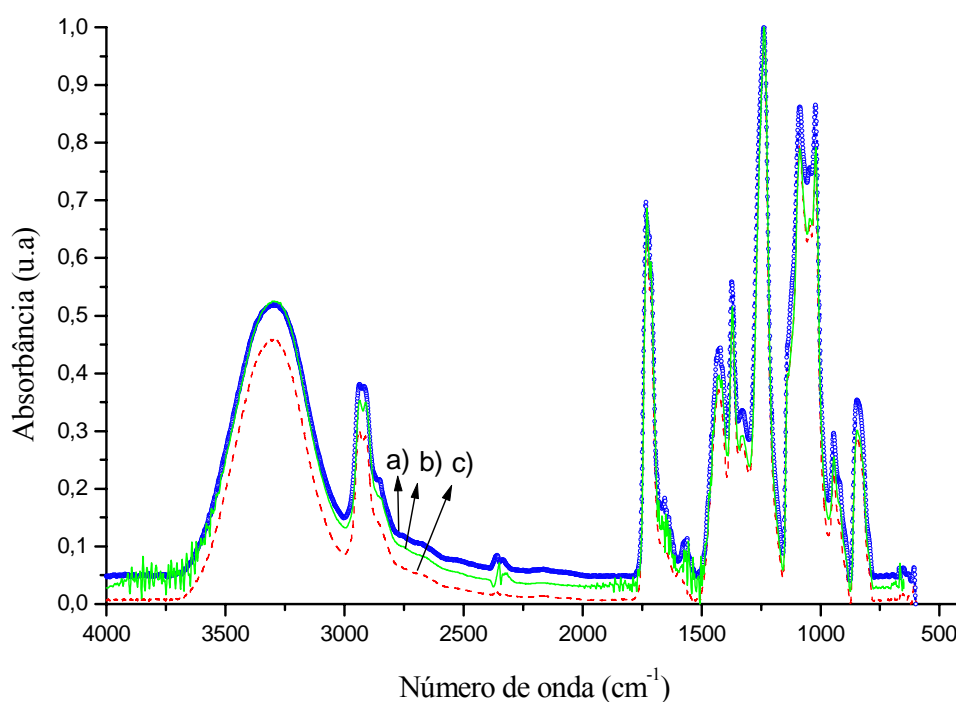


FIGURA 5.16 - Blendas PVA / Qui / Ge a) 1:0:1 b) — 1:0:0.5 c) --- 1:0:0 .

1.2.3 GRAU DE INTUMESCIMENTO

A Figura 5.17 mostra comportamento quanto ao grau de intumescimento para a quitosana sem reticulação e as reticulada com genipin em PBS (pH = 7,4). A transição do estado contraído para o estado expandido é marcada por mudanças nas propriedades dos filmes. Pode-se observar que os géis vão se expandindo (maior intumescimento) quando estão sem

reticulante, ou seja, não reagiram com o genipin ou possuem pouco reticulante em comparação com géis reticulados. O intumescimento depende do grau de reticulação. Assim, é importante observar que a redução no grau de intumescimento depende da quantidade de agente reticulante. Porém, esta redução na absorção de solvente não é simplesmente inversamente proporcional à quantidade de agente reticulante. Isto pode ser observado na Figura 5.17.

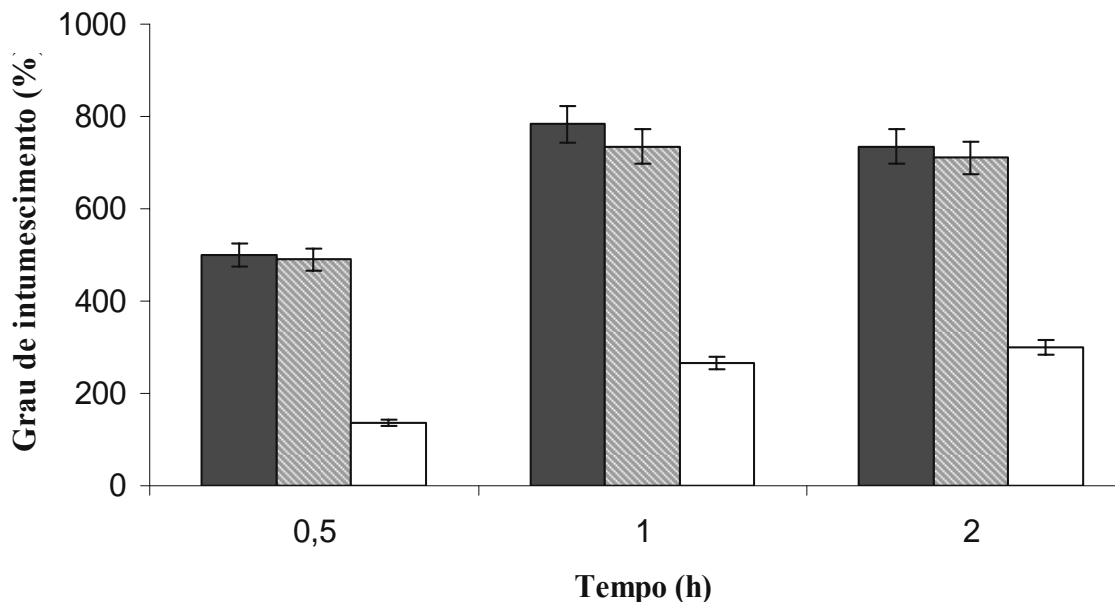





FIGURA 5.17 - Grau de intumescimento de quitosana sem reticulante , com 0,5% de  genipin,  com 1% de genipin.

Os valores de intumescimento, em 2 horas, para a quitosana pura chegaram a aproximadamente 780% enquanto os reticulados com 1% de genipin a 300%. O genipin reage com a quitosana nos grupos mais hidrofílicos, as aminas, e isso também favorece a redução do intumescimento nos filmes de quitosana reticulados. As cadeias presas por ligações cruzadas também perdem a mobilidade. Isto dificulta a entrada de solvente ou expansão do filme. Além disso, sobram, após a reticulação, os grupos acetatos e diminui-se a proporção dos grupos NH_3^+ na quitosana, reduzindo o número das ligações de hidrogênio com a água. Além disso, o grupo acetato tem um efeito estérico, reduzindo a interação da água com o polímero. Os graus de intumescimento no mesmo pH são semelhantes aos de Ginani e colaboradores (1999). É possível observar que existe pouca diferença no ensaio de

intumescimento entre géis de quitosana pura e géis reticulados com 0,5% de genipin. Isto pode ocorrer, de acordo com a literatura (Flory, 1953; Ginani *et al.*,1999; Bispo, 2004), porque em géis iônicos, a pressão osmótica irá levar ao intumescimento do gel, que ocorre com a diferença de concentração dos íons no gel e na solução. Quando a membrana é menos reticulada (0,5 % de genipin) sobram mais grupos hidrofílicos, com NH_3^+ , na membrana, para interagir com a água do que com 1% de genipin, ou seja, os grupos hidrofílicos estão em menores quantidades com 1% de agente reticulante. Entretanto, deve-se ressaltar que com um maior número de reticulações as cadeias apresentam menos mobilidade para se expandirem. Por fim, o tipo de reticulante também influencia. Dependendo do reticulante, pequenas quantidades do mesmo não modificam muito o intumescimento, porém o acréscimo de determinada quantidade, mesmo que não muito superior, irá reduzir bastante o intumescimento. Isto ocorre por causa das características do reticulante com hidrofílicidade e eficiência do agente reticulante e é verificado em trabalhos como o de Bispo (2004) e Ginani e colaboradores, além de outros (Flory, 1953; Ginani *et al.*,1999; Bispo, 2004; Muzzarelli, 2009).

O grau de intumescimento, também conhecido como grau de expansão, é uma das propriedades mais importantes de um hidrogel. Observa-se que o grau de intumescimento está relacionado a taxa de absorção ou permeabilidade a solventes e é influenciado pela resistência química da rede polimérica no gel (Gehrke, 2000).

A quantidade de solvente absorvido pelo gel é controlado pela hidrofílicidade do polímero, o número ou densidade de ligações cruzadas (ligações que formam a rede polimérica do gel) e a concentração de grupos ionizados na rede (Gehrke, 2000). O PVA com 80% de grupos hidrolisados é um polímero com propriedades hidrofílicas mais acentuadas que a quitosana. Isto ocorre porque o PVA possui um grande número de grupos hidroxilas. Assim, o intumescimento foi maior para filmes contendo maior concentração de PVA. Os filmes com maior concentração de quitosana apresentam menores graus de expansão (Flory, 1953; Ginani *et al.*,1999; Gehrke, 2000).

O grau de desacetilação é uma característica importante para explicar os fenômenos de interação iônica na quitosana. Como o grau de desacetilação da quitosana empregada para fabricar estes filmes é elevada, cerca de 80%, a quitosana transforma-se em um polieletrólito. Quanto maior o número de grupos amino presentes, devido a desacetilação, aumenta o caráter hidrofílico do polímero. Para compreender as interações, é preciso entender o comportamento desse polímero nas diferentes concentrações hidrogeniônicas. O pH da solução de quitosana em ácido acético é 3,5 e, em seguida, é ajustado o pH para 4 com a adição de solução de NaOH, como descrito na parte experimental. Dessa forma, nesse meio a quitosana se dissolve melhor, formando uma solução viscosa. Isto ocorre porque, a quitosana devido ao caráter básico, retira o próton do íon hidroxônio disperso em meio reacional. Assim, pode ser denominado como um polieletrólito *sui generis*, porque se torna solúvel somente em pH próximo a 3, interagindo com água do meio. Como o pH da solução de fosfato tampão é 7.4 a quitosana, sem reticulante, com esse grau de desacetilação não se dissolve (Lima, 2005). Isto pode ser comprovado nos filmes de quitosana sem reticulação durante os testes com os polímeros em imersão em PBS. Além disso, o filme de quitosana forma ligações de hidrogênio entre os polímero durante a secagem, o que estabiliza o filme. A adição de genipin não altera significativamente o pH, medido durante a síntese. Assim, o filme de quitosana sem reticulação e o reticulado, quando submetido ao teste, interage com as cargas dos eletrólitos dissolvidos no PBS e estes interagindo com a água, acabam por passar a interagir com a membrana (com um próton adquirido do meio ácido no qual foi dissolvida) intumescendo esta a valores consideráveis, como pode ser observado na Figura 5.17 (Lima, 2005; Sztukaa e Kolodziejska, 2009).

Na Figura 5.18, o aumento no teor da quitosana diminui o intumescimento, devido propriedades químicas da quitosana anteriormente especificados. A diminuição parece suave. Os filmes com 25 e 50% de quitosana têm um comportamento de intumescimento parecidos. A expansão dos filmes também aumenta com o tempo de 0,5 a 2 horas, o que mostra que ainda está ocorrendo absorção.

Para blendas com alto teor de quitosana a carga superficial de partículas dispersas é positiva devido aos grupos amônio catiônicos, uma vez que os grupos amino são facilmente protonados em uma solução ácida.

A quitosana carregada positivamente promove uma estabilização estérica e eletrostática no filme. Assim, com o aumento de teor de quitosana uma separação de fases pode ocorrer (Don *et al.*, 2006). Com a separação de fases, o comportamento de intumescimento pode variar. Pode também, com a adição de agente reticulante, encontrar regiões reticuladas menos agregadas e outras agregadas não reticuladas. Além disso, a reticulação se torna mais difícil para regiões agregadas de quitosana, onde o polímero pode não estar estendido o suficiente (não exposição de grupos amina) para reagir com o genipin (Gehrke, 2000; Don *et al.*, 2006).

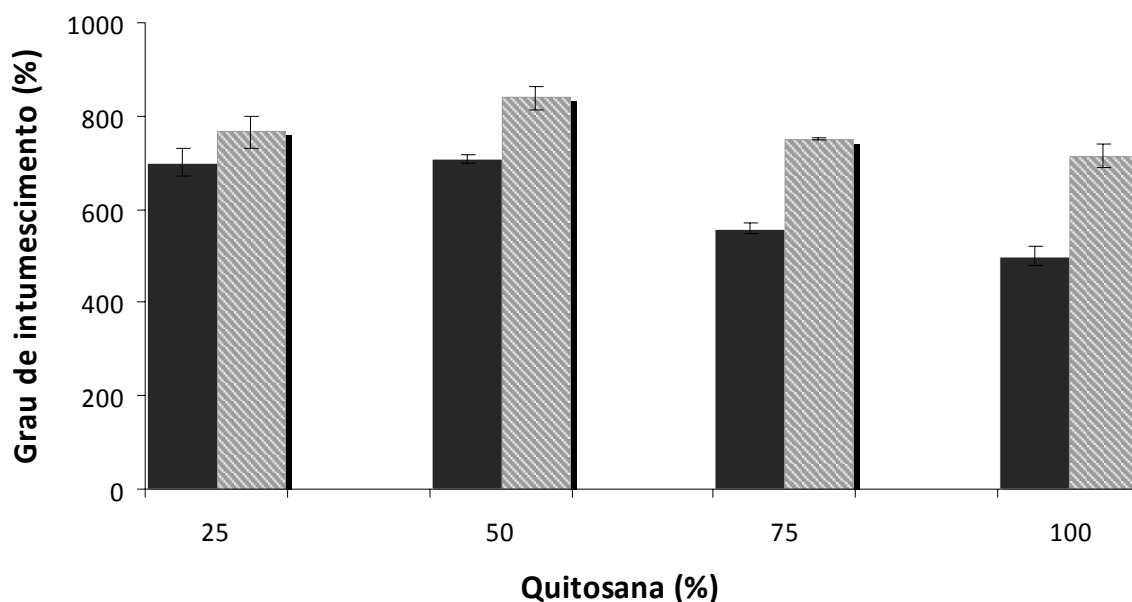


FIGURA 5.18 - Efeito do teor de quitosana nas blendas sem reticulação identificadas por:

■ em 0,5 hora e ▨ 2 horas.

Nas blendas de quitosana e PVA, dependendo da composição, comportamento diferentes podem ser notados no intumescimento. PVA tem muitas hidroxilas e é um polímero hidrofílico. Portanto, filmes com adição de PVA mostram uma mudança de afinidade com a

água. Na mistura dos dois polímeros, quitosana e PVA podem alongar as suas cadeias, em grande extensão, em uma solução aquosa. Após a secagem das blendas, esses polímeros poderiam interagir entre si, formando assim um filme mais homogêneo. É possível verificar que o aumento na concentração de quitosana diminui o intumescimento, porque ela forma ligações de hidrogênio que estabilizam o filme e os acetatos reduzem a hidrofiliçidade dos filmes. Além disso, a quitosana só se torna solúvel em pH 4, enquanto o PVA é solúvel em pH 7. O intumescimento da quitosana neste trabalho é parecido com o da literatura que varia de 650 a 800% com reticulação de 0,01% ou 0,015% de genipin (Finch, 1973, Muzzarelli e Muzzarelli, 2002; Don *et al.*, 2006; Costa JR., 2008; Muzzarelli, 2009).

Ao se discutir o grau de reticulação observa-se que o genipin está formando ligação cruzada com a quitosana. O genipin pode reagir com os grupos hidroxila do PVA podendo haver reticulação. Entretanto, esta reação não ocorre preferencialmente e nem em grande escala, pois os filmes de PVA puros, e mesmo os que reagiram com genipin, se dissolveram durante os experimentos. Estes filmes não foram resistentes ao meio de fosfato tampão. Os filmes de PVA puros e reagidos com genipin simplesmente se dissolvem durante o experimento em aproximadamente 2 minutos. O PVA pode também formar ligações de hidrogênio com a quitosana. Esta é uma reticulação chamada física que pode ser quebrada pela água (Oliveira, 2000; Gehrke, 2000). A absorção de solvente para todos os outros filmes ocorreu rapidamente. É apreciável os valores de absorção em 30 minutos.

Na Figura 5.19, para blenda com 25% de quitosana, observa-se que com o aumento na porcentagem de agente reticulante diminui-se a expansão ou intumescimento. As reações entre genipin e quitosana produzem ligações cruzadas. As ligações cruzadas reduzem a movimentação do polímero e hidrofiliçidade do mesmo, reduzindo assim o grau de intumescimento. Desse modo, corrobora-se também, a partir dos resultados dos testes de intumescimento, a reação dos grupos amina com o genipin. Estes resultados são semelhantes àqueles obtidos por Costa JR. (Costa JR., 2008).

As medidas de intumescimento são importantes em géis, pois assim se verifica o conteúdo de água nestes materiais. O conteúdo de água é um dos requisitos básicos para o material

ser considerado biocompatível. Posteriormente, os hidrogéis são sistemas atrativos pela semelhança física com os tecidos vivos, que têm elevado conteúdo de água e consistência macia e elástica (Oliveira *et al.*, 2002; Bispo, 2004).

A Figura 5.20 representa a taxa de intumescimento em mg/h das blendas PVA /Qui (3:1) sem reticulação e reticuladas com 0,5 e 1% de genipin. Observa-se que a taxa de intumescimento diminui com o tempo. Isto ocorre porque esta taxa está relacionada com a difusão. Fenômenos como difusão podem ser explicados com base em conceitos físico-químicos e em especial na teoria cinética, pela qual define-se que todas as partículas de dimensões atômicas e moleculares estão em constante movimento, em todas as temperaturas acima de zero absoluto ($-273,16^{\circ}\text{C}$) (Ferreira, 1992). Dessa forma, conceitua-se a difusão como um movimento orientado de moléculas, que se movem na direção que vai do maior potencial químico para o menor potencial químico. Potencial químico de uma substância é a energia livre parcial molar de Gibbs desta substância dentro de uma solução. Dessa forma podemos considerá-lo como a força motriz para a difusão das substâncias e átomos que as constituem. Com o tempo o potencial químico dentro e fora da rede polimérica das blendas vai se igualando e a taxa de entrada de solvente diminui como é verificado na Figura 5.20.

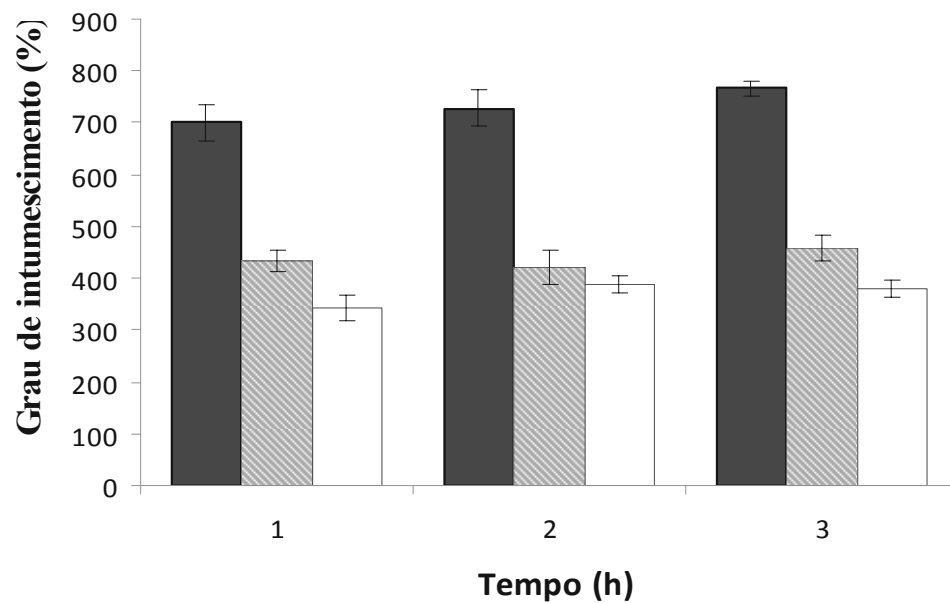


FIGURA 5.19 - Efeito do grau de intumescimento de blendas de PVA /Qui (3:1) sem reticulante , com 0,5% de genipin e com 1% de genipin .

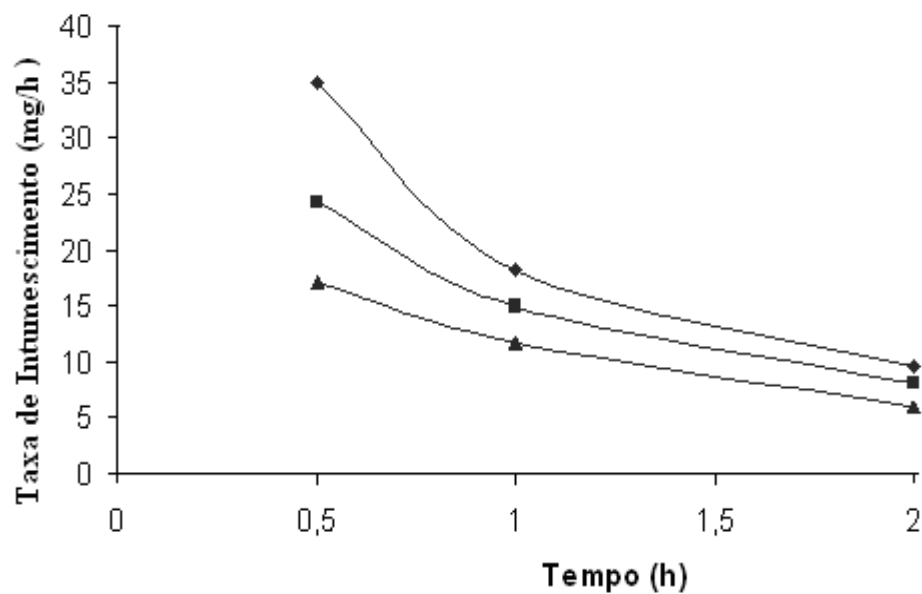


FIGURA 5.20 - Efeito da taxa de intumescimento de blendas de PVA /Qui (3:1) sem reticulante, 0,5% de genipin, 1% de genipin.

5.2.4. ENSAIO MECÂNICO

As amostras na forma de filmes foram testadas por ensaio mecânico para verificação de suas propriedades mecânicas, sendo que durante o preparo das soluções dos polímeros o pH foi ajustado a $4 \pm 0,05$, obtendo depois da secagem uma espessura dos filmes na faixa de 25-75 μm . Os ensaios mecânicos foram realizados com corpos de prova, que são amostras dos materiais que se deseja testar, com dimensões e forma especificadas em norma técnica. Os testes foram realizados com 6 corpos de prova para cada tipo de filme e calculando as médias de todas as amostras para maior representatividade dos dados.

Na Figura 5.21, observa-se a tensão em MPa em função da deformação percentual de diferentes filmes produzidos sem reticulação. O ensaio para a obtenção da tensão pela deformação foi realizado para submeter o material a um esforço axial que tende a alongá-lo até a ruptura. Assim, foi possível conhecer como os filmes produzidos reagem ao esforço de tração, quais são os limites de tração que suportam e a partir de que momento se rompem, para entender e verificar a possibilidade de sua potencial aplicação como tecido epitelial artificial.

Para filmes formados a partir das misturas de polímeros os resultados mostraram que estas têm valores de tensão máxima intermediários, quando comparados aos filmes puros, contendo apenas quitosana ou PVA. Filmes contendo quitosana pura obtiveram um maior valor de tensão máxima, cerca de 12 MPa (média de 6 amostras). O filme de PVA puro teve como valor de tensão máxima 3,6 MPa. Os resultados para valores de tensão máxima para as blendas PVA / Qui / Ge (1:1:0) e PVA / Qui / Ge (1:3:0) sem reticulação, chegaram a cerca de 10 MPa com um desvio padrão de 1,8 para a blenda PVA / Qui / Ge (1:1:0) e de 4,6 para a blenda PVA / Qui / Ge (1:3:0). Verificou-se maiores valores de tensão máxima para filmes com quitosana.

Relata-se que o grau de desacetilação da quitosana, o perfil de secagem do solvente, o uso de plastificantes e procedimentos de mistura podem influenciar conjuntamente todas as propriedades mecânicas dos materiais produzidos nestas condições. Isto é verificado na

literatura para filmes de quitosana, que possuem valores de resistência à tração com uma variação na faixa que vai de 1,4 a 50 MPa e valores de 3,5 a 115% para a deformação (Chielline *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2004; Costa JR., 2008).

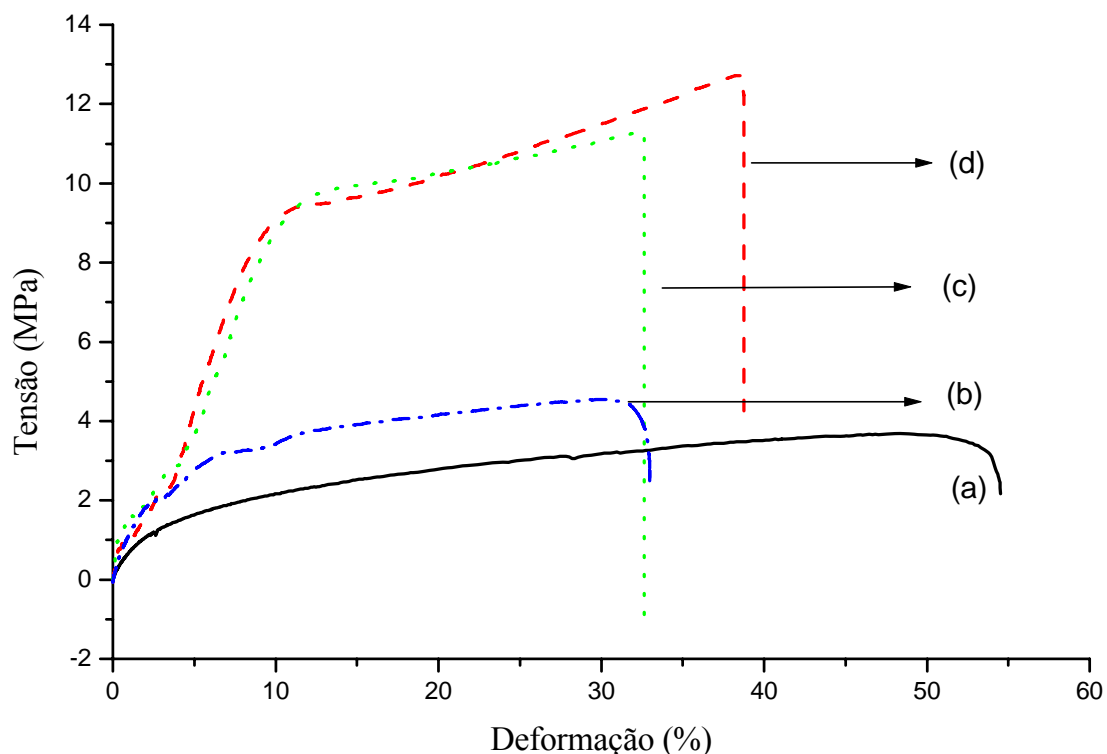


FIGURA 5.21 - Tensão x deformação dos filmes (a) $\text{PVA/Qui/Ge}(1:0:0)$, (b) $\text{PVA/Qui/Ge}(3:1:0)$, (c) $\text{PVA/Qui/Ge}(1:3:0)$, (d) $\text{PVA/Qui/Ge}(0:1:0)$.

A Figura 5.22 apresenta valores de tensão máxima para os filmes PVA/Qui/Ge: (1:0:0), (3:1:0), (1:3:0), (0:1:0) produzidos sem agente reticulante e PVA/Qui/Ge: (1:0:1), (3:1:1), (1:3:1), (0:1:1) reticulados. Os resultados indicam que o aumento da porcentagem de quitosana nos filmes aumenta os valores de tensão máxima, para qualquer concentração de reticulante nos filmes produzidos. De forma semelhante, o acréscimo de agente reticulante genipin, aumenta os valores de tensão máxima. Dessa forma, a tensão máxima pode ser modulada pela concentração de polímero quitosana e pela quantidade de genipin. Assim, pode-se produzir materiais com propriedades controláveis e definidas a partir das

concentrações de polímero: quitosana e PVA e do reticulante genipin. Posteriormente, foi possível observar que filmes com 25% de quitosana e sem genipin, PVA/Qui/Ge (3:1:0), tiveram um ganho de 250 % na tensão máxima com a adição de 1% de genipin. Filmes com 50% de quitosana PVA/Qui/Ge (1:1:0) sem reticulante tiveram aumento de 140% na tensão máxima de ruptura com adição de 1% de genipin. Os filmes com 75% de quitosana, PVA/Qui/Ge(1:3:0), tiveram aproximadamente 150 % de ganho na tensão máxima de ruptura com o acréscimo de 1% de genipin. Os valores de tensão máxima com adição de genipin possuem melhora significativa. Mostra-se, como exceção, o comportamento do filme de PVA / Qui / Ge (0:1:1).

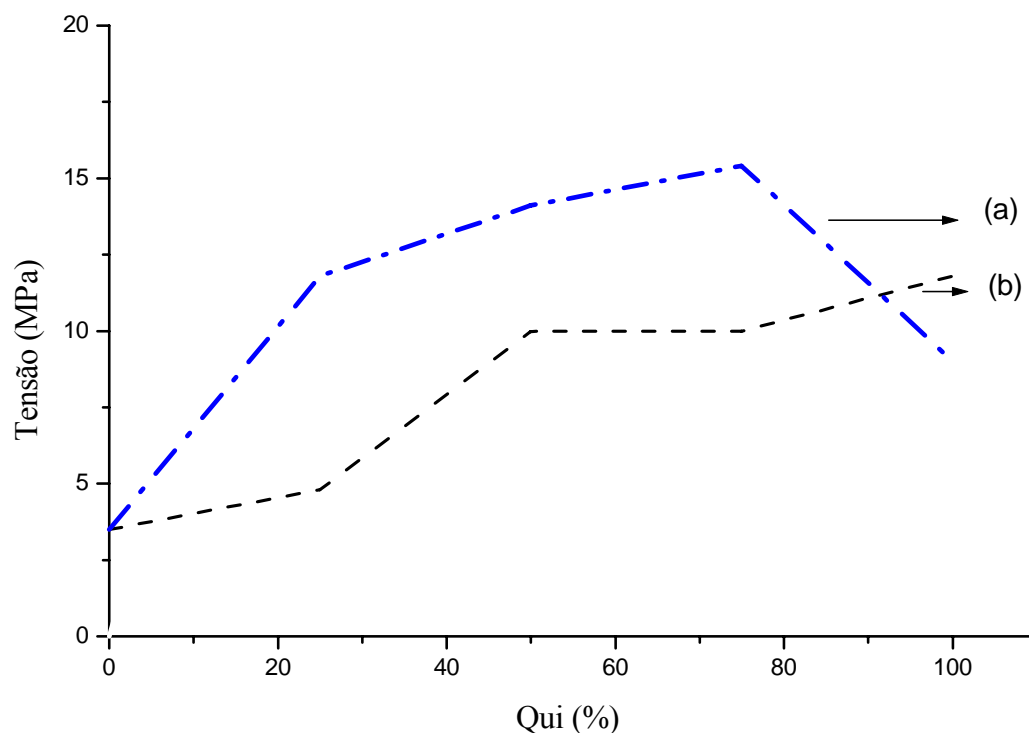


FIGURA 5.22 - A influência da concentração de quitosana na tensão máxima dos filmes (a)reticulados-.-.-.PVA/Qui/Ge(1:0:1), (3:1:1), (1:1:0), (1:3:1), (0:1:1). b) e sem reticulação - - - -PVA/Qui/Ge(1:0:0), (3:1:0), (1:1;0), (1:3:0), (0:1:0).

O comportamento do filme de PVA/Qui/Ge (0:1:1) é diferente dos outros filmes, apresentando descontinuidade no comportamento mecânico em relação à composição. Este fenômeno é apresentado também na Figura 5.23, mostrando que com um aumento do genipin o filme tornou-se mais frágil, reduzindo a tensão máxima. Isto ocorre pois as

cadeias ficam imobilizadas numa proporção tão grande, que a força não consegue movimentar as cadeias umas sobre as outras, comparativamente aos casos com menos reticulante, e acabam se rompendo. Este mesmo efeito de genipin é encontrado no trabalho de Jin e colaboradores (Jin *et al.*, 2004). Resultado semelhante foi também encontrado por Costa JR. com quitosana e glutaraldeído (Costa JR., 2008). Comportamento parecido também foi observado por Chiellini e colaboradores (2001), quando a concentração de glutaraldeído aumentou no filme de gelatina (Chiellini *et al.*, 2001; Costa JR., 2008; Muzzarelli, 2009;).

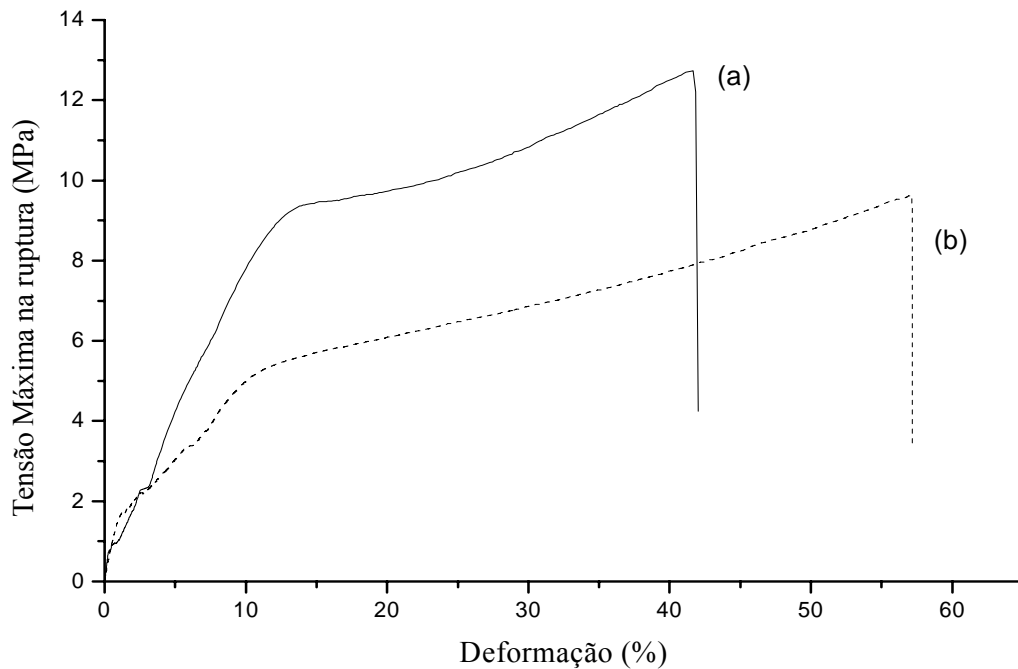


FIGURA 5.23 - Gráfico da influência da concentração do reticulante na tensão máxima de tração dos filmes PVA/Qui/Ge (0:1:0) com 0% genipin (a) e PVA/Qui/Ge (0:1:1) com 1% de genipin (b).

A Figura 5.23 evidencia também que o aumento da quantidade de genipin reduziu a tensão no material para que se inicie o comportamento plástico. Uma possível explicação para este efeito é que o aumento de genipin está diminuindo a mobilidade das cadeias e reduz a tensão para obter o regime plástico, na qual ocorre a deformação permanente. Isto é também verificado neste trabalho. De acordo com os valores, e como evidenciado na literatura (Bahrami, 2003; Jin *et al.*, 2004), o comportamento dos filmes é altamente influenciado pela mudança de sua composição e tipo de reticulantes. Valores experimentais obtidos e apresentados neste trabalho evidenciam que as propriedades mecânicas de tensão têm uma tendência a aumentar com a quantidade de agente reticulante. Isto é relatado na literatura por Costa JR. (2008) e Chiono e colaboradores (2008) (Arvanitoyannis, 1997; Chiellini, 2001; Cervera *et al.*, 2004; Costa JR., 2008; Chen *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2008; Chiono, 2008; Muzzarelli, 2009).

Foram determinados os valores de módulo de elasticidade para os filmes produzidos. O menor valor para o módulo de elasticidade foi do filme PVA/Qui/Ge (1:0:0), com 48 MPa e para o filme de PVA puro reticulado com 1% de genipin, PVA/Qui /Ge (1:0:1), obteve-se a 54 MPa. Módulo de Young ou módulo de elasticidade é um parâmetro que fornece informações sobre a resistência que este material apresenta em relação a deformação elástica. Sendo assim, é esperado que filmes de PVA puro, assim como observado na Figura 5.21, apresentassem menores módulos de elasticidade e, assim, sendo menor resistência, como discutido anteriormente. Para o filme de quitosana pura, o módulo foi de 96 MPa sem reticulação, chegando a 120 MPa com reticulação por 1% de genipin. Nos filmes formados pela mistura de polímeros, o módulo de Young é dependente da composição, como pode ser visto nos dados experimentais. Este comportamento também foi observado por Kolodziejska e Piotrowska (2007) (em estudos de propriedades mecânicas de filmes de gelatina e quitosana quimicamente modificada com transglutaminase) (Kolodziejska e Piotrowska, 2007; Rotta, 2008).

O tecido epitelial tem valores de tração máxima dentro da faixa de 2,5 a 16 MPa e da literatura verificamos tensões para quitosana que variam de 1,4 a 57,2 MPa. Assim, as propriedades mecânicas das blendas de quitosana tem aplicação potencial como substituinte

da pele. As blendas com e sem reticulação apresentaram valores dentro da faixa de valores do tecido epitelial. Os resultados deste trabalho evidenciam que os filmes da Figura 5.21 PVA/Qui/Ge: (3:1:0), (1:1:0), (1:3:0), (3:1:1), (1:1:1), (1:3:1) seriam melhores como substituintes de tecido epitelial. A concentração de PVA nas blendas aumenta a sua maleabilidade, enquanto a quitosana e o genipin aumentam a resistência no material. Assim estas blendas, com e sem reticulação, poderiam ser utilizadas potencialmente como tecido epitelial artificial.

A pele é um material complexo e pode ser descrito como um material com propriedades elásticas, viscosas e plásticas. As propriedades mecânicas da pele são determinadas principalmente pela camada epitelial denominada de derme. Os principais componentes da pele são colágeno, elastina e matriz extracelular sendo 72%, 4%, 20% os seus valores respectivos no órgão (Harris, 2009). Na pele, a matriz extra celular é constituída de um tecido que circunda células que é Substancia Fundamental (gel): Sulfato de Condroitina, Querato Sulfato, Acido Hialurônico. Estas substâncias são hidrofílicas, portanto, têm um elevado conteúdo de água. São responsáveis pela arquitetura estrutural da pele e conferem propriedades viscosas à mesma. O colágeno resiste à tensão de deformação e é responsável pela força e rigidez do tecido. As fibras de colágeno são constituídas de cristais de tropocolágeno, que formam os blocos de microfibrilas de colágeno. Cada nível adicional de composição de fibras é arranjado de forma organizada em termos de relação e dimensão. À medida que as fibras de colágeno se desenvolvem e amadurecem, elas se acoplam, inicialmente com ligações instáveis de hidrogênio, que então se convertem em ligações covalentes estáveis. Quanto mais fortes as ligações, maior a estabilidade mecânica do tecido. As fibras elásticas são formadas por uma proteína chamada elastina e proporcionam extensibilidade. Elas mostram uma grande quantidade de alongamento com pequenas cargas e falham abruptamente, sem deformação, com cargas mais altas. Os tecidos com maior quantidade de fibras elásticas possuem maior flexibilidade (Harris, 2009).

Dessa forma, a pele é considerada uma mistura de biopolímeros e outras substâncias (Harris, 2009). As propriedades das blendas de polímeros produzidas neste trabalho, com diferentes características, assemelham-se às propriedades mecânicas da pele natural. A

quitosana tem o efeito de aumentar a resistência do material e o PVA confere uma maior maleabilidade aos filmes. A combinação destes polímeros nas blendas vem modular as propriedades dos materiais e maior resistência pode ser conseguida com a adição do agente reticulante genipin.

Os resultados dos ensaios mecânicos e seus desvios padrão para as blendas são sumarizados nas Tabelas 5.7, 5.8 e 5.9.

TABELA 5.4 - Tensão máxima (MPa) e desvio padrão(dp) com médias para 6 amostras.

| Ge | PVA/Qui(1:0) | | PVA/Qui(3:1) | | PVA/Qui(1:1) | | PVA/Qui(1:3) | | PVA/Qui(0:1) | |
|----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|--------------|-----|
| | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp |
| 0% | 3,5 | 0,9 | 4,8 | 0,9 | 10 | 1,8 | 10 | 4,6 | 11,8 | 3,1 |
| 1% | 3,5 | 1,4 | 11,8 | 3,7 | 14 | 3,7 | 15,4 | 3,5 | 9 | 1,8 |

TABELA 5.5 - Deformação total (elástica e plástica) (%) e desvio padrão (dp) com médias para 6 amostras.

| Ge | PVA/Qui(1:0) | | PVA/Qui(3:1) | | PVA/Qui(1:1) | | PVA/Qui(1:3) | | PVA/Qui(0:1) | |
|----|--------------|-----|--------------|------|--------------|------|--------------|-----|--------------|-----|
| | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp |
| 0% | 47 | 0,9 | 42 | 14,2 | 19 | 5,4 | 9,7 | 4,5 | 9 | 4,4 |
| 1% | 57 | 1,4 | 21 | 6,7 | 20 | 11,1 | 8,6 | 4,8 | 10,3 | 8 |

TABELA 5.6 - Módulo de elasticidade (MPa) e desvio padrão (dp) com médias para 6 amostras.

| Ge | PVA/Qui(1:0) | | PVA/Qui(3:1) | | PVA/Qui(1:1) | | PVA/Qui(1:3) | | PVA/Qui(0:1) | |
|----|--------------|------|--------------|----|--------------|-----|--------------|----|--------------|----|
| | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp | média | dp |
| 0% | 48 | 11 | 102 | 25 | 139 | 36 | 107 | 44 | 96 | 28 |
| 1% | 55 | 10,0 | 106 | 25 | 129 | 102 | 135 | 35 | 120 | 57 |

É possível observar a partir dos resultados que as blendas (1:1) e (1:3) tiveram valores que parecem desviar dos resultados dos outros filmes. Isto pode ocorrer porque as blendas formadas após uma secagem rápida formam regiões com aglomerações de quitosana e PVA. Os acetatos tendem a se aglomerarem formando regiões mais hidrofóbicas e as hidroxilas e aminas por serem mais hidrofílicas formam outra região em que os segmentos tendem a interagir por ligações de hidrogênio. Isto pode fazer com que o filme apresente comportamento mecânico diverso do esperado por causa da separação de fases. O material apresenta-se heterogêneo e cada fase apresenta um comportamento mecânico predominante que afeta o comportamento total do material. Estas regiões são mostradas na Figura 5.24.

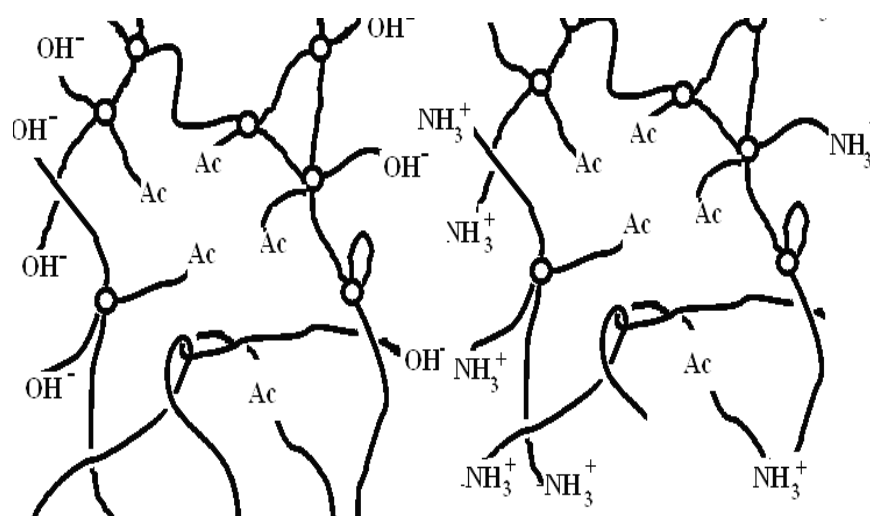


FIGURA 5.24 - A formação de aglomerados nos filmes de quitosana e PVA.

Se a secagem for lenta, estas regiões se formam em proporções nanométricas, como se fossem moléculas constituintes do produto, deixando o material mais homogêneo, e o comportamento mecânico apresentado seria contínuo em relação à composição.

5.2.5. DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO NOS FILMES

O aumento do ângulo de contato com o aumento da concentração de quitosana é devido a maior hidrofobicidade do filme de quitosana e das blendas em relação ao filme de PVA. O aumento do ângulo de contato indica um aumento na hidrofobicidade da superfície (Costa JR., 2008). O ângulo de contato, para o filme de PVA é de $\theta = 65 \pm 3^\circ$, que é mostrado na Figura 5.25, é menor que o ângulo encontrado para a quitosana pura provavelmente devido ao balanço entre as quantidades de C-O e OH que o torna hidrofílico e solúvel em água. Os grupos polares na quitosana podem não ser capazes de se orientar na superfície e podem exibir forte ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular abaixo da superfície do filme. Por outro lado, o PVA é uma molécula linear e tem estrutura bidimensional. Hamilton (2006) apresenta para a quitosana com grau de desacetilação de 79% ângulos de contato de $(73 \pm 1,9)^\circ$. Neste trabalho foi obtido o valor próximo a 80% semelhante ao obtido por Costa, para a quitosana com GD de 76%, com valor de ângulo de contato de $78 \pm 4^\circ$ (Ratner *et al.*, 2005; Hamilton, 2006; Mansur, 2007; Costa JR., 2008).

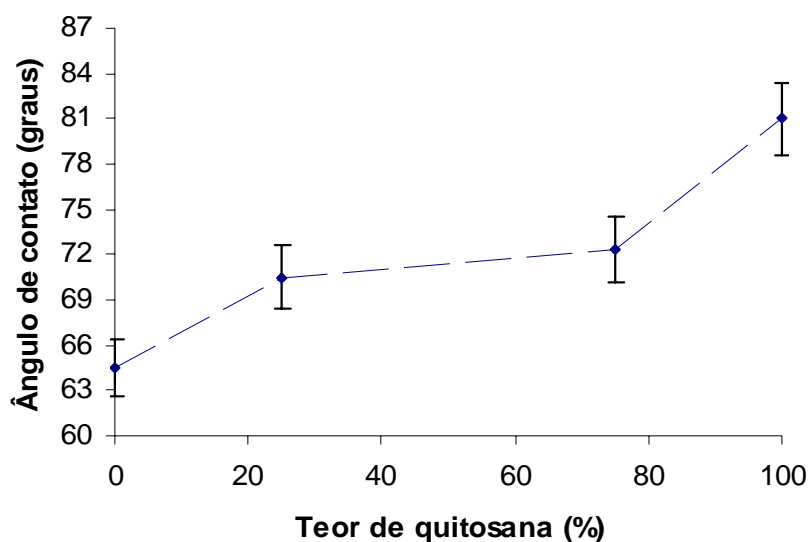


FIGURA 5.25 - Ângulo de contato em função do teor de quitosana nos filmes.

5.5. QUITOSANA / PVA CITOCOMPATIBILIDADE ENSAIOS COM CULTURAS DE CÉLULAS VERO

A viabilidade celular foi medida por ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e representa a atividade das enzimas mitocondriais presentes na célula, capazes de reduzir o MTT. Neste estudo, o teste de viabilidade foi medido no intervalo de 24h após a semeadura da célula. A capacidade das matrizes de Qui/PVA para apoiar a viabilidade e proliferação mostrou que as amostras avaliadas apresentaram biocompatibilidade comparável, amostras não reticuladas por genipin e aquelas reticuladas, Figuras.5.26 e 5.27 respectivamente.

É possível observar na Figura 5.26 números variados de viabilidade celular em um intervalo relativamente amplo (em comparação com células VERO, usadas como controle de 100%), utilizou-se para análise dos dados o método ANOVA ($p < 0,05$; $n \geq 4$). Pode-se inferir a partir dos resultados que todas as matrizes produzidas mostram-se promissoras para serem testadas em ensaios *in vivo*. Testes de citotoxicidade utilizando culturas de células foram aceitas como o primeiro passo na identificação de compostos ativos para serem usados em testes de biossegurança. Verificou-se, neste estudo, que as células possuem viabilidade celular de aproximadamente 105% em filmes sem reticulação. Já para as amostras reticuladas com 1% de genipin observou-se que a viabilidade celular chegou a valores aproximados de 140%, e os valores mínimos para filmes reticulados foram de 80%.

O valor mínimo requerido para o teste de biocompatibilidade é de 50% e os valores deste trabalho são superiores a este, tendo, portanto, a viabilidade mínima aceitável. Os valores encontrados neste trabalho são superiores a aqueles encontrados no trabalho de Costa JR. (2008) com blendas de PVA e quitosana, reticuladas por glutaraldeído, no qual a viabilidade foi de aproximadamente 78%, no mínimo, e valor máximo próximo a 97%.

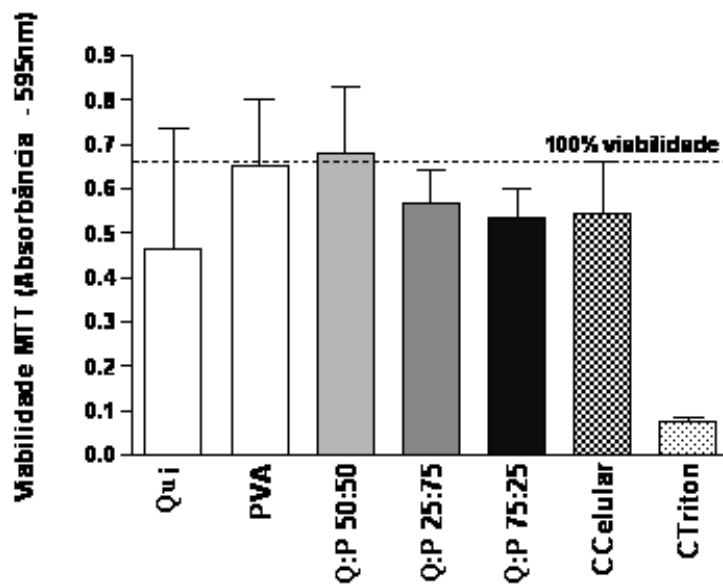


FIGURA 5.26 - Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) (0:1:0); (b) (1:0:0) (1:3:0,5); (c) (1:1:0), (d) (1:3:0), (e) (3:1:0).

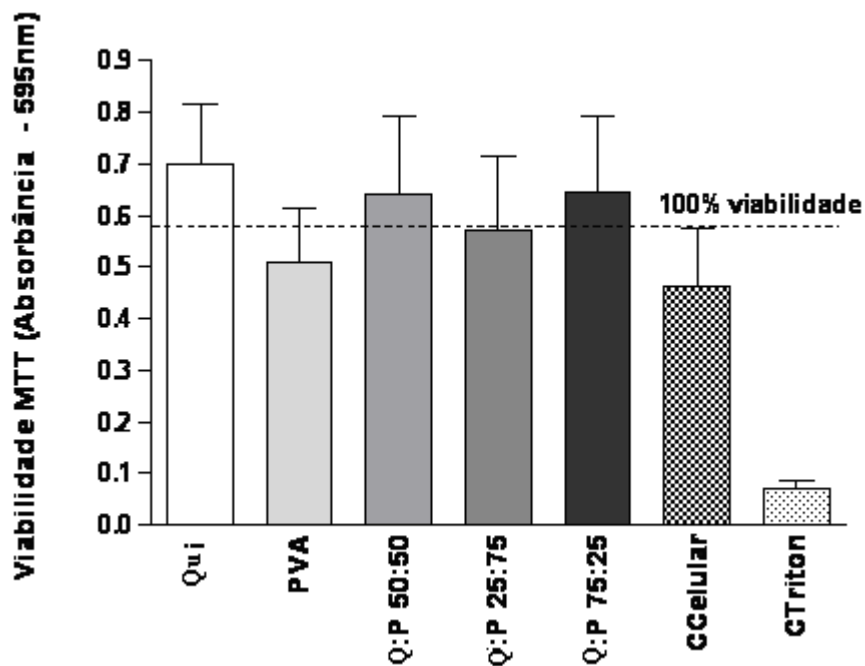


FIGURA 5.27 - Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) Ge (a) (0:1:1); (b) (1:0:1) (1:3:1); (c) (1:1:1), (d) (1:3:1), (e) (3:1:1).

Nas Figuras 5.28, 5.29 e 5.30, observa-se manchas de coloração escura em vários pontos da microscopia óptica. Estas manchas referem-se aos cristais de tetrazólio e formazana produzidas por enzimas mitocondriais. Quanto maior a formação destes cristais, maior a atividade mitocondrial, e, assim, pode-se verificar a viabilidade celular. As regiões claras dentro destas manchas, com forma arredondada, é o núcleo das células. Observa-se uma diferença na quantidade destas manchas escuras, que são os cristais formados pela redução do MTT. A Figura 5.28 (b) possui um número maior destes cristais e ele representa o filme de quitosana pura reticulado com 1% de genipin, enquanto a Figura 5.28 (a) representa a quitosana pura sem reticulação. Mostrando a microscopia um aumento na viabilidade celular com o acréscimo de genipin. Assim, materiais com genipin mostraram maior proliferação celular.

Na Figura 5.29 para filme de PVA puro com e sem reticulação verificou-se por microscopia óptica um grande número de cristais formados. Tanto o filme com e sem genipin mostraram viabilidade celular. A viabilidade celular destes filmes mostrou-se semelhante por microscopia óptica.

Na Figura 5.30 (a), é apresentada a microscopia óptica da blenda PVA/Qui/Ge (1:1:0) sem genipin e a Figura 5.30 (b) a blenda PVA/Qui/Ge (1:1:1) contendo genipin. A Figura 5.30 (b) contém um maior número de cristais, indicando um aumento na formação dos cristais e na viabilidade celular com a adição de genipin na blenda. O mesmo resultado pôde ser verificado nas Figuras 5.26 e 5.27, que mostram dados quantitativos de viabilidade celular para os diferentes filmes produzidos.

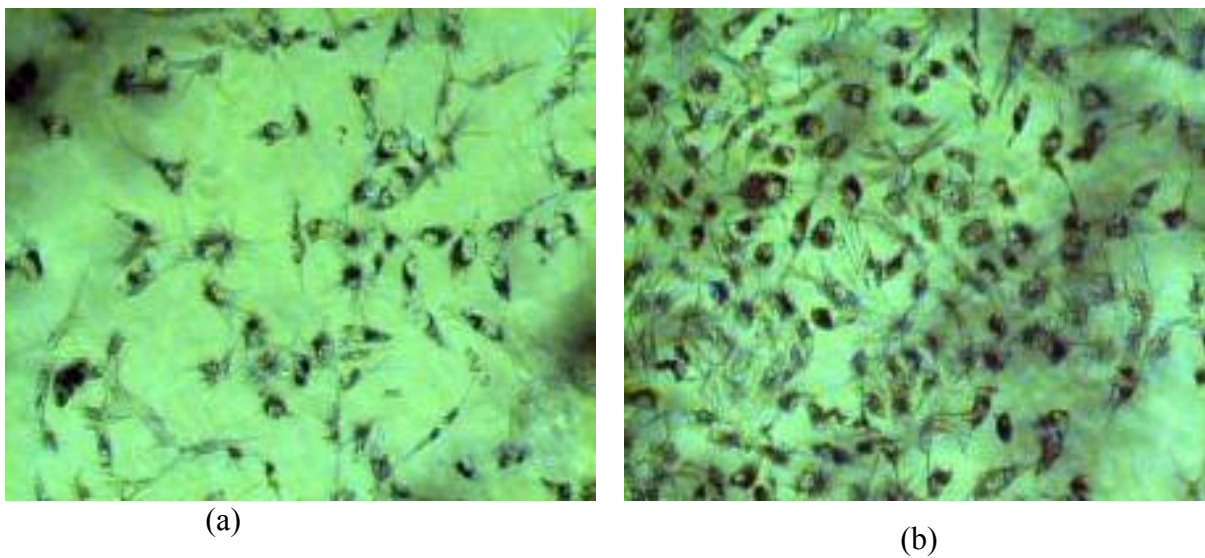


FIGURA 5.28 - Registro por microscopia óptica de MTT do filme de quitosana (a) (0:1:0) sem genipin (b) (0:1:1) com genipin(100x).

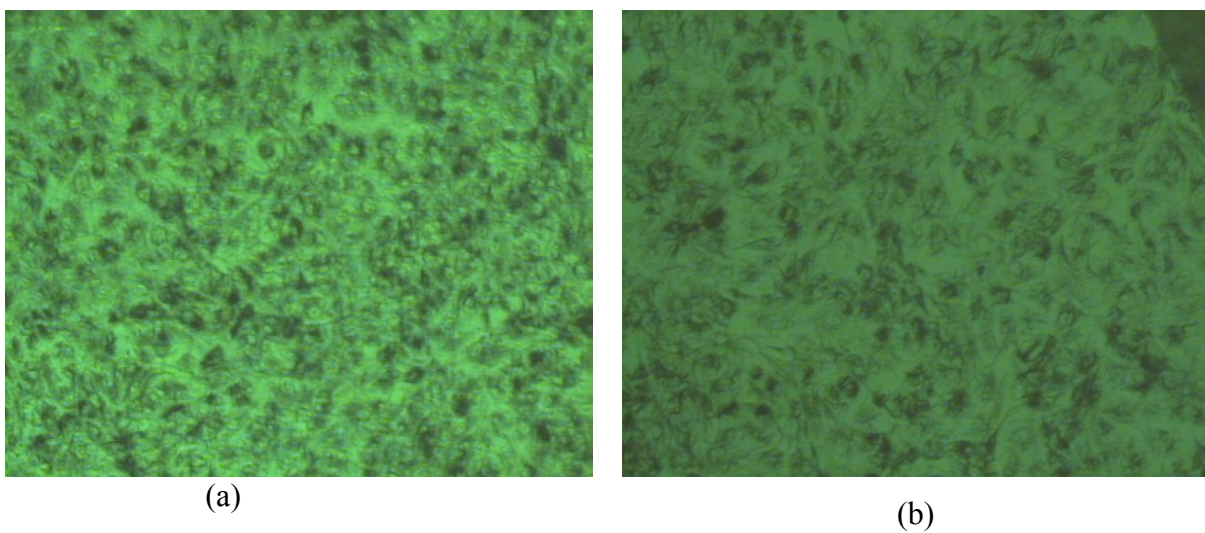


FIGURA 5.29 - Registro por microscopia óptica de MTT do filme de PVA (a) (1:0:0) sem genipin (b) (1:0:1) com genipin 100x.

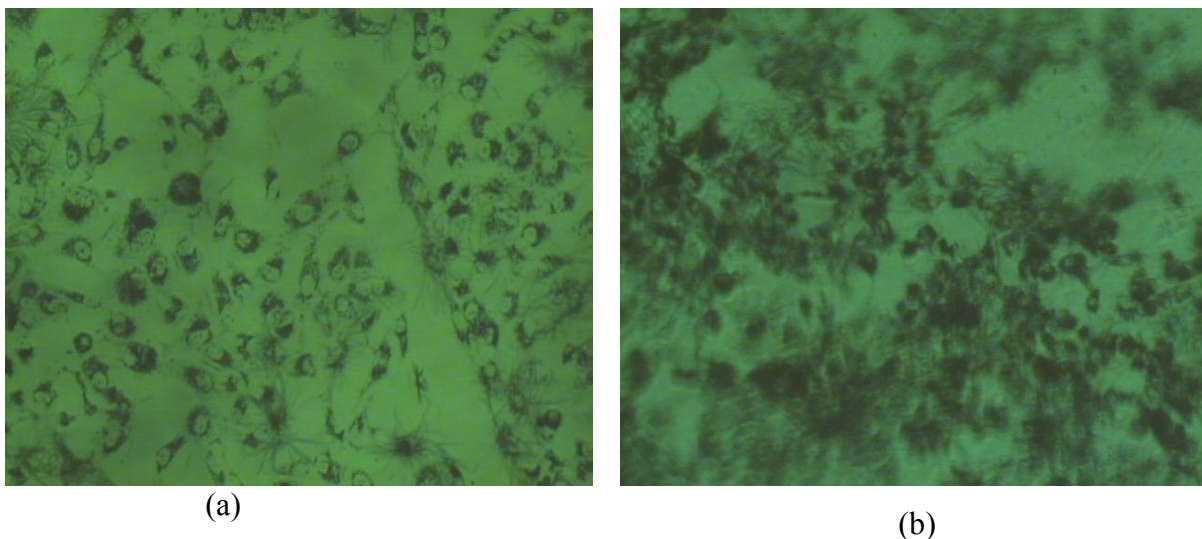


FIGURA 5.30 - Registro por microscopia óptica de MTT do filme de PVA (a) (1:1:0) sem genipin (b) (1:1:1) com genipin 100x.

Embora a ação proliferativa celular ocorra no núcleo, a “decisão celular” de ativar ou inibir determinada função pode estar subordinada a acontecimentos externos à célula (Pinho, 1999). O genipin pode atuar externamente à membrana. Primeiro, porque ele não é lipossolúvel, sendo assim, há maior dificuldade para atravessar a membrana. Segundo, que provavelmente, pelas reações estudadas aqui, o genipin reticula a quitosana, que apresentou um dos melhores resultados, estando reticulado por duas regiões ou por pelo menos uma. Verifica-se com os resultados que a proliferação celular pode ser, controlada, já que, com composições diferentes dos materiais e diferentes concentrações de genipin, as respostas para proliferação foram mudando.

5.6 BIOCOMPATIBILIDADE ATRAVÉS ENSAIO DE ADESÃO CELULAR E ESPALHAMENTO

A proliferação celular e o crescimento foram avaliados através de adesão e espalhamento, sendo a morfologia geral observada por imagens típicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que são observadas nas Figuras 5.31, 5.32, 5.33, 5.34, 5.35, 5.36, 5.37. Pode-se notar que as células VERO semeadas nas matrizes apresentaram boa aderência e espalhamento. Observou-se nos materiais a morfologia das células, que apresentou-se regular para esta linhagem fibroblástica. Assim, ligação celular, adesão e espalhamento ocorreram nos materiais e estes fenômenos constituem a primeira fase da interação das células com o material. A qualidade desta fase irá influenciar a proliferação e diferenciação de células em superfícies de biomateriais.

Com base nos resultados obtidos por MEV neste trabalho, pode-se atribuir a propagação de células VERO e adesão verificada nas blendas de PVA/Qui de serem uma prova de confiança de biocompatibilidade e não citotoxicidade de amostras.

Segundo a literatura, o espalhamento de células é geralmente dividido em três níveis de interação principais: (a) não se espalhou: as células foram ainda esféricas na aparência e saliências ou lamelipódio ainda não foram produzidos, (b) parcialmente distribuídos: nesta fase, as células começaram a espalhar-se lateralmente em um ou mais lados, mas as extensões da membrana plasmática não foram completamente confluentes e (c) totalmente propagado. O último modelo (c) representaria o melhor resultado para a pilha de material de hospedagem (Muzzarelli e Muzzarelli, 2002; Suh, 2000, Dunn, 1995; Yeo *et al.*, 2004; Bose *et al.*, 2002; Hannah e Samuel, 2005; Mansur *et al.*, 2009).

A linhagem celular (VERO) usada como modelo nesta pesquisa foi escolhida porque desempenha um papel na produção de muitos dos componentes essenciais do tecido conjuntivo. Por exemplo, componentes extracelulares, tais como glicosaminoglicanos e colágeno. Promover a inserção de células fibroblásticas ajudaria na integração do tecido conjuntivo e o implante, melhorando a vascularização na superfície do implante e diminuindo a chance de encapsulamento fibroso. Em resumo, a adesão celular e o

espalhamento são de vital importância na vida biológica e estes processos estão envolvidos em vários fenômenos naturais, tais como a manutenção da estrutura dos tecidos, cicatrização, resposta imune, e da integração tecidual dos biomateriais (Dunn, 1995; Yeo *et al.*, 2004; Bose *et al.*, 2002; Hannah e Samuel, 2005; Costa, 2008).

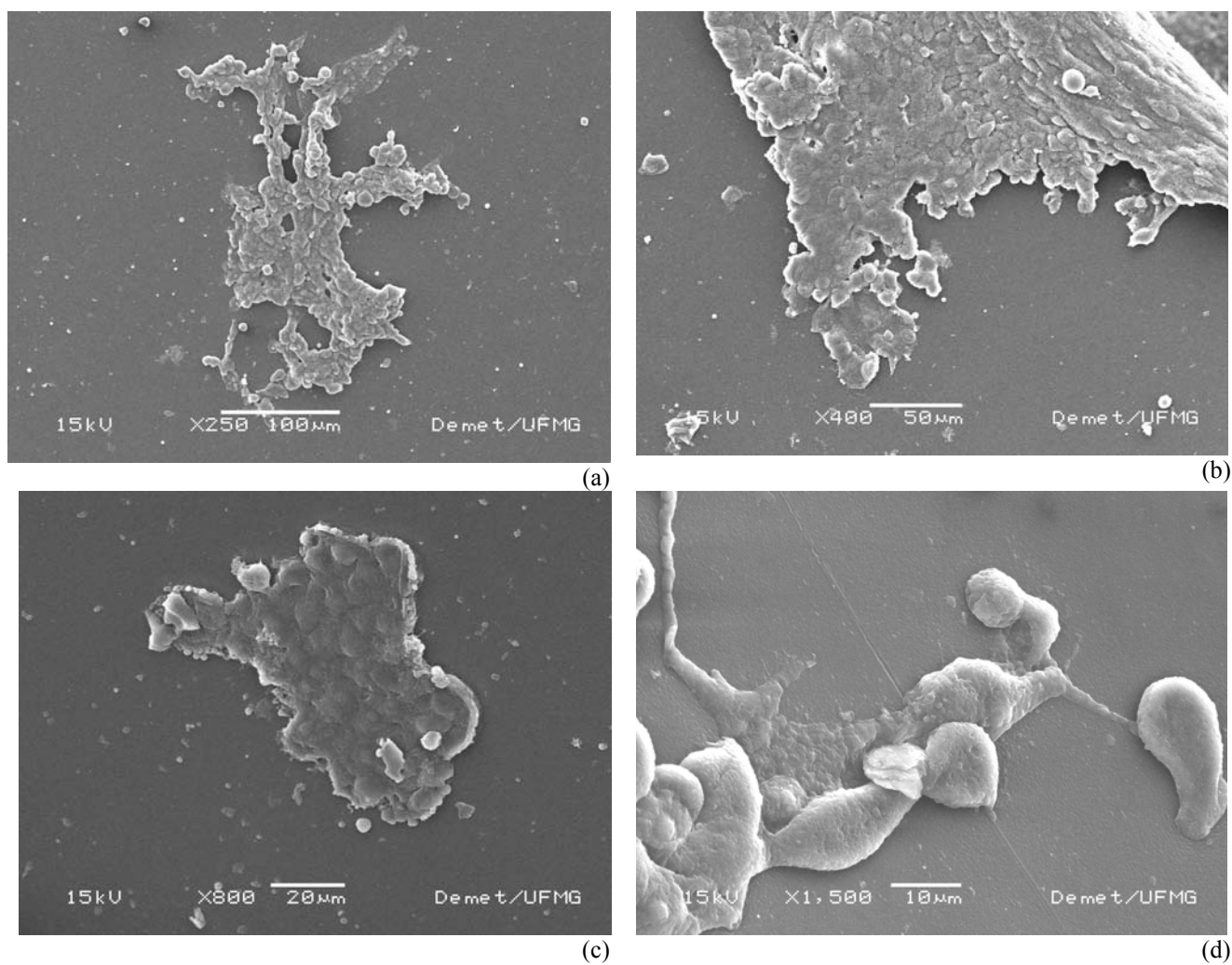


FIGURA 5.31 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de quitosana sem genipin (a) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 250x; (b) PVA/Qui/Ge (0:1:0) ampliação de 400x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0) ampliação de 800x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:0) ampliação de 1500x

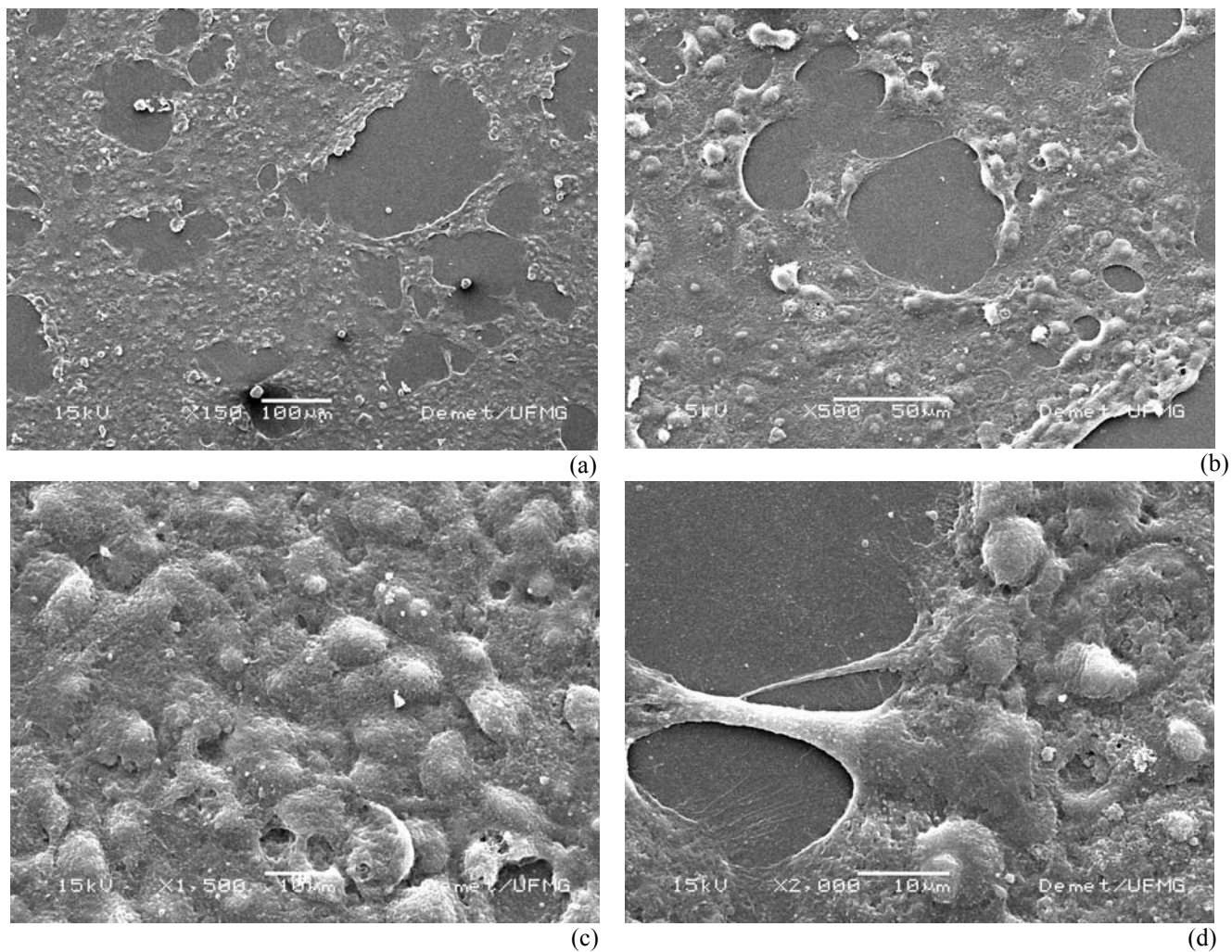


FIGURA 5.32 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de quitosana reticuladas com genipin (a) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 500x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 2000x.

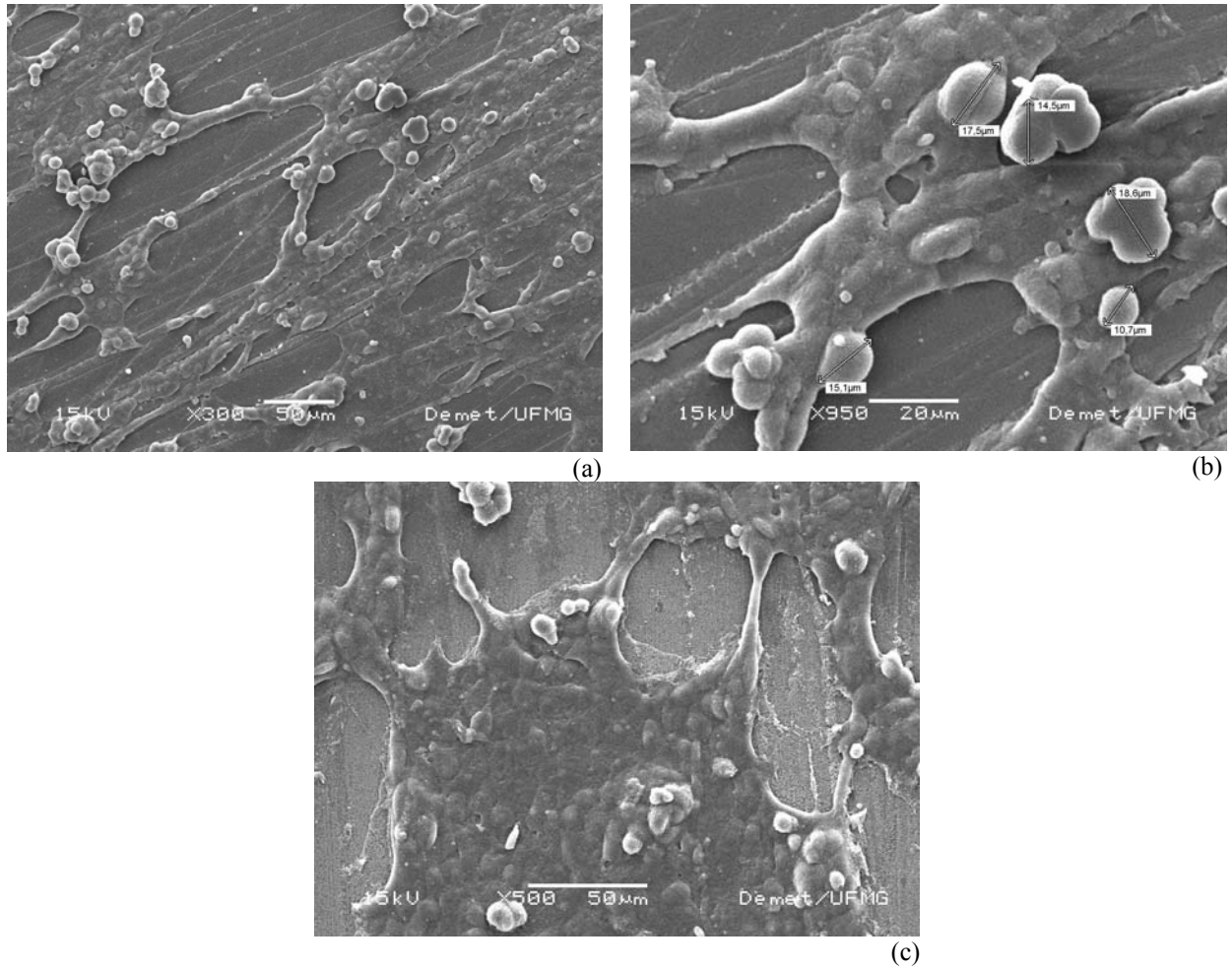


FIGURA 5.33 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de quitosana reticuladas com genipin (a) PVA/Qui/Ge (1:1:0) ampliação de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:1:0) ampliação de 900x (c) PVA/Qui/Ge (1:1:1) ampliação de 500x.

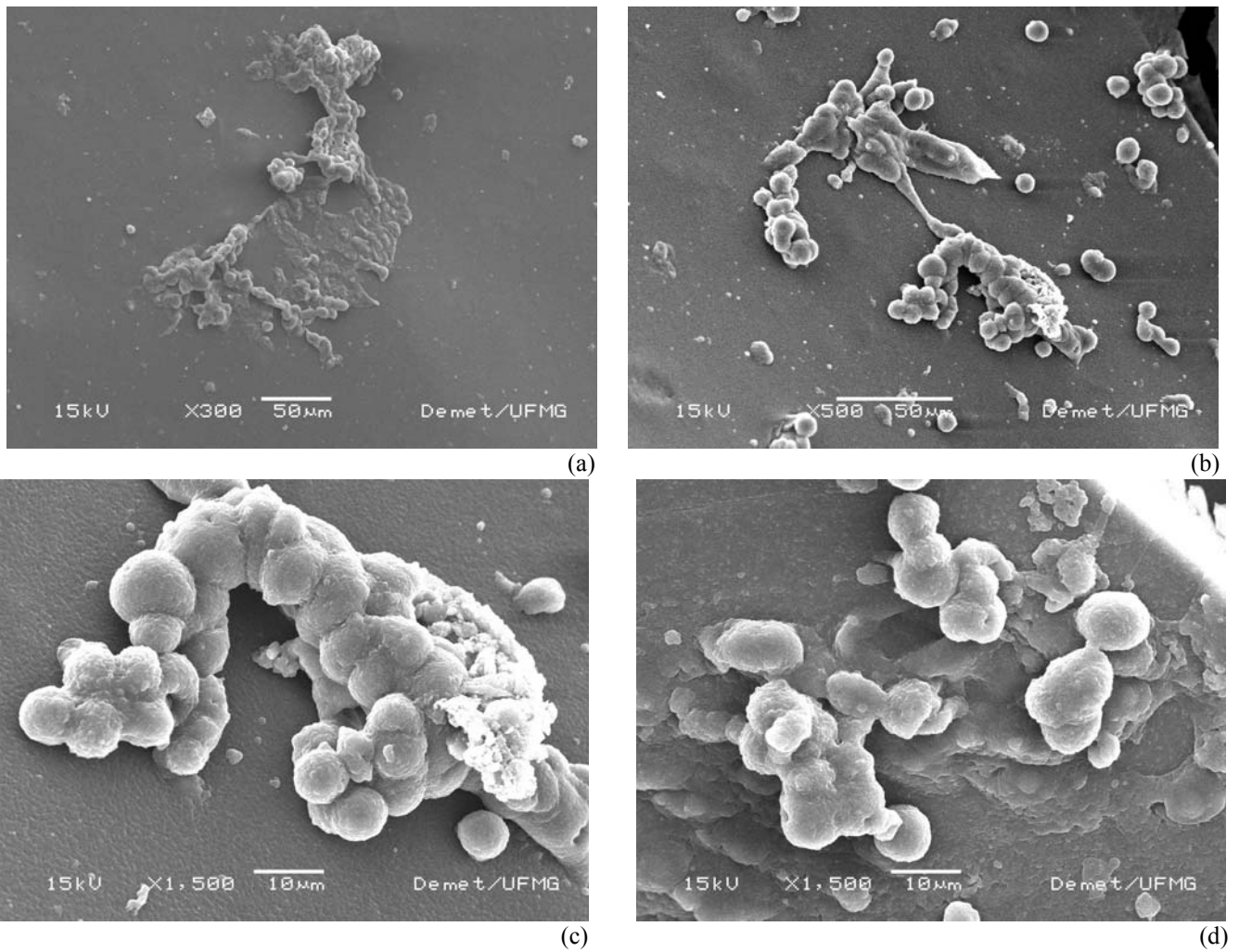


FIGURA 5.34 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana sem genipin (a) PVA/Qui/Ge (1:3:0) ampliação de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:0) ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (1:3:0) ampliação de 2000x.

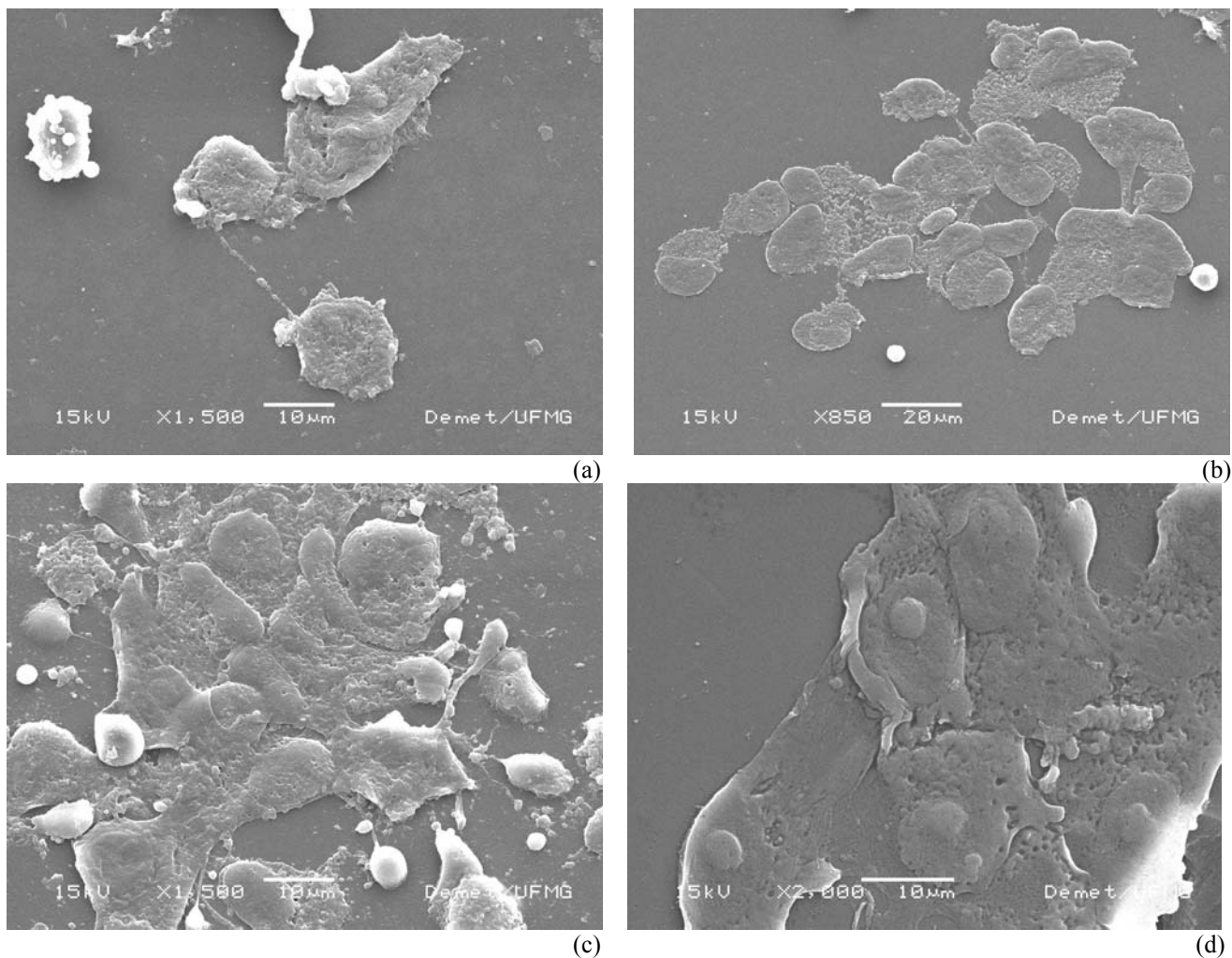


FIGURA 5.35 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana com genipin (a) PVA/Qui/ (1:3:1) ampliação de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:1) ampliação de 500x (c) PVA/Qui/Ge (1:3:1)ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (1:3:1)ampliação de 2000x.

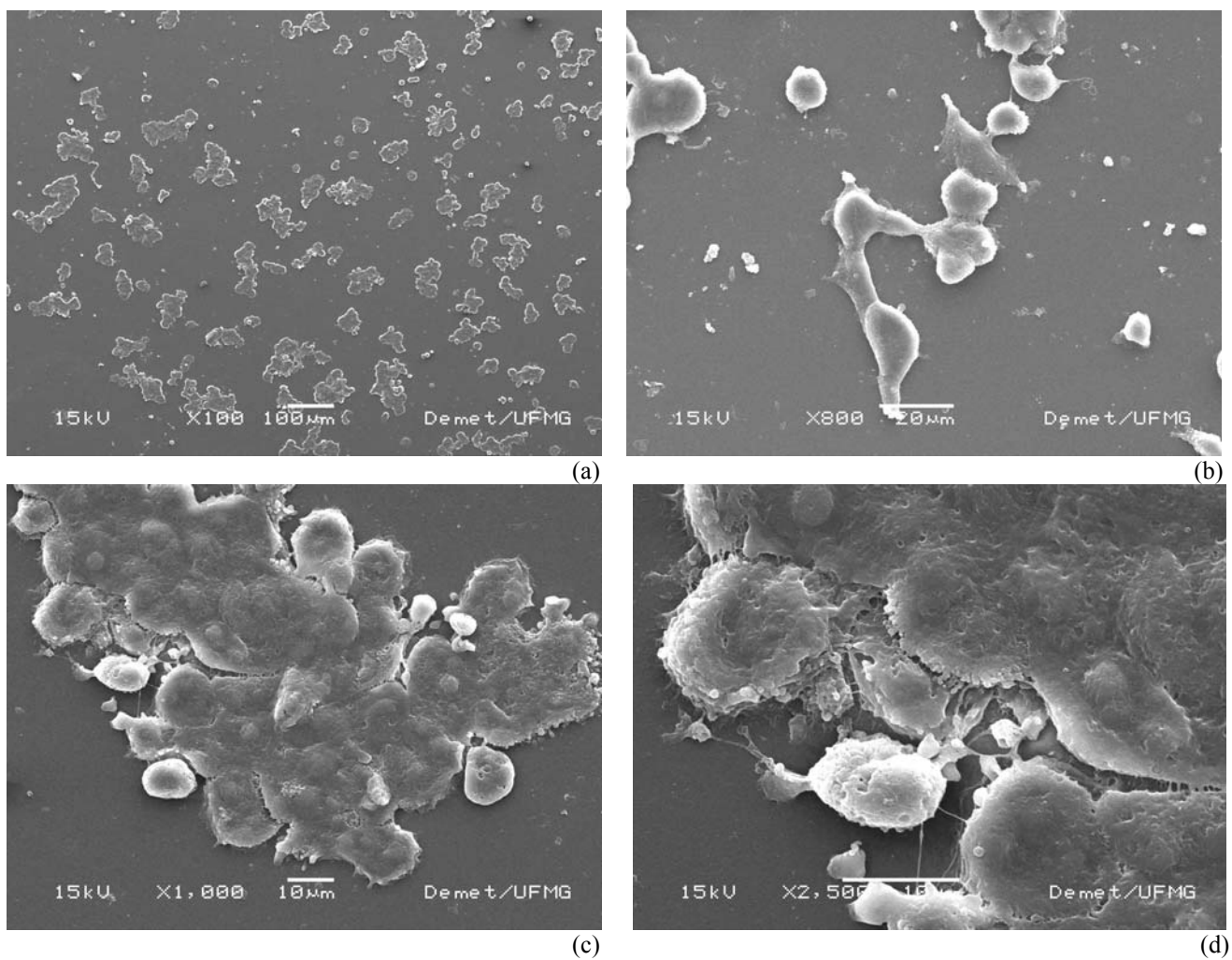


FIGURA 5.36 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana sem genipin (a) PVA/Qui/ (3:1:0) ampliação de 100x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:0) ampliação de 800x (c) PVA/Qui/Ge (3:1:0) ampliação de 1000x e (d) PVA/Qui/Ge (3:1:0) ampliação de 2500x.

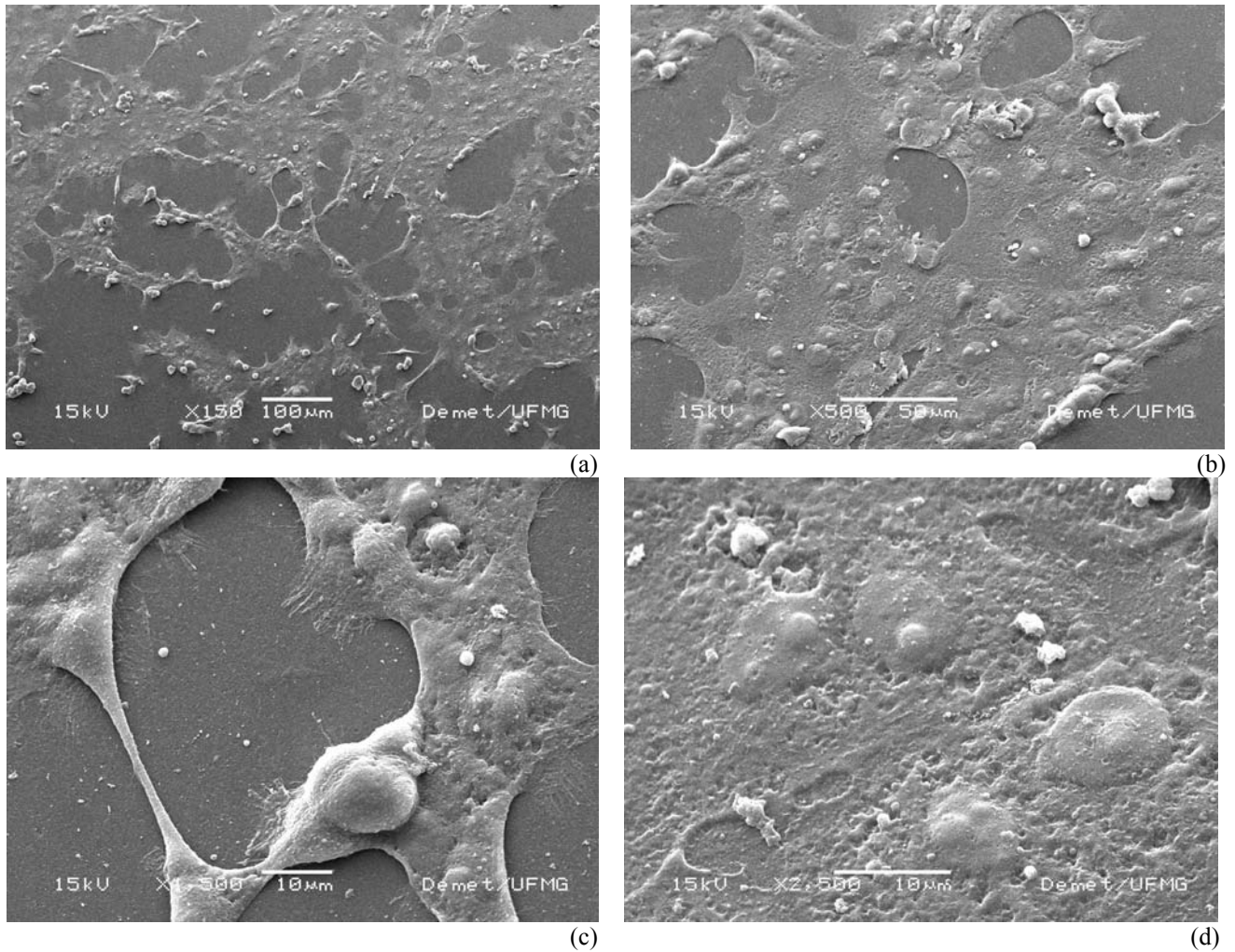


FIGURA 5.37 - Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana com genipin (a) PVA/Qui/ (3:1:1) ampliação de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:1) ampliação de 500x (c) PVA/Qui/Ge (3:1:1) ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (3:1:1) ampliação de 2500x.

Os resultados obtidos neste trabalho para adesão celular mostram que filmes contendo genipin, apresentaram melhores resultados de espalhamento celular e proliferação. Podem ser citados como resultados promissores de adesão e espalhamento os filmes PVA/Qui/Ge: (0:1:1), (1:3:1), (3:1:1). Outro filme que apresentou bons resultados de espalhamento e proliferação foi o filme PVA/Qui/Ge (3:1:0), sem reticulante e contendo 25% de quitosana e 75% de PVA. Mostrando que o aumento do PVA pode atuar melhorando a adesão e espalhamento de células em filmes contendo quitosana. Isto pode ser verificado comparando-se com o filme PVA/Qui/Ge (1:3:0), contendo 75% de quitosana.

O teste de adesão foi escolhido e realizado de acordo com a Norma ISO 10993-5 (*tests for Citotoxicity: in vitro Methods*). A norma mostra que a avaliação *in vitro* pode fornecer dados financeiramente acessíveis sobre interações biológicas, o que justifica seu uso. Os testes *in vitro* minimizam o uso de animais em pesquisa. Pode ser citado, como exemplo, materiais que causam coagulação e que são incompatíveis com as células, geralmente não merecem uma avaliação *in vivo*. Neste trabalho, foi verificado a possibilidade de teste em vivo com todos os filmes produzidos, de acordo com os resultados anteriormente discutidos, mostrando a viabilidade celular e a adesão das células (ISO 10993-5, 1992).

CAPÍTULO 6

CONCLUSÕES

Novas blendas de PVA e quitosana foram sintetizadas e quimicamente reticuladas neste trabalho. Os resultados mostraram que alterando-se a proporção de quitosana e PVA, associado com diferentes concentrações de agente reticulante, genipin, as propriedades gerais dos hidrogéis podem ser moduladas.

Os sistemas investigados indicaram uma redução significativa no comportamento de inchamento com o aumento do teor de quitosana e também com o aumento da quantidade de agente de reticulação, o que também é verificado em outros trabalhos descritos na literatura.

As propriedades mecânicas, como a resistência à tração, foram aumentadas pela formação de uma rede mais rígida, utilizando-se o agente reticulante genipin ou aumentando-se a concentração de quitosana. O genipin aumenta significativamente a tensão máxima de ruptura dos filmes produzidos. A deformação total foi maior para maiores concentrações de PVA. Este resultado indica que o PVA aumenta a maleabilidade do material, o que é importante para o uso em bandagens e pele artificial. A taxa de secagem é um fator importante que deve ser controlado pois ajuda no controle da homogeneidade e afeta as propriedades mecânicas do material. Observando-se estes resultados obtidos, pode-se controlar as propriedades mecânicas dos filmes produzidos.

Observou-se que as reações de reticulação ocorrem entre genipin e quitosana, alterando o comportamento mecânico e de intumescimento. Interações de reticulação física podem estar ocorrendo entre PVA e quitosana, como ligações de hidrogênio e emaranhados físicos. Além disso, podem ocorrer reações diferentes entre genipin, quitosana e PVA, em proporções distintas, como verificado nos espectros de infravermelho analisados neste trabalho.

Os dados obtidos indicam que o genipin melhorou, nos materiais, a biocompatibilidade, a adesão e o espalhamento das células. Além disso, os sistemas avaliados provaram ser apropriados como potenciais biomateriais para o reparo do tecido epitelial, devido ao grau de intumescimento, às propriedades mecânicas e biocompatibilidade.

Observou-se que os melhores resultados para os ensaios de intumescimento, comportamento mecânico, viabilidade celular, adesão e espalhamento celular foram para os filmes PVA/Qui/Ge: (0:1:1), (1:3:1), (1:1:1), (3:1:1), (3:1:0). Estes filmes apresentaram propriedades que os assemelham ao tecido epitelial, tanto em relação a hidrofílicade quanto características de tensão máxima na ruptura e viabilidade celular. Além disso, as matrizes mostraram-se viáveis para o desenvolvimento de células fibroblásticas. Estas são as células mais abundantes no tecido conjuntivo, pois são as principais células envolvidas na cicatrização e têm por principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo. Dessa forma, estes filmes podem ser considerados os mais promissores dentre os estudados para a utilização como tecido epitelial artificial.

CAPÍTULO 7

CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO

7.1 ARTIGOS SUBMETIDOS

Bispo, M.B.; Mansur, A. A. P.; Mansur, H. S. Physicochemical Properties of Chitosan/PVA Blends Chemically Modified by Natural Cross-linker. *Express Polymer Letters* (2009).

Bispo, M.B.; Mansur, A. A. P.; Mansur, H. S. Biocompatibility of Nanostructured Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blends Chemically Crosslinked with Genipin for Biomedical Applications. *Biomedical Nanotechnology* (2009).

7.2 TRABALHOS COMPLETOS EM CONGRESSOS NACIONAIS

Bispo, M. B.; Mansur, A. A. P.; Mansur, H. S. Síntese e Caracterização de Blendas de Poli (Álcool Vinílico) e Quitosana Reticuladas com Genipin. In: Livro de Resumos do Congresso Brasileiro de Polímeros, 78. Foz do Iguaçu, Associação Brasileira de Polímeros, (2009).

Bispo, M.B.; Mansur, A.A.P.; Mansur, H. S. Caracterização por Espectroscopia de Infravermelho de Filmes de Quitosana com Diferentes Quantidades de Agente Reticulante. In: Livro de Resumos do Congresso Brasileiro de Polímeros, 78. Foz do Iguaçu, Associação Brasileira de Polímeros, (2009).

Viviane Mota Bispo ; Mansur, A.A.P. ; Mansur, H. S. FTIR and Swelling of Chemically Crosslinked Chitosan Films. In: 11th International Conference on Advanced Materials, 91, Rio de Janeiro-RJ, International Union of Materials Research Societies, (2009).

CAPÍTULO 8

TRABALHOS FUTUROS

Como desdobramento da presente pesquisa, pode-se ainda destacar as seguintes sugestões para trabalhos futuros:

Analisar a densidade de reticulação cruzada pelo método de espectroscopia na região do visível ou através de teste mecânico com as amostras expandidas.

Investigar as interações do genipin com as células para um melhor entendimento do processo de proliferação em amostras contendo esta substância.

Avaliação *in vivo* das blendas de quitosana e PVA reticuladas e não reticuladas com genipin, verificando-se a biocompatibilidade e citotoxicidade, resposta inflamatória e degradabilidade durante a regeneração tecidual.

Análise da degradabilidade dos materiais em água, PBS, SBF em relação ao tempo de imersão nas soluções.

Verificar o comportamento do sistema de blendas deste trabalho com incorporação de fármaco, como a ciprofloxacina, utilizando o sistema como agente de liberação controlada de drogas.

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agache, P. G.; Monneur, C.; Leveque, J. L.; De Rigal, J. Mechanical properties and Young's modulus of human skin *in vivo*. *Archives of Dermatological Research*, **269**, 221-232 (1980).

Akutsu, T. *Artificial Cardiac Prostheses*. In Norman, Cardiac Surgery. Appleton-Century-Crofts. New York, (1972).

Anseth, K. S. , Metters, A. T. , Bryant, S. J., Martens, P. J. , Elisseeff, J. H. , Bowman, C. N. In situ forming degradable networks and their application in tissue engineering and drug delivery. *Journal of Controlled Release*, **78**, 199–209, (2002).

Aranha, I. B.; Lucas, E. F. Poli(álcool vinílico) modificado com cadeias hidrocarbônicas: Avaliação do balanço hidrófilo/lipófilo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **11**(4), 174-181, (2001).

Ayres, E. Desenvolvimento de poliuretanos modificados a partir da inserção de entidades inorgânicas. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, (2002).

Barbanti, S.H., Zavaglia, C., Duek, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15** (1), 13-21, (2005).

Basak, P.; Adhikari, B. Poly (vinyl alcohol) hydrogels for pH dependent colon targeted

Batyrbekov, E. O.; Iskakov, R.; Zhubanov, B. A. Synthetic and natural polymers as drug carriers for tuberculosis treatment. *Macromolecular Symposia*, **127**, 251-256 (1998).

Bear, M. F.; Connors, B. W.; Paradiso, M. A. *Neurociências: Desvendando o sistema nervoso*. Artmed Editora, Porto Alegre, (2008).

Bell, E.; Ehrlich, P.; Sher, S.; Merric, C.; Sarber, R.; Hull, B.; Nakatsuji, T.; Church, D.; Buttle, D.J. Development and use of a living skin equivalent. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **67**(3), (1981).

Beppu, M. M.; Arruda, E.; Santana, C. C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **9** (4), 163-169 (1999).

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 19-34 (2004).

Beumer, G. Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an in vivo evaluation. *Journal of Biomedical Materials Research*, **28** (5), 545-52 (1994).

Bigi, A.; Cojazzi, G.; Panzavolta, S.; Roveri, N.; Rubii, K. Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, **23**, 4827-4832 (2004).

Billmeyer, F. W. *Textbook of Polymer Science*. John Wiley & Sons, New York, 1984.

Binde, H. H.: *Lexikon der chemischen Elemente - das Periodensystem in Fakten, Zahlen und Daten*. Hirzel, Stuttgart, (1999).

Bispo, V. M. Controle do Comportamento de Fases de Géis Termossensíveis de Hidroxipropil Celulose. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte (2004).

Boccafoschi, F.; Habermehl, J.; Vesentini, S.; Mantovani, D. Biological performances of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering. *Biomaterials*, **26** (35), 7410-7417 (2005).

Bose, S.; Darsell, J.; Hosick, H. L.; Yang, L.; Sarkar, D. K.; Bandyopadhyay, A. Processing and characterization of porous alumina scaffolds, *J Mater Sci Mater Med* **13**, 23 (2002).

Brandl, F.; Sommer, F.; Goepferich, A. Rational design of hydrogels for tissue engineering: Impact of physical factors on cell behavior. *Biomaterials*, **28**, 34-146, (2007).

Brant, A. J. C. Preparação e caracterização de hidrogéis a partir de misturas de soluções de quitosana e poli(N-vinil-2-pirrolidona). Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Instituto de Química, São Paulo (2008).

Breuer, H. *DTV-Atlas zur Chemie*. Verlag Auflage, Munchen, 2000.

Buckley, C. T.; O'Kelly, K. U. Topics in bio-mechanical engineering. *Trinity Centre for Bioengineering Science*, Dublin, Ireland, 147-166 (2004).

Burke, J. F.; Yannas, I. V., Quinby, W. C.; Bondoc, C. C.; Jung, W. K. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, **1** (4), 194 (1981).

Butler, M. F.; Pudney, P. D. A. Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin *Journal of polymer science part a-polymer chemistry*, **41**(24), 3941-3953 (2003).

Campana, P. S. F.; Signini, R. Efeito de Aditivos na Desacetilação de Quitina. *Polímeros*, **11**(4), 169-173 (2001).

Carvalho, R. B.; Borges, C. P.; Nóbrega, R. Formação de membranas planas celulósicas por espalhamento duplo para os processos de nanofiltração e osmose inversa. *Polímeros*, **11**(2), 65-75 (2001).

Chan, B. P.; So, K. F. Photochemical crosslink improves the physicochemical properties of collagen scaffolds. *Journa Biomedical Materials Research. Part A* , **75** (3), 689-701 (2005).

Chan, Y. L.; Ngan, A. H. W.; King, N. M. Use of focused ion beam milling for investigating the mechanical properties of biological tissues: A study of human primary molars. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2** (4), 375-383 (2009).

Chen, H.; Ouyang, W.; Jones, M.; Martoni, C.; Haque, T.; Cohen, R.; Prakash, S. Genipin cross-linked alginate-chitosan microcapsules: membrane characterization and optimization of cross-linking reaction. *Biomacromolecules*, **7**, 2091-2098, (2006).

Choi, J.; Ma, X. P. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. *Tissue Engineering*, **7**(1), 23-33 (2001).

Ciapetti, G.; Cenni, E.; Pratelli, L.; Pizzoferrato, A. In vitro evaluation of cell/biomaterial interaction by MTT assay. *Biomaterials*, **14**(5), 359-64 (1993).

Costa JR., E. S.; Mansur H. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*, **31**, 1460-1466 (2008).

Costa, H. S.; Mansur, A. A. P.; Stancioli, E. F., Pereira, M. M., Mansur, H. S. Morphological, mechanical, and biocompatibility characterization of macroporous alumina scaffolds coated with calcium phosphate/PVA, *Journal of Materials Science*. **43**, 510–524 (2008).

Costa, JR. Desenvolvimento de matriz de quitosana/PVA quimicamente reticulado para aplicação em engenharia de tecido epitelial. Tese de doutorado. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte (2008).

Craecker, D. W; Roskams, N. Beeck, R. O. *Occupational skin diseases and dermal exposure in the European Union (EU-25): policy and practice overview*. Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg, (2008).

Dallan, P. R. M. Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele. Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas, (2005).

Darea, E. V; Griffitha, M.; Poitrasb, P.; Kauppc, J. A.; Waldmanc, S. D.; Carlssond, D. J.; Dervine, G.; Mayoux d, C.; Hinckea, M. T. Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration. *Cells Tissues Organs*, **189**, 1-13 (2009).

Dharmananda, S. "Gardenia: Key herb for dispelling dampness and heat via the triple burner", Institute for Traditional Medicine, Portland, Oregon (<http://www.itmonline.org/arts/gardenia.htm>). **September** (2003).

drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **20**, 137-146(2009).

Duff, D. A. *Colourful Tale*. Chemistry in Britain, **37**(1), (2001).

Dunn, G. A., Zicha, D. Dynamics of Fibroblast Spreading, *Journal of Cell Science*. **108**, 1239-1249 (1995).

Edmunds, H. L. *The Sangreal. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **90**, 1-6, (1985).

Fazio, M. J; Zitelli J. A; Goslen J. B. Cicatrização de feridas. In: Coleman, W. P; Hanke C. W; Alt, T. H.; Asken, S. *Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas*. Revinter, Rio de Janeiro, (2000).

Ferreira, L. G. R. *Fisiologia Vegetal – Relações Hídricas*. Editora UFC. Fortaleza, (1992).

Fieser, L. F.; Fieser, M. *Organic Chemistry*. Heath and Company, Boston, (1967).

Finch, C. A. *Poly Vinyl Alcohol, Properties and Applications*, John-Wiley, New York, (1973).

Flory P. J. *Principles of Polymer Chemistry*. Cornell University Press, Ithaca, (1953).

Galletti, P.M.; Brecher, G.A. *Heart-Lung Bypass*. Principles and Techniques of Extracorporeal Circulation. Grune & Stratton, New York, (1962).

Gehrke S. H. *Synthesis and Properties of Hydrogels used for Drug Delivery*. Fundamental Aspects of Polymers in Pharmaceutics. Marcel Dekker, New York, (2000).

Gehrke S. H., Lee P. I.: *Specialized Drug Delivery Systems Manufacturing and production Tecnology. Hydrogels for Drug Delivery*. Marcel Dekker, New York, (1990).

Gil E. S., Frankowski D. J., Spontak R. J., Hudson S. M.: Swelling behavior and morphological evolution of mixed gelatin/silk fibroin hydrogels. *Biomacromolecules*, **6**, 3079-3087 (2005).

Greenwood, N. N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*. 2nd ed. Oxford : Butterworth-Heinemann, 1997.

Guaratini, C.; Zanoni, M. Corantes Têxteis. *Química Nova*, **23**(1), 71 (2000).

Hafeman, A. E.; Li, B.; Yoshii, T.; Zienkiewicz, K.; Davidson, J. M.; Guelcher, S. A. *Injectable biodegradable polyurethane scaffolds with release of platelet-derived growth factor for tissue repair and regeneration. Pharmaceutical Research*, **25**(10), 2387-99 (2008).

Hamilton, V. Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **17**,1373-1381 (2006).

Hannah, S.; Samuel S. I. Cellular Response to Zinc-containing Organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials*, **26**, 5492, (2005).

Harris, M. I. *Pele, Estrutura, Propriedades e Envelhecimento*. Editora SENAC. São Paulo, (2009).

Harris, T. R., Bransford J. D., Brophy S.P. Roles for learning sciences and learning technologies in biomedical engineering education: a review of recent advances. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **4**, 29–48 (2002).

Harsh, D.C. Controlling Swelling Behavior of Novel Cellulose Ether Hydrogels. Ph.D. Thesis, University of Cincinnati, Cincinnati, (1992).

Hondurilla, N. G.; Gimeno, M. J; Sánchez, R. L.; Corrales, C.; Soldani, G.; Samouillan, V.; Buján, J., Bellón, J. M. Caracterización y biocompatibilidad de las prótesis vasculares de poliuretano estabilizado con polidimetilsiloxano. *Angiologia*, **54**(4), 270-281 (2002).

Huang, Y.; Onyeri, S.; Siewe, M.; Moshfeghian, A.; Madihally, S. V. *In vitro* characterization of quitosana-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **26**, 7616-7627, (2005).

Ignácio, H.; Mazzer, N.; Barbieri, C. H.; Chierice, G. O. Utilização da poliuretana da mamona nas formas compacta e porosa no preenchimento de falha óssea: estudo experimental em cães. *Revista Brasileira de Ortopedia*, **37**(5), 187-194 (2002).

Isenberg, B. C.; Wong, J. Y. Building structure into engineered tissues. *Materials Today*, **9**, 54-60 (2006).

Iwasaki, N.; Yamane, S.; Majima, T.; Kasahara, Y. Minami, A.; Harada, K.; Nonaka, S.; Maekawa, N.; Tamura, H.; Tokura, S.; Shiono, M.; Monde, K.; Nishimura, S. 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*, **5**(3), 828–833 (2004).

Jalili, K.; Abbasi, F.; Oskoe, S. S.; Alinejad, Z. Relationships between The morphology, swelling and mechanical properties of poly(dimethyl siloxane)/poly (acrylic acid) interpenetrating networks. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2** (5), 534-541 (2009).

Jang, J. H.; Rives, C. B.; Shea, L. D. Plasmid delivery in vivo from Porous tissue-engineering scaffolds: transgene expression and cellular transfection. *Molecular Therapy*, **12**(3), 475-482 (2005).

Jin, J.; Song, M.; Hourston, D. J. Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules*, **5**, 162-168 (2004).

Kaihara, S.; Borenstein, J.; Koka, R.; Lalan, S.; Ochoa, E. R.; Ravens, M.; Pien, H.; Cunningham, B.; Vacanti, J.P. Silicon micromachining to tissue engineering branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue Engineering*, **6**, 105-117 (2000).

Kolodziejaska, I.; Piotrowska, B. The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin–chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, **103**(2), 295-300 (2007).

Kong, L.; Ao, Q.; Wang, A.; Gong, K.; Wang, X.; Lu, G.; Gong, Y.; Zhao, N.; Zhang, X. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *Journal Biomaterials Applications*, **22**(3), 1-18 (2007).

Kuijpers, A. J.; Wachen, P. B.; Van Luyn, M. J. A.; Plantinga, J. A.; Engbers, G. H. M.; Krijgsveld, J.; Zaat, S. A. J.; Dankert, J.; Feijen, J. In vivo compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *Journal of Biomedical Materials Research*, **51**,136-145 (2000).

Kuo, Y. C, Lin, C. Y. Effect of genipin-crosslinked chitin-chitosan scaffolds with hydroxyapatite modifications on the cultivation of bovine knee chondrocytes *Biotechnology and bioengineering* , **95**(1), 132-144 (2006).

Lane. N. *Oxygen - the molecule that made the world*. Oxford Univ. Press, Oxford, (2003).

Langer, R. Designing materials for biology and medicine. *Nature*, **428**, 487-492 (2004).

Lee, J. S.; Woo, J.; Kim, Jung, H.; Pyun, D.; Park, M. H.; Yoon, Taek, R.; Lee, H.; Kuroyanagy, Y. Preparation of wound dressing using hydrogel polyurethane foam. Trends biomater. *Artif. Organs* **15**(1),4-6 (2001).

Lenza, R. F. S.; Jones, J. R.; Vasconcelos, W. L.; Hench, L. L. Surface-modified 3d scaffolds for tissue engineering. *Journal Mat. S.*,**13**, 837-842, (2002).

Li, Y.; Du, Y.; Tang, Y.; Wang, X. pH sensitive chitosan/gelatin hybrid polymer network scaffold for tissue engineering. *Polymer International*, **58**, 1120-1125 (2009).

Liang, H. C.; Chang, W. H.; Lin, K. J.; Sun, H. W. Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **65**, 271 – 282 (2003).

Lima S. I. Quitosanas e Quitosanas Química e Morfologicamente Modificadas com Anidrido Succínico-Propriedades, Adsorção e Termoquímica. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2005).

Liu, B. S.; Yao, C. H.; Hsu, S. H. A Novel Use of Genipin-fixed Gelatin as extracellular Matrix for Peripheral Nerve Regeneration. *Journal of biomaterials Applications*, **19**(1), 21-34 (2004).

Liu, H.; Yao, F. Zhou, Y.; Yao, K.; Mei, D. Cui, L.; Cao, Y. Porous poly(DL-lactic acid) modified chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterial Applications*, **19**, 303-322 (2005).

Liu, M.; Cheng, R.; Wu, C.; Qian, R. Viscometric Investigation of Intramolecular Hydrogen Bonding Cohesional Entanglement in Extremely Dilute Aqueous Solution of Poly(Vinyl Alcohol). *Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition*, **35**, 2421 (1997).

Ma, X. P.; Choi, J. W. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. *Tissue Engineering*, **7**(1), 23-33 (2001).

MacPherson, G. J. *Oxygen in the solar system. Mineralogical Society of America. Lunar and Planetary Institute, Washington, 2008.*

Mandelbaum, S. H.; Di Santis, E. P.; Mandelbaum, M. H. S. Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I: Anais Brasileiros de Dermatologia, RJ, **78**(5), 525-542 (2003).

Mandelbaum, S. H.; Di Santis, E. P.; Mandelbaum, M. H. S. Cicatrização, conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II: Anais Brasileiros de Dermatologia, RJ, **78**(4), 393-410 (2003).

Mansur A. A. P., Mansur H. S. Interface porcelain Tile/PVA modified mortar: a novel nanostructure approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **9**, 1071-1075 (2009).

Mansur, A. A. P. Mecanismo físico-químico de aderência na interface argamassa modificada com polímeros/cerâmica de revestimento. Universidade Federal de Minas Gerais, Tese de Doutorado, Belo Horizonte, (2007).

Mansur, H. S.; Costa Jr., E. S.; Mansur, A. A. P.; Stancioli, E. F. B. Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, v. 29, p. 1574-1583, (2009).

Mansur, H. S.; Sadahira, C. M.; Souza, A.; Mansur, A. A. P. FTIR Spectroscopy Characterization of Poly (vinyl alcohol) Hydrogel with different Hydrolysis Grade and Chemically Crosslinked with Glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C*, **28**, 539-548, (2007).

Mao, J. S.; Zhao, L. G. Study of novel chitosan-gelatin composite artificial skin in vitro. *Journal Biomedical Material Research*, **64**,301-308 (2003).

Marconi, W.; Benvenuti, F.; Piozzi, A. Covalent bonding of heparin to a vinyl copolymer for biomedical applications. *Biomaterials*, **18**, 885, (1997).

Marten, F. L. *Vinyl Alcohol Polymer*. Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, vol. 17, H. F. Mark, N. M. Bikales, C. G. Overberger & G. Menges (eds.), John-Wiley, New York (1985).

Mercier, N.R., Constantino, H.R., Tracy, M.A., Bonassar, L.J. Poly(lactide-co-glycolide) microspheres as a moldable scaffold for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, **26**(14), p.1945-1952, 2005.

Mi, F. L.; Sung, H. W.; Shyu, S. S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **38**, 2804–2814 (2000).

Mikos, A. G., Bao, Y., Cima, L. G., Ingber, D. E., Vacanti, J. P. and Langer, R. Preparation of Poly(glycolic acid) bonded fiber structures for cell attachment and transplantation. *Journal of Biomedical Materials Research*, **27**, 183-189 (1993).

Miles, B; Zajackowski, B.A., Cukierman,E.; Ph.D.,Catherine G. Galbraith, Ph.D., and Kenneth m. Yamada, m.d., Ph.D. Cell–Matrix Adhesions on Poly(vinyl alcohol) Hydrogels. *Tissue Engineering*, **3**, 525-533 (2003).

Ministério da saúde. MS anuncia investimentos de R\$ 24,1 milhões em transplantes. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/pacsauade/not_21102009.php. Acessado em 27 de novembro de 2009.

Muzzarelli, C.; Muzzarelli, R. A. A. Natural and Artificial Chitosan-Inorganic Composites, *Journal Inorganic Biochemistry*, **92**(2), 89-94 (2002).

Muzzarelli, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*, **77** (1), 1-9 (2009).

Nguyen, D.T., Orgill D.P., Murphy G.F. Chapter 4: The pathophysiologic basis for wound healing and cutaneous regeneration. *Biomaterials For Treating Skin Loss*. CRC Press (US) & Woodhead Publishing (UK), Boca Raton, Cambridge, 25-57 (2009)

Nilson, C., Rangel, Elidiane C; Bento, Wanderson C A; Kayama, Milton Eiji; Schreiner, Wido H; CRUZ. Enhancement of Polymer Hydrophobicity by SF6 Plasma Treatment and Argon Plasma Immersion Ion Implantation. *Surface And Interface Analysis*, **35**(2), 179-183 (2003).

Nitz, A. C.; Ely, J. B.; Acampora, A. J.; Tames, D. R.; Corrêa, B. P. Estudo morfométrico no processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos, usando: *Coronopu didymus* e *Calendula officinali*. *Arquivos Catarinenses de Medicina*, **35**(4), 74-79 (2006).

Nuttelman, R.; Henrya, S.M. Anseth, S. b, Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds. *Biomaterials*, **23**, 3617–3626 (2002).

Okaya, T.; Suzuki, A.; Kikuchi, K. Importance of grafting in the emulsion polymerization of MMA using PVA as a protective colloid. Effect of initiators. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **153**, 123-125 (1999).

Oliveira, E. D. ; Hirsch, S. G. ; Spontak, R. J. ; Gehrke, S. H. . Influence of Polymer Conformation on the Shear Modulus and Morphology of Poly(L-Lysine) Hydrogels. *Macromolecules*, **36**(16), 6189-6201 (2003).

Oliveira, E.D. Estudo das Propriedades e do Comportamento de Fases de Géis Termossensíveis. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, (1992).

Oliveira, E.D. Synthesis and Characterization of Novel Polypeptide Hydrogels. *PhD Thesis*, University of Cincinnati, Cincinnati, (2000).

Oliveira, E.D.; Hagan, S.A.; Gehrke, S.H. Influence of Microstructure on the Permeability and Modulus of Responsive Biopolymer Gels. *Advance in Biomaterials and Drug Delivery Systems*, 1, 517-525 (2002).

Onuki, Y.; Bhardwaj, U.; Papadimitrakopoulos, F.; Burgess, D. J. A Review of the Biocompatibility of Implantable Devices: Current Challenges to Overcome Foreign Body Response. *Journal Diabetes Science Technology*; 2(6): 1003–1015 (2008).

Orban, M.J., Marra, G.K., Hollinger, O.J. Review composition options for tissue-engineered bone. *Tissue engineering*, 8 (4), 530-538 (2002).

Oréfice, R.L.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. Biomateriais: Fundamentos e Aplicações. Editora Cultura Médica, (2005).

Ovington, L. G. (2002). The evolution of wound management: ancient origins and advances of the past 20 years. *Home Healthcare Nurse*. 20, p 652-656.

Peppas, N.A; Lustig, S.R. *Hydrogels in Medicine and Pharmacy, vol. I: Fundamentals*. CRC Press, Boca Raton, 1-105 (1986).

Pinho, M.S.L. Como as proteínas regulam a proliferação celular? Ver. Brás. Colopro. 19(3): 223-225 (1999).

Puzari, J. B. Baruah, J. B. Oxidative polymerisation of 1,4-diaminobenzene by cobalt and copper (II) catalysed reaction. *Reactive and functional polymers*, 47, 147-152 (2000).

Ratner, B.D.; Hoffman, A. S.; Schoen F.J.; Lemons, J.E.: An introduction to materials in medicine. Academic Press, San Diego, (2005).

Rinaudo, M.; Domard, A. Solution properties of chitosan. Chitin and Chitosan. Elsevier Applied Sciences, London, (1989).

Rodas, A. C. D. Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, São Paulo (2004).

Salvini, V. R.; J. R. Garcia, I. R. de Oliveira, V. C. Pandolfelli.; Agente espumante e seus efeitos nas propriedades físicas de alumina porosa cerâmica, **52**, 57-62 (2006).

Santos, S. F. Análise de filmes poliméricos densos de AcC/PHAmcl por técnicas de DSC, DMA, XPS, Ângulo de Contato e AFM. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (2005).

Schwall, C.T.; Banerjee, I.A. Micro- and Nanoscale Hydrogel Systems for Drug Delivery and Tissue Engineering. *Materials*, **2**, 577-612 (2009).

Seal, B.L.; Otero, T.C.; Panitch, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. *Material Science and Engineering*, **34**, 147-230 (2001).

Sharma, C. P. Blood-Compatible Materials: A Perspective. *Journal of Biomaterials Applications*, **15**, 359-381 (2001).

Shen, F.; Cui, Y. L.; Yang, L. F. A study on the fabrication of porous chitosan/gelatin network scaffold for tissue engenering. *Polymer International*, **49**, 1596-1599 (2000).

Sheridan, R. L., Tompkins, R.G. Skin substitutes in burns. *Burns*, **25**, 97-103 (1999).

Shin, H.; Jo, S.; Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, **24**(24), 4353-4364 (2003).

Shin, S. M.; Matsuda, M. K.; Ishii, O.; Mofrad, M. K.; Detmar, M.; Borenstein, J.; Vacanti, J. P. Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane). *Biomedical Microdevices*, **6**, 269-278 (2004).

Silva, M. H. P. Apostila de Biomateriais. Disponível em (<http://mesonpi.catcbpf/e2006/posgraduacao/pdf>). Acesso em 10 de junho de 2007.

Sipos, P.; Gyory, H.; Hagymasi, K.; Ondrejka, P.; Blazovics, A. Special wound healing methods used in ancient Egypt and the mythological background. *World Journal of Surgery*. **28**, 211-216 (2004).

Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.: *Princípios de Análise Instrumental*. Editora Bookman, Porto Alegre (2002).

Soares, G.A. Biomateriais. Fórum de biotecnologia em Biomateriais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

Sohn, V.Y.; Eckert, M.J.; Martin, M.J.; Arthurs, Z.M.; Perry, J.R.; Beekley, A.; Rubel, E.J.; Adams, R.P.; Bickett, G.L. Rush, R.M J. Efficacy of Three Topical Hemostatic Agents Applied by Medics in a Lethal Groin Injury Model. *Journal of Surgical Research*, **154** (2), 258-261(2009).

Solomons, G., Fryhle, C. *Organic Chemistry*. 7ed. vol. 1.,Ed. John Wiley and Sons, New York, 2001.

Steudel, R. *Chemie der Nichtmetalle*. Gruyter, Berlin, (1998).

Suh, J.K.F., Matthew, H.W.T. Application of Chitosan-based Polysaccharide Biomaterials in Cartilage Tissue Engineering: A Review, *Biomaterials*, **21**, 2589-2598 (2000).

Sung, H. W.; Chan, Y.; Huang, L. L. H.; Liang, I.; Chang, W. H.; Chen, Y. C. Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: Fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration with genipin. *Journal Biomedical Materials Research*, **52**, 77-87 (1998).

Sung, H. W.; Huang, R. N.; Huang, L. L. H.; Tsai, C. C.; Chiu, C. T. Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Journal Biomedical Materials Research*, **47**, 116-126 (1999).

Sztukaa, K.; Kolodziejska, Ilona. The influence of hydrophobic substances on water vapor permeability of fish gelatin films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC). *Food Hydrocolloids*, **23**(3), 1062-1064 (2009).

Toyuama, R.; Takeda, Y.; Inoue, K.; Kawamura, I.;Yatsuzuka,M.; Ikumoto, T.; Shingu, T.;Yokoi, T.; Inouye, H. Studies on the blue Pigments Produced from Genipin and

Methylamine. I. Structures of the Brownish-Red, Pigments, Intermediates Leading to the blue Pigments. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(3),668-673 (1994).

Weiguel, T.; Schinkel G. and Leindlen A. Design and preparation of polymeric scaffold for tissue engineering. *Expert Rev. Med. Devices*, **3**(6),835-851 (2006).

Weinand, C.; Pomerantseva I.; Neville C.M. Hydrogel-b-TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone*, **38**(4), 555-563 (2006).

Wiberg, H. *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*. de Gruyter, Auflage Berlin, (2007).

Yamane, S. Feasibility of chitosan-based hyaluronic acid hybrid biomaterial for a novel scaffold in cartilage tissue engineering. *Biomaterial*, **26**, 611-619 (2005).

Yeo, Y. J.; Jeon, D. W.; Kim, C. S.; Choi, S. H.; Cho, K. S.; Lee, Y. K.; Kim, C.K. Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **72B**(1), 86 – 93 (2004).

APÊNDICE A

REAÇÕES COM GENIPIN

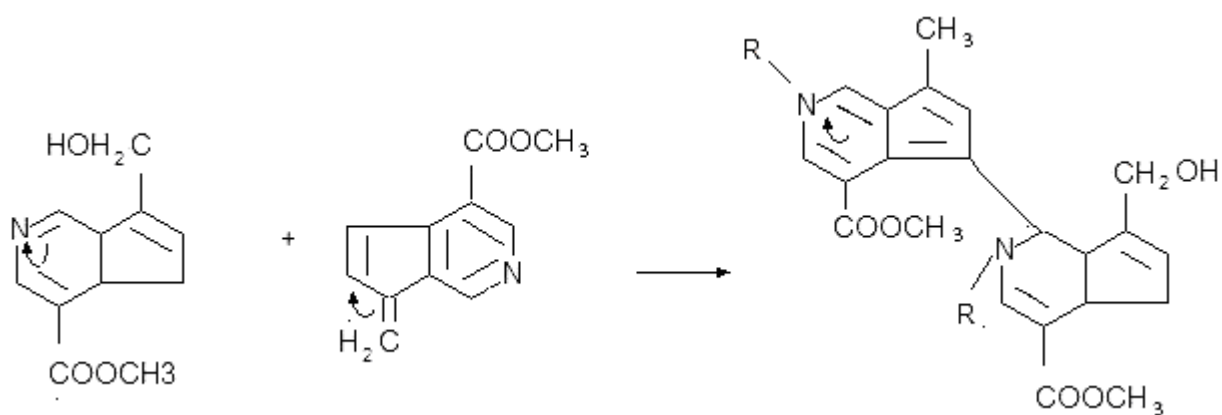


Figura A.1 - Formação de dímero através de reações entre moléculas de genipin após ataque nucleófilo de composto contendo grupo amina.

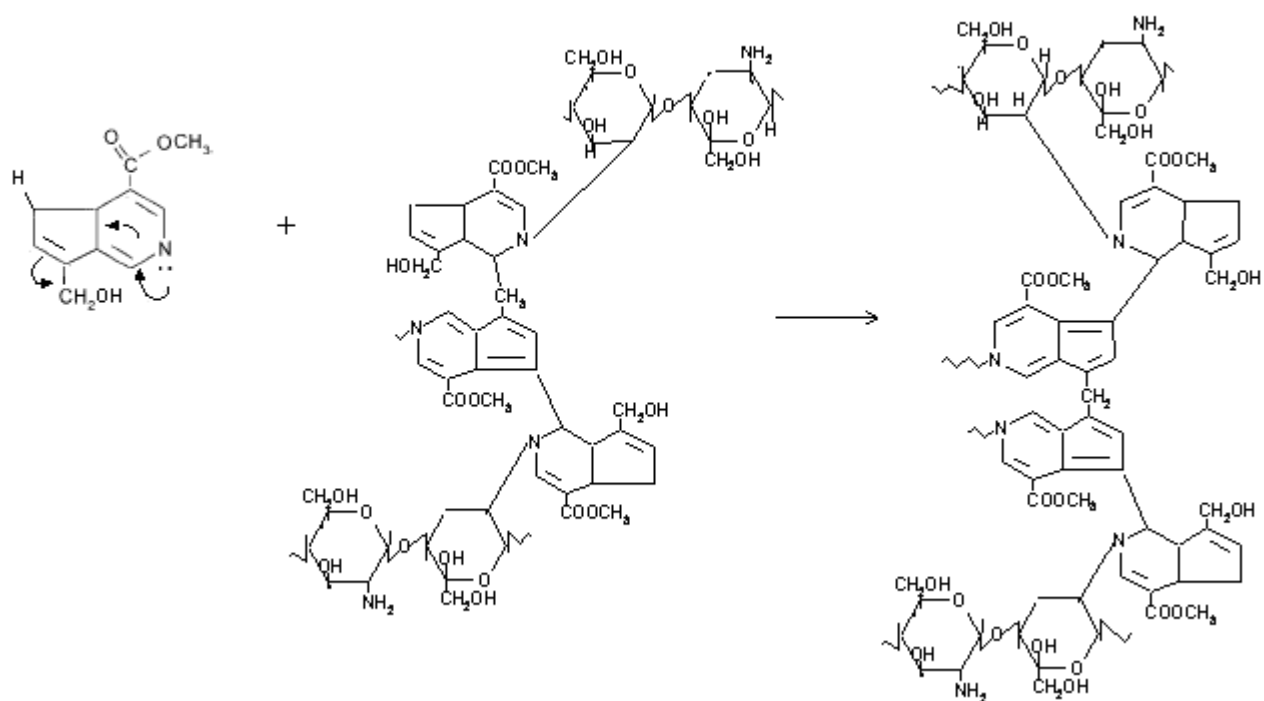


Figura A.2 - Formação de tetrâmero de genipin por reação com compostos de ressonância do genipin após ataque por reagente nucleófilo.

APÊNDICE B**ARTIGOS****Express Polymer Letters****Biomedical Nanotechnology**

Physicochemical Properties of Chitosan/PVA Blends Chemically Modified by Natural Cross-linker

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

Phone 55-31-3409-1801/3652 Fax 55-31-3409-1815

Department of Metallurgical Engineering and Materials, Federal University of Minas Gerais

**corresponding author: hmansur@demet.ufmg.br*

Films of chitosan and PVA crosslinked by different quantities of genipin were investigated by different physicochemical techniques. The blends produced were characterized by infrared spectroscopy, swelling test and mechanical test. Through these analyses the properties and reactions were verified, both qualitatively and quantitatively. The intensity of the amide band of about 1650 cm^{-1} suggests the genipin carboxymethyl group reacted with the amino group of chitosan to form a secondary amide. Additionally, the chemical reactions for forming chitosan films with genipin were observed in order to identify possible mechanisms for modification of polymer for applications in biomaterials. Also, swelling tests were performed in phosphate buffer solution (PBS) of the materials. These tests corroborated the chemical stability of materials. Based on the test results, it was possible to identify the properties that are more important in the production of biomaterials for tissue development.

Keywords: *Biocompatible polymers, Chitosan, Polymer blends, Genipin, PVA.*

1. Introduction

Synthetic or natural polymers with biocompatible and biodegradable properties are being widely studied, developed and refined for biomedical applications [1,2], because of the great need that exists to improving the medical treatment in the world, seeking for better results in the recovery of patients. Therefore, a field that has been developing in recent times is tissue engineering. Tissue engineering has been applied for manufacturing materials that serve as a scaffold for the development of tissues and even organs. These materials must have suitable characteristics for growth of live cells. These matrices can be made of polymers, which have many properties that are necessary for producing biomedical materials, among them flexibility and similarity with the tissues of the human body, so that they can be modified with some ease, adapting their characteristics to the role that will play [3-6].

The choice of polymers as a biomaterial is important due to the final properties. A lot of research has been developed on synthetic polymers, especially about the poly (vinyl alcohol) (PVA). The hydrogel of PVA has excellent transparency, soft consistency when in the form of a membrane, and is biocompatible and biologically inert. The PVA is a polymer derived by polymerization of vinyl acetate followed by the reaction of hydrolysis of poly (vinyl acetate) (PVAc) in Poly (vinyl alcohol - co- vinyl acetate) (PVA). The relationship between the percentage of hydroxyl in the final copolymer, after the hydrolysis reaction, and the total number of first acetic acid radical is the degree of hydrolysis (DH) of PVA. The degree of hydrolysis is important to characterize the properties of the polymer. An increase of DH results in a drop of solubility in water and increase in membership in hydrophilic surfaces, the viscosity and tensile strength [6-9].

Currently, chitosan has gained prominence as an integral polymer in matrices for the development of tissues. Chitosan has been subject of several studies due to its various properties, such as biocompatibility, biodegradability, acceleration of recovery from injuries, decrease in blood cholesterol, besides its bacteriostatic and fungistatic characteristics [7-14]. All these characteristics make chitosan suitable for use in matrices for tissue engineering. However, there are properties difficult to control such as mechanical properties. One way to control these properties is the use of substances called crosslinkers. These crosslinkers will react with the polymers forming networks with higher stability for the material. Among the crosslinkers, glutaraldehyde has been widely used. However, this substance has cytotoxic effects. In a recent report, Sung and colleagues [7] found that genipin is a cross-linker 10,000 times less cytotoxic than glutaraldehyde. The matrices of chitosan films and their mechanical

properties could be improved with genipin. Genipin, which is found in traditional Chinese medicine, is extracted from the fruit of the gardenia. The genipin is commonly used to react with amino acids. This natural reagent, given its low toxicity, is a substance that can be used to produce matrices for the development of cells and tissues, thus improving performance [15-24].

In this work, different concentrations of genipin were used to produce hybrids of chitosan and PVA. The objective was to verify the influence of crosslinkers in the chemical interactions, the deacetylation degree of chitosan and the chemical groups of the polymers that reacted with genipin. The Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) was adopted for the characterization. The hybrid films were also placed in phosphate buffer solution in order to evaluate their swelling degree and preliminary degradation behavior.

2 Experimental

2.1 Materials

All salts and reagents used were of analytical degree and Milli-Q water was used in all solutions (18.0 MX). Poly (vinyl alcohol-co-vinyl acetate) (PVA) supplied from Sigma-Aldrich Chemical (Milwaukee, Wisconsin, USA) (Cat.#360627) with 80% degree of hydrolysis and molar weight $MW = 9,000\text{--}10,000$ g/mol. Chitosan powder (Cat.#419419, Sigma-Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin, USA), high molecular weight, $MW = 161,000$ g/mol, degree of deacetylation, $DD = 75.6\%$, was used without further purification. Genipin (Ge, reagent grade, purity $> 98\%$ as HPLC assay, Challenge Bioproducts, Taiwan) used as chemical crosslinking reagent.

2.2 Methods

2.2.1 Chitosan and PVA solution preparation

Briefly, PVA hydrogels were prepared by fully dissolving 5.0 g of polymer powder without further purification in 100 ml of Milli-Q water, under magnetic stirring, at temperature of $75 \pm 2^\circ\text{C}$ (solution A), as previously reported by our group [7–9]. PVA 5% solution was let to cool down to room temperature. Chitosan hydrogels (Chi) were produced in a similar procedure by fully dissolving 2.5 g in 250.0 ml of Milli-Q water with 2% of CH_3COOH (Sigma), under magnetic stirring for 48 h (solution B).

2.2.2 Chitosan, PVA and blends films preparation

Different quantities of PVA (solution A) were added into the 1.0% chitosan solution (solution B) to obtain chitosan/ PVA mass ratios of (0:1), (1:3), (1:1), (3:1), and (1:0). The mixture was kept under stirring for 5 min until the PVA and chitosan completely formed a clear solution. Then, the crosslinker reagent (Ge) was slowly added under constant stirring. The final concentration of Ge in the gel solution precursors was 0%, 0,5% and 1% (wt%). Further in the sequence, the solution was poured into plastic molds and let drying for 72–120 h at room temperature, and finally dried at 40°C for 24 h (constant weight). Chitosan/PVA samples chemically crosslinked were identified by (X:Y:Z) that is, X as chitosan content, Y as PVA content, and Z as Ge (wt%). For instance, sample identified as PVA/ Chi /Ge (1:3:1) represents the following proportion of reagents: 25% PVA, 75% chitosan and crosslinked with 1.0% Ge (wt%). The dried gel was stored in a desiccator before all subsequent characterization procedures.

2.3 Characterization

2.3.1 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

FTIR was used to characterize the presence of specific chemical groups in the hydrogels. Chi, PVA films, and hydrogels blends crosslinked with Ge (PVA/ Chi /Ge) were obtained as 100–200 μm thick films and analyzed by FTIR using ATR (attenuated total reflection) Modes. FTIR spectra were collected with wavenumber ranging from 4,000 to 650 cm^{-1} during 64 scans, with 2 cm^{-1} resolution (Paragon 1000, Perkin-Elmer, USA). The FTIR spectra were normalized and major vibration bands were identified and associated with the main chemical groups.

Equation (1) is used with the absorption of infrared spectrum to obtain a degree of deacetylation.

$$DD = \left[97,67 - \left(\frac{\alpha_1}{\alpha_2} \right) \right] \quad (1)$$

Where α_1 and α_2 represent the main absorption in the infrared spectrum of wavenumber at 1655 and 3450 cm^{-1} respectively, from the spectrum of chitosan [11].

2.3.4 Swelling test

The characterization of the swelling test was performed in films of 1cm² in 10mL of phosphate buffer solution at room temperature. Equation 2 was utilized to obtain the results for swelling of the films of chitosan crosslinked and without crosslinked.

$$\text{Swelling} = \left(M_i - \frac{M_s}{M_s} \right) \times 100\% \quad (2)$$

M_i is dry mass and M_s is swelling mass after immersion in PBS.

2.3.5 Tensile test

The tensile tests were also carried to evaluate the mechanical behavior (maximum tensile stress (σ), strain-specific (A) and modulus (E)) of the films produced. The experiment were carried in equipment Emic DL 3000, using a load cell of 50N, test speed of 5 mm.min⁻¹ and specimens in the form of strips 5cm long and 1cm wide on average. The L_o was 2 cm, ASTM D882/97, 15 test temperature of 21 ± 2 ° C.

The tensile stress was calculated by Equation 3 where (F) represents the traction force (A) the cross-sectional area of samples.

$$\sigma = \frac{F}{A} \quad (3)$$

The Yong module (E) was obtained from the slope of the stress-strain curve.

3. Results

3.1 Fourier Transform infrared spectroscopy (FTIR)

Figure 1 shows the FTIR spectra relative the chitosan powder. The numbers in the Figure 1: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX and X are respectively related to groups N-H/O-H, C-H, C=O, tertiary amine, secondary amine, primary amine, and saccharide ring. In the curve, the absorptions shown in the peaks at 1321 cm⁻¹, 1260 cm⁻¹, 1379 cm⁻¹ correspond to bending vibrations of the amines, which are detailed in Table 1 together with other characteristic bands of chitosan. Vibrations of the bond C-H corresponding to the saccharides structure at 1154 and 896 cm⁻¹ are also found in these spectra. There are also absorptions at 1100 and 1500 cm⁻¹. They are discussed in the literature and represent the C-N stretching in the carbon 2 of the glucopyranoside ring [24].

From the intensity of bands in the infrared frequencies at 1655 and 3450 cm^{-1} (A1 and A2 in Equation 1, respectively) the average degree of deacetylation was calculated. This polymer reached the value of $(80 \pm 4)\%$, and the method of infrared spectroscopy proposed by Lima was indicated as the experimental procedure (2005). This result is relatively similar to that found by the manufacturer (76%), as pointed out in the experimental procedure. There are more variations in the techniques recommended to verify the degree of chitosan deacetylation. Among these techniques are, for example, titulometry, potentiometry, infrared spectroscopy, and nuclear magnetic resonance. However, the infrared spectra have been the most used and accepted technique.

The chitosan structure is shown in Figure 2(a), as observed in the infrared spectra of the material. In Figure 2(b) the representation of genipin is showed. The chemical interactions established by the addition of genipin can be seen in the spectra as showed in Figure 3. In the spectra presented in Figure 3, the absorption of the band at 1650 cm^{-1} associated with the amide group increases from curve (a) to curve (c) while increasing the content of cross-links. The band at 1064 cm^{-1} is a result of C-O stretching and the band at 1406 cm^{-1} results from the ring stretching of the molecule of genipin (C=C). The vibration in the range of 1540 cm^{-1} to 1560 cm^{-1} is due to protonated amine groups. The stretching of the ring of the heterocyclic amine appears at 1340 cm^{-1} and occurs with increased absorption to higher concentrations of genipin [23-29]. The typical profile of polysaccharide is shown at 1150 cm^{-1} with characteristic stretching of C-O-C. Figure 4 shows the increase in the intensity of vibration of amides at 1650 cm^{-1} represented by I in Figure 6. Figure 5 shows the increase of tertiary amines at 1321 cm^{-1} , represented by II in Figure 6, with increased crosslink, where the absorbance was normalized on the band at 1450 cm^{-1} associated with the C-H group [25]. By considering these results and the study on reaction mechanisms in acid medium by Butller and collaborators (2003), the synthesis of chitosan by cross-linked genipin can be represented as shown in Figure 6. The amine group in the polymer reacts with the ester group in the genipin forming amides [30].

Figure 7 shows samples of blends where by increasing the percentage of chitosan there is an increase in the peak at 1558 cm^{-1} related to amines found in chitosan. With the mixture of chitosan and PVA, a band can be found at 1250 cm^{-1} as a result from the NH_3^+ , -CO and OH groups existing in the polymers [29]. This peak at 1250 cm^{-1} is absent in the pure chitosan. The broad peak at 3290 cm^{-1} results from the hydroxyl. This band is important because it suggests forming the hydrogen bond in the sample. The connections of hydrogen can increase the strength of the material and decrease the solubility in water [30-31].

In Figure 8 it is possible to observe at 1717cm^{-1} the decrease in the band of the cross-linked blend containing 1% of genipin represented by c in the spectra. This band is related to the acetate of PVA. The band related to the acetate at 1260cm^{-1} also decreases in the blend with 1% of crosslink. The band decrease at 1717 and 1260cm^{-1} is probably due to the reaction of the acid solution with PVA. The bands related to the amides increase, suggesting the formation of amides between genipin and chitosan, produced by reaction, as shown in Figure 6. In Figure 10 there is a decrease of the amines. The hydroxyl is present in both the PVA and the chitosan [24]. At 1406cm^{-1} there is a band for carboxylic acid that increases as the acid solution of genipin increases. For the PVA there can be hydrolysis because the pH is around 3.6, which justifies reducing the bands at 1717 and 1260cm^{-1} . In Figures 9 and 10, as shown also in Figure 8, at 1650cm^{-1} it is possible to verify the considerable increase in the amide band and decrease in absorbance of amine band of the blends containing different concentrations of genipin. The absorbance of the amide bands increases as the crosslink increases. Figure 11 illustrates quantitatively the decrease of acetate in blends; which probably occurs by hydrolysis of the PVA, because there is a decrease in the absorption in the band of the acetate at 1260cm^{-1} . At 1550cm^{-1} occurs an increase of amide band for blend more crosslinked PVA / Chi / Ge 3:1: 1.

The film of pure PVA and cross-linked with 1% of genipin is shown in Figure 12. From 1300 to 1500cm^{-1} the band increases, and that may be associated with the heterocyclic ring in the genipin. 1750cm^{-1} is the peak of C=O stretching in PVA without crosslinks, similar to that which has 0.5% of genipin [25-30]. Due to the less aggressive pH 6.5 without genipin solution of this reaction, the PVA does not suffer hydrolysis in this medium. At 3500cm^{-1} the band increases because of increased hydroxyl.

3.2 Swelling Degree

The degree of swelling, also known as the degree of expansion, is one of the most important properties of a hydrogel. This property was analyzed in this work by using immersed samples. The relation sample area and immersion volume is 1cm^{-1} at room temperature [6]. It was observed the degree of swelling is related to rate of absorption or permeability to solvents, and chemical resistance is influenced by the network in the gel. The experiment was conducted in the swelling at pH 7.4 in phosphate buffer solution (PBS).

The solvent absorbed by the gel is controlled by the hydrophilicity of the polymer, the number or density of crosslinks (bonds that form the network of the gel) and concentrating ionized groups in the network [5]. The PVA with 80% of hydrolyzed groups is more hydrophilic that

chitosan. This is because the PVA has a large number of hydroxyl groups. The swelling was much higher for films containing higher concentrations of PVA. The films with higher concentration of chitosan have lower degrees of expansion. The degree of deacetylation is an important feature to explain the ionic interaction in chitosan. As the degree of deacetylation employed by chitosan to make these films is high, about 80%, chitosan becomes a polyelectrolyte. The higher number of amino groups present due to deacetylation increases the hydrophilic character of the polymer. The pH of chitosan solution of acetic acid is 3.5 and is then set to pH 4 with NaOH solution as described in the experimental part. So chitosan is dissolved, forming a viscous solution. This is because the basic character of chitosan (anions as good donors of electrons) removes the proton ion hydroxon dispersed in the reaction medium. Thus, it can be called a unique polyelectrolyte, because it is solvable only at pH close to 3, interacting with water in solution. As the pH of the phosphate buffer solution is 7.4, the uncross-linked chitosan with that degree of deacetylation does not dissolve [24]. This can be seen in the films of chitosan not crosslinked during testing with the polymers immersed in PBS. Also, the film of chitosan forms hydrogen bonds during the drying, which stabilizes the film [24-30]. Adding genipin does not significantly alter the pH, which is measured during the synthesis. Thus, the film of chitosan uncrosslinked and crosslinked, when subjected to the test, interacts with the loads of electrolytes dissolved in PBS. And these interactions with water eventually lead to the membrane swelling to considerable values.

Figure 13 shows the swelling behavior in chitosan uncrosslinked and crosslinked with genipin. The transition from contracted to expanded state is marked by changes in the properties of the films. It can be observed the gels will be expanding (more swelling) when uncrosslinked in comparison with crosslinked. The swelling depends on the degree of crosslinking. The reduction in the degree of swelling depends on the amount of crosslinkers. But this decreased swelling value is not exactly inversely proportional to the amount of crosslinkers. This was also found in previous studies [3,4].

The results show that crosslinking has occurred as expected. This is because the swelling decreases as the amount of cross-linkers increases. The crosslinked polymer chains reduce their mobility and expand less in contact with solvents. For gels of chitosan during the swelling test, it was found that their ionic character will be one of the important parameters to be considered during the expansion of the gels.

For ionic gels, according to the Flory-Huggins theory, the osmotic pressure will lead to swelling of the gel that occurs with the difference in concentration of ions between the gel and the solution [3]. Thus, when the membrane is less crosslinked with 0.5% of genipin, there are

more hydrophilic groups (NH_3^+) in the network. These groups will interact with the dissolved ions (present in physiological PBS buffer) and with the water that solvate these ions. This promotes the obeyed swelling of the membranes. Therefore, when the membrane is less crosslinked, for example, with 0.5% of genipin, more hydrophilic groups are available with NH_3^+ in the membrane, to interact with water and ions, than with 1% of genipin.

Therefore, the hydrophilic groups are in smaller quantities with 1% crosslink. Furthermore, with the largest number of crosslinking the chains have less mobility to expand during the interactions. Depending on the crosslinking, small amounts of it do not change much swelling, but by adding a certain amount, even if not very high, will greatly reduce the swelling. This occurs because of properties such as hydrophilicity and efficiency of the crosslinker, and is found in the work developed by Bispo and Ginani *et al* [4, 31]. In the blends of chitosan and PVA shows Figure 14, depending on the composition different behaviors can be observed in the swelling. Thus, films with the addition of PVA resulted in changed affinity with water. The mixture of two polymers, chitosan and PVA, can extend their chains to a large extent in an aqueous solution. After drying the blends, the polymers could interact with one another, thus forming a more homogeneous film [31-32]. For blends with a high amount of chitosan, the load surface is positive because of the cationic ammonium groups, since the amino groups are easily protonated in an acid solution. The positively charged chitosan promotes a steric and electrostatic stabilization in the film. So, increased chitosan content can lead to separating phases [30-35]. With separating phases, the behavior of swelling may vary. With adding crosslinkers, it is possible to find crosslinked regions and less crosslinked aggregated. However, the crosslinking is more difficult to aggregate regions of chitosan where the polymer cannot be extended enough (no exposure to amine groups) to react with genipin.

In Figure 15 - blend with 25% of chitosan - it is observed that the increase in the percentage of crosslinkers reduces swelling. The reaction between genipin and chitosan leads to crosslinking that reduce the polymer mobility and hydrophilicity while reducing the degree of swelling. These results are similar to those obtained by Souza (2008) [6].

3.3 Mechanical Tests

It is noted the blends have intermediate maximum tension values when compared to pure films. It is showed in Figure 17. The pure chitosan has a higher value of maximum stress, about 11.8 MPa (average of 6 samples). The values of maximum stress are close to the blends PVA / Chi / Ge (1:1:0) and PVA/ Chi / Ge (1:3:0), which are respectively 10 and 9.9 MPa. It is reported that the degree of deacetylation of chitosan, the profile of drying the solvent, the

use of plasticizers and mixing procedures may jointly influence all mechanical properties. This is seen in the literature for the results of tensile strength and strain are in the particular range from 1.4 to 50 MPa and 3.5 to 115%, respectively [6, 36-40]. Figure 17 shows that increasing the percentage of chitosan in the films increases the values of maximum stress for any concentration of crosslinker [6, 39]. The exception is the behavior of the film PVA / Chi / Ge (0:1:1), which is different because it shows that with an increase in the film genipin became weaker, reducing the maximum stress. This effect of genipin is found in the work of Jin and collaborators [39], in which the author explains the reasons have not been elucidated yet. Similar performance was observed by Chiellini and collaborators (2001), when concentrating glutaraldehyde increased over the gelatin film. Figures 17 and 18 show that as the amount of genipin increases lower tensions in the material are required for it to start the plastic behavior. A possible explanation for this effect is that the increase of genipin is decreasing mobility of the chains and reducing the tension to get the plastic regime. This is also verified in this work. The plastic regime is where the plastic permanent deformation happens in the movies. According to the values and as evidenced in the literature [6, 35-41], the behavior of the films is highly influenced by what changes their composition and type of crosslinkers. Experimental values obtained and showed in this work evidence that mechanical stress properties have a tendency to increase with the amount of crosslinker. This is reported in the literature by Souza (2008) and Chiono *et al* (2008) [6, 37]. The lowest value for modulus was of the film in the PVA / Chi / Ge (1:0:0) with 48 MPa. Young's modulus or modulus of elasticity is a parameter that provides information about the resistance that this material has to elastic deformation. For the pure chitosan film, the module was 145 MPa and pure PVA was 54 MPa [42]. In films of the polymer mixture, Young's modulus is dependent on their composition, as seen in the experimental data. This behavior was also observed by Kolodziejaska and Piotrowska (in studies of mechanical properties of films of gelatin-chitosan chemically modified with transglutaminase) [43].

4. Conclusion

Novel chitosan/PVA blends were synthesized and chemically crosslinked in this work. The results have shown that by altering the proportion of chitosan to PVA, associated with different concentration of genipin natural crosslinker, the overall properties from hydrogels can be tailored. The systems investigated have indicated a significant reduction on the swelling behavior as the chitosan content was increased and also as the amount of crosslinking reagent was raised. As a consequence, from the mechanical point of view, the

tensile strength was increased by the formation of a more rigid network. Moreover, all systems evaluated have proven to be suitable as potential biomaterials in skin tissue repair as far as the swelling degree and mechanical properties are concerned.

Acknowledgement

The authors acknowledge FAPEMIG/CNPq/CAPES for financial support on this work. Also we are grateful to Prof. Wander L. Vasconcelos (Laboratory of Ceramic Materials) for the FTIR spectroscopy and to Prof. Dagoberto B. Santos and Patrícia M. T. de Azevedo for SEM analysis.

References

- [1] Gil E. S., Frankowski D. J., Spontak R. J., Hudson S. M.: Swelling behavior and morphological evolution of mixed gelatin/silk fibroin hydrogels. *Biomacromolecules*, **6**, 3079-3087 (2005).
- [2] Gehrke S. H.: *Synthesis and Properties of Hydrogels used for Drug Delivery*. 'Fundamental Aspects of Polymers in Pharmaceutics'(eds.: Gordon L.A., Ping I. L., Elizabeth M.T.) Marcel Dekker, New York, 473-507 (2000).
- [3] Flory P. J.: *Rubber Elasticity*. 'Principles of Polymer Chemistry'. Cornell University Press, Ithaca, 432-493 (1953).
- [4] Bispo V. M.: 'Controle do Comportamento de Fases de Géis Termossensíveis de Hidroxipropil Celulose'. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte (2004).
- [5] Gehrke S. H., Lee P. I.: *Specialized Drug Delivery Systems Manufacturing and production Technology*. 'Hydrogels for Drug Delivery' (ed.: Praveen T.) Marcel Dekker, New York, (1990).
- [6] Costa E. S., Mansur H. S.: Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Química Nova*, **31**, (2008).
- [7] Sung H. W., Huang R. N., Huang L. L. H., Tsai C. C., Chiu C. T.: Crosslinking characteristics and mechanical properties of a bovine pericardium fixed with a naturally occurring crosslinking agent, *Journal Biomedical Materials Research*, **47**, 116-126 (1999).

- [8] Berger J., Reist M., Mayer J. M., Felt O.: Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **57**, 19-34 (2004).
- [9] Isenberg B. C., Wong J. Y.: Building structure into engineered tissues. *Materials today*, **9**, 54-60 (2006).
- [10] Kaihara S., Borenstein J., Koka R., Lalan S., Ochoa E. R., Ravens M., Pien H., Cunningham B., Vacanti J.P.: Silicon micromachining to tissue engineering branched vascular channels for liver fabrication. *Tissue engineering*, **6**,105-117 (2000).
- [11] Shin S. M., Matsuda M. K., Ishii O., Mofrad M. K., Detmar M., Borenstein J., Vacanti J. P.: Endothelialized networks with a vascular geometry in microfabricated poly(dimethyl siloxane). *Biomedical Microdevices*, **6**, 269-278 (2004).
- [12] Shen F., Cui Y. L., Yang L. F.: A study on the fabrication of porous chitosan/gelatin network scaffold for tissue engenering. *Polymer International*, **49**, 1596-1599 (2000).
- [13] Li Y., Du Y., Tang Y., Wang X.: pH sensitive chitosan/gelatin hybrid polymer network scaffold for tissue engineering. *Polymer International*, **58**, 1120-1125 (2009).
- [14] Mao J.S., Zhao L.G.: Study of novel chitosan-gelatin composite artificial skin in vitro. *Journal Biomedical Material Research*, **64**,301-308 (2003).
- [15] Chen H., Ouyang W., Jones M., Martoni C., Haque T., Cohen R., Prakash S.: Genipin cross-linked alginate-chitosan microcapsules: membrane characterization and optimization of cross-linking reaction. *Biomacromolecules*, **7**, 2091-2098, (2006).
- [16] Liang H. C., Chang W. H., Lin K. J., Sun H. W.: Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **65**, 271 – 282 (2003).
- [17] Darea E. V, Griffitha M., Poitrasb P., Kauppc J. A., Waldmanc S. D., Carlssond D. J., Dervine G., Mayoux d C., Hinckea M. T.: Genipin cross-linked fibrin hydrogels for in vitro human articular cartilage tissue-engineered regeneration. *Cells Tissues Organs*, **189**, 1-13 (2009).
- [18] Sung, H. W., Chan Y., Huang L. L. H., Liang I., Chang W. H., Chen Y. C.: Fixation of biological tissues with a naturally occurring crosslinking agent: Fixation rate and effects of pH, temperature, and initial fixative concentration with genipin. *Journal Biomedical Materials Research*, **52**, 77-87 (1998).

- [19] Bigi A., Cojazzi G., Panzavolta S., Roveri N., Rubii K.: Relationship between triple-helix content and mechanical properties of gelatin films. *Biomaterials*, **23**, 4827-4832 (2004).
- [20] Kuijpers A. J., Wachen P.B, vanLuyn M. J. A., Plantinga J. A., Engbers G. H. M., Krijgsveld J., Zaat S. A. J., Dankert J., Feijen J.: In vivo compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. *Journal of Biomedical Materials Research*, **51**, 136-145 (2000).
- [21] Jin J., Song M., Hourston D. J.: Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules*, **5**, 162-168 (2004).
- [22] Mansur A. A. P., Mansur H. S.: Interface porcelain Tile/PVA modified mortar: a novel nanostructure approach. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, **9**, 1071-1075 (2009).
- [23] Liu B. S., Yao C. H., Hsu S. H.: A novel use of genipin-fixed gelatin as extracellular matrix for peripheral nerve regeneration. *Journal of biomaterials Applications*, **19**, 21-34 (2004)
- [24] Lima S. I.: 'Quitosanas e Quitosanas Química e Morfologicamente Modificadas com Anidrido Succínico-Propriedades, Adsorção e Termoquímica'. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2005).
- [25] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A.: *Princípios de Análise Instrumental*. Editora Bookman, Porto Alegre (2002).
- [26] Elizondo N. J., Sobral P. J. A., Menegalli F. C.: Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly(vinyl alcohol). *Carbohydrate Polymers.*, **75**, 592-598 (2009).
- [27] Mi F. L., Sung H. W., Shyu S. S.: Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **38**, 2804–2814 (2000).
- [28] Costa E. S., Barbosa S. E., Vasconcelos W., Mansur H., Mansur A. A. P.: Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, p. 1, 2008 *Carbohydrate Polymers*, **76**, 472-481(2009).
- [29] Wang T., Turhan M., Gunasekaran S.: Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel. *Polymer International*, **53**, 911-918 (2004).

- [30] Butler M. F., Pudney P. D. A.: Mechanism and kinetics of the crosslinking reaction between biopolymers containing primary amine groups and genipin. *Journal of polymer science part a-polymer chemistry*, **41**, 3941-3953 (2003).
- [31] Shirosaki Y., Tsurua K., Hayakawa S., Osaka A., Lopes M. A., Santos J. D., Fernandes M. H.: In vitro cytocompatibility of MG63 cells on chitosan-organosiloxane hybrid membranes. *Biomaterials*, **26**, 485-493 (2005).
- [32] Ginani F., Navarro M. V., Nascimento E. G., Oliveira U. O. B.: Estudo da influência da natureza de reticulantes e aditivos orgânicos sobre o comportamento de géis de quitosana. *Química Nova*, **22**, 801-804 (1999).
- [33] Don T. M., King C. F., Chiu W. Y., Peng C. A.: Preparation and characterization of chitosan-g- poly(vinyl alcohol)/poly(vinyl alcohol) blends used for the evaluation of blood-contacting compatibility. *Carbohydrate Polymers*, **63**, 331-339 (2006).
- [34] 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*, **42**, 3569- 3580 (2001).
- [35] Monteiro O. A. C., Airoidi C.: Some studies of crosslinking chitosan–glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. *International Journal of Biological Macromolecules*, **26**, 119-128 (1999).
- [36] Rao P. S., Smitha S., Krishnaiah A.: 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*, **48**, 244-254 (2006).
- [37] Bahrami S. B., Kordestani S. S., Mirzadeh H., Mansoori P.: Poly(vinyl alcohol)-chitosan blends: preparation, mechanical and physical properties. *Iranian Polymer Journal*, **12**, 139-146 (2003).
- [38] Arvanitoyannis I., Psomiadou E., Nakayama A.: Physico-chemical studies of chitosan-poly(vinyl alcohol) blends plasticized with sorbitol and sucrose. *Carbohydrate Polymers*, **34**, 9-10 (1997).
- [39] Jin J, Song M., Hourston D. J.: Novel chitosan-based films cross-linked by genipin with improved physical properties. *Biomacromolecules*, **5**, 162-168 (2004).
- [40] Chiono V., Vozzi G., Ciardelli G., Giusti P.: Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **19**, 889–898 (2008).

- [41] Chiellini E., Cinelli P., Fernández E. G., Kenawy A., Lazzeri A. S.: Composite films based on biorelated agro-industrial waste and poly(vinyl alcohol). Preparation and mechanical properties characterization. *Biomacromolecules*, **2**, 806 - 8011, 2001.
- [42] Rotta J.: Propriedades físico-químicas de soluções formadoras e de filmes de quitosana e hidroxipropilmetilcelulose. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.
- [43] Kolodziejska L., Piotrowska B.: The water vapour permeability, mechanical properties and solubility of fish gelatin-chitosan films modified with transglutaminase or 1-ethyl-3-(3-dimetilaminopropyl) carbodiimide (EDC) and plasticized with glycerol. *Food Chemistry*, **103**, 295-300 (2007).

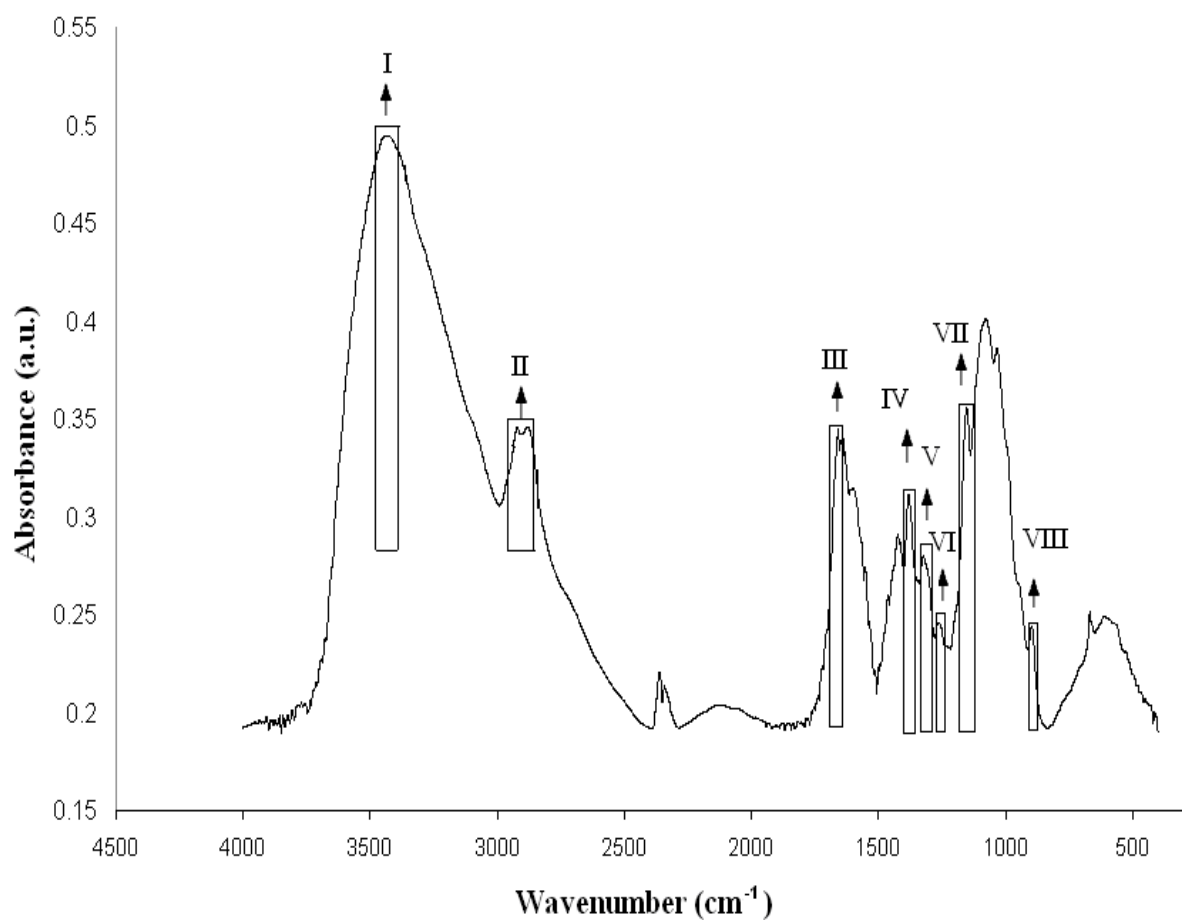


Figure 1 – Spectra FTIR of pure chitosan with deacetylation degree estimated at 80%.

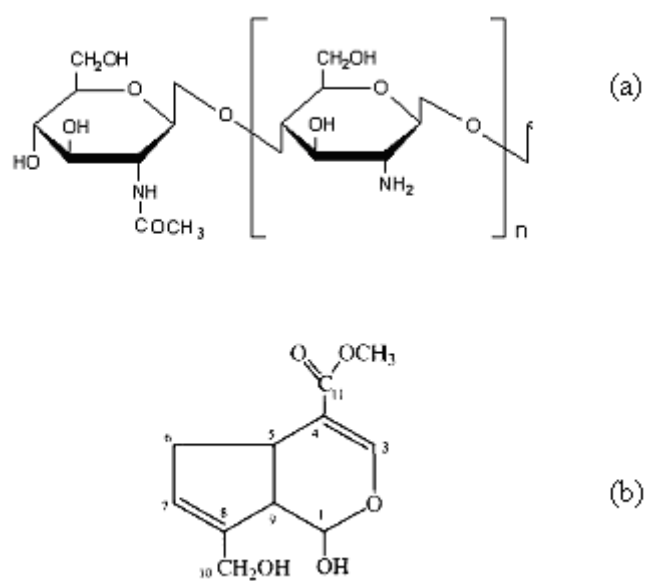


Figure 2 - Representation of structural formula (a) monomer of chitosan (b) molecule of genipin.

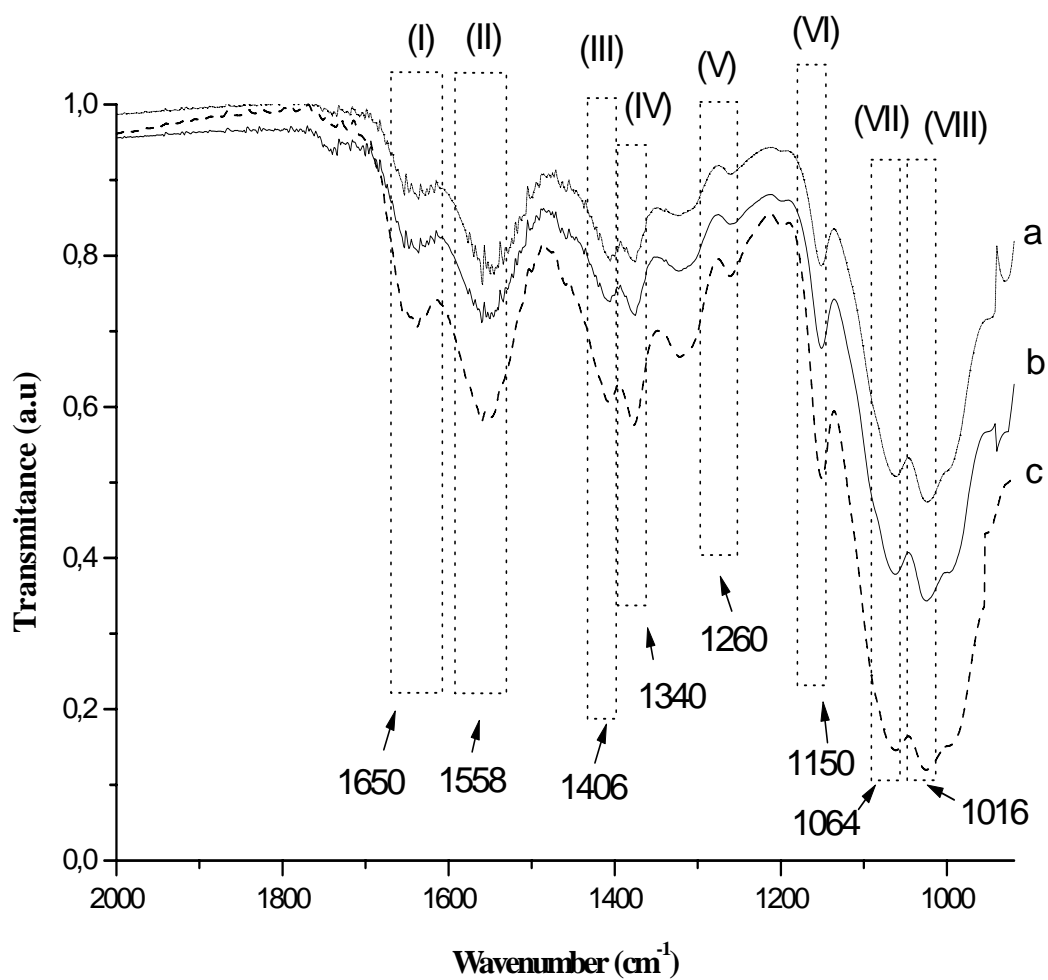


Figure 3 - Spectra FTIR. (a) --- film of chitosan uncrosslinked, (b) — film of 0.5% of genipin with chitosan and (c)..... film of 1% of genipin with chitosan.

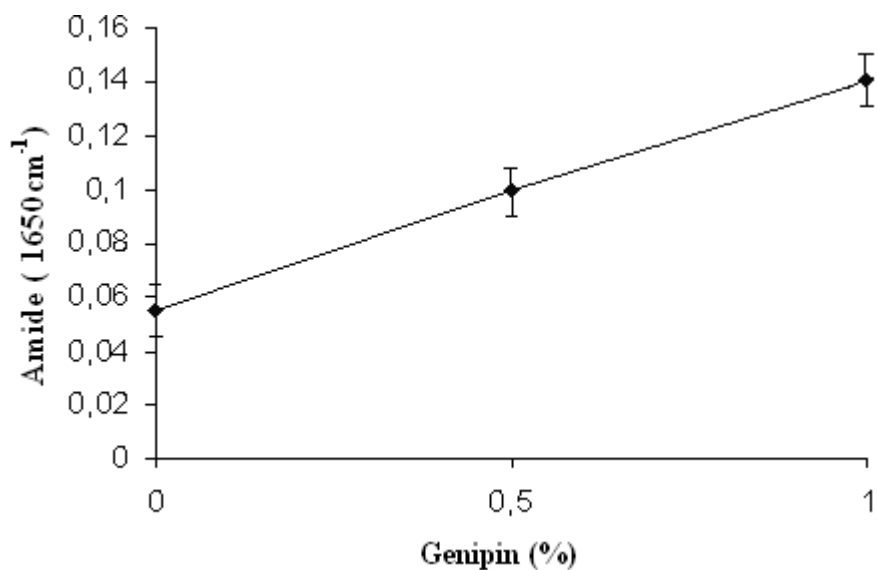


Figure 4- Intensity of the bands of amides formed by reaction of chitosan genipin for different concentrations of genipin in films and normalized by the band 1450 cm⁻¹.

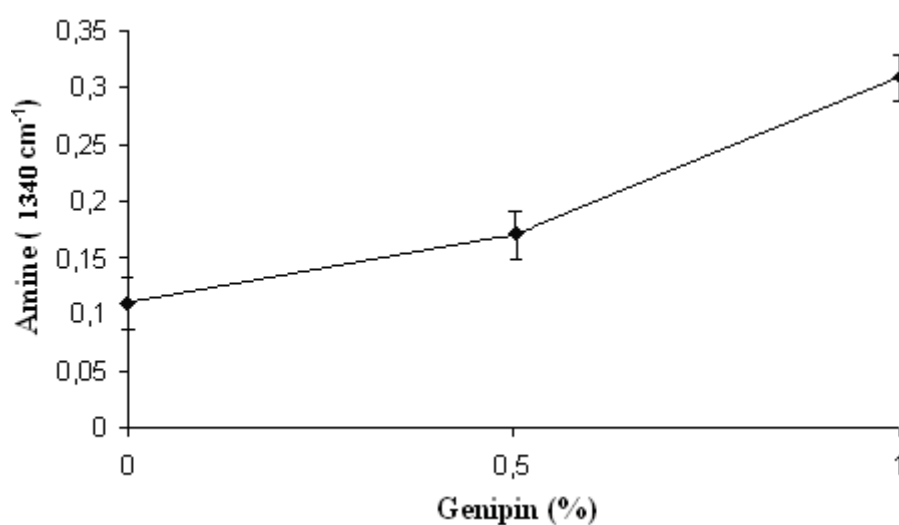


Figure 5 – Increase of the intensity of the bands of the amines by reaction of chitosan genipin for different concentrations of genipin in films and normalized by the band 1450 cm⁻¹.

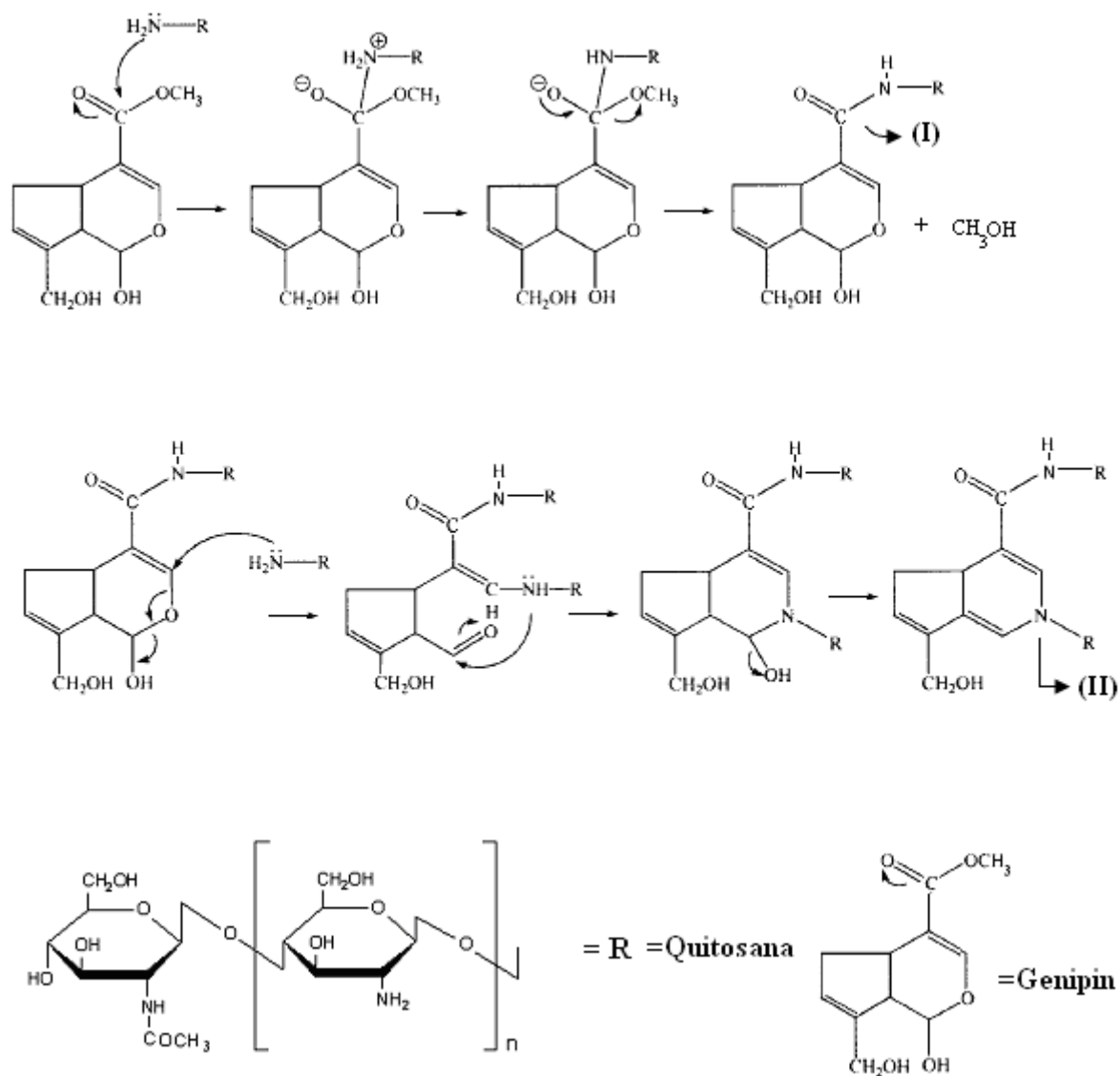


Figure 6- Amine reactions of groups of polymers such as chitosan with genipin [29].

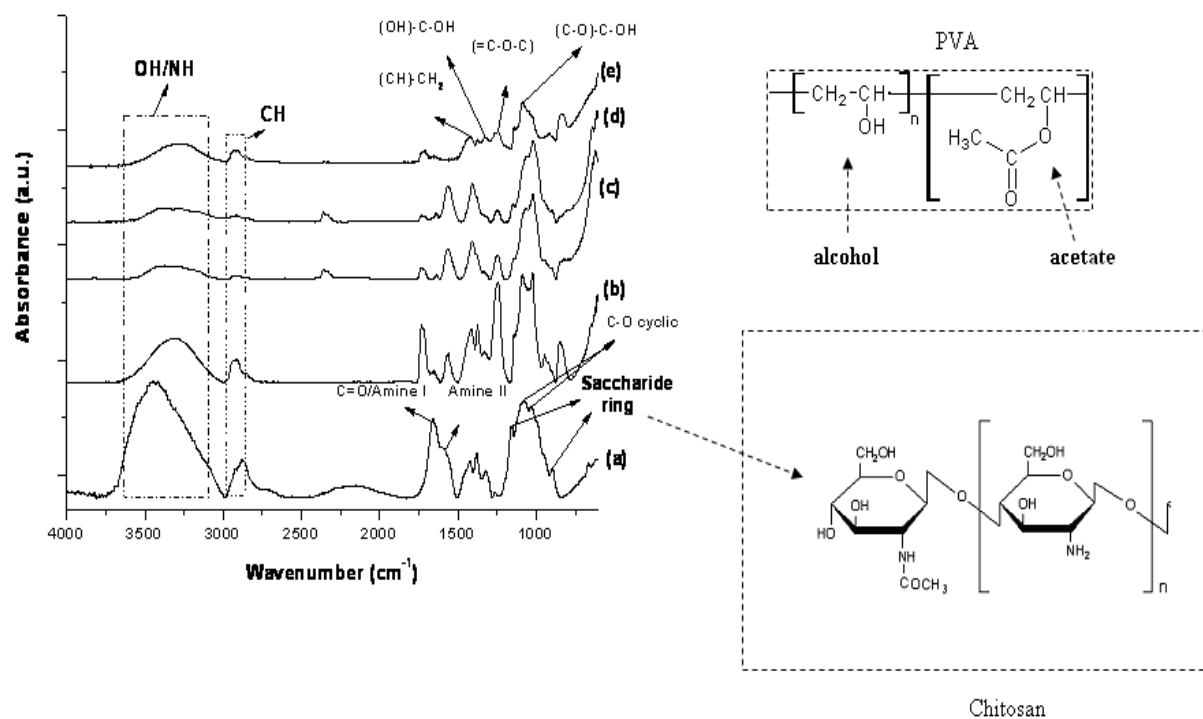


Figure 7. Blends of chitosan and PVA uncrosslinking with proportions PVA /Chi / Ge: a) 1:0:0, b) 3:1:0, c) 1:1:0, d) 0:1:0.

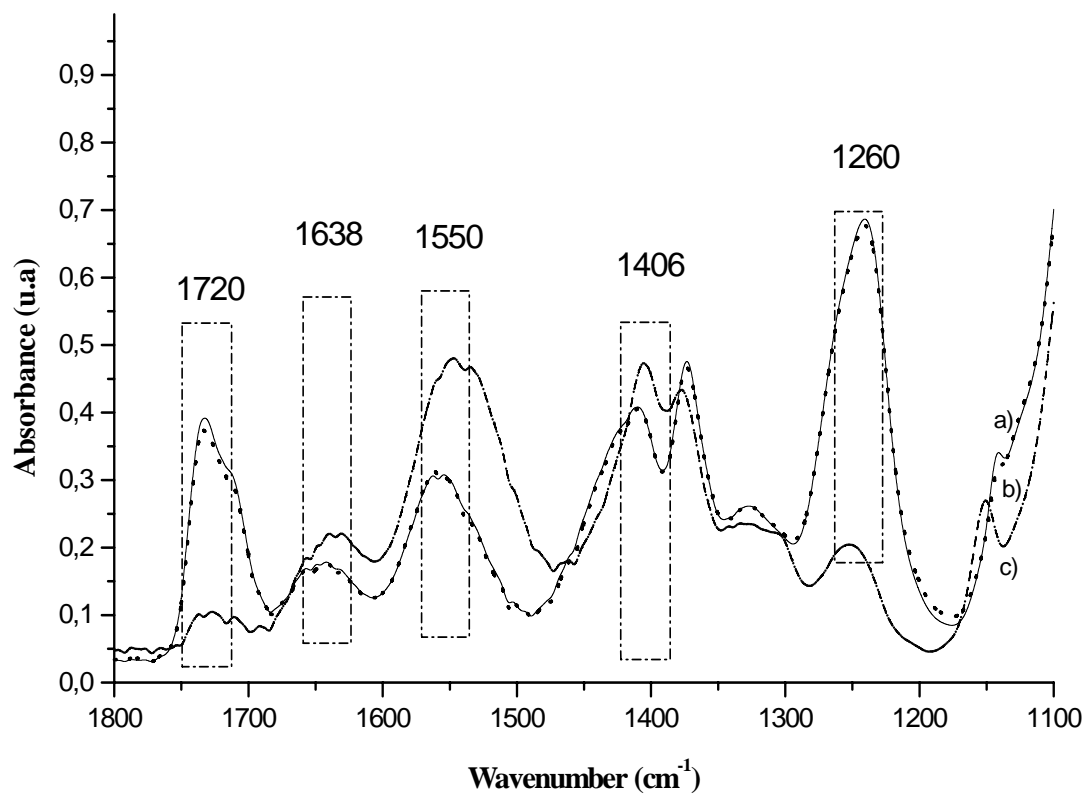


Figure 8. Blends PVA / Chi / Ge a) — 3:1:0 b).....3:1: 0.5 c) --- 3:1: 1 .

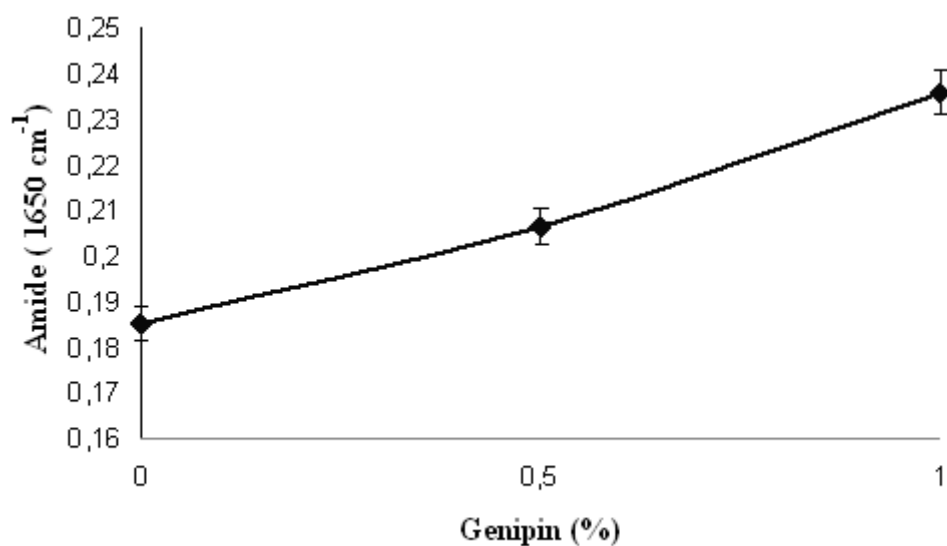


Figure 9- Intensity of the bands of amides by reaction of chitosan genipin for different concentrations of genipin in blends and normalized by the band 1450 cm⁻¹.

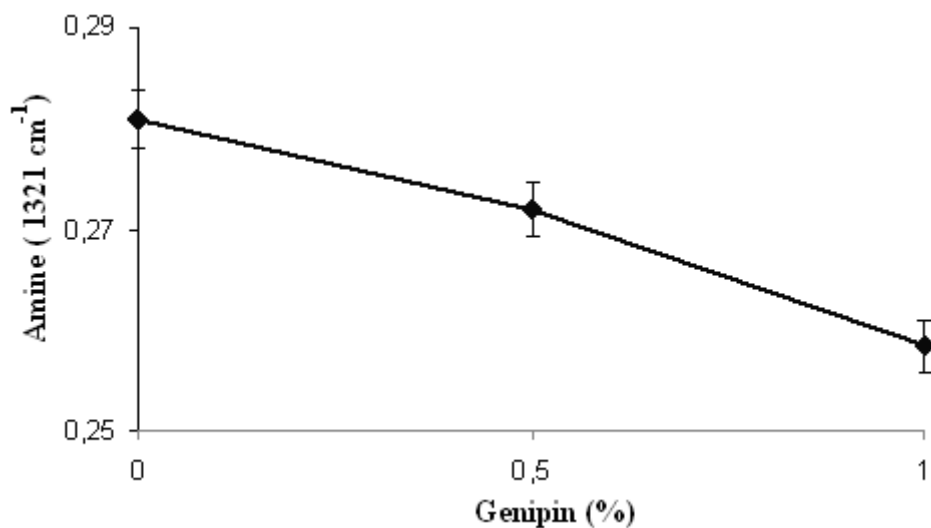


Figure10- Intensity of the bands of amines by reaction of chitosan genipin for different concentrations of genipin in blends and normalized by the band 1450 cm⁻¹.

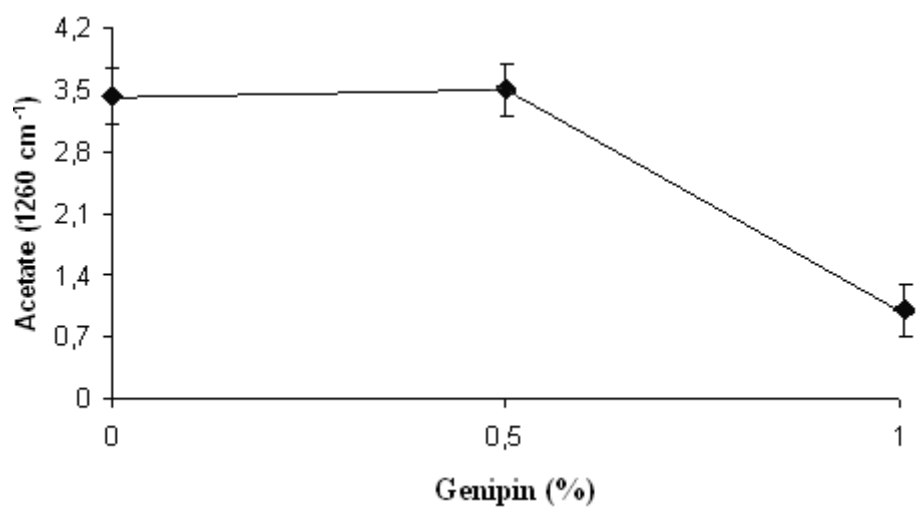


Figure 11- Intensity of the bands of acetate in blends to different concentrations of genipin in films and normalized by the band 1450 cm⁻¹ (C-H stretching) .

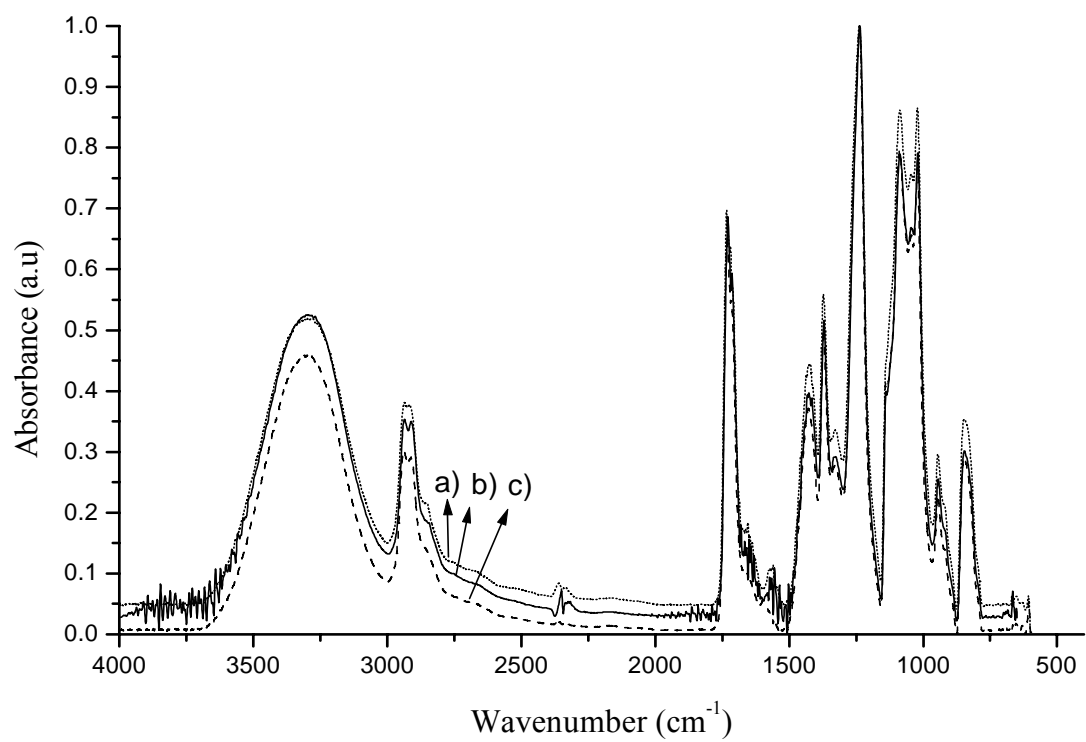


Figure 12. Film of PVA a) 1% of crosslinked b) — 0.5% of crosslinked c) --- uncrosslinked

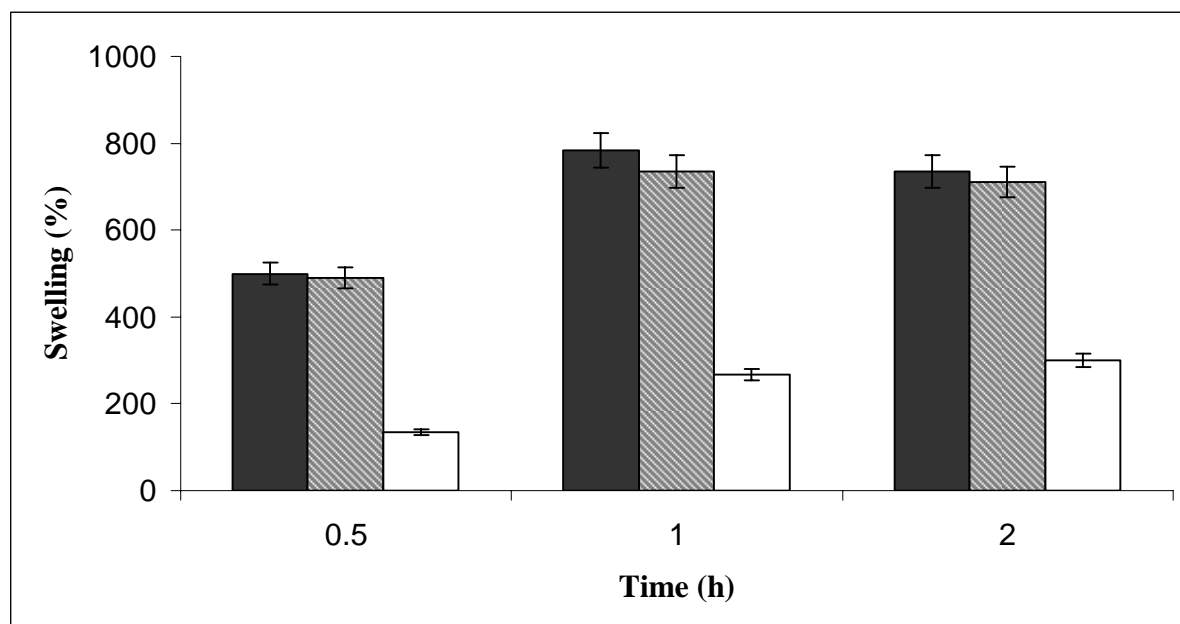


Figure13 - Degree of swelling in PBS films of chitosan: ■ uncrosslinked, ▨ 0,5% of genipin, □ 1% of genipin..

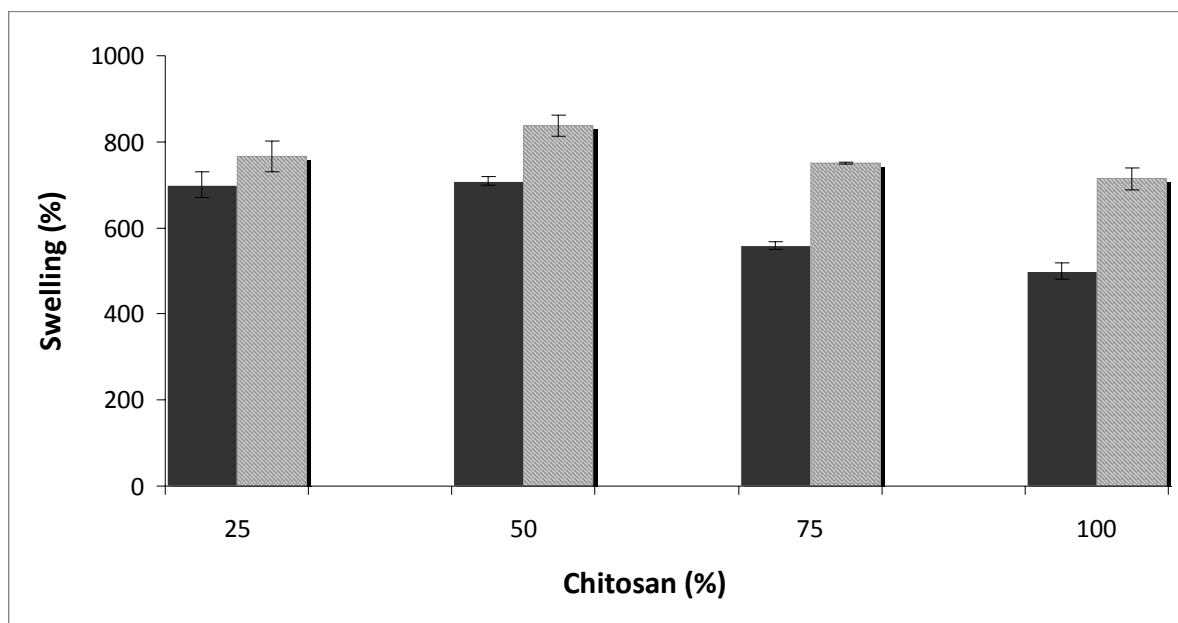




Figure14. Effect of chitosan content in the blends uncrosslinked in 0.5 hours  and 2 hours .

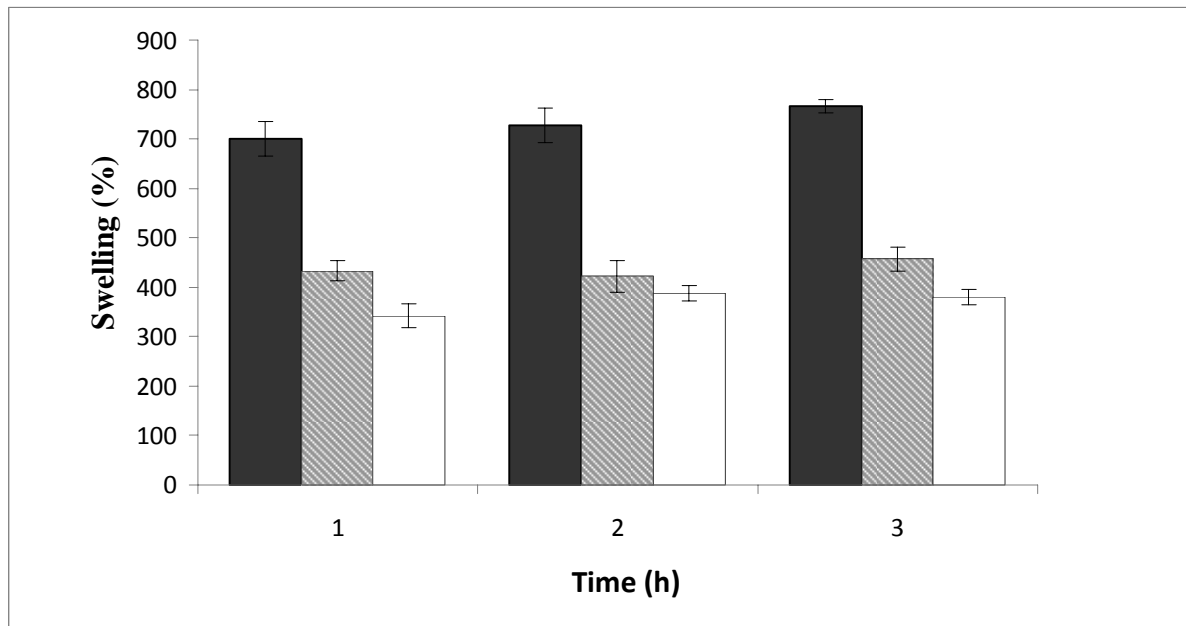





Figure 15. Effect of swelling on blends of PVA with 75% and 25% of chitosan (3:1) uncrosslinking , with 0.5% of genipin  and com 1% of genipin .

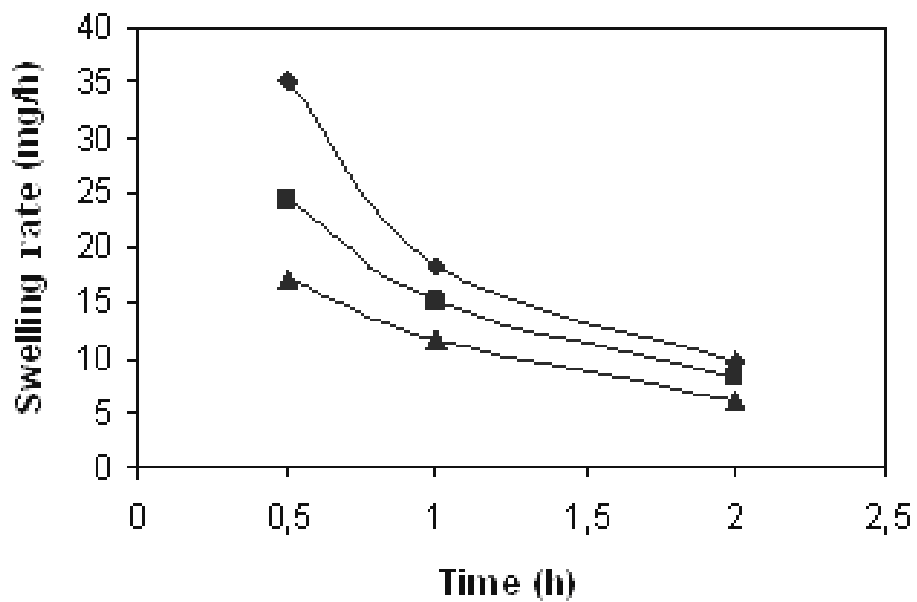





Figura16. Effect of swelling rate on blends 75% of PVA and 25% of chitosan:  uncrosslink,  0.5% of genipin,  1% of genipin.

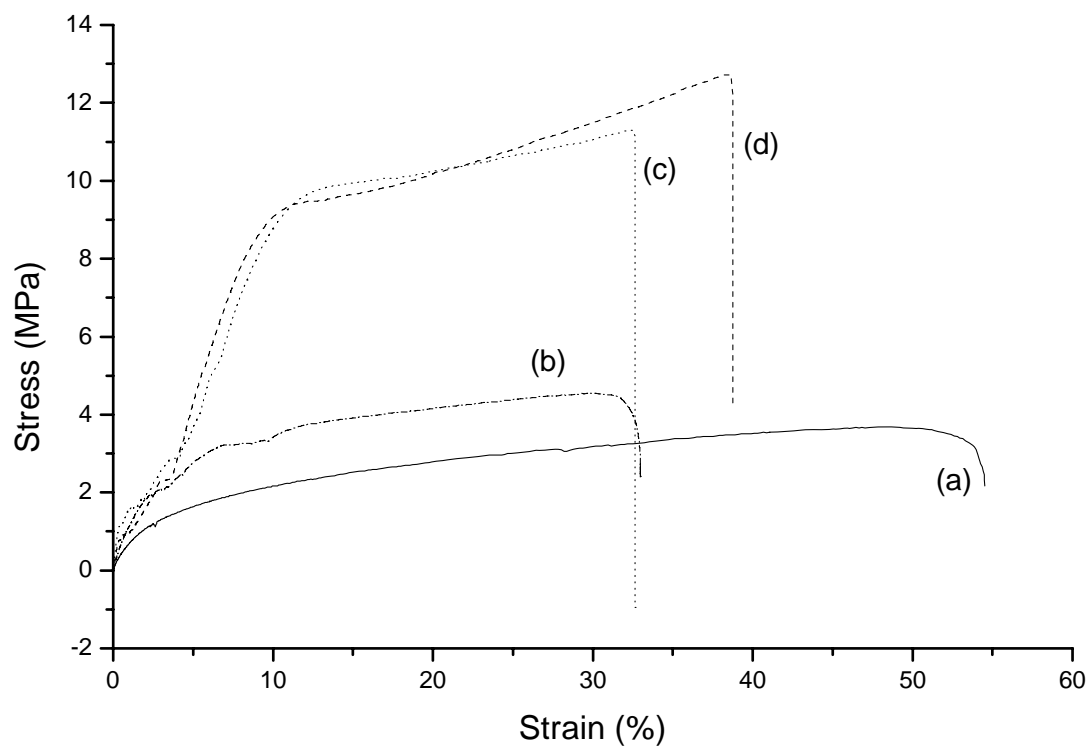


Figure 17. Stress-strain curve showing the films (a) __PVA/Chi/Ge(1:0:0), (b) -.-.-.PVA/Chi/Ge(3:1:0), (c)... PVA/Chi/Ge(1:3:0), (d)----- PVA/Chi/Ge(0:1:0).

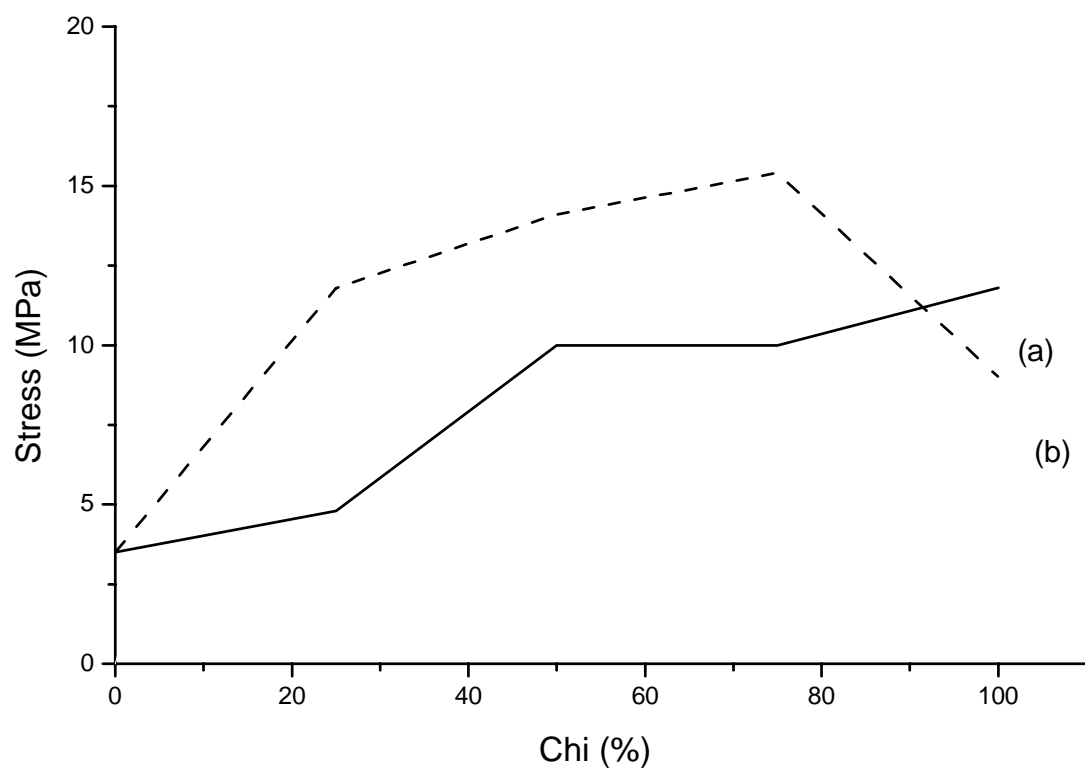


Figure 18. The influence of concentrating chitosan in the maximum stress traction film
(a) Crosslinked __PVA/Chi/Ge(1:0:1), (3:1:1), (1:3:1), (0:1:1). b) Without Crosslinked -----
PVA/Chi/Ge(1:0:0), (3:1:0), (1:3:0), (0:1:0).

Biocompatibility of Nanostructured Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blends Chemically Crosslinked with Genipin for Biomedical Applications

Viviane M. Bispo¹, Alexandra A.P. Mansur¹, Herman S. Mansur^{1*},

¹*Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Brazil*

ABSTRACT: In the present research it is reported the development and characterization of novel polymer blends based on Chitosan and poly(vinyl alcohol) (PVA). The hybrid polymeric network was synthesized and modified by chemical crosslinking using genipin for potential use in a variety of biomedical applications. The micro and nanostructures of the blended hydrogels were characterized through Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) and swelling test analysis. Moreover, cytotoxicity and cell viability were also performed by MTT assay with cell culture. The chemical crosslinking was assessed via the relative intensity of the band at 1650 cm^{-1} which is mostly associated with the reaction of genipin carboxymethyl group with the amino group of chitosan forming amides. It was found that by increasing the chitosan content relative to PVA the swelling index of the blend has decreased, reflecting the reduction on the mobility of polymer network and the hydrophilic behavior of the blend. The tested hydrogels have clearly presented adequate cell viability, non-toxicity and suitable properties which can be tailored to for potential use in bioengineering applications.

KEYWORDS: Biomaterial, nanostructured hydrogels, natural crosslinker, chitosan, poly(vinyl alcohol), genipin.

*Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: hmansur@demet.ufmg.br; Av. Antonio Carlos, 6627-Pampulha-Belo Horizonte-MG-Brazil – 31.270-901

INTRODUCTION

The innovative basis of nanotechnology, opened up by rapid advances in science and technology, creates numerous new opportunities for improving medical science and disease treatment in human health care. The subject arises from the convergence of electronics, physics, chemistry, biology and materials science to create new functional systems of nanoscale dimensions. Nanotechnology deals with science and technology associated with dimensions in the range of 0.1 to 100 nm. The rapid expansion of scientific, technological and commercial interests in sub-micron materials, assembly, and properties unique at this size scale has spawned the fields of nanoscience and nanotechnology. Applications of nanotechnology to medicine and physiology imply materials and devices designed to interact with the body at cellular and molecular scales with a high degree of specificity.¹ A complete list of the potential applications of nanotechnology is too vast and diverse to discuss in detail, but without doubt, one of the greatest values of nanotechnology will be in the development of new and effective medical treatments [1-5].

Fortunately, the path for a solution came from mimicking nature. By combining two or more materials in a pre-designed manner, a system can be fabricated with properties that are not possible to be attained when considering each of the individual components separately. Nature provides inspiration for designing materials and systems, which derive their functions from highly organized structures under dynamically changing conditions. Many of these structures are composed of an intrinsically complex matrix based on organic and inorganic components producing a natural hybrid material, usually referred as biocomposites (or biological nanocomposites). However, in a much broader context, nanocomposites are not restricted to organic-inorganic systems, but also would include organic-organic materials such as natural and synthetic molecules and polymers joined to produce an integrated network. In many applications, crosslinking of polymer matrix is necessary that can further improved the mechanical and physical properties of the hydrogels, composites and hybrids. For that reason, nanoscience and nanotechnology will certainly be of paramount importance for assisting researchers to explore the interfaces of living tissues and biomaterials [3-5].

Biomaterials for tissue engineering or drug delivery have seen numerous advances in recent years as researchers continue to develop and modify polymeric materials to meet the demanding needs of these biomedical applications. In this sense, many types of synthetic and natural polymers have been synthesized and employed as drug delivery vehicles or tissue scaffolding, roles that typically require precise and controllable polymer properties for successful function [6-9]. In the continually expanding library of natural and synthetic polymers available for biomedical applications, block copolymers of chitosan (CHI) and poly(vinyl alcohol) (PVA) have emerged as one of the more promising biodegradable materials due to their highly controllable chemical and physical properties [10-14].

Therefore, chitosan a [(1→4) 2-amino-2-deoxy-β-D-glucan] is obtained by the alkaline deacetylation of chitin. Chitosan molecule belongs to a class of biodegradable polymer and it is as copolymer of N-acetyl-D-glucosamine and D-glucosamine. The sugar backbone consists of β-1,4-linked D-glucosamine with a high degree of N-acetylation, a structure very similar to that cellulose, except that the acetylamino group replaces the hydroxyl group on the C-2 position. Thus, chitosan is poly(N-acetyl-2-amino-2-dexoxy-D-glucopyranose), where the N-acetyl-2-amino-2-dexoxy-Dglucopyranose (or Glu-NH₂) units are linked by (1→4)-β-glycosidic bonds [15]. Chitosan is degraded by enzymatic hydrolysis [16], however its tensile strength and elasticity is not suitable for some biomedical applications such as wound dressing and skin tissue replacement.

Chitosan usually need to be crosslinked in order to modulate their general properties over a desired period of time. Certain reagents have been used for crosslinking chitosan such as glutaraldehyde, tripolyphosphate, ethylene glycol, diglycidyl ether and diisocyanate. However, studies have shown that the synthetic crosslinking reagents are all more or less cytotoxic and may impair the biocompatibility of a chitosan delivery system [17]. Hence, it is desirable to provide a crosslinking reagent for use in biomedical applications that has low cytotoxicity and that forms stable and biocompatible crosslinked products. For this reason, much interest has been recently addressed toward naturally derived crosslinking agents, with a low toxicity. Genipin is a natural crosslinking reagent which has recently been used for its ability to crosslink chitosan containing primary amine groups [18]. Genipin is obtained from geniposide, an iridoid glucoside isolated from the fruits of *Genipa*

Americana and *Gardenia jasminoides Ellis*. Chitosan joined to other polymers opened a window of research for altering or tailoring the property of interest. Blend systems with PVA hydrogel has been explored for medical and pharmaceutical application due to the advantage of non toxic, non-carcinogenic and bioadhesive properties [11]. Chemical crosslinking is a highly versatile method to create and modify polymer nanostructure, where properties can be improved, such as mechanical, thermal, and chemical stabilities. In addition degradation is regulated [19]. Hence, by combining hydrophilic polymers with distinct origins, one synthetic (PVA) and the other natural (CHI) one can produce a class of hybrid organic-organic (O-O) network aiming to match properties not present in either one separately [12].

The present work characterizes the properties and cytocompatible behavior of the newly synthesized biodegradable Chitosan, PVA and blends cross-linked materials, demonstrating the property modulation that can be achieved in this system through polymer blending. This paper aims to prepare and comprehensively investigate the physical and chemical properties of polymer blends based on chitosan/PVA and chemically crosslinked with genipin. To our knowledge, this is the first report where such system was synthesized and extensively characterized by spectroscopic aspects with different polymer contents, regarding to the hybrid network formation (polymer-polymer), swelling performance and also preliminary biocompatibility behavior. Moreover, cell viability was also conducted using MTT reducing assay in order to evaluate the ability of these hybrids to support cell growth and proliferation. Thus, it brings a broad field with almost unlimited opportunities for investigating these systems as biomaterials, drug delivery systems and tissue engineering applications.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All salts and reagents used were of analytical degree and Milli-Q water was used in all solutions (18.0M Ω). Poly (vinyl alcohol-co-vinyl acetate) (PVA) supplied from Sigma-Aldrich Chemical (Milwaukee, Wisconsin, USA) (Cat.#360627) with 80% degree of

hydrolysis and molar weight $MW=9,000-10,000\text{g/mol}$ (Figure.1A). Chitosan (Aldrich Chemical) powder, medium molecular weight, $M_w = 161,000\text{ g/mol}$, degree of deacetylation, $DD = 75.6\%$, and viscosity $1,406\text{ cPoise}$ (1% in 1% acetic acid) were used without further purification (Figure.1A). Genipin (or IUPAC name: Methyl (1R,2R,6S)-2-hydroxy-9-(hydroxymethyl)-3-oxabicyclo[4.3.0]nona-4,8-diene-5-carboxylate, Ge, reagent grade, purity $> 98\%$ as HPLC assay, Challenge Bioproducts, Taiwan) was used as natural chemical crosslinking reagent.

2.2. Methods

2.2.1. Chitosan and PVA solution preparation

Briefly, PVA hydrogels were prepared by fully dissolving 5.0g of polymer powder without further purification in 100mL of Milli-Q water, under magnetic stirring, at temperature of $75^\circ\text{C}\pm 2^\circ\text{C}$. PVA 5% (wt%) solution was let to cool down to room temperature and the pH was corrected to (2.00 ± 0.05) with 1.0 M HCl (Sigma).

Chitosan solution (CHI) was produced in a similar procedure by fully dissolving 2.5g in 250.0mL (1.0 wt%) of Milli-Q water with 2% of CH_3COOH (Sigma), under magnetic stirring for 48h.

2.2.2. Chitosan, PVA and nanostructured hydrogel films preparation

Different quantities of PVA were added into the 1.0 % chitosan solution to obtain chitosan/PVA molar ratios of (0:1), (1:3), (1:1), (3:1) and (1:0) and pH was corrected to (4.5 ± 0.5) with 1.0M NaOH solution. The mixture was kept under stirring for 5min until the PVA and chitosan completely formed a clear solution. Then, the crosslinker reagent (genipin) was slowly added under constant stirring. The final concentration of genipin in the gel solution precursors was 0.5% and 1.0% (wt%). Further in the sequence, the solution was poured into plastic moulds (polyethylene, round-plate shape, diameter=85 mm, height=10 mm) and let drying for 72-120h at room temperature ($\sim 25^\circ\text{C}$) in the desiccator (silica gel replaced every 24 h) followed by additional 24h in controlled oven at 40°C . The dried gel was stored in a desiccator before all following characterization procedures. Chitosan/PVA samples chemically crosslinked were identified by (X:Y:Z) that is, X as chitosan content, Y as PVA content and Z as genipin (wt%). For instance, sample identified

as Chi/PVA/Ge (1:3:1) represents the following proportion of reagents: 25% chitosan, 75% PVA and crosslinked with 1.0% Ge (wt%).

2.3. Characterization

2.3.1 Qualitative assessment

Qualitative visual observations were made taking into account the solubility, miscibility and phase segregation of the blends. The average film thickness produced was assessed with a Mitotoyo ($\pm 10\mu\text{m}$) micrometer.

2.3.2. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR was used to characterize the presence of specific chemical groups in the hydrogels. CHI, PVA films and hydrogels blends crosslinked with Ge (CHI/PVA/Ge) were obtained as thick films ($75 \pm 25\mu\text{m}$) and analyzed by FTIR using ATR (attenuated total reflection) Modes. FTIR spectra were obtained in the wavenumber range from 4000 to 650cm^{-1} during 64 scans, with 2cm^{-1} resolution (Paragon 1000, Perkin-Elmer, USA). The FTIR spectra were normalized and major vibration bands were identified associated with the main chemical groups.

2.3.3. Swelling assay

Fluid absorption studies are of great importance for a biodegradable material. For fluid-uptake measurements, all the specimens of the chitosan/PVA hydrogels with molar ratios of 0:1, 1:3, 1:1, 3:1 and 1:0 were prepared as described in the previous section, were weighed (W_0) before being immersed in Phosphate Buffered Saline (PBS) at 37°C . After immersion for different time periods, the samples were carefully removed from the medium and, after wiping off water excess on the surface with filter paper, they were weighed for the determination of the wet weight (W_f) as a function of the immersion time [20]. Swelling index (S) is given by using the equation 1:

$$S = \frac{W_f - W_0}{W_0} \times 100 \quad \text{eq.1}$$

Each PBS swelling experiment was repeated three times and the average value was taken to validate the results.

2.3.4. Cytocompatibility and cell viability on nanostructured polymeric blends

2.3.4.1. Biocompatibility of chitosan/PVA blends in VERO cell culture

All the samples submitted to the cytotoxicity experiment have been previously sterilized by exposure to saturated steam of ethylene oxide. As previously reported by our group [12,13], African green monkey kidney VERO cells, a fibroblastic cell line, were used for the experiments of cell biocompatibility MTT (3-[4,5-dimethyltriazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium) and adhesion assays. It is worth to point out that a fully detailed description of the MTT is beyond the major goal of this research as it has been extensively reported in the literature. Briefly, 5×10^4 cells were seeded on matrices samples within a 96-well plate. The cells were incubated at 37°C in humidified atmosphere containing 5% CO₂. After 24 hours incubation, supernatant of each well was replaced with MTT diluted in serum free medium and the plates incubated at 37°C for 4h. After that, SDS 10%/HCl 0.04 N solution was added to supernatant and plates were re-incubated for more 24h and after exhaustive pipetation, 200µL was transferred to a clean 96-well plate, where absorbance was measured at $\lambda=595\text{nm}$ using ASYS EXPERT PLUS spectrometric microplate reader. The absorbance was directly proportional to cell viability. For analysis, all data were expressed as average \pm standard deviation for number of 4 replicates ($n=4$). Statistical significance was determined for all groups and P values were generated by ANOVA using the Dunnett Test for multiple comparisons to one control ($P < 0.05$, $n \geq 4$ assays). This method relies on assumptions of normality and homogeneity of the variances of the distributions.

2.3.4.2. Bioactivity evaluation - Cell Adhesion-Spreading assay

Cell viability was evaluated by spreading and attachment assays in order to examine their morphology, adhesion and spreading behavior. VERO cells were plated at 6×10^4 density on the hosting scaffold; Cell spreading was evaluated by scanning electron microscopy (SEM, JEOL/Noran, JSM 6360LV) of the specimens after culturing for 2 hours. Before microscopy analysis, specimens were fixed with 2% glutaraldehyde for 16 hours and

dehydrated by passing through a series of alcohol solutions (ethanol-water). Then, they were dried in nitrogen flowing reactor for 4 hours and out-gassed in vacuum desiccator for 12 hours. Before examination the samples were sputtered with a thin layer of gold using low deposition rate, and placed at the maximum distance from the target to prevent damaging them. The images were obtained using an accelerating voltage of 10-15kV.

3. Results and discussion

3.1 Qualitative assessment

In this study, genipin, a natural and non-toxic cross-linking reagent, was used to cross-link chitosan. The films were ($75 \pm 25\mu\text{m}$) thick and no heterogeneities were observed regarding to solubility, miscibility and phase segregation when the Chi/PVA blends with different proportions were visually inspected. In general, very uniform films were obtained. The pure PVA films were optically transparent to visible light. The pure chitosan film were yellowish whereas the genipin crosslinked chitosan films were bluish. Additionally, the extent of the color change in the reaction was found to depend on the genipin concentrations. Therefore, the reaction between genipin and chitosan/PVA mixtures was qualitatively monitored by detecting the changes in the optical appearance of the mixtures. Hence, the color was deepened with the increase of genipin concentration (cross-linker). Bluish color attributed to unsaturated double bonds in the new chemically crosslinked polymeric network and genipin molecules. Figure 1 presents photographs of the wide number of polymeric networks of samples produced, that is, pure PVA (a), pure chitosan (b) and genipin-crosslinked blends (c,d,e,f) films.

INSERT FIGURE 1

3.2. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)

FTIR spectroscopy was used to assess the polymer chemical groups (chitosan and PVA) and investigating the formation of crosslinked networks from the blends with genipin. Figure 2 shows the FTIR spectra relative to the chitosan, PVA and [Chi/PVA] blends. Fig.2a spectrum of pure chitosan shows peaks around 893cm^{-1} and 1156cm^{-1} corresponding to saccharide structure [21-22]. In spite of several peaks clustering in the

amide II peak range from 1510cm^{-1} to 1570cm^{-1} , there still were strong absorption peaks at 1658cm^{-1} and 1322cm^{-1} , which are characteristic of chitosan and have been reported as amide I and III peaks, respectively. The sharp peaks at 1383cm^{-1} and 1424cm^{-1} were assigned to the CH_3 symmetrical deformation mode. The broad peak at 1030 and 1080cm^{-1} indicates the C-O stretching vibration in chitosan. Another broad peak at 3447cm^{-1} is caused by amine N-H symmetrical vibration, which is used with 1650cm^{-1} for quantitative analysis of deacetylation of chitosan. Peaks at 2800cm^{-1} and 2900cm^{-1} are the typical C-H stretch vibrations [10,21-25]. The IR spectra of the CHI/PVA blended films presented in Fig.2A-b, Fig.2c and Fig.2d are different from that of the chitosan because of the ionization of the primary amino groups. There are two distinct peaks at 1408cm^{-1} and 1548 – 1560cm^{-1} . Formation of the 1548 – 1560cm^{-1} peak is the symmetric deformation of $-\text{NH}_3^+$ resulting from ionization of primary amino groups in the acidic medium whereas the peak at 1408cm^{-1} indicates the presence of carboxylic acid in the polymers. The peaks at 1700 – 1725cm^{-1} are characteristic of the carboxylic acid dimer. In the present study, the presence of carboxylic dimer was due to the acetic acid used for dissolving the chitosan [22]. The peak at 1210 – 1300cm^{-1} is due to the C-H vibration. Hence, it can be undoubtedly observed a significant reduction of intensities from main absorption bands related to chitosan, for instance amine region (1500 – 1650cm^{-1}), as its content was decreased from 100% (pure chitosan, Fig.2a), 75% (Fig.2b), 50% (Fig.2c), 25% (Fig.2d) and 0% (pure PVA, Fig.2e). The FTIR spectrum of pure PVA is shown in Figure.2e, where all major peaks related to hydroxyl and acetate groups were observed. More specifically, the broad band observed between 3550 and 3200cm^{-1} is associated with the stretching O–H from the intermolecular and intramolecular hydrogen bonds. The vibrational band observed between 2840 and 3000cm^{-1} refers to the stretching C–H from alkyl groups and the peaks between 1750 – 1735cm^{-1} are due to the stretching C=O and C-O from acetate group remaining from PVA (saponification reaction of polyvinyl acetate) [12,16,20].

Figure.3 shows the FTIR spectra of pure chitosan and with two concentrations of Ge natural chemical crosslinker 0.5%, (curve-b) and 1.0 % (curve-c). It can be observed that the absorption at 1650cm^{-1} band associated with the amide group increases from curve (a) to curve (c) while increasing the content of crosslinker. It is known that under acidic

condition (pH~4-5), a nucleophilic attack of genipin C-3 carbon by chitosan is inhibited due to protonation of its amine groups. In contrast, acid catalysis improved the nucleophilic substitution of the ester group on genipin to form a secondary amide with chitosan. The genipin-crosslinked chitosan networks prepared at this condition consist of short chains of cross-linking bridges [18]. Thus, it is expected to have a significant reduction of network mobility caused by covalent bonds among chitosan polymer chains as the genipin crosslinker concentration was raised. Additionally, from FTIR spectra in Figure.3, it was verified the contribution of C-O stretching at 1064 cm^{-1} and the band at 1400 cm^{-1} results from the ring stretching of the molecule of genipin (C=C). The vibration in the range from 1540 cm^{-1} to 1560 cm^{-1} is due to protonated amine groups and carboxylic acid group of the molecule of acetic acid. Also, the band associated with the heterocyclic amine ring from genipin appeared at 1380 cm^{-1} and it has increased at higher concentrations of genipin [7,26-31]. The characteristic stretching band of C-O-C related to the saccharides unit present in chitosan was detected at 1150 cm^{-1} .

Figure 4 shows the analysis resulting from FTIR spectra specifically related to the amide band centered at 1650 cm^{-1} . The relative intensity of the amide vibration band was normalized by the band at $2800\text{-}2900\text{ cm}^{-1}$ associated with the C-H group practically unchanged by the reactions [28]. It was verified that the amide band was gradually increased as the genipin concentration was raised from 0% (not crosslinked chitosan), to 0.5% and 1.0% genipin crosslinked network. Analogously, Figure 5 shows the reduction of amine band in the region of $1540\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ from chitosan samples when the genipin content was increased, mostly related to the covalent bond formation consuming amine groups. By considering these results and the study on reaction mechanisms in acid medium by Butler and collaborators (2003), the modification of chitosan by chemical crosslinking with genipin can be represented as shown in Figure 6 [32]. The amine group in the polymer reacts with the ester group in the genipin forming amides [32].

INSERT FIGURE 2, 3, 4, 5 6

3.3. Swelling test

The degree of swelling, also known as the degree of expansion, is one of the most important properties of a hydrogel. This property was analyzed in this work by using fully immersed samples at pH 7.4 in phosphate buffer solution (PBS). Swelling experiments were conducted with chi/PVA blends, with different polymer proportions and crosslinked by genipin. A typical swelling behavior is shown in Figure 7 performed for pure chitosan films before and after chemical crosslinking with 0.5% and 1% of genipin content. The results showed that crosslinking has occurred as expected. That is, the swelling degree decreased as the amount of cross-linker was increased. That fact is attributed to a more rigid network formed by the inter-intra polymer chain reactions that have occurred, reducing the flexibility and number of hydrophilic groups of hydrogel which is unfavorable to the swelling rate. So, these results are corresponding to the hydrogel mechanism. Such behavior is more pronounced in chitosan-derived hydrogels related to their ionic character sometimes referred as polyelectrolyte in acid/alkaline medium.

INSERT FIGURE 7

The effect of chitosan to PVA ratio was also analyzed. A very similar trend was observed on Chi/PVA blends chemically crosslinked by genipin. Before genipin reaction, the PVA chains are physically entangled with the chitosan chains, forming a hydrogel network. In the sequence, when the Ge content was increased the chemical crosslinking has occurred, forming covalent bonds among chains, fixing and reducing polymer mobility, which resulted in the lower swelling rate, in case, less than half of that blend without chemical crosslinking. These results are supported by understanding the crosslinking reaction which has occurred in the blended hydrogels, where the amine groups of chitosan are more reactive to genipin than hydroxyls of PVA. In summary, despite of the swelling being a macroscopic effect, it is caused by the overall contribution from the micro and nanostructures of the chemically modified network of the polymeric hybrid system. The present research is different from other reported chitosan studies, nevertheless similar trends regarding to the swelling behavior of PVA and chitosan supported these findings, where PVA has a swelling degree above 400% and chitosan of about 200%, depending of course of the solution medium, pH, temperature and so forth [22,33-36].

INSERT FIGURE 8

3.4. Chitosan/PVA cytocompatibility assays with VERO cell cultures

3.4.1. - VERO cell culture

Cell viability was measured using MTT assay and represents the active mitochondrial enzymes present in a cell capable of reducing MTT. In this study the viability assay was measured at 24h interval after cell seeding. The ability of the CHI/PVA matrices to support viability and proliferation shown that these samples evaluated exhibited comparable biocompatibility, not crosslinked by genipin and crosslinked, Fig.9A and Fig.9B respectively. Although it is possible to observe in Fig.9 that the cell viability numbers varied in a relative broad range (comparing to VERO cell control as 100%), this difference was not statistically significant (ANOVA, $p < 0.05$; $n \geq 4$) and can be inferred that all the matrices produced shows to be promissory to be tested *in vivo* assays. Cytotoxicity tests using cell cultures have been accepted as the first step in identifying active compounds and for biosafety testing.

INSERT FIGURE 9 (A) (B)

3.4.2. Chitosan/PVA biocompatibility via spreading assay

From MTT assays, the ability of the Chi/PVA matrices (crosslinked or not) to support cell viability was verified, where the whole set of hydrogel samples evaluated exhibited comparable biocompatibility. Beyond that, cell proliferation and growth was assessed via adhesion and spreading test, where general morphology was observed by typical SEM images (Figure 10). It can be noted that the VERO cells seeded on matrix with good adhesion and spreading morphology regular for this fibroblastic lineage. Since cellular attachment, adhesion, and spreading belong to the first phase of cell/material interactions, the quality of this phase will influence proliferation and differentiation of cells on biomaterials surfaces. Based on the SEM results obtained in our work, one may attribute the VERO cell spreading and adhesion verified on the chitosan/PVA blends to be a reliable proof of biocompatibility and non-cytotoxicity of samples. According to the literature [13,16,37-41], cell spreading are usually divided into three main interaction levels: (a) not

spread: cells were still spherical in appearance, protrusions or lamellipodia were not yet produced; (b) partially spread: at this stage, cells began to spread laterally at one or more sides, but the extensions of plasma membrane were not completely confluent; and (c) fully spread. The last model (c) would represent the best result for material cell hosting. Additionally, the cell line (VERO) used as a model in this research plays a role in producing many of the components essential to connective tissue, for example extracellular components such as glycosaminoglycans and, in fibrous tissue, collagen. Promoting the attachment of fibroblast cells would aid in integrating soft connective tissue to the implant, improving vascularity at the implant surface and decreasing the chance of fibrous encapsulation. In summary, cell adhesion and spreading are of vital importance in living biology processes and are involved in various natural phenomena such as embryogenesis, maintenance of tissue structure, wound healing, immune response, metastasis, and tissue integration of biomaterials [12,13,16,37-42].

INSERT FIGURE 10

4. Conclusion

In this work, novel chitosan/PVA blends were synthesized and chemically modified with natural crosslinker. The results have shown that by altering the proportion of chitosan to PVA, associated with different concentration of crosslinker, the overall properties from hydrogels can be tailored. The systems investigated have indicated a significant reduction on the swelling behavior as the chitosan content was increased and also as the amount of crosslinking reagent was raised. Moreover, all systems evaluated have proven to be non-toxic and biocompatible. In summary, the micro-nanostructures of the hybrid polymeric network play crucial role on defining the system behavior, even at macroscopic order. These blends based on chitosan/PVA offer a broad range of choices to be potentially used in biomedical applications such as biomaterial, drug delivery vehicles and tissue engineering.

Acknowledgement

The authors acknowledge FAPEMIG/CNPq/CAPES for financial support on this work. They are grateful to Prof. Wander L. Vasconcelos (Laboratory of Ceramic Materials) for the FTIR spectroscopy and to Prof. Dagoberto B. Santos and Patrícia M. T. de Azevedo for SEM analysis. Authors also thank Prof Edel F. Barbosa-Stancioli (Department of Microbiology-UFMG) for conducting MTT laboratory protocols.

References

- [1] Gao J., Xu, B. Applications of nanomaterials inside cells, *Nano Today* (2009) 4, 37-51.
- [2] Park, J.H., Lee, S., Kim, J.-H., Parkb, K., Kimb, K., Kwon, I.C. Polymeric nanomedicine for cancer therapy, *Prog. Polym. Sci.* (2008) 33, 113–137.
- [3] Smith, I.O., Liu, X.H., Smithand, L.A., Ma, P.X. Nanostructured polymer scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* (2009), 1.
- [4] Sahoo, S.K., Parveen, S., Panda, J.J. The present and future of nanotechnology in human health care, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* (2007) 3,20–31.
- [5] Mansur, H. Quantum dots and Nanocomposites, *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* (2009), accepted.
- [6] Davis, K.A., Anseth, K.S. Controlled Release from Crosslinked Degradable Networks, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* (2002) 19(4-5), 385-423.
- [7] Wang T., Turhan M., Gunasekaran S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-poly(vinyl alcohol) hydrogel, *Polymer International* (2004) 53, 911-918.
- [8] Hollister, S.J. Porous Scaffold Design for Tissue Engineering, *Nature Materials* (2005) 4, 518-524.
- [9] 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* (2005) 26, 3187-3196.

- [10] Costa Jr., E.S.C., Mansur, H.S. (2007). Preparation and Characterization of Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Blend Chemically Crosslinked by Glutaraldehyde for Tissue Engineering Application, In: Anais of 9^o Congresso Brasileiro de Polímeros, 86, Campina Grande, PB Brazil.
- [11] Mansur, H.S., Oréfice, R.L., Mansur, A.P. Characterization of Poly(Vinyl Alcohol)/Poly(Ethylene Glycol) Hydrogels and PVA-Derived Hybrids by Small-Angle X-ray Scattering and FTIR Spectroscopy, *Polymer* (2004) 45, 7193-7202.
- [12] Mansur, H.S., Costa, H.S. Nanostructured Poly(Vinyl Alcohol)Bioactive Glass and Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan/Bioactive Glass Hybrid Scaffold for Biomedical Application, *Chemical Engineering Journal* (2008) 137, 72-83.
- [13] Muzzarelli, C., Muzzarelli, R.A.A. Natural and Artificial Chitosan-Inorganic Composites, *Journal Inorganic Biochemistry* (2002) 2002, 89-94.
- [14] Peppas, N.A., Mongia, N.K. Ultrapure Poly(Vinyl Alcohol) Hydrogels with Mucoadhesive Drug Delivery Characteristics, *European Journal Pharmaceutics and Biopharmaceutics* (1997) 43, 51-58.
- [15] Hejazi, R., Amiji, M. Chitosan-Based Gastrointestinal Delivery Systems, *Journal Controlled Release* (2003) 89, 151-165
- [16] Suh, J.K.F., Matthew, H.W.T. Application of Chitosan-based Polysaccharide Biomaterials in Cartilage Tissue Engineering: A Review, *Biomaterials* (2000) 21, 2589-2598.
- [17] Riccardo A.A. Muzzarelli. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids, *Carbohydrate Polymers* (2009) 77,1-9.

- [18] Mi, F.-L., Shyu, S.-S., Peng, C.-K. Characterization of Ring-Opening Polymerization of Genipin and pH-Dependent Cross-Linking Reactions Between Chitosan and Genipin, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* (2005) 43,1985–2000.
- [19] Mansur, H.S., Mansur, A.A.P. Synchrotron SAX, XRD and FTIR Characterization of Nanostructured PVA/TEOS Hybrid Cross-Linked with Glutaraldehyde, *Solid State Phenomena* (2007) 121-123, 855-858.
- [20] Mansur, H.S., Sadahira, C.M. Souza, A.N., Mansur, A.A.P. FTIR Spectroscopy Characterization of Poly (Vinyl Alcohol Hydrogel with Different Hydrolysis degree and Chemically Crosslinked with Glutaraldehyde, *Materials Science and Engineering C*. (2008) 28, 539-548.
- [21] Shigemasa, Y., Matsuura, H., Sashiwa, H., Saimoto, H. Evaluation of Different Absorbance Ratios from Infrared Spectroscopy for Analyzing the Degree of Deacetylation in Chitin, *International Journal of Biological Macromolecules* (1996) 18, 237-242.
- [22] Wang, D., Williams, C.G., Yang, F., Elisseeff, J.H. Enhancing the Tissue-Biomaterial Interface: Tissue-Initiated Integration of Biomaterials, *Advanced Functional Materials* (2004) 14, 1152-1159.
- [23] Costa Jr., E.S.C., 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* (2008) “in press”.
- [24] 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* (2001) 42, 3569-3580.

- [25] Rao, K.S.V. K., Naidu, B.V.K., Subha, M.C.S., Sairam, M., Aminabhavi, T.M. Novel Chitosan-Based pH-Sensitive Interpenetrating Network Microgels for the Controlled Release of Cefadroxil, *Carbohydrate Polymers* (2006) 66, 333-344.
- [26] Liu B. S., Yao C. H., Hsu S. H. A novel use of genipin-fixed gelatin as extracellular matrix for peripheral nerve regeneration, *Journal of biomaterials Applications* (2004) 19, 21-34.
- [27] Lima S.I. Quitosanas e Quitosanas Química e Morfologicamente Modificadas com Anidrido Succínico-Propriedades, Adsorção e Termoquímica. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2005).
- [28] Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. Princípios de Análise Instrumental. Editora Bookman, Porto Alegre (2002).
- [29] Elizondo N. J., Sobral P. J. A., Menegalli F. C. Development of films based on blends of *Amaranthus cruentus* flour and poly(vinyl alcohol), *Carbohydrate Polymers* (2009) 75, 592-598.
- [30] Mi F.L., Sung H.W., Shyu S.S. Synthesis and characterization of a novel chitosan-based network prepared using naturally occurring crosslinker, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry* (2000) 38, 2804–2814.
- [31] Costa E. S., Barbosa S. E , Vasconcelos W. , Mansur H. , Mansur A. A. P.: Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications, *Carbohydrate Polymers* (2009) 76, 472-481.
- [32] Butler, D.L., Goldstein, S.A., Guilak, F. Functional Tissue Engineering: The Role of Biomechanics, *Journal of Biomechanical Engineering* (2000) 122, 570-575.

- [33] Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R. Structure and Interactions in covalently and ionically crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications, *European Journal of Pharmaceutics Biopharmaceutics* (2004) 57, 19-34.
- [34] 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* (2007) 48, 6554-6564.
- [35] Grupta, K.C., Jabrail, F.H. Glutaraldehyde Cross-Linked Chitosan Microspheres for Controlled Release of Centchroman, *Carbohydrate Research* (2007) 342, 2244-2252.
- [36] Zhang, Y., Huang, X., Duan, B., Wu, L., Li, S., Yuan, X. Preparation of Electrospun Chitosan/Poly(Vinyl Alcohol) Membranes, *Colloid & Polymer Science* (2007) 285, 855-863.
- [37] Dunn, G.A., Zicha, D. Dynamics of Fibroblast Spreading, *J. Cell. Sci.* (1995) 108, 1239-1249.
- [38] Yeo, Y.-J., Jeon, D.-W., Kim, C.-S., Choi, S.-H., Cho, K.-S., Lee, Y.-K., Kim, C.-K. Effects of chitosan nonwoven membrane on periodontal healing of surgically created one-wall intrabony defects in beagle dogs, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* (2004) 72B(1), 86 – 93.
- [39] Bose S., Darsell J., Hosick H.L., Yang L., Sarkar D.K., Bandyopadhyay A. Processing and characterization of porous alumina scaffolds, *J Mater Sci Mater Med* (2002) 13, 23.
- [40] Hannah S., Samuel S.I. Cellular Response to Zinc-containing Organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization. *Biomaterials* (2005) 26, 5492.

[41] 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.* (2008) 43, 510–524.

[42] Costa, H.S., Rocha, M.F., Andrade, G.I., Barbosa-Stancioli, E.F., Pereira, M.M., Oréface, R.L., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S. (2008). Sol-gel Derived Composite from Bioactive Glass-Polyvinyl Alcohol, *J. Mater. Sci.*, **43**: 494-502.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1 – Images of samples from polymers and blends films. (a) PVA (1:0:0); (b) Chitosan (0:1:0); (c) PVA/Chi/Ge (0:1:0.5); (d) PVA/Chi/Ge (0:1:1); (e) PVA/Chi/Ge (1:1:0.5); and (f) PVA/Chi/Ge (1:1:1) in white background (without magnification).

Figure 2 – FTIR spectra of polymers and blends not crosslinked. (a) chitosan (0:1:0); (b) PVA/Chi/Ge (1:3:0); (c) PVA/Chi/Ge (1:1:0); (d) PVA/Chi/Ge (3:1:0) and (e) PVA (1:0:0).

Figure 3 - FTIR spectra of Chitosan-based network. (a) Pure chitosan (0:1:0); (b) Chitosan crosslinked with 0.5% of genipin (0:1:0.5) and (c) Chitosan crosslinked with of 1% of genipin (0:1:1).

Figure 4- Relative intensity of the amide band at 1650 cm^{-1} formed by the reaction of chitosan with different concentrations of genipin.

Figure 5 – Relative Intensity of the amine band at $1550\text{-}1560\text{ cm}^{-1}$ reduced by the reaction of chitosan with different concentrations of genipin.

Figure 6 – Schematic representation of genipin reaction with chitosan yielding crosslinking reaction by formation of monosubstituted amide.

Figure 7 - Degree of swelling in PBS films of chitosan not crosslinked (0:1:0), crosslinked with 0.5% (0:1:0.5) and 1.0% (0:1:1) of genipin for 2 hours.

Figure 8 - Effect of swelling on blends of PVA with 75% and 25% of chitosan not crosslinking (3:1:0), crosslinked with 0.5% (3:1:0.5) and 1.0% (3:1:1) of genipin.

Figure 9 – Viability of VERO cell on different matrices. (a) Not crosslinked polymers and blends and (b) polymers and blends crosslinked with 1.0% of genipin.

Figure 10 – Viability and spreading of VERO cell on different matrices. Biocompatibility assay for cell viability was carried out for VERO cells seeded on PVA/Chi/Ge matrices (a) Chitosan-1% Genipin (0:1:1); (b) PVA/Chi/Ge (1:3:1).

Figure 1 - Bispo et al.

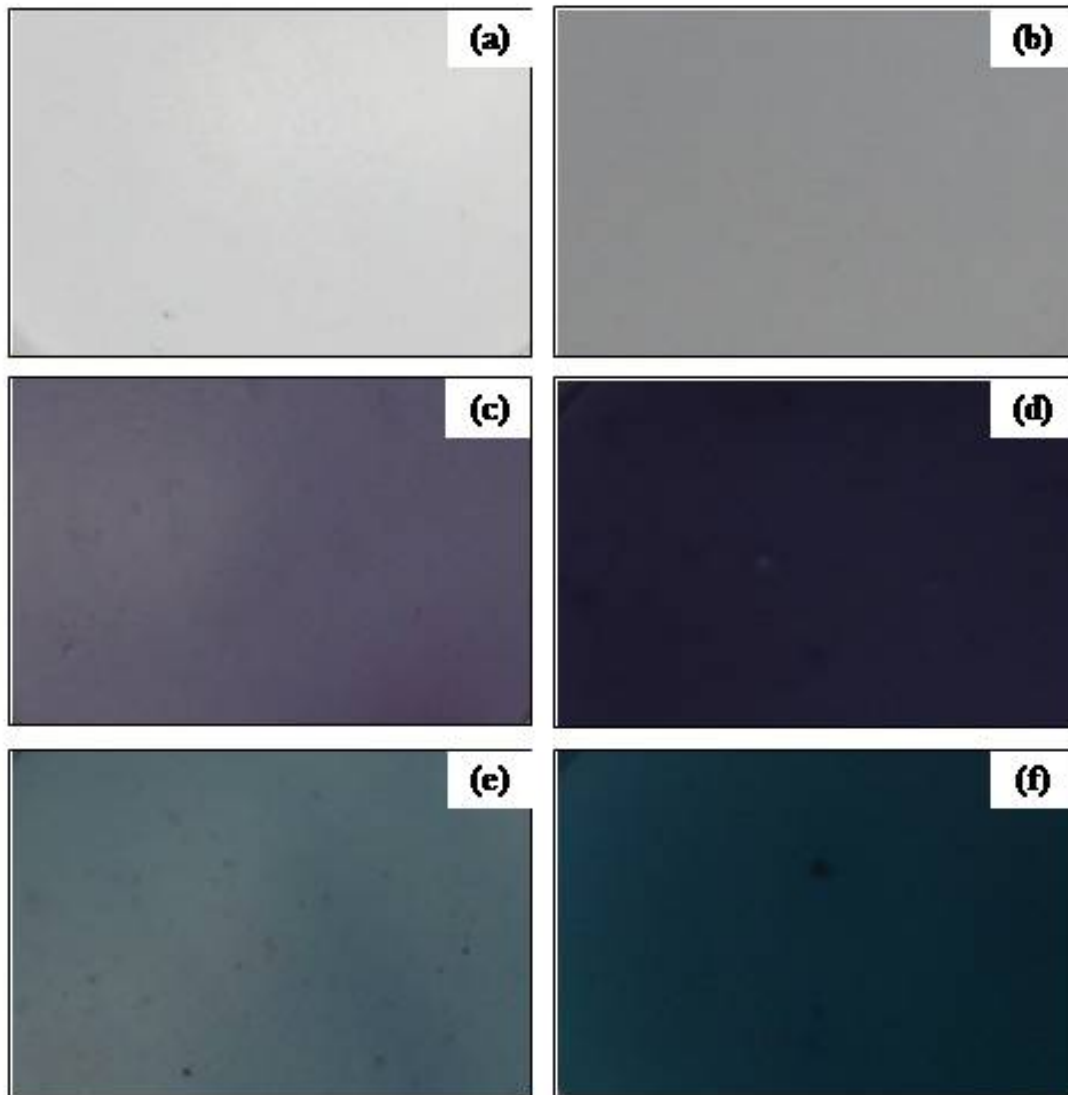


Figure 2 - Bispo et al.

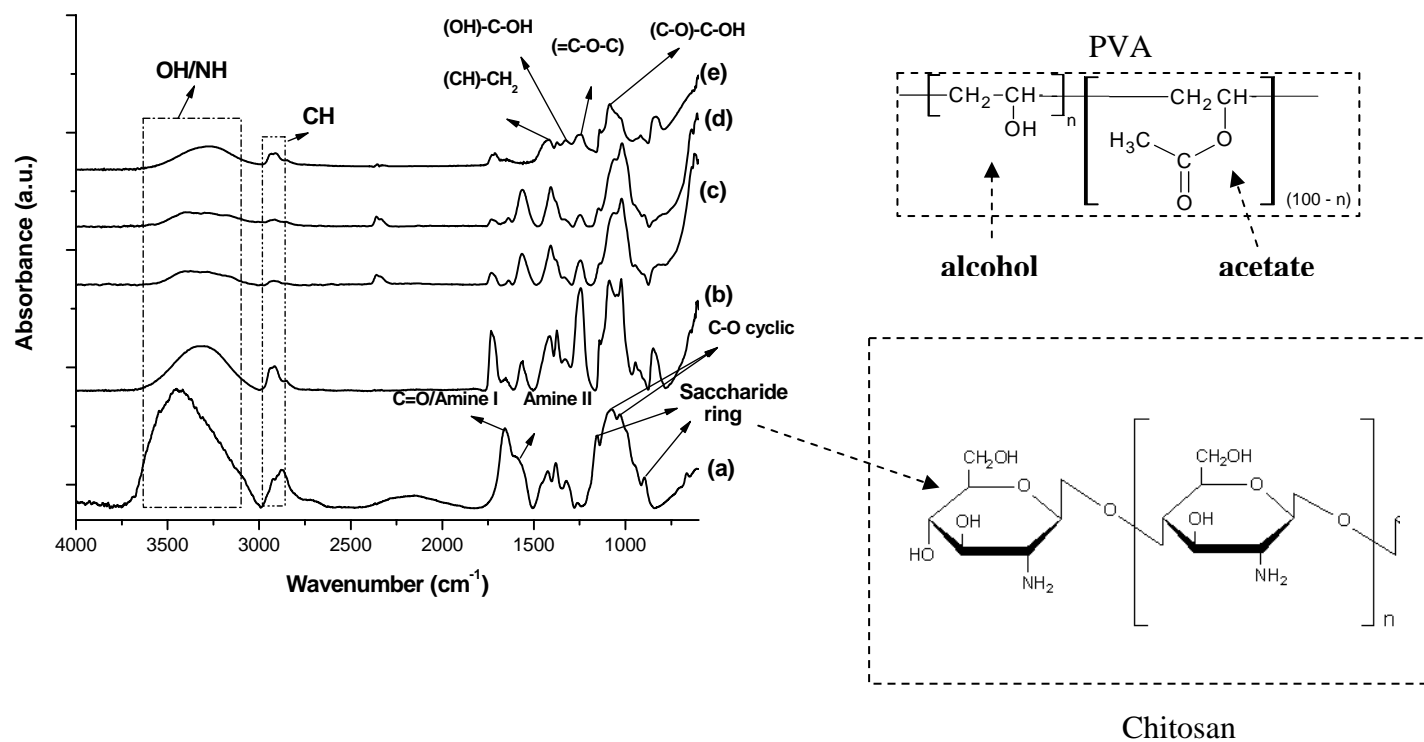


Figure 3 - Bispo et al.

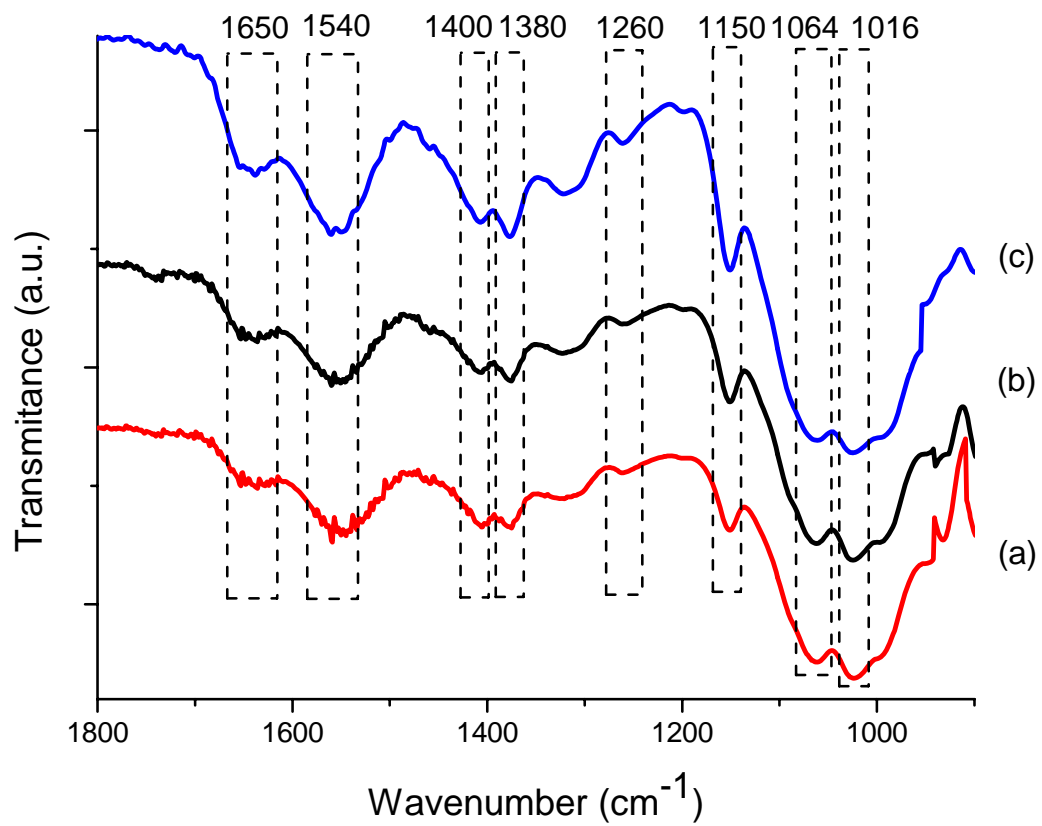


Figure 4 - Bispo et al.

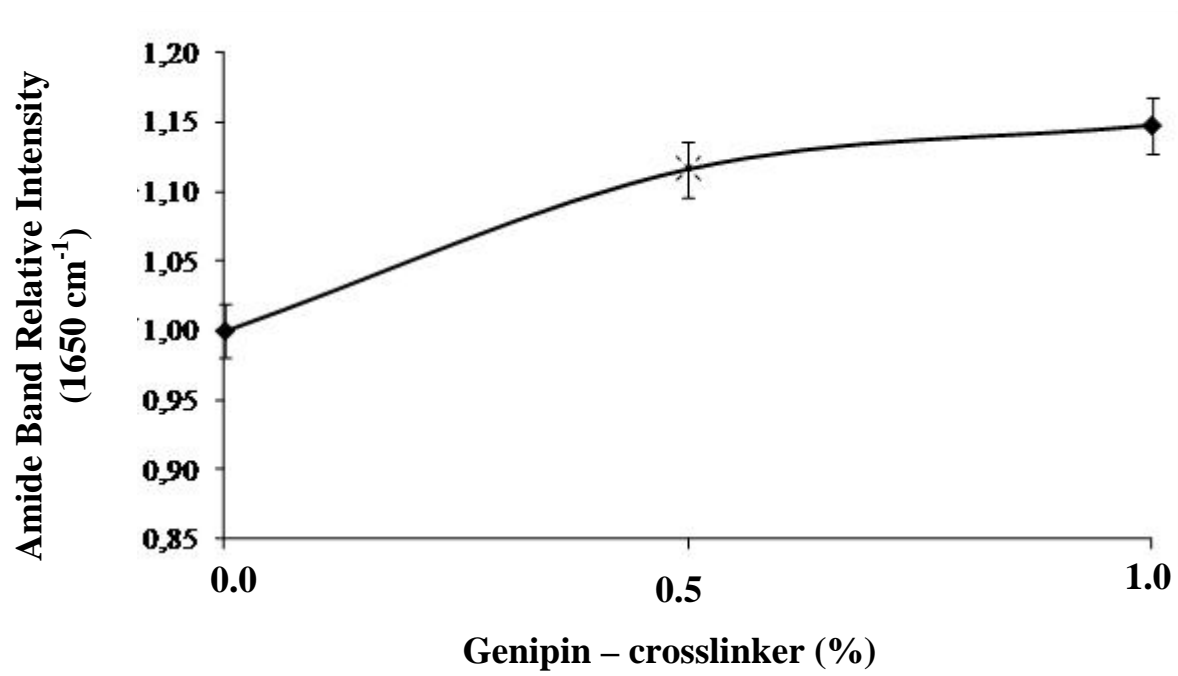


Figure 5 - Bispo et al.

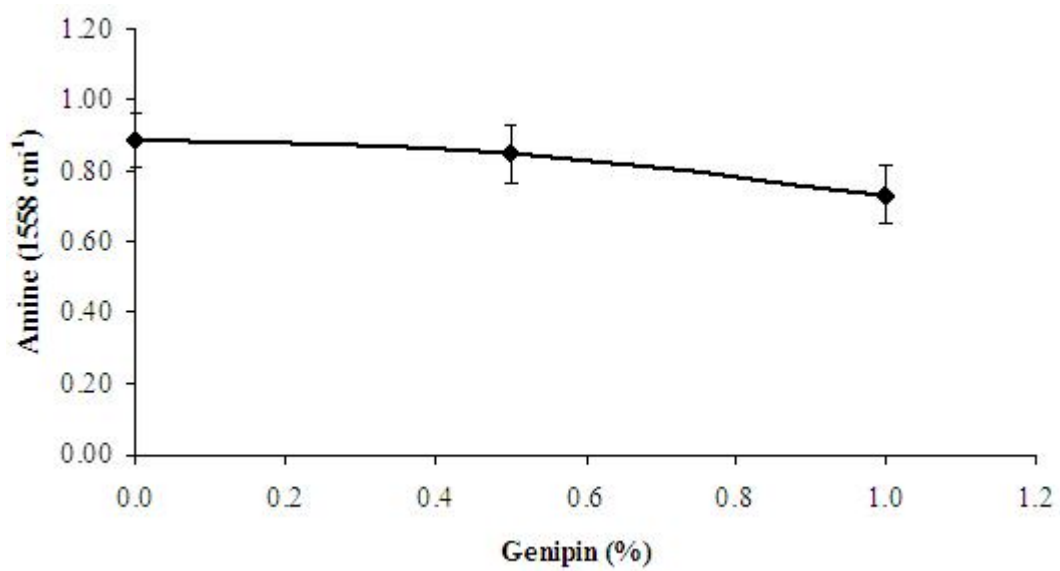


Figure 6 - Bispo et al.

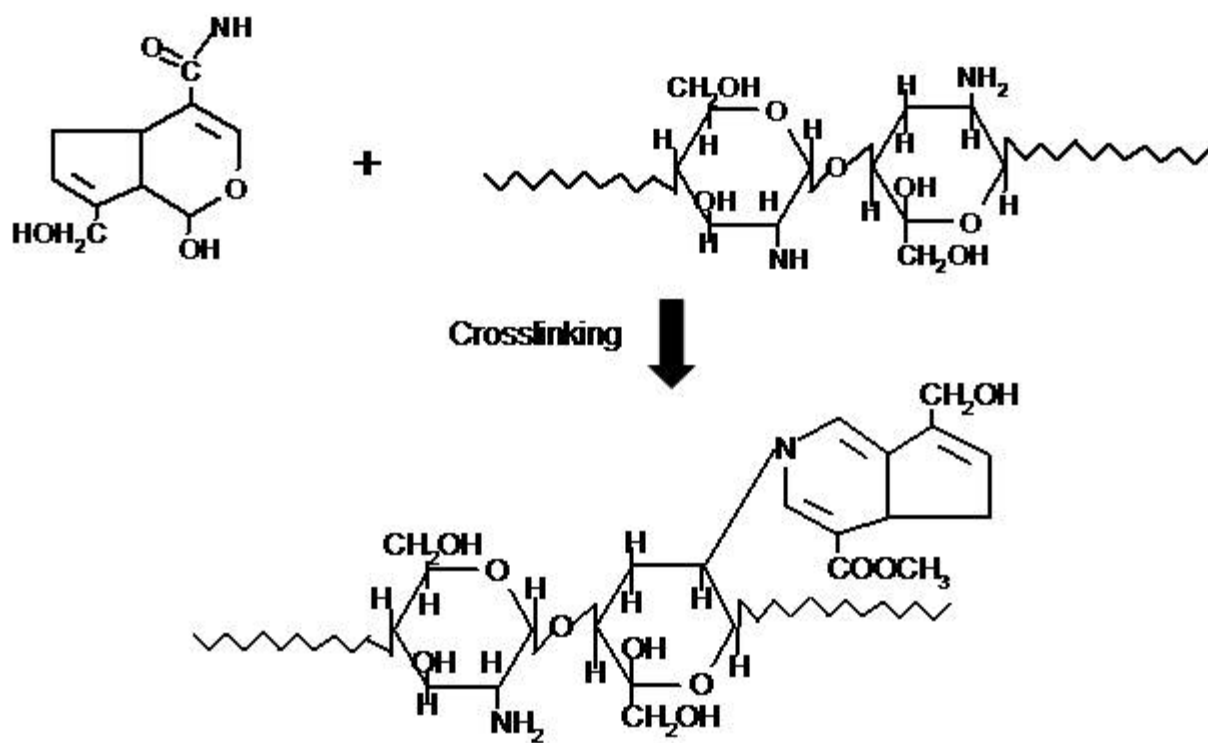


Figure 7 - Bispo et al.

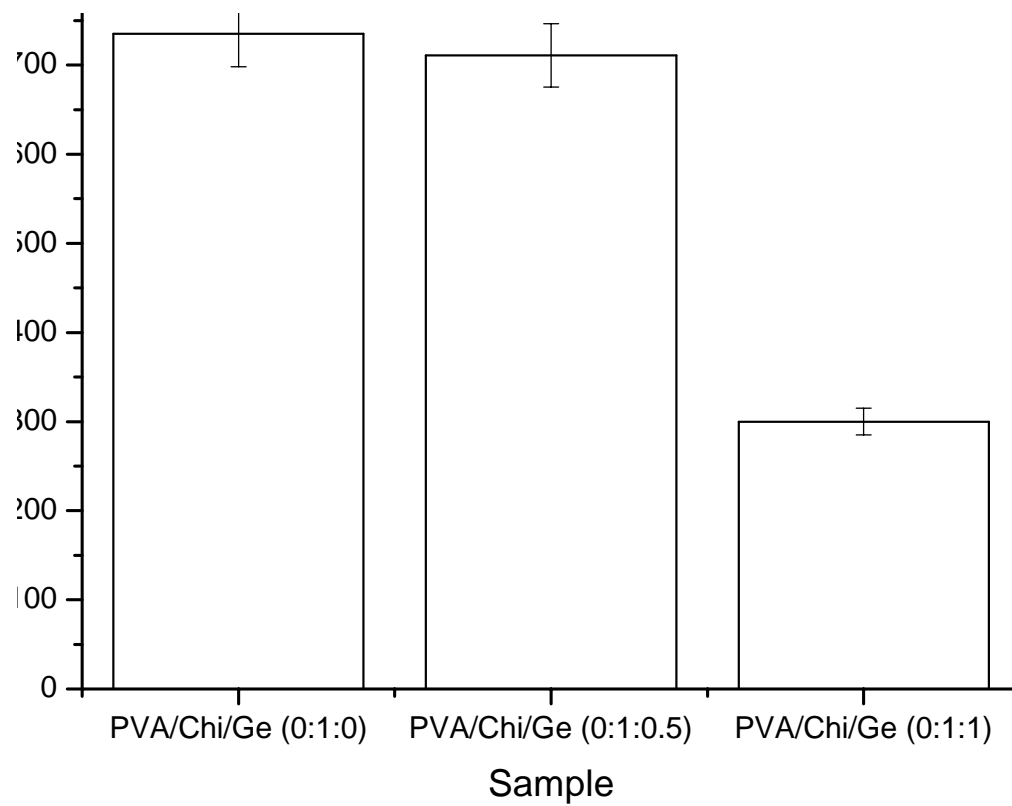


Figure 8 - Bispo et al.

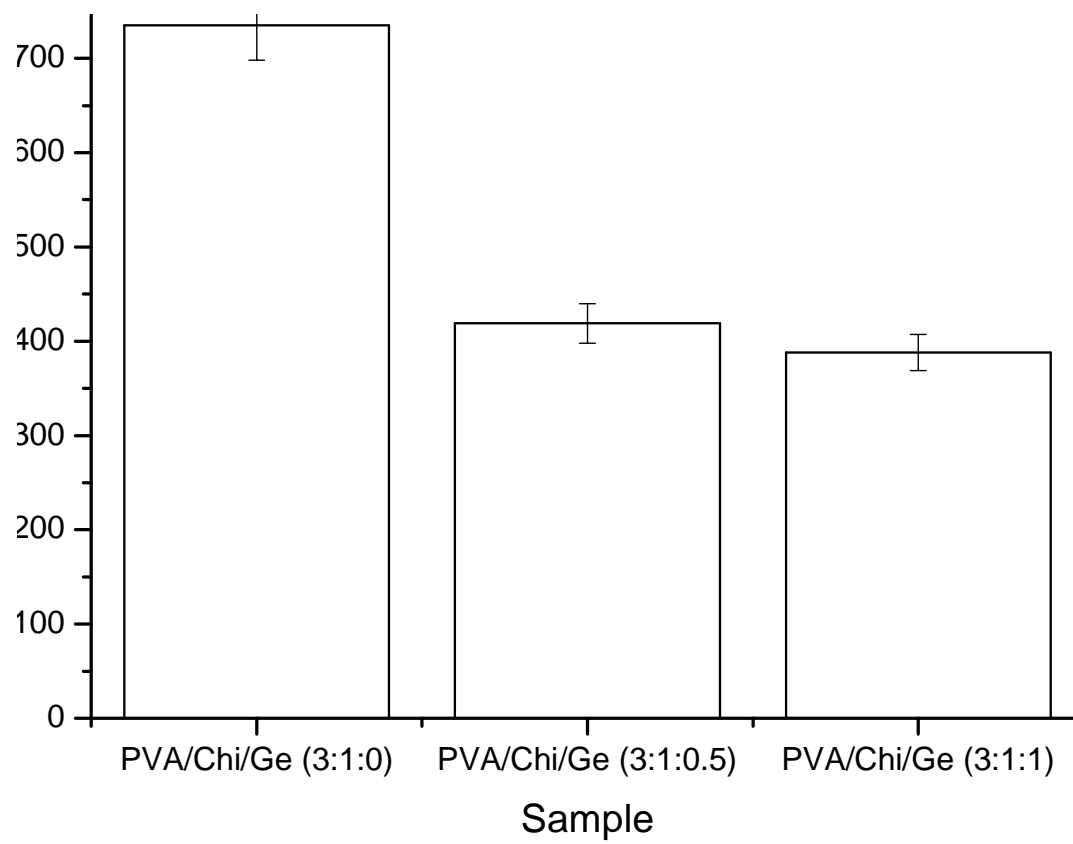


Figure 9A - Bispo et al.

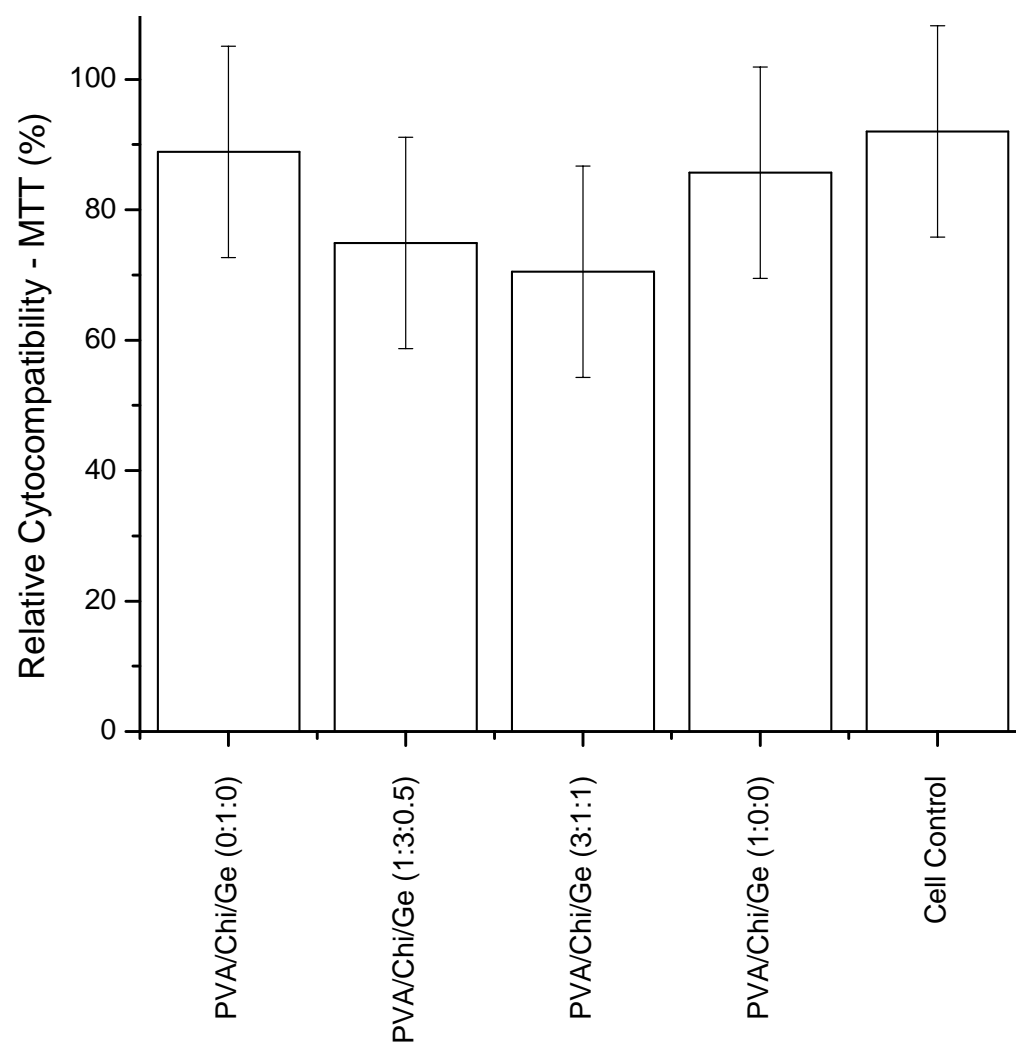


Figure 9B - Bispo et al.

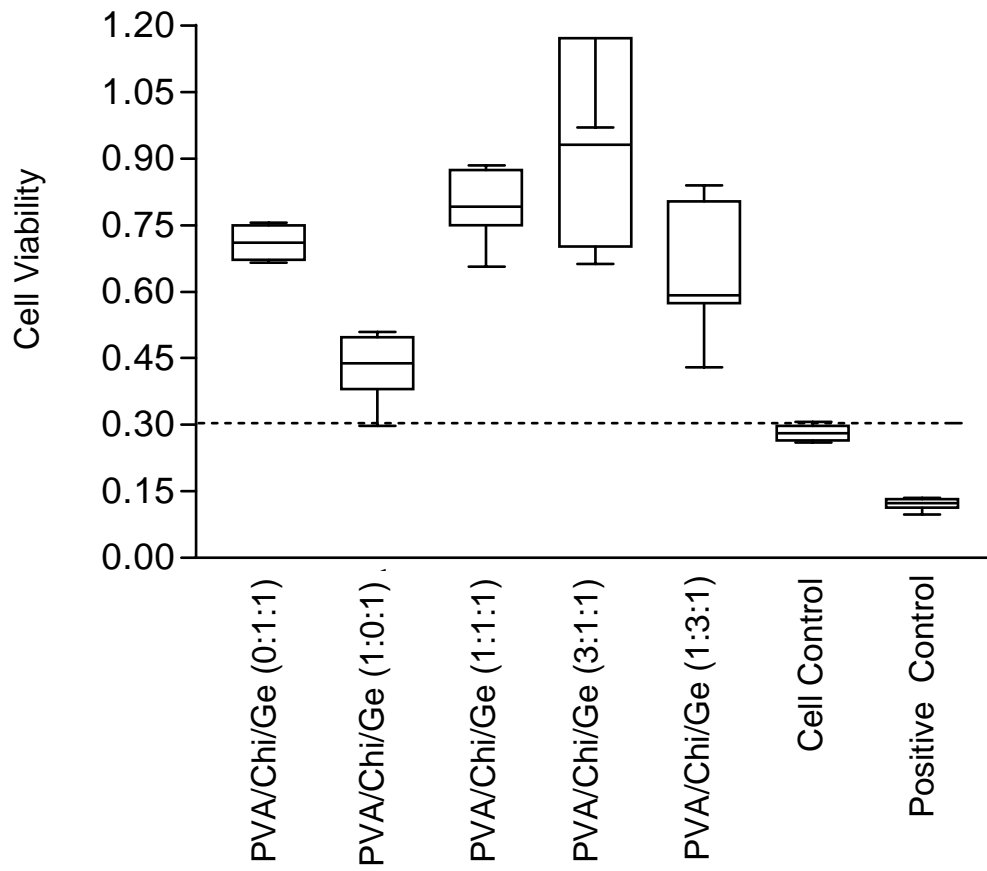
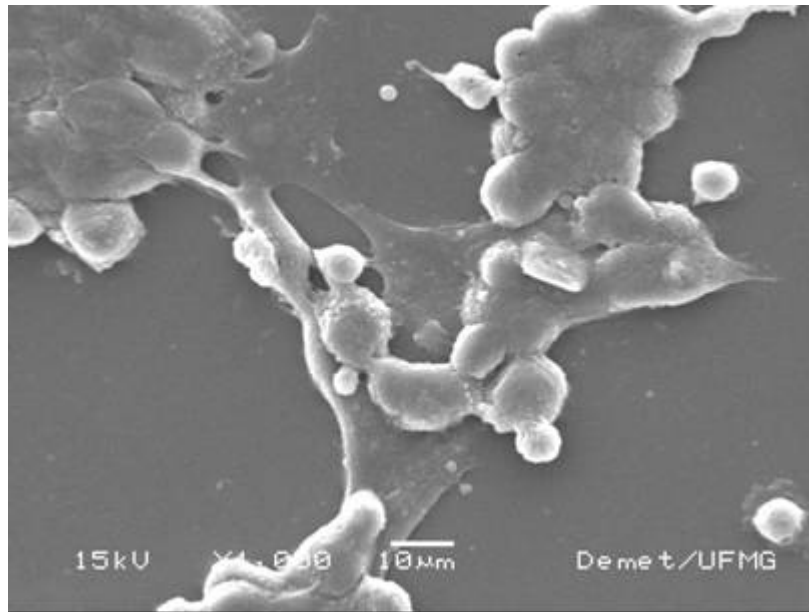
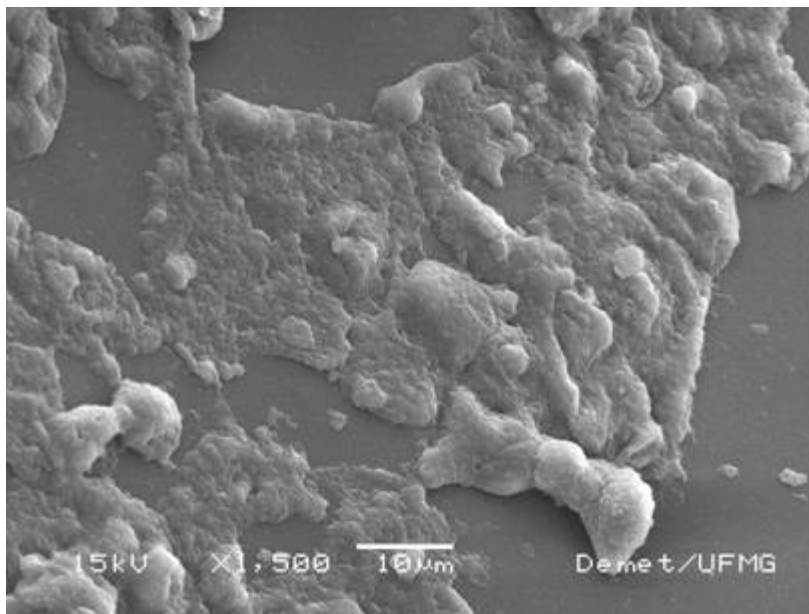


Figure 10 - Bispo et al.



(a)



(b)