

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Programa de Pós Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas

Dissertação de Mestrado

Hidrogéis Híbridos Poliméricos de Quitosana Funcionalizada e Gelatina Fotoreticulados
como Matrizes Porosas Tridimensionais para Potencial Reparo de Tecido Epitelial

Autora: Isadora Cota Carvalho

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Fevereiro/2017

Isadora Cota Carvalho

Hidrogéis Híbridos Poliméricos de Quitosana Funcionalizada e Gelatina Fotoreticulados
como Matrizes Porosas Tridimensionais para Potencial Reparo de Tecido Epitelial

Material apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica, Materiais e de Minas da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais

Orientador: Prof. Dr. Herman Sander Mansur

Belo Horizonte
Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Engenharia
2017

Agradecimentos

Àqueles que amo, meu sincero agradecimento não só por fazerem parte deste ciclo que agora se encerra, mas por serem parte do que sou. Vocês, de longe ou de perto, fazem da vida uma jornada mais leve. Sou por e para vocês!

Ao Prof. Herman Mansur, que considero exemplo de profissional, minha gratidão pela oportunidade, dedicação e confiança.

A Alexandra Mansur, pelo compartilhamento diário de conhecimento e pela execução das análises de infravermelho.

Aos companheiros de LasMat/CeNano²I, meu muito obrigada pela recepção, paciência, ajuda na condução de experimentos e pelos ensinamentos de todo dia.

A Sandhra Carvalho, pela execução dos ensaios biológicos.

Ao colega de PPGEM, Breno Baroni, pela disponibilidade para a realização das análises morfológicas por μ -CT.

À laboratorista Patrícia Azevedo, pela prontidão de sempre e pela obtenção das imagens por microscopia eletrônica de varredura.

Aos profissionais do PPGEM, que, direta ou indiretamente, participaram da execução do trabalho, em especial a Maria Aparecida Pacheco e a Nelson Azevedo, pela colaboração nos mais diversos trâmites cotidianos.

À querida -e incansável- Tia Marlene M. Zica Vianna, entre incontáveis razões, pela revisão de texto, feita com tanto carinho e cuidado.

À CAPES, à FAPEMIG e ao CNPq, pelo incentivo e pelo apoio financeiro à pesquisa desenvolvida.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS.....	5
2.1	Objetivo geral.....	5
2.2	Objetivos específicos:	5
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
3.1	Polímeros como biomateriais	6
3.2	Quitosana.....	7
3.2.1	Aplicações da quitosana em engenharia de tecidos	12
3.3	Gelatina	15
3.3.1	Aplicação da gelatina em engenharia de tecidos	19
3.4	Hidrogéis	20
3.4.1	Reticulação de hidrogéis	22
3.4.2	Água em hidrogéis	26
3.4.3	Cinética de intumescimento de hidrogéis	27
3.4.4	Sinérese em hidrogéis	29
3.4.5	Hidrogéis à base de quitosana e gelatina	29
3.4.6	Fotoquímica e fotofísica de reticulação	33
3.4.7	Estado fundamental, estados excitados e orbitais moleculares.....	34
3.4.8	Fotorreticulação	35
3.4.9	Fotoiniciadores.....	38
3.4.10	Considerações sobre os componentes do sistema: FI, grupos funcionais e radiação.	39
3.5	Uso de ácido ascórbico como desativador de radicais livres oriundos da exposição à radiação UV.....	42
3.6	Caracterização de materiais e matrizes polimérica	43
3.6.1	Titulação potenciométrica.....	44
4	METODOLOGIA	60
4.1	Etapas do Procedimento Experimental	60
4.2	Materiais.....	61

4.3	Métodos.....	61
4.3.1	Espectroscopia no infravermelho.....	61
4.3.2	Determinação do grau de desacetilação.....	61
4.3.3	Modificação da matéria-prima - Síntese de quitosana metacrilamida (ChMA)	63
4.3.4	Produção de hidrogéis de ChMA e GelChMA	67
4.3.5	Caracterização Morfológica.....	70
4.3.6	Intumescimento.....	71
4.3.7	Toxicidade e viabilidade celular - MTT	72
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	74
5.1	Caracterização da matéria-prima.....	74
5.1.1	Espectroscopia no infravermelho.....	74
5.1.2	Determinação do grau de desacetilação.....	76
5.2	Funcionalização química da quitosana por anidrido metacrílico.....	80
5.2.1	Verificação da funcionalização por espectroscopia UV-Vis	80
5.2.2	Verificação da funcionalização por espectroscopia no infravermelho.	82
5.2.3	Estimativa do grau de funcionalização das cadeias de quitosana.....	84
5.3	Reticulação de ChMA e GelChMA	86
5.3.1	Caracterização da reticulação química por espectroscopia no infravermelho.....	86
5.4	Caracterização morfológica	94
5.4.1	Quitosana	94
5.4.2	Gelatina.....	96
5.4.3	Hidrogéis fotoreticulados: ChMA e GelChMA.....	101
5.5	Intumescimento	112
5.5.1	Filmes de quitosana não reticulada.....	112
5.5.2	Filmes de gelatina não reticulada.....	115
5.5.3	Filmes de quitosana e gelatina não reticulada	115
5.5.4	Filmes de ChMA reticulados por radiação UV	116
5.5.5	Filmes de GelChMA por radiação UV	118
5.5.6	Matrizes de quitosana metacrilamida reticulada por radiação UV	121
5.5.7	Matrizes de GelChMA reticulada por radiação UV	123

5.5.8	Comparativo da capacidade de intumescimento para ChMA e GelChMA na forma de filmes e matrizes.....	125
5.6	Ensaio de toxicidade e viabilidade celular- MTT	130
6	CONCLUSÃO	132
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	133
8	CONTRIBUIÇÃO COM A LITERATURA	134

Lista de Figuras

Figura 3.1: Estrutura química da quitosana.	8
Figura 3.2: Efeito do pH na solubilidade da quitosana.	9
Figura 3.3: Estrutura química dos aminoácidos Glicina, Hidroxiprolina e Prolina.	16
Figura 3.4: Esquema da obtenção de gelatina tipos A e B do colágeno.	17
Figura 3.5: Estrutura química da sequência RGD.	19
Figura 3.6: Esquema de três mecanismos de formação de redes de hidrogéis poliméricos.	23
Figura 3.7: Relação entre propriedades do hidrogel e densidade de reticulações da rede. No gráfico, Q representa a taxa de intumescimento, D o coeficiente de difusão e G o modo de cisalhamento	25
Figura 3.8: Reticulação física em hidrogéis à base de quitosana.	31
Figura 3.9: Transições eletrônicas possíveis para ligações entre carbonos.	35
Figura 3.10: Mecanismo de reação possível entre um FI e uma cadeia polimérica.	37
Figura 3.11 Ilustração do mecanismo de foto clivagem de FI tipo I.	38
Figura 3.12: Imagens de MEV de redes de gelatina pura, item a) ou modificada com grupos metacrilamida, itens b), c) e d), formadas em diferentes proporções de Irgacure 2959 (I2959).	40
Figura 3.13 Oxidação do ácido ascórbico em desidroascorbato.	43
Figura 3.14: Regiões do espectro infravermelho de vários tipos de bandas vibracionais.	48
Figura 3.15: Espectro no infravermelho destacando a presença de grupos amida I, II, III e A para gelatina pura, funcionalizada com anidrido metacrílico e funcionalizada com anidrido acrílico.	49
Figura 3.16: Principais transições envolvendo alguns tipos de substâncias com indicação da tendência energética de acordo com o tipo de transição, a), e o efeito da conjugação na energia de transições eletrônicas, b).	51
Figura 3.17: Vistas superior e da secção transvesal de membranas com diferentes graus de indução de porosidade. Imagens obtidas por MEV.	54
Figura 3.18: Aderência e espalhamento de células VERO semeadas em matrizes de quitosana e PVA para o ensaio de biocompatibilidade. (A) Desenhos animados do processo de interação celular: adesão, propagação, proliferação; (B), (C) e (D): imagens	

de MEV que ilustram a morfologia típica de células semeadas em blendas de quitosana, PVA e glutaraldeído.....	55
Figura 4.1 Fluxograma de procedimento experimental.	60
Dissolveu-se quitosana (3% m/v) em ácido acético (2% v/v) sob agitação por 24h. Dissolvida a quitosana, adicionou-se anidrido metacrílico, AM, (0,6g para cada 1g de quitosana) a uma taxa de 0,5mL.min ⁻¹ e deixou-se que a solução reagisse por 4h. Após completado o tempo de reação, a solução foi submetida à diálise (membrana de 12 a 14 kDa) por 5 dias, com troca de água destilada 2x ao dia. Ao fim da diálise, congelou-se o material (-4°C por 24h em congelador doméstico), para posterior liofilização (72h, à temperatura de -50°C e pressão de 300µbar - ModulyoD, Thermo Electron Corporation). A Figura 4.2 ilustra o processo de funcionalização da quitosana. Figura 4.2: Esquema ilustrativo da funcionalização da quitosana com AM.	63
Figura 4.3: Esquema ilustrativo da produção dos hidrogéis na forma de matrizes porosas e filmes, item a), e detalhe para o processo de liofilização, item b).	69
Figura 4.4: Ilustração da porção de material caracterizada morfologicamente após a liofilização.	70
Figura 5.1: Espectro no infravermelho de filme de quitosana 2% m/v.....	74
Figura 5.2: Espectro no infravermelho para filme de gelatina.	75
Figura 5.3: Destaque para as regiões onde se localizam as principais bandas de interesse para matérias primas e blenda. A) quitosana, B) blenda 1:1 quitosana:gelatina, C) gelatina.	75
Figura 5.4: Curva de titulação e sua curva derivada para titulação potenciométrica da quitosana.	77
Figura 5.5: Regressões e resultados obtidos para Ve em intervalos de pH 2-3, 2-6 e 2,5-5,8 para a titulação potenciométrica de quitosana para determinação de GD.	78
Figura 5.6: Espectro UV-Vis da matéria-prima, quitosana, curva A), e da matéria-prima funcionalizada, ChMA, curva A).....	81
Figura 5.7: Comparação dos espectros obtidos para a matéria-prima original e funcionalizada, indicando as regiões de maior alteração com o procedimento de funcionalização. A) ChMA, B) quitosana.	82
Figura 5.8: O resultado da razão entre as áreas do pico de prova (1550cm ⁻¹) e referência (897cm ⁻¹) para matéria-prima original e funcionalizada com grupos metacrilamida.....	83

Figura 5.9: Curvas de titulação e derivada para titulação potenciométrica da ChMA. ..	84
Figura 5.10: Esquema ilustrativo do processo de funcionalização da quitosana com grupos metacrilamida. Sendo $x = 0.85$, $y = 0.15$ and $w = 0.85*$ (grau de substituição)..	85
Figura 5.11: Comparação dos espectros de ChMA encontrados para amostras expostas por A) 0min; B) 1 min; C) 5; D) 10min; e E)30 min à radiação UV.....	87
Figura 5.12: Comparação dos espectros de GelChMA encontrados para amostras expostas por A) 0min; B) 1 min; C) 5min; D) 10min; e E) 30 min à radiação UV.....	88
Figura 5.13: Comparação da variação da intensidade relativa do pico centrado em $\sim 1630\text{cm}^{-1}$ para amostras de GelChMA A) não exposta diretamente à radiação UV e B) exposta por 30 minutos à radiação UV.	89
Figura 5.14: Resultado das razões entre áreas de picos de prova e de referência pela integração do espectro e determinação dos picos presentes pelo método de máximo local pelo aplicativo Origin®.....	90
Figura 5.15: O resultado obtido a partir da deconvolução de regiões dos picos de interesse, item a) e as curvas obtidas pela deconvolução das curvas de interesse para ChMA e GelChMA, expostas por 30 minutos à radiação UV, nos itens b) e c), respectivamente.	91
Figura 5.16: Esquema ilustrativo da fotorreticulação das cadeias de ChMA.	93
Figura 5.17: Corpos de prova de quitosana liofilizados em a) corte transversal e b) longitudinal.	94
Figura 5.18: Imagem de matriz de quitosana obtida por μ -CT em corte a) transversal e b) longitudinal.,.....	94
Figura 5.19: Imagens obtidas por MEV para matriz de quitosana (corte longitudinal) em aumentos de 50, 100, 300 e 500 vezes.....	95
Figura 5.20: Gráfico de distribuição de tamanho de poros para matriz de quitosana. Os dados foram obtidos por μ -CT.....	95
Figura 5.21: Matriz de gelatina não quimicamente reticulada em corte transversal após liofilização.	96
Figura 5.22: Imagem de matriz de gelatina obtida por μ -CT em a) corte longitudinal e b) e c) em vista frontal.	97
Figura 5.23: Imagens obtidas por MEV para matriz de gelatina em ampliações variando de 50x a 500x.....	97

Figura 5.24: Imagem de matriz de gelatina obtida por MEV com aumento de 2000 vezes.....	98
Figura 5.25: Seção longitudinal de matriz de blenda de quitosana e gelatina.	99
Figura 5.26: Imagem de matriz de gelatina obtida por μ -CT em a) vista frontal, b) corte longitudinal e c) corte transversal.	99
Figura 5.27: Imagens obtidas por MEV para matriz de gelatina em aumentos variando de 50x a 500x.....	100
Figura 5.28: Gráfico de distribuição de tamanho de poros para matriz de blenda de quitosana e gelatina. Os dados foram obtidos por μ -CT.	100
Figura 5.29: Microscopia eletrônica de varredura acoplada de amostras de ChMA expostas por 0, 5 e 10 minutos à radiação UV. Item a), não exposta; item b), exposta por 5 minutos e item c), exposta por 10 minutos. O item d) apresenta o resultado de EDS para a formulação.....	102
Figura 5.30: Microscopia eletrônica de varredura de amostras de GelChMA expostas por 0, 5 e 10 minutos à radiação UV. Item a), exposta; item b), exposta à 5 minutos e item c), exposta por 10 minutos. O item d) apresenta o resultado de EDS para a formulação.	103
Figura 5.31: Gráfico relacionando consumo de sítios de reticulação entre cadeias de ChMA e o tempo de exposição à radiação (item a)) e a estrutura morfológica obtida para cada tempo de exposição à radiação (itens b) 0min, c) 5min e d) 10min) para hidrogéis de ChMA.....	104
Figura 5.32: Gráfico relacionando consumo de sítios de reticulação entre cadeias de ChMA e o tempo de exposição à radiação (item a)) e a estrutura morfológica obtida para cada tempo de exposição à radiação (itens b)0min, c)5min e d)10min) para hidrogéis de GelChMA.....	105
Figura 5.33: Vistas superior e longitudinal obtidas por μ -CT das amostras de ChMA expostas a 0 minuto, itens a) e d); 5 minutos, itens b) e e), e 10 minutos, itens c) e f), respectivamente.	107
Figura 5.34: Vistas superior e longitudinal obtidas por μ -CT das amostras de GelChMA expostas a 0 minuto, itens a) e d); 5 minutos, itens b) e e), e 10 minutos, itens c) e f), respectivamente.	108

Figura 5.35: Comparativo de morfologias obtidas por μ -CT para amostras de GelChMA expostas por 0 minutos, itens a) e b), e 30 minutos, itens c) e d), à radiação UV.	109
Figura 5.36: Distribuição do tamanho médio dos poros, obtido por μ -CT, de matrizes ChMA e Gel ChMA expostas à luz UV por diferentes tempos. Os dados obtidos por μ -CT foram tratados pelo aplicativo Origin [®] (modelagem Gaussiana) para obtenção das curvas representadas. Item a)ChMA ($R^2=0.99$) e item b) GelChMA ($R^2=0.98$)......	110
Figura 5.37: Gráfico de GI em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$ para filmes de quitosana não reticulada.	113
Figura 5.38: Gráfico de ID no processo de intumescimento em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$ para filmes de quitosana não reticulada.	113
Figura 5.39: GI de filmes de quitosana não reticulada submetidos a 24h de intumescimento.	114
Figura 5.40: Filme de quitosana e gelatina não reticuladas antes e após o intumescimento em PBS, a 37°C , por 1h.	115
Figura 5.41: Perda da coesão de filme de quitosana e gelatina não reticuladas após tentativa de manipulação do material para pesagem.	116
Figura 5.42: Filme fotorreticulado de ChMA destinado ao ensaio de intumescimento em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$	117
Figura 5.43: Comparação entre primeiro e segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de filme de ChMA de acordo com os tempos de imersão.	117
Figura 5.44: Resultados do cálculo de ID para os filmes de ChMA fotorreticulados. .	118
Figura 5.45: Comparação entre primeiro e segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.	119
Figura 5.46: Resultados do cálculo de ID para os filmes de GelChMA fotorreticulados.	119
Figura 5.47: Filme de GelChMA intumescido, após 1h de imersão em PBS a $37\pm 1^\circ\text{C}$, no item a), e após sua secagem em estufa por 24h a 40°C , no item b).	120
Figura 5.48: Comparação entre primeiro e segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.	121
Figura 5.49: Resultados do cálculo de ID para matrizes de ChMA fotorreticuladas.	122

Figura 5.50: Matriz de ChMA pronta par o ensaio de intumescimento, a); A mesma matriz imersa na solução de PBS, a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, em b); e no seu estado intumescido após a retirada da solução de imersão, em c).	123
Figura 5.51: Comparação entre <i>intumescimento</i> e <i>reintumescimento</i> para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.	124
Figura 5.52: Resultados do cálculo de ID para matrizes de GelChMA fotoreticuladas.	124
Figura 5.53: Matrizes de GelChMA submetidas a 24h de imersão em PBS durante o primeiro procedimento de intumescimento, a); após a retirada da solução de PBS, b); e após desidratada em estufa por 24h a 40°C	125
Figura 5.54: Gráficos comparativos para diferentes morfologias, filme e matriz, de ChMA e GelChMA. a) GI para ChMA; b) GI para GelChMA; c) ID para ChMA; d) ID para GelChMA.	127
Figura 5.55: Resultado comparativo dos ID para amostras de ChMA e GelChMA, item a). Amostras de matriz de GelChMA, item b) e ChMA, item c) imersas por 24h, em PBS, a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, item b). Comparação entre matrizes de ChMA e GelChMA desidratadas após o segundo procedimento de intumescimento para os diferentes tempos de imersão, item d).	129
Figura 5.56: Gráficos MTT após 24h de tratamento por contato direto das amostras desenvolvidas.	130
Figura 5.57: Imagens de microscopia após 24 h de tratamento por contato direto das amostras desenvolvidas. a) controle, b) filme de ChMA, c) filme de GelChMA, d) matriz de ChMA, e) matriz de GelChMA.	131

Lista de Tabelas

Tabela 3.1: Principais propriedades dependentes do grau de desacetilação da quitosana e seu efeito.	10
Tabela 3.2: Energia, comprimento de onda e frequência de diferentes faixas de radiações eletromagnéticas.	34
Tabela 3.3: Fórmulas utilizadas por diversos autores para determinação do GD da quitosana por titulação potenciométrica.	44
Tabela 4.1: Parâmetros envolvidos no procedimento experimental.	68
Tabela 5.1: Valores de grau de desacetilação obtidos de acordo com a razão entre absorbâncias entre picos de prova e de referência listados na literatura.....	79
Tabela 5.2: Relação entre área dos picos de prova e de referência para cálculo de grau de desacetilação.	79
Tabela 5.3: Resultados obtidos para o grau de desacetilação da quitosana com base na titulação potenciométrica e na análise do espectro de infravermelho das amostras em forma de filme e matriz porosa.	80
Tabela 5.4: Resultados de grau de funcionalização obtidos por espectroscopia no infravermelho e titulação potenciométrica.	85
Tabela 5.5: Redução, em porcentagem acumulada, do tamanho médio de poros determinado por MEV para amostras de ChMA e GelChMA expostas por 0min, 5min e 10min à radiação UV.	105
Tabela 5.6: Características morfológicas de matrizes porosas de ChMA e GelChMA a partir de análise μ -CT.	110

Lista de notações

AA: Ácido ascórbico.

AM: Anidrido metacrílico

Asp: Ácido aspártico

ChMA: quitosana metacrilamida

Cis: Cisteína

COOH: Grupo ácido carboxílico

FGF-2: Fator de crescimento de fibroblastos básico

FI: Fotoiniciador

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho por transformada de fourier

GAG: Glucosaminoglicana

GD: Grau de desacetilação

GelChMA: Blenda de gelatina e quitosana metacrilamida

Gli: Glicina

Glu: Ácido glutâmico

Hip: Hidroxiprolina

His: Histidina

HOMO: Orbital ocupado de maior energia

IPNs: Redes interpenetrantes

Lis: Lisina

LUMO: Orbital desocupado de menor energia

MEC: Matriz extra celular

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

MTT: Ensaio de redução do sal de tetrazólio (3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)

NH₂: Grupo amina

OB: Condrócitos bovinos

OBF: Osteoblastos fetais humanos

OH: Hidroxila

PEG: Poli(etileno glicol)

PI: Ponto isoelétrico

Pro: Prolina

PVA: Poli(álcool vinílico)

RGD: Sequência de aminoácidos contendo arginina, glicina e aspartato

SBF: Fluido corporal simulado

UV: Ultravioleta

UV-Vis: Espectroscopia no ultravioleta e visível

Resumo

Hidrogéis têm sido comprovadamente eficazes no auxílio da regeneração tecidual de órgãos macios, como a pele. Quitosana e gelatina são materiais naturais, de grande disponibilidade, atóxicos, bioativos e degradam formando produtos elimináveis por vias metabólicas. A adição de anidrido metacrílico (AM) às cadeias da quitosana dá origem ao grupo lateral metacrilamida, que contribui para o aumento da solubilidade da matéria-prima e contém grupos vinil que servem como sítios para fotorreticulação das cadeias na presença de um fotoiniciador (FI). Neste trabalho, produziram-se hidrogéis à base de quitosana metacrilamida e gelatina. A reticulação química dos hidrogéis se deu por fotorreticulação sob radiação UV, na presença do FI 2-Hidroxi-4'-(2-hidroxietoxi)-2-metilpropiofenona (Irgacure 2959) e, terminada a reação, o sistema foi estabilizado pela adição de ácido ascórbico (AA). A matéria-prima foi caracterizada por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) antes e após a funcionalização com anidrido metacrílico. A análise do processo de cura foi baseada em Espectroscopia no UV-visível (UV-vis) e FTIR. Os hidrogéis foram avaliados em relação à morfologia, por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Tomografia Computadorizada (μ -CT). Características físico-químicas, como capacidade de intumescimento, e biológicas, como toxicidade/viabilidade celular, foram analisadas por brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT). Os resultados de FTIR e UV-Vis comprovaram a funcionalização da quitosana na reação com AM. A formação da reticulação fotoquímica dos hidrogéis foi confirmada e seu mecanismo foi sugerido com base nos resultados obtidos por FTIR. Análises do grau de intumescimento dos hidrogéis apontaram uma capacidade de intumescimento variando de 500% a 2000%, dependendo da composição dos hidrogéis. MEV e μ -CT, em conjunto, mostraram que os hidrogéis possuem uma estrutura 3D porosa uniforme, com interconectividade entre poros, e cuja arquitetura é influenciada pela extensão da fotorreticulação. O sistema apresentou biocompatibilidade, com viabilidade celular acima de 90%. Esses novos hidrogéis, com propriedades projetadas por meio de sua composição relativa e extensão de fotorreticulação, têm, portanto, potencial para serem utilizados como curativos para feridas cutâneas, base para crescimento celular e reparação tecidual.

Palavras-chave: Hidrogel; Quitosana; Gelatina; Fotorreticulação; Engenharia de tecidos.

Abstract

Hydrogels have been proven effective in aiding tissue regeneration processes of soft organs, such as skin. Chitosan and gelatin are natural, highly available, non-toxic, bioactive and biodegradable materials. The addition of methacrylic anhydride (AM) to chitosan chains gives rise to the side group methacrylamide, which increases the solubility of the raw material and contains vinyl groups which serve as sites for photophoreticulation of the chains in the presence of a photoinitiator (FI). In this work, hydrogels based on chitosan methacrylamide and gelatin were produced. The chemical crosslinking of the hydrogels was led by photoreticulation under UV irradiation in the presence of 2-Hydroxy-4'- (2-hydroxyethoxy) -2-methylpropiophenone (Irgacure 2959) FI and, after the reaction, the system was stabilized by the addition of Ascorbic acid (AA). The raw material was characterized by Infrared Spectroscopy by Fourier transform (FTIR) before and after the functionalization with methacrylic anhydride. Analysis of the curing process was based on UV-Visible Spectroscopy (UV-Vis) and FTIR. Hydrogels morphology was evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Computed Tomography (μ -CT). Physical-chemical characteristics, such as swelling ability, and biological, such as toxicity / cellular viability, were analyzed by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The results of FTIR and UV-Vis proved the functionalization of chitosan by the reaction with AM. The formation of the photochemical crosslinking of the hydrogels was confirmed and its mechanism was suggested based on the results obtained by FTIR. Analysis of the degree of swelling of the hydrogels indicated a swelling capacity ranging from 500% to 2000%, depending on the composition of the hydrogels. MEV associated with μ -CT X-ray imaging of the hydrogels showed a uniform porous 3D structure with interconnectivity between pores and whose architecture features are influenced by the photoreticulation extent. The system presented biocompatibility, with cellular viability above 90%. These new hydrogels, with properties projected by means of their relative composition and photoreticulation extension, have potential to be used as wound dressings and in tissue repair applications.

Key words: Hydrogel; Chitosan; Gelatin; Photocrosslinking; Tissue engineering.

1 INTRODUÇÃO

Danos ao tecido epitelial causados, entre outras razões, por câncer de pele, úlceras venosas ou de diabetes, feridas de acidentes e queimaduras, provocam não somente danos estéticos ao paciente, mas também podem levar a sérias infecções, resultando até mesmo em óbito (SARAIVA *et al.*, 2015). Essas lesões constituem um problema permanente e demandam esforços cada vez maiores para contorná-lo devido à sua elevada incidência e ao crescente número de casos na população como um todo. O câncer de pele, por exemplo, é a forma mais prevalente de todos os cânceres tanto nos EUA quanto no Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2011; MA, A. B. *et al.*, 2016; WALKER *et al.*, 2016). O número de casos apenas de câncer de pele do tipo não melanoma no Brasil representa um impacto financeiro aos sistemas público e privado de saúde de cerca de R\$ 37 milhões e R\$ 26 milhões ao ano, respectivamente (DE SOUZA *et al.*, 2011). Avalia-se que, em 2020, o número de novos casos de câncer de pele será da ordem de 15 milhões em todo o mundo. Além disso, o Instituto Nacional do Câncer estima que o câncer de pele continue sendo o mais incidente no Brasil (DE SOUZA *et al.*, 2011). O processo cicatrização de queimaduras é um dos maiores problemas da cirurgia moderna devido à alta ocorrência desse tipo de lesão comparado a outros traumas, à sua alta letalidade e possível invalidez do paciente após o tratamento de queimaduras de elevada área de extensão. Em todo o mundo, cerca de 300 mil pessoas morrem anualmente devido a queimaduras e, de acordo com a *American Burn Association* (ABA), a cada 23 minutos uma pessoa se queima nos EUA. No Brasil, registra-se mais de 1 milhão de lesões por queimaduras a cada ano. No caso de feridas crônicas de pele, apesar de não envolverem grandes áreas de superfície, elas apresentam alta incidência na população em geral e, portanto, têm enormes impactos médicos e econômicos. Apenas nos Estados Unidos essas feridas afetam mais de 2 milhões de pessoas, com custos totais de tratamento de até US \$1 bilhão anualmente (SUPP; BOYCE, 2005).

Embora sejam intrinsecamente capazes de se regenerar, alguns tecidos não são capazes de recuperar grandes lesões teciduais. Além disso, a capacidade de regeneração de tecidos é substancialmente reduzida com o envelhecimento (SARAIVA *et al.*, 2015). A reconstrução cirúrgica, ainda que seja uma solução muito utilizada, é incapaz de reparar plenamente tecidos e órgãos perdidos, muitas vezes devido à indisponibilidade de

doadores. Nesse sentido, a engenharia de tecidos tem evoluído como um campo excitante e multidisciplinar de pesquisa com o objetivo de recriar e restaurar tecidos doentes ou danificados (SARAIVA *et al.*, 2015).

A indústria de biomateriais vem crescendo nas últimas décadas, sendo esperada uma taxa de crescimento anual de 15% para os próximos anos (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). Há mais de 25 anos estudos têm tentado desenvolver materiais que simulem efetivamente a pele humana (GROEBER *et al.*, 2011). Peles artificiais ou matrizes dérmicas à base de polímeros naturais, tais como Integra[®] e Biobrane[®], vêm sendo desenvolvidas. Elas apresentam boa aparência e mantêm a funcionalidade a longo prazo, mas apresentam baixa resistência mecânica e têm angiogênese e antibiose limitadas (WANG, F. *et al.*, 2015). Tem sido notada a presença cada vez maior de abordagens experimentais mais focadas no reparo, com uso de biomateriais ditos inteligentes, do que na substituição de tecidos lesionados. Biomateriais inteligentes são biodegradáveis e participam ativamente do processo de regeneração de tecidos danificados, estimulando respostas celulares específicas em nível molecular. Para atender a esses requisitos, modelos de matrizes tridimensionais podem ser projetados em nível macro, micro e nanoestruturais (HOLZAPFEL *et al.*, 2013). Na sequência de abordagens de engenharia de tecidos, esses materiais podem ser combinados e ajustados às condições *in vivo* de infinitas formas, modificando suas propriedades tridimensionais e sua composição para criar matrizes porosas degradáveis para o reparo do tecido em questão (HOLZAPFEL *et al.*, 2013).

Matrizes projetadas são usadas normalmente como apoio temporário para a regeneração da matriz extracelular (MEC) de células do tecido danificado, e suas propriedades físicas e bioquímicas são extremamente importantes. Devem, por exemplo, ser biocompatíveis e biodegradáveis e apresentar propriedades mecânicas compatíveis com sua aplicação (SARAIVA *et al.*, 2015). A medicina regenerativa envolve abordagens interdisciplinares biomiméticas para terapia celular e regeneração tecidual, empregando o sistema matriz/células/fatores de crescimento. A capacidade de apoio e de auxílio na diferenciação das células vai depender do quanto a matriz é capaz de mimetizar o microambiente celular (HILDERBRAND *et al.*, 2016).

Hidrogéis são redes de polímeros hidrofílicos que vêm sendo projetados para reagir a/ e estimular respostas celulares específicas em nível molecular. Intumescem quando em contato com água ou meio fisiológico, mas são capazes de manter sua estrutura tridimensional nessas condições (KIRSCHNER; ANSETH, 2013). Biomateriais à base de hidrogéis são adequados para simular aspectos da MEC de tecidos não resistentes devido à similaridade que têm com seu teor de água, elasticidade, e ao fato de seu conteúdo bioquímico ser frequentemente ajustável. Além disso, os hidrogéis podem ser manipulados para alcançar alterações nas propriedades da matriz ao longo do tempo, de forma a melhor imitar microambientes dinâmicos da MEC (HILDERBRAND *et al.*, 2016). Hidrogéis têm também potencial para serem formados *in situ*, na região da lesão que se deseja tratar, por exemplo, por meio de fotopolimerização (SARAIVA *et al.*, 2015). Estes hidrogéis são atraentes para a medicina regenerativa dada sua facilidade de administração, fácil encapsulação de células e biomoléculas, por não apresentarem grandes efeitos tóxicos e por fazerem parte de um tratamento minimamente invasivo (YANG, J. A. *et al.*, 2014).

Hidrogéis naturais são tipicamente formados de componentes de MECs, como polissacarídeos e proteínas. Eles apresentam, pois, propriedades físico-químicas que, além de representarem bem as MECs, têm potencial para direcionar migração, adesão e crescimento celular durante a regeneração do tecido (HILDERBRAND *et al.*, 2016). A quitosana é um polissacarídeo derivado da quitina que tem sido muito utilizada como biomaterial para a engenharia de tecidos em razão da sua biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade (SARAIVA *et al.*, 2015). Um material ideal, para atuar como uma matriz para crescimento de pele, deve ter alta capacidade de absorção de líquido, permeação de gás adequada, biocompatibilidade e propriedades antibacterianas a fim de proteger o tecido contra infecções e desidratação. A quitosana engloba grande parte dessas propriedades, mas apresenta limitações devido ao seu comportamento frágil. Essa propriedade, no entanto, pode ser adaptada pela sua combinação com outros materiais (SARAIVA *et al.*, 2015). A gelatina e seus derivados são biocompatíveis e biodegradáveis, tendo, portanto, potencial para serem utilizados como biocompósitos com várias substâncias, tais como biopolímeros, moléculas orgânicas, drogas e nanopartículas (SARAIVA *et al.*, 2015). A combinação de quitosana e gelatina na produção de hidrogéis apresenta não somente uma excelente capacidade de absorção de

exudatos da ferida, mas também se mostra eficiente como matriz para guiar adesão, crescimento, proliferação e diferenciação celular. Ademais, o ajuste da razão entre quitosana e gelatina na blenda permite o controle da morfologia do material, como tamanho de poro, porosidade, capacidade de intumescimento e retenção de líquido, comportamento de degradação e biocompatibilidade (SARAIVA *et al.*, 2015).

Neste trabalho, propõe-se a produção de um hidrogel fotorreticulado de quitosana funcionalizada com anidrido metacrílico e gelatina. Ele deve ter características físico-químicas, morfológicas e biológicas para aplicação em sistemas destinados à reparação de tecidos moles. O sistema foi escolhido com base na necessidade do desenvolvimento de matrizes que atendam a demanda por substitutos eficientes de enxertos de pele, levando em consideração a facilidade de utilização/aplicação/manuseio, disponibilidade de matéria prima, bioatividade e preço final.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir hidrogéis híbridos à base de quitosana de elevada massa molar funcionalizada com anidrido metacrílico e gelatina tipo A. Os hidrogéis devem ser reticulados por radiação ultravioleta (UVC, $\lambda \sim 254\text{nm}$) e submetidos à liofilização de forma a se obter uma estrutura 3D porosa, a fim de apresentar potencial para aplicação como matriz destinada à reparação de tecido epitelial.

2.2 Objetivos específicos:

- Caracterização da quitosana de alta massa molar em relação à estrutura;
- Caracterização da gelatina tipo A em relação à estrutura;
- Preparação de hidrogéis físicos de gelatina pura, quitosana pura e blendas nas proporções 1:0, 1:1 e 0:1 das soluções preparadas para cada matéria-prima;
- Caracterização dos hidrogéis em relação a intumescimento, temperaturas de transição, estrutura e morfologia;

Funcionalização de quitosana com anidrido metacrílico e caracterização dos produtos em relação à estrutura química;

Preparação de hidrogéis fotoreticulados de quitosana funcionalizada e gelatina nas proporções 1:0 e 2:1 das soluções preparadas para cada componente;

- Liofilização das soluções preparadas e fotoreticuladas de forma a se obter uma estrutura tridimensional porosa;

Caracterização dos hidrogéis em relação a intumescimento, estrutura, morfologia e toxicidade.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros como biomateriais

Biomateriais podem ser definidos como materiais naturais ou sintéticos para tratar, complementar ou substituir órgãos, tecidos ou exercer função de tecidos vivos. Além dos requisitos em relação às propriedades mecânicas e físico-químicas, os biomateriais devem apresentar características tais quais (ROSIAK; YOSHII, 1999):

- Ser atóxico;
- Apresentar funcionalidade desejada para a aplicação;
- Ser esterilizável;
- Ser biocompatível.

Apesar do amplo uso de biomateriais em medicina, a maior parte deles não possuem todos os requisitos para interagir com o tecido vivo. Há uma busca constante e grande progresso no projeto de novos materiais para superar essas limitações (PATEL; MEQUANINT, 2011).

O termo biomaterial compreende polímeros, metais, cerâmicas e compósitos, sendo que os polímeros representam a grande maioria dos biomateriais disponíveis (ROSIAK; YOSHII, 1999). Além das propriedades físico-químicas dos polímeros, uma grande vantagem de seu uso é a possibilidade de desenvolvimento de materiais inteligentes com propriedades específicas de proteínas de sinalização, como componentes de MEC e fatores de crescimento (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

Polímeros são muito adequados para a aplicação biomédica devido à sua ampla gama de propriedades. Eles podem, por exemplo, ser rígidos ou flexíveis, de baixa ou alta resistência mecânica, ter ou não resistência à adsorção de proteínas ou mesmo ser modificados para tornar apropriada sua compatibilidade com essas estruturas. Além disso, polímeros podem ser moldados em formas bastante complexas. Em contrapartida, a degradação de polímeros pode gerar produtos tóxicos e/ou prejudicar o processo de cicatrização (KUHN, 2012). Outra vantagem interessante envolvendo uso de polímeros é a viabilidade de funcionalização das cadeias, ampliando a possibilidade de manipulação de suas propriedades.

Uma classe de materiais poliméricos que vem sendo muito estudada para aplicações biomédicas nas últimas décadas, é o hidrogel. Hidrogéis são polímeros altamente hidratáveis que formam uma rede tridimensional física ou química e apresentam grande similaridade com MEC de tecidos macios. Entre as propriedades dos hidrogéis que confirmam seu potencial como biomaterial para aplicação em sistemas de liberação controlada de drogas, encapsulação celular, lentes de contato, matrizes para engenharia de tecido, biossensores, substratos inteligentes de cultura celular, curativos e preenchimento de tecidos lesionados, incluem-se (PATEL; MEQUANINT, 2011):

- Biocompatibilidade superior;
- Boa permeabilidade ao oxigênio;
- Ambiente superficial aquoso que auxilia na proteção de células, fármacos, peptídeos, proteínas, DNA, oligonucleotídeos;
- Mínima irritação por fricção do tecido circundante quando da implantação;
- Propriedades físicas similares às dos tecidos macios;
- Microestrutura porosa;
- Fácil modificação superficial com biomoléculas específicas;
- Possibilidade de serem injetados *in vivo* antes da cura.

3.2 Quitosana

A quitosana é um copolímero semissintético derivado de quitina. Ela é proveniente do exoesqueleto de insetos, crustáceos e fungos (DASH *et al.*, 2011; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014). A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, sendo a celulose o primeiro (CROISIER; JÉRÔME, 2013; DASH *et al.*, 2011; WAN; TAI, 2013). Em relação à sua estrutura, a quitosana é um polissacarídeo semicristalino, contendo um grupo amina e dois grupos hidroxilas em unidades de repetição (N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina) em quantidades variadas (CROISIER; JÉRÔME, 2013; DASH *et al.*, 2011; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; JAYAKUMAR *et al.*, 2011). A Figura 3.1 ilustra a estrutura química da quitosana.

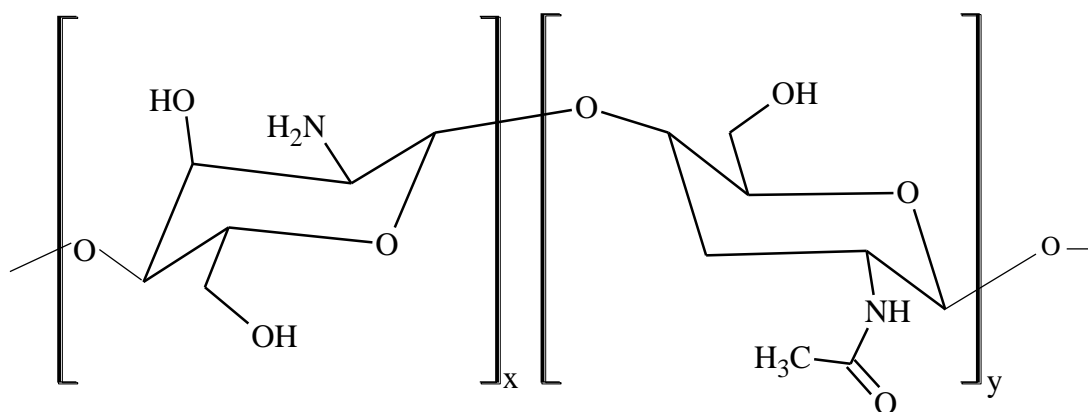


Figura 3.1: Estrutura química da quitosana.

Fonte: (VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL; SCHACHT, 2011)

A quitina pode ser completamente acetilada, completamente desacetilada ou parcialmente desacetilada, sendo que a completa desacetilação é raramente obtida. Para que se obtenha quitosana a partir da quitina, deve-se proceder à desacetilação alcançando grau de desacetilação (GD) superior a 60, ou seja, 60% de resíduo de unidades de D-glucosamina (CROISIER; JÉRÔME, 2013). A desacetilação da quitina pode ser conduzida por meio de hidrólise química em meio alcalino (DASH *et al.*, 2011) ou hidrólise enzimática (CROISIER; JÉRÔME, 2013). As condições de desacetilação determinam a massa molecular do polímero e o GD, sendo que o GD varia entre 60 e 100, e a massa molecular, de 300 a 1000kDa (CROISIER; JÉRÔME, 2013). Sugere-se que a porção cristalina da quitina influencie o processo de desacetilação e, conseqüentemente, a estrutura final da quitosana, sua massa molar e o GD. Tais características influenciam a solubilidade, reatividade em processos de modificação química e o comportamento biológico, mecânico e reológico (LAMARQUE *et al.*, 2005; PACHECO *et al.*, 2009, 2011).

A quitosana é comumente descrita em termos de massa molecular (MM) e GD. O grau de desacetilação tem influência na MM da quitosana, que por sua vez, influencia a estabilidade química e resistência mecânica da quitosana. Menor o GD maior será a MM (EL-HEFIAN; NASEF; YAHAYA, 2014). A solubilidade da quitosana em água depende do balanço eletrostático resultante da protonação dos grupos amina e das ligações de hidrogênio. Pode-se dissolver quitosana em soluções de ácidos dependendo do GD das cadeias do polímero. A dissolução da quitosana em ácido acético puro é

muito difícil, sendo que, a altas temperaturas, é possível que haja sua despolimerização. É comum a utilização de soluções aquosas de ácido acético para preparar soluções de quitosana. As propriedades da quitosana são dependentes não apenas da MM e do GD, mas também da distribuição dos grupos acetil ao longo da cadeia (KURITA, 2001).

A presença de grupos amina em sua estrutura gera propriedades interessantes à quitosana quando esse polissacarídeo é comparado à quitina, como a possibilidade de dissolução do polímero no estado protonado em $\text{pH} < 6$ (HOLLISTER, 2005) devido à quartenização dos grupos, que apresentam pK_a de aproximadamente 6,3. No caso de a solução aquosa apresentar $\text{pH} > 6$, os grupos amina perdem a carga positiva e a quitosana se torna insolúvel (DASH *et al.*, 2011). O valor exato do pH de transição será dependente do GD do polímero (CHO, Y.-W. *et al.*, 2000), lembrando que quanto maior o GD maior será a quantidade de grupos amina presentes na cadeia e maior será sua porção catiônica em $\text{pH} < 6$.

A Figura 3.2 ilustra a mudança da solubilidade da quitosana com o abaixamento do pH .

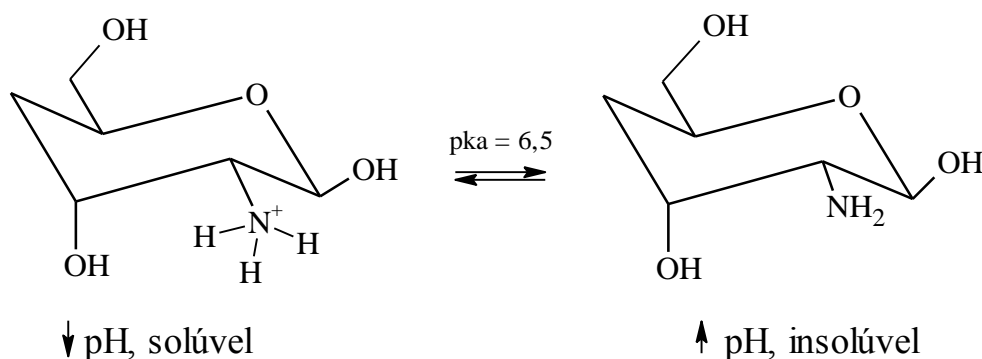


Figura 3.2: Efeito do pH na solubilidade da quitosana.

Fonte: Adaptado (DASH *et al.*, 2011)

Os grupos amina possibilitam a formação de complexos com várias espécies aniônicas como lipídios, proteínas, DNA e polímeros sintéticos (HOLLISTER, 2005; KIM *et al.*, 2007; PAVINATTO; CASELI; OLIVEIRA, 2010). Assim como os grupos amina, os grupos hidroxila permitem que o polissacarídeo forme ligações covalentes estáveis com outras moléculas. Reações não específicas podem ocorrer nos alcoóis, como esterificações (RINAUDO, 2006). Várias funcionalizações podem, então, ser feitas ao longo da cadeia de quitosana, aumentando seu leque de aplicações.

A estrutura química da quitosana influencia sua cristalinidade e sua taxa de degradação. Quanto menor o GD maior a cristalinidade e menor a taxa de degradação do polissacarídeo (KIM *et al.*, 2008).

A Tabela 3.1 resume a relação entre estrutura e propriedade da quitosana.

Tabela 3.1: Principais propriedades dependentes do grau de desacetilação da quitosana e seu efeito.

Propriedade	Característica estrutural ^a
Solubilidade	↑ GD
Cristalinidade	↓ GD
Biodegradabilidade	↓ GD, ↓ Massa molecular
Viscosidade	↑ GD
Biocompatibilidade	↑ GD
Mucoadesão	↑ GD, ↑ Massa molecular
Analgésica	↑ GD
Microbicida	↓ GD, ↓ Massa molecular
Permeabilidade	↑ GD
Antioxidante	↑ GD, ↓ Massa molecular
Hemostática	↑ GD

^a↑Propriedade diretamente proporcional; ↓Propriedade inversamente proporcional.

Fonte: (DASH *et al.*, 2011)

A quitosana possui propriedades biológicas notáveis, e o grupo amina protonável nas unidades de D-glucosamina permite justificar grande parte delas. A mucoadesividade pode ser explicada pela presença de resíduos aniônicos na mucina (glicoproteína que compõe o muco) capaz de interagir com os grupos amina protonados em meio ácido (HE; DAVIS; ILLUM, 1998). Igualmente, devido à carga positiva da quitosana em meio ácido, há a possibilidade de interação entre o polímero e partes negativamente carregadas de membranas celulares, o que pode levar à sua reorganização e interação com proteínas de junção. Em relação às propriedades bactericida e fungicida da quitosana, propõem-se, embora ainda não haja um consenso, dois principais mecanismos de atuação. O primeiro leva em conta a possibilidade de mudança de permeabilidade da membrana celular, quando há interação de partes da célula com a cadeia positivamente carregada da quitosana. Isso poderia impossibilitar a entrada do

microorganismo na célula e/ou levar a ausência de substâncias essenciais a eles no ambiente extracelular. O segundo mecanismo envolve a ligação da quitosana ao DNA celular, o que poderia levar à inibição da síntese de RNA do microorganismo. É possível que haja, também, uma combinação dos mecanismos propostos, sendo que ambos envolvem a natureza catiônica dos grupos amina em meio ácido (CHO, Y. W. *et al.*, 1999; CHUNG; CHEN, 2008; CROISIER; JÉRÔME, 2013; HE, P.; DAVIS; ILLUM, 1998; IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; ONG *et al.*, 2008; SASHIWA; AIBA, 2004; SMITH; WOOD; DORNISH, 2004). Estudos apontam um amplo espectro de atividade bactericida e fungicida da quitina, da quitosana e dos derivados (DU *et al.*, 2009).

A biodegradabilidade da quitosana pode ser relacionada ao fato de ela ser um polissacarídeo contendo sítios para a quebra de ligação glicosídea de proteases, como a lisozima (DASH *et al.*, 2011). A biodegradação da quitosana leva à formação de oligossacarídeos não tóxicos de comprimentos variáveis, que podem ser eliminados por vias metabólicas (CROISIER; JÉRÔME, 2013). Além disso, não sendo tóxico, o produto de degradação da quitosana (N-glucosamina) está presente em matrizes celulares de células eucariotas (KUMAR, R. *et al.*, 2004).

A biocompatibilidade e a bioatividade do copolímero em meio fisiológico, por sua vez, serão dependentes do método de preparação e da presença de substâncias residuais do processo. O GD influencia a biocompatibilidade do material dada a sua influência na carga positiva da cadeia polimérica, tendo o polímero com maior GD maior tendência a ser biocompatível em meio biológico (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001).

A utilização de quitosana vem sendo cada vez mais explorada não somente por ser originária de uma fonte renovável abundante, como também por apresentar propriedades biológicas e físico-químicas que favorecem sua aplicação como biomaterial. Características como biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e atividades biológicas- tais quais efeito bactericida, baixa imunogenicidade e mucoadesividade- têm aberto espaço para a exploração e o desenvolvimento da quitosana (LIU *et al.*, 2000; ONG *et al.*, 2008; YI *et al.*, 2005). Ela, além disso, se faz versátil pelo fato de suas propriedades poderem ser controladas e projetadas por meio da funcionalização de sua estrutura (KRAJEWSKA, 2005; MOURYA; INAMDAR, 2008,

2009). Apesar de tecidos conectivos não conterem quitosana, esta apresenta similaridade estrutural com glucosaminoglicanas (GAG), que representam grande parte dos componentes de MECs. A natureza catiônica da quitosana é capaz de promover adesão celular e agir como modeladora de morfologia, diferenciação, movimento, síntese e função celulares. Por um lado, foi reportado que a quitosana induz a liberação de interleucina 8 por fibroblastos. Esta, por sua vez, influencia a migração e proliferação de fibroblastos e células vasculares endoteliais. Por outro lado, constatou-se que a quitosana também promove trombose e embolização induzidas por superfície, o que limita sua aplicação em biomateriais contendo sangue (WANG *et al.*, 2003).

A quitosana tem sido utilizada em variados sistemas biológicos, como em engenharia de tecidos macios (COSTA-JÚNIOR, E. S. *et al.*, 2009; MANSUR, H. S. *et al.*, 2009; MOREIRA *et al.*, 2016) ou duros (DIAS *et al.*, 2011; DUMONT *et al.*, 2016), ou em complexos sistemas de marcação celular e detecção de câncer (MANSUR, A. A.; MANSUR, 2015; MANSUR, H. S.; MANSUR; SORIANO-ARAÚJO; LOBATO, 2015; MANSUR, H. S.; MANSUR; SORIANO-ARAÚJO; LOBATO; *et al.*, 2015).

3.2.1 Aplicações da quitosana em engenharia de tecidos

A quitosana pode gerar uma matriz de hidrogel polissacarídea capaz de suportar o crescimento de tecidos e de ativar macrófagos, estimulando a proliferação celular e a organização histológica do tecido. Sendo hemostática, promove o crescimento de vasos e pode atuar bloqueando terminações nervosas, reduzindo a dor. Ela despolimeriza formando N-acetil- β -D-glucosaminas, moléculas capazes de desencadear a proliferação de fibroblastos, estimulando a deposição de colágenos e aumentando o nível de ácido hialurônico na região da lesão. Pode-se dizer, então, que a quitosana auxilia na aceleração da cura de feridas e na redução de cicatrizes (PAUL; SHARMA, 2004).

Há uma ampla gama de estudos envolvendo quitosana na forma de esponjas (HAN, FEI *et al.*, 2014; JAYAKUMAR *et al.*, 2011), membranas (KRAJEWSKA, 2005; NAGAHAMA *et al.*, 2008; NAGAHAMA; RANI; *et al.*, 2009; ZHU, X. *et al.*, 2005) e hidrogéis (BOUCARD *et al.*, 2007; COSTA-JÚNIOR, E. S. *et al.*, 2009; HAN, FENGXUAN *et al.*, 2015; HUA *et al.*, 2012; JI; KHADEMHOSEINI; DEGHANI, 2011; MANSUR, H. S. *et al.*, 2009; MIGUEL *et al.*, 2014; SADAT EBRAHIMI;

SCHONHERR, 2014; SHARMA *et al.*, 2015) como substratos para regeneração tecidual. Entre as possíveis formas de manipulação e aplicação dos substratos à base de quitosana, os hidrogéis merecem destaque devido a uma série de propriedades. Hidrogéis de quitosana têm graus de intumescimento tais que os fazem compatíveis com grande parte dos tecidos macios, além de serem capazes de formar ligações com o tecido circundante, minimizando danos no ato do/após o implante (DASH *et al.*, 2011).

O aprimoramento das propriedades da quitosana vem sendo alcançado com sua combinação com outros materiais, incluindo íons de prata, colágeno e GAG (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014). A impregnação dessas estruturas à base de quitosana com agentes bactericidas para a prevenção de infecções associadas ao implante do biomaterial também é interessante do ponto de vista da engenharia de tecidos e auxilia no processo de cicatrização (CUI *et al.*, 2011; HUANG, D. *et al.*, 2011; SARAVANAN *et al.*, 2011).

Uma série de estudos relata a utilização da quitosana na produção de substratos destinados à engenharia de tecidos. Isso se deve à possibilidade da quitosana poder ser processada de forma que se obtenham diferentes morfologias, como filmes, fibras e matrizes tridimensionais (WEN *et al.*, 2010). A degradação da quitosana envolve sua hidrólise enzimática, feita por lisozimas e mediada por macrófagos, resultando em oligossacarídeos protonados no grupo amina. As aminas protonadas são capazes de interagir com moléculas aniônicas incluindo proteoglicanas e GAG, que tendem a envolver um grande número de citosinas e fatores de crescimento (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014).

Estudos relativos ao uso de quitosana como matriz para regeneração tecidual óssea relataram sua participação na expressão continuada de colágeno tipo I, com aumento de adesão e proliferação de condrócitos e da produção de MEC cartilaginosa com a incorporação de ácido hialurônico à matriz de quitosana (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014). Foi igualmente relatada a influência da quitosana na promoção de crescimento celular e na deposição de matriz rica em minerais em cultura de osteoblastos (SEOL *et al.*, 2004). Matrizes porosas compósitas de hidroxihapatita/quitosana-gelatina, fabricadas por técnica de separação de fases, mostraram aumento da adesão, proliferação e expressão de osteoblastos (ZHAO *et al.*,

2002). Biocompósitos de glicol quitosana e nanohidroxihapatita, produzidos por um processo químico coloidal ecologicamente amigável em meio aquoso, seguido por métodos de fusão e evaporação do solvente à temperatura ambiente, mostraram-se promissores para uso em engenharia de tecido ósseo (DUMONT *et al.*, 2016).

Quitosana foi escolhida também como material-base para engenharia de tecido articular cartilaginoso devido à sua similaridade com GAGs presentes em cartilagem articular (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014). Essas polissacarídeos têm importante papel no desenvolvimento da morfologia, diferenciação e função dos condrócitos (WU, M.-Y. *et al.*, 2009). Fibras poliméricas produzidas à base de quitosana e alginato também se mostraram eficientes em elevar adesão e proliferação dessas células comparadas a fibras de alginato (IWASAKI *et al.*, 2004).

Materiais à base de quitosana, produzidos em variadas composições, têm sido usados para auxiliar o processo de cicatrização de feridas, sendo constatada a redução de cicatrizes em casos de aplicação de curativos à base de quitosana (UENO; MORI; FUJINAGA, 2001). Constatou-se, por meio de estudos realizados *in vitro*, que carboximetilquitosana atua duplamente em cultura de fibroblastos da pele, promovendo a proliferação de fibroblastos de pele normal e inibindo a proliferação de fibroblastos de quelóide (CHEN *et al.*, 2002). Estima-se que a quitosana tenha importante papel no aumento da vascularização, e sua presença na região de lesão implica melhor incorporação de fibrina colágena na matriz extracelular (WU *et al.*, 2009). Hidrogéis de quitosana se mostraram eficientes como curativos quando utilizados também como carreadores de fatores de crescimento de fibroblastos tipo 2 (FGF-2), que estimulam angiogênese por ativar células capilares epiteliais e fibroblastos (OBARA *et al.*, 2003). Para manter a concentração do fator de crescimento na região da lesão, ele pode ser incorporado na rede do hidrogel de quitosana por meio de fotorreticulação por luz UV (ISHIHARA *et al.*, 2002).

O uso de quitosana no auxílio de regeneração de pele após queimaduras de terceiro grau se mostrou eficiente em experimentos veterinários em pele de suínos. Os resultados apontam indução de migração de células inflamatórias e atividade angiogênica, favorecendo a vascularização do novo tecido que, após 100 dias, apresentou similaridade com a pele nativa, principalmente em relação à estética e elasticidade

(BOUCARD *et al.*, 2007). Há indícios de que a quitosana atue acelerando a proliferação de queratinócitos (CHATELET; DAMOUR; DOMARD, 2001). Testes *in vivo* em ratos indicaram que substratos à base de quitosana e gelatina aceleraram efetivamente o fechamento de feridas com perda de espessura total da pele, observando-se facilidade de descolamento de epiderme após a cicatrização da lesão. As razões indicadas para a melhoria do processo de cicatrização se relacionam com o suporte mecânico e o espaço tridimensional fornecidos pelo substrato para o povoamento de fibroblastos autólogos, induzindo a formação de tecido fibroso e vasos sanguíneos em direção ao centro da lesão (TU *et al.*, 2015). Estudos *in vivo*, realizados em coelhos, revelaram que matrizes de colágeno e quitosana reticuladas com glutaraldeído deram suporte à/ aceleraram a infiltração de fibroblastos de tecidos vizinhos, apresentando bioestabilidade e biocompatibilidade (MA *et al.*, 2003).

Substratos à base de quitosana também foram utilizados para auxiliar na regeneração de tecido hepático e nervoso (DASH *et al.*, 2011).

3.3 Gelatina

A gelatina é um polipeptídeo comercial composto por 18 tipos de aminoácidos, em variadas proporções, contendo cargas positivas e negativas distribuídas não uniformemente pelas cadeias (SAMAL *et al.*, 2012). Ela é um derivado da desnaturação ou desintegração de colágeno, o que gera grandes faixas de pesos moleculares e pontos isoelétricos, dependendo da fonte de colágeno utilizada e do processo de obtenção (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2009). Entre as fontes de colágeno mais utilizadas, podem ser citadas bovinos, suínos e, mais recentemente, peixes. Ela é um dos biomateriais mais conhecidos e, assim como seus derivados, é não tóxica, biocompatível, biodegradável e tem potencial para ser aplicada na síntese de biocompósitos (GORGIEVA; KOKOL, 2011). Entre as substâncias comumente incorporadas à gelatina, estão moléculas orgânicas, fármacos, nanopartículas, DNA e células. Matrizes à base de gelatina têm sido utilizadas como pele artificial, curativos, instrumento para liberação controlada de fármacos e sensores biorresponsivos (HAN, FEI *et al.*, 2014).

A gelatina apresenta menor antigenicidade quando comparada ao colágeno, tendo o vista seu processo de desnaturação, no qual sua estrutura terciária é rompida (NICHOL

et al., 2010). Sua funcionalização pode gerar hidrogéis de diferentes propriedades mecânicas variando-se a densidade de reticulações. No caso de hidrogéis fotoreticuláveis de gelatina funcionalizada, o controle da extensão de reticulações pode ser feito por meio da massa de polímero seco inicial, grau de funcionalização da gelatina, concentração de FI e intensidade e tempo de exposição à luz UV (NICHOL *et al.*, 2010).

Geralmente a gelatina contém alto conteúdo dos aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina, sendo que sua composição depende da fonte de obtenção do colágeno. Estruturalmente, as moléculas de gelatina contêm sequências repetidas de glicina-X-Y, em que X e Y, frequentemente, são os aminoácidos prolina e hidroxiprolina (aminoácido não essencial derivado de prolina). Essas sequências são responsáveis pela tripla estrutura helicoidal da gelatina e pela sua capacidade de formar géis físicos (PB GELATINS, 2010; WEISHARDT INTERNATIONAL –NA *et al.*, 2012)

A Figura 3.3 ilustra as estruturas químicas dos principais aminoácidos presentes na gelatina.

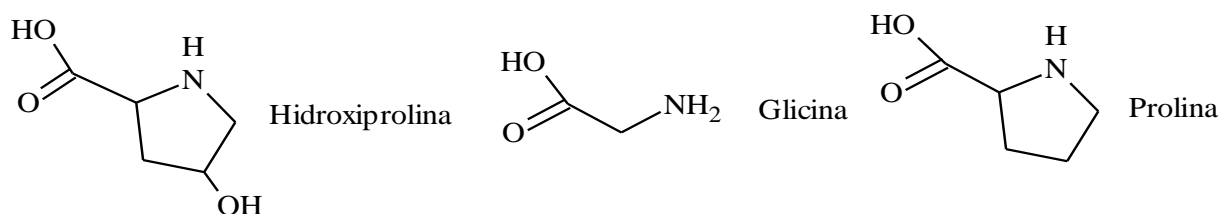


Figura 3.3: Estrutura química dos aminoácidos Glicina, Hidroxiprolina e Prolina.

Fonte: (GALLO, 2016)

Para obtenção da gelatina, um tratamento químico quebra ligações não covalentes, de forma que há uma desorganização da estrutura da proteína que torna o colágeno solúvel. Um tratamento térmico subsequente cliva as ligações covalentes e de hidrogênio para desestabilizar a estrutura em tripla hélice, resultando na conversão do colágeno em gelatina, cuja conformação será uma espiral aleatória (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011). O tratamento químico quebra principalmente ligações cruzadas entre as cadeias, mas pode, ocasionalmente, hidrolisar as cadeias em fragmentos. Assim, uma ampla distribuição da massa molecular é obtida para a gelatina (DJABOUROV; LEBLOND;

PAPON, 1988). No processo de desnaturação/hidrólise, o colágeno, organizado em tripla hélice (tropocolágeno), é hidrolisado nas ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas por via ácida, no caso de colágeno obtido de pele suína (tipo A), ou alcalina, no caso de colágeno proveniente de pele ou ossos de bovinos (tipo B). As gelatinas obtidas por cada processo terão diferentes pontos isoeletrônicos (PI), sendo que gelatina tipo A apresenta PI de 7-9 e a B PI 3,6-5,4 (GORGIEVA; KOKOL, 2011).

O processo alcalino ataca grupos amina de asparagina e glutamina e os hidrolisa em grupos carboxílicos. O resultado é uma gelatina com maior densidade de grupos carboxila, tornando as cadeias mais negativas e baixando, portanto, seu PI. O processo ácido não afeta significativamente os grupos amina (SAMAL *et al.*, 2012). O caráter catiônico da gelatina se manifesta em pH abaixo de seu PI pela protonação dos grupos amina, como pode ser observado na Figura 3.4. A densidade catiônica é maior para gelatina ácida (tipo A) (SAMAL *et al.*, 2012).

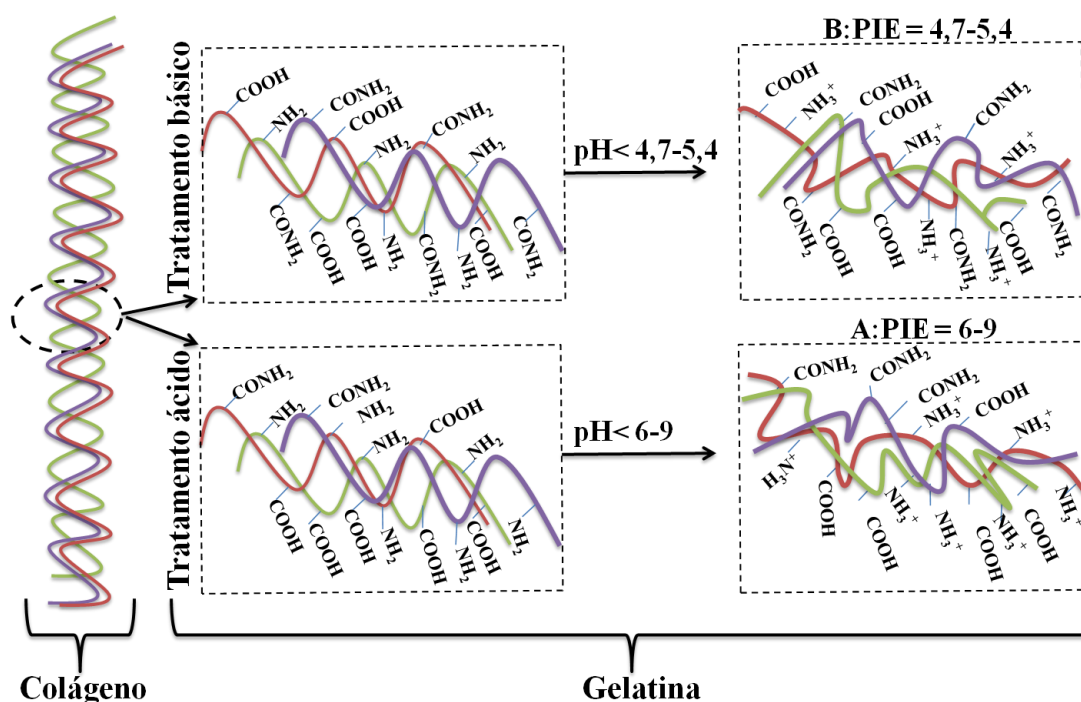


Figura 3.4: Esquema da obtenção de gelatina tipos A e B do colágeno.

Fonte: Adaptado (SAMAL *et al.*, 2012).

O grau de conversão de colágeno em gelatina é dependente da severidade dos tratamentos envolvidos em função do pH, temperatura e tempo de extração (GÓMEZ-GUILLÉN *et al.*, 2011).

O colágeno é resistente a grande parte das proteases e requer enzimas especiais (colagenases) para sofrer hidrólise enzimática. Em contrapartida, a gelatina é sensível a muitas proteases, e não somente a colagenases, que a quebram em peptídeos com 20 ou mais aminoácidos (GORGIEVA; KOKOL, 2011). Apesar de ser um derivado de uma proteína animal, o processo de degradação da gelatina gera produtos metabólicos de pouca resposta antigênica (SANTORO; TATARA; MIKOS, 2014).

A gelatina forma géis físicos em presença de solventes polares capazes de formar ligações de hidrogênio. A gelação termoreversível se dá em temperaturas por volta de 30°C, quando as moléculas de gelatina se associam em uma transição conformacional formando uma tripla hélice. A fase "sol" consiste em cadeias na forma de espirais aleatórias e alguns agregados enquanto, na fase "gel", prevalecem triplas hélices estabilizadas por meio de ligações de hidrogênio, que sustentam uma rede tridimensional interconectada de gelatina (MOHANT; BOHIDAR, 2003; MOHANTY, BISWARANJAN; BOHIDAR, 2005). A formação do hidrogel é acompanhada por um arranjo de ordem e desordem no qual as cadeias de gelatina retomam parcialmente a estrutura tripla hélice do colágeno, levando à formação de gelatina renaturada com regiões amorfas. A gelatina renaturada contém cadeias em espirais aleatórias interconectadas com domínios de microcristalitos. Estes são estabilizados por ligações de hidrogênio entre domínios N-H de glicina (Gli) e C=O de prolina (Pro). A estabilização da conformação molecular e interação inter-hélices são consequências da existência de uma camada hidratada, altamente ordenada, que forma pontes de ligação entre dois grupos da mesma cadeia ou entre cadeias diferentes. As pontes de hidrogênio são responsáveis pelo aumento da temperatura de desnaturação de hidrogéis de gelatina (GORGIEVA; KOKOL, 2011).

A composição da gelatina em termos de aminoácidos difere ligeiramente em relação à sua fonte de obtenção. A gelatina derivada de pele e ossos de porcos, por exemplo, não contém cisteína (Cis), ao passo que a gelatina originária de escamas e espinha de peixe contém menor quantidade de glicina (Gli) em comparação à originária de mamíferos

(ZHANG, X. *et al.*, 2010). Com exceção da gelatina advinda de pele de porco, nenhuma outra contém ácidos aspártico (Asp) e glutâmico (Glu) (GORGIEVA; KOKOL, 2011). Gelatinas provenientes de pele de suínos e bovinos apresentam cerca de 30% de prolina (Pro) e hidroxiprolina (Hip). Gelatinas provenientes de peixes apresentam cerca de 20% desses aminoácidos e, como resultado, a temperatura em que se perde estabilidade térmica é cerca de 5 a 10°C mais baixa para o último caso (FARRIS *et al.*, 2009).

3.3.1 Aplicação da gelatina em engenharia de tecidos

A sequência de aminoácidos RGD (arginina, glicina e aspartato), presente em cadeias de gelatina, é a sequência peptídica mais empregada para estímulo de adesão celular em superfícies artificiais (HERSEL; DAHMEN; KESSLER, 2003). Isso se deve à sua distribuição no organismo, habilidade de se comunicar com vários receptores de adesão celular e no seu impacto biológico na ancoragem e comportamento celular (RUOSLAHTI; PIERSCHBACHER, 1987). Essa sequência de aminoácidos constitui o sítio de reconhecimento celular da maior parte das proteínas da matriz extracelular, como fibronectina e colágeno. Peptídeos contendo a sequência RGD, representada na Figura 3.5, podem então ser aplicados como estimuladores de adesão celular, uma vez que funcionam como sítio específico de ligação com as proteínas que atuam nesse fenômeno (ZHU *et al.*, 2002).

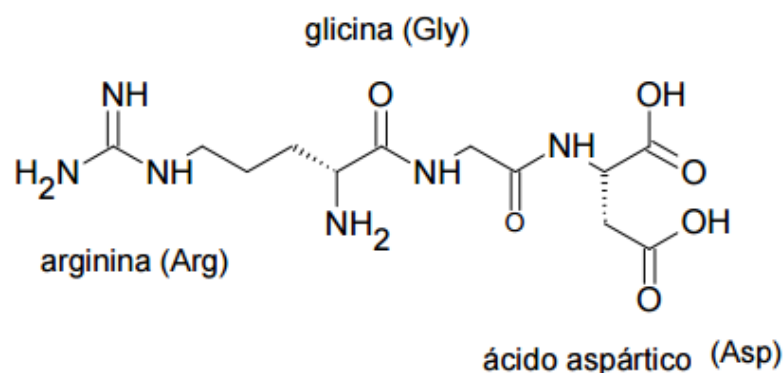


Figura 3.5: Estrutura química da sequência RGD.

Fonte: (VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL; SCHACHT, 2011)

Compósitos envolvendo gelatina têm demonstrado sucesso na liberação de fatores de crescimento em matrizes para promover regeneração tecidual. Criogéis à base de gelatina suportaram o crescimento e a proliferação de uma grande variedade de células

humanas, tais quais fibroblastos, células epiteliais e endoteliais e osteoblastos (VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL; SCHACHT, 2011).

A modificação da gelatina e sua combinação com outros biomateriais demonstram a flexibilidade desse material. Devido ao fato de a gelatina ser derivada do colágeno, esta é frequentemente combinada com GAGs (ZHANG *et al.*, 2007) e/ou com fosfatos de cálcio (VANDERHOOFT *et al.*, 2009), dependendo do tecido visado para regeneração. Polímeros sintéticos tais quais poli(ácido lático) e poliuretanos também são frequentemente combinados com gelatina (VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL; SCHACHT, 2011). Entre as formas de processamento usualmente empregadas para a formação de matrizes porosas à base de gelatina estão *freeze drying* e separação de fases (FAN *et al.*, 2008; VAN VLIERBERGHE, S *et al.*, 2009).

Como agente de liberação de fármacos, a gelatina é versátil graças à sua estrutura que permite sua ligação a biomoléculas carregadas. Selecionando-se tratamento ácido ou básico para obtenção da gelatina, seu ponto isoelétrico pode ser adaptado para maximizar a eficiência do carregamento dependendo das propriedades eletrostáticas da molécula da droga em questão. Além disso, a cinética da liberação depende da taxa de degradação do polímero, que pode ser manipulada dependendo da massa molar e da densidade de ligações cruzadas. A gelatina tem sido utilizada também em engenharia de tecidos, tratamento de câncer e angiogênese (SANTORO; TATARA; MIKOS, 2014).

3.4 Hidrogéis

Como já mencionado, hidrogéis são capazes de absorver grandes quantidades de água sem que se dissolvam. A capacidade de reter água desses materiais se deve à presença de grupos hidrofílicos, como OH, COOH, CONH₂ e CONH em sua cadeia, e aos efeitos de força capilar e pressão osmótica (DERGUNOV; MUN, 2009). Esses materiais apresentam também grande variação de volume entre estados intumescido e colapsado como resposta a estímulos ambientais, como mudança de pH e temperatura (YAN *et al.*, 2011).

Uma das áreas de maior interesse na aplicação de hidrogéis é a de produção de matrizes carreadoras de biomoléculas, como proteínas, fármacos e células. Para esse tipo de

aplicação, normalmente se exige que os géis degradem em condições fisiológicas, o que significa que a rede tridimensional deve se desfazer gerando produtos atóxicos (HENNINK; VAN NOSTRUM, 2012). Hidrogéis podem ser classificados em diferentes grupos dependendo de sua estrutura física (amorfo, semicristalino), de sua carga (iônico ou neutro), de sua reticulação (química ou física), de sua resposta a efeitos externos (sensíveis ou não a estímulo) ou de sua origem (sintético ou natural) (DELIGKARIS *et al.*, 2010; PEPPAS; BURES; *et al.*, 2000). Os hidrogéis ditos naturais são compostos tipicamente por componentes de MEC, como polissacarídeos ou proteínas e, portanto, biocompatíveis e facilmente reconhecidos por células (BALAKRISHNAN; JAYAKRISHNAN, 2005).

No geral, hidrogéis têm pouca tendência a adsorver proteínas de fluídos corpóreos devido à sua baixa tensão superficial (GUPTA, P.; VERMANI; GARG, 2002). No entanto, polímeros naturais, como colágeno, gelatina e GAGs e seus derivados, têm alta afinidade com proteínas presentes no *serum*. A gelatina, por exemplo, apresenta alta afinidade com fibronectina (VAN VLIERBERGHE, SANDRA *et al.*, 2009). Polímeros naturais têm grande potencial de aplicação em engenharia de tecidos justamente devido às propriedades relacionadas à afinidade com proteínas componentes da MEC. Estudos indicam que a adesão celular ocorre preferencialmente em regiões onde há deposição de proteínas da MEC (VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL; SCHACHT, 2011).

Hidrogéis podem ser caracterizados basicamente por três parâmetros: volume de fração polimérica no estado intumescido, massa molar média entre ligações e tamanho de poro (BARROS, 2007). Pode-se estimar o tamanho de poro da rede polimérica por meio de medidas de equilíbrio de intumescimento dos hidrogéis. Esse equilíbrio dependerá da densidade de reticulações que, por sua vez, relaciona-se com a massa molar média entre duas ligações cruzadas (BARROS, 2007).

Além das propriedades da rede polimérica, a composição química do hidrogel também é responsável pelo controle das propriedades bioquímicas do material, incluindo carga, hidrofobicidade e bioatividade. São essas características que influenciam as interações intermoleculares entre as cadeias poliméricas da rede e entre as cadeias e o solvente. Grupos laterais podem influenciar no comportamento do polímero, tornando-o neutro, catiônico, aniônico ou anfótero (PEPPAS; HUANG; *et al.*, 2000). O caráter iônico e o

hidrofílico das cadeias poliméricas afetam o grau de intumescimento e permitem a adaptação de propriedades responsivas a mudanças no pH dependendo do pK_a ou pK_b dos grupos funcionais (KIRSCHNER; ANSETH, 2013).

São várias as estruturas macromoleculares possíveis para hidrogéis, sejam eles físicos ou químicos. Por exemplo, segundo Hoffman (2012):

- Hidrogéis de homopolímeros, reticulados quimicamente ou fisicamente;
- Copolímeros lineares em bloco ou grafitizados;
- Políon multivalente, políon-políon ou complexos unidos por ligações de hidrogênio;
- Redes hidrofílicas estabilizadas por domínios hidrofóbicos;
- Redes interpenetrantes (IPNs);
- Blendas físicas.

3.4.1 Reticulação de hidrogéis

A gelação de um hidrogel consiste na formação da rede de cadeias poliméricas a partir de um número crítico de reticulações. Antes de ela ocorrer, o material é uma mistura fluida e polidispersa de cadeias poliméricas de tamanho finito e monômeros reativos ou moléculas reticuladoras (KIRSCHNER; ANSETH, 2013). Com a gelação, um número crítico de reticulações é formado, resultando em uma matriz 3D. A rede tridimensional dos hidrogéis pode ser formada por meio de reticulações físicas ou químicas de homopolímeros ou copolímeros, sendo possível que a reticulação ocorra durante ou após a polimerização (DELIGKARIS *et al.*, 2010). Reticulações químicas são formadas por ligações covalentes, ao passo que as físicas podem ser regiões cristalinas mais resistentes ou associações reversíveis de cadeias poliméricas, formadas por interações mais fracas (hidrofóbicas, eletrostáticas, dipolo-dipolo) (FARRIS *et al.*, 2009). Copolimerização e ligação cruzada via radicais livres são métodos comumente utilizados para produzir hidrogéis pela reação de monômeros hidrofílicos e agentes reticulantes.

Em copolimerização e reações de reticulação em solução, cadeias poliméricas e/ou monômeros, iônicos ou neutros, são misturados ao agente de reticulação. A reação pode

ser iniciada por radiação UV ou iniciador redox. Os hidrogéis devem ser enxaguados para a eliminação de moléculas não reagidas e outras impurezas. A separação de fases ocorre quando a quantidade de água durante a polimerização é maior que a quantidade correspondente ao equilíbrio de intumescimento. Solventes comumente utilizados incluem água, etanol, misturas de água e etanol e álcool benzílico. O solvente utilizado na síntese deve ser removido com auxílio de água após a formação do gel (AHMED, 2015).

A Figura 3.6 ilustra três mecanismos de formação de redes de hidrogéis via reticulações química, física e enzimática.

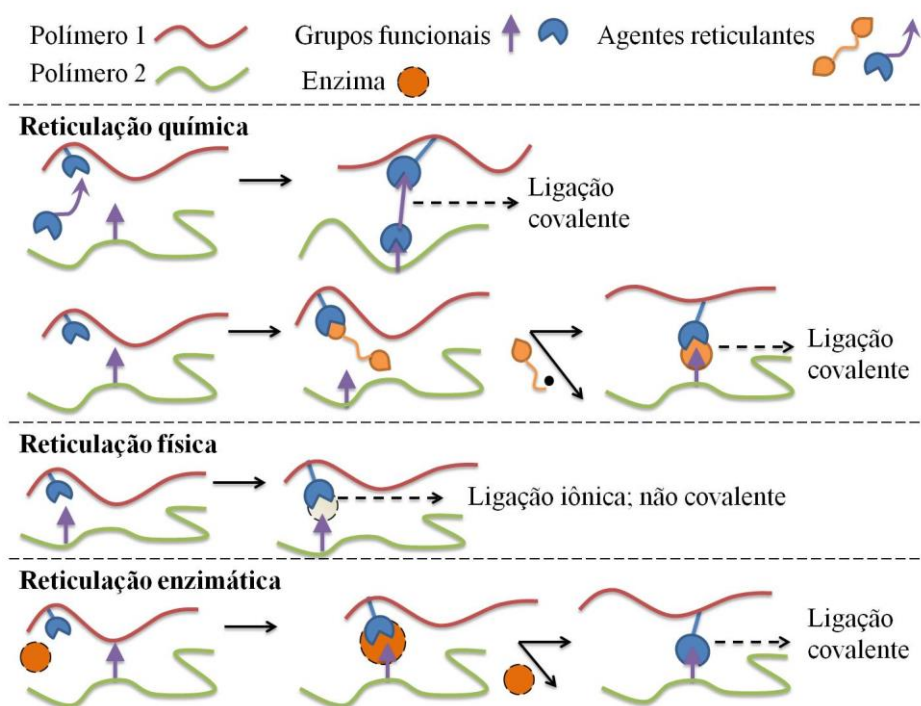


Figura 3.6: Esquema de três mecanismos de formação de redes de hidrogéis poliméricos.

Fonte: Adaptado (REDDY; REDDY; JIANG, 2015)

A reticulação de hidrogéis à base de polímeros naturais ou sintéticos pode ser feita por meio de reações de seus grupos funcionais, tais quais álcool (OH), ácido carboxílico (COOH) e amina (NH₂), e agentes reticulantes, como aldeídos. Existem vários métodos de obtenção de hidrogéis permanentes, entre eles hidrogéis interpenetrantes. Estes podem ser obtidos pela polimerização de um monômero em meio a uma rede já

formada, resultando em redes interpenetradas (GULREZ; AL-ASSAF; PHILLIPS, 2011).

Polímeros em solução aquosa podem formar hidrogéis pela geração e recombinação de radicais livres induzidos por radiação. A polimerização é desencadeada por iniciadores sob radiação (ex. luz UV ou visível), e os radicais formados atacam ligações duplas e se propagam formando a rede polimérica (ALLEN, 1996; FOUASSIER E LALEVEE, 2014; RUTSQUITOSANA *et al.*, 1996; SEGUROLA *et al.*, 1999; TURRO, 1978). Formações de rede por estímulos luminosos são processos versáteis que podem ocorrer em condições ambiente, sendo que o estímulo luminoso é passível de ser controlado remotamente (HUA *et al.*, 2012).

Grande parte das características de um hidrogel está ligada à natureza e à densidade das reticulações da rede. A densidade de reticulações é o número de ligações químicas em um dado volume e controla várias propriedades fundamentais à aplicação do hidrogel como biomaterial. Entre essas propriedades, destacam-se: taxa de intumescimento (Q), módulo de cisalhamento (G) e coeficiente de difusão (D) (MASON *et al.*, 2001; METTERS; BOWMAN; ANSETH, 2001). A Figura 3.7 ilustra a variação das propriedades do polímero de acordo com a densidade de reticulações da rede polimérica. A malha (λ) é uma medida da dimensão dos espaços disponíveis em meio à rede polimérica.

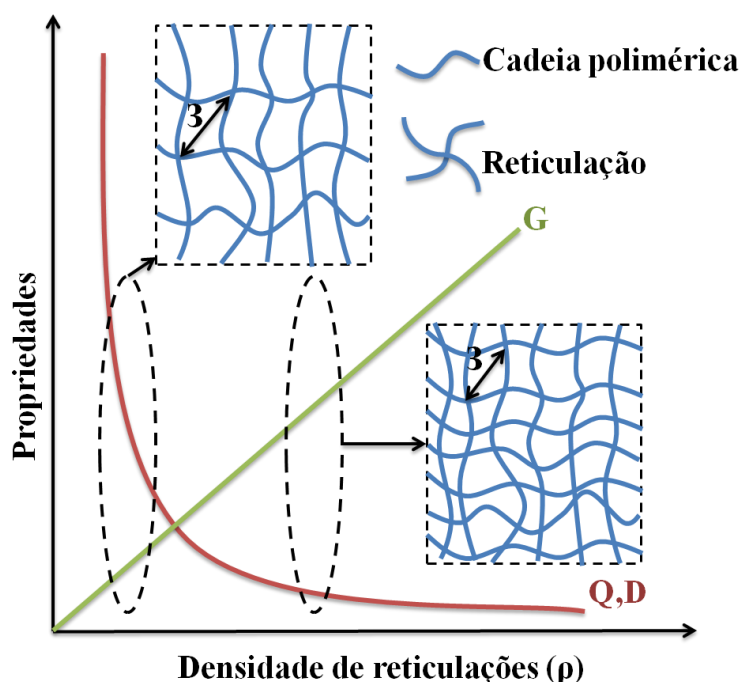


Figura 3.7: Relação entre propriedades do hidrogel e densidade de reticulações da rede. No gráfico, Q representa a taxa de intumescimento, D o coeficiente de difusão e G o modo de cisalhamento

Fonte: Adaptado (KIRSCHNER; ANSETH, 2013).

As propriedades físico-químicas do hidrogel podem ser projetadas para reagir de diferentes formas em meio fisiológico, por meio de mudanças químicas, físicas ou mecânicas na rede polimérica.

Hidrogéis com gelação reversível podem ser utilizados em matrizes para células com degradação parcial, liberação controlada de drogas e/ou agentes biológicos e material responsivo a alterações ambientais (SPERLING, 2006).

Moléculas fotossensíveis podem ser incorporadas a um hidrogel como agentes reticulantes ou como parte de um grupo lateral (BOWMAN; KLOXIN, 2008). Grupos laterais reativos, como tiol ou acrilato, podem ser adicionados ao polímero para participar de reações fotoiniciadas com objetivo de formar reticulações em sua estrutura ou de adicionar a ela moléculas bioativas regulando, assim, propriedades físicas e químicas do material quanto expostos a determinadas condições (KIRSCHNER; ANSETH, 2013). A presença de água induz maior formação de radicais livres. O fenômeno é relacionado à maior mobilidade dos polímeros em solução e à reação

indireta de produtos de hidrólise da água com as macromoléculas (ZHAO *et al.*, 2003). A presença de água é indicada na fotorreticulação de cadeias de gelatina por ser fonte de radicais OH[•], necessários para a reação (HUANG, X. *et al.*, 2013).

A engenharia de tecidos e a medicina regenerativa têm tentado superar limitações de modelos de matrizes de hidrogéis pré-modeladas. Nesse sentido, os hidrogéis injetáveis de cura *in situ* têm ganhado espaço dado que são pouco invasivos cirurgicamente, pela sua capacidade de preenchimento de defeitos irregulares de tecidos lesionados sem causar danos em regiões circundantes (HUA *et al.*, 2012; TAN, H.; MARRA, 2010) e pela possibilidade de inoculação e posicionamento de células e moléculas bioativas em defeitos teciduais de maneira não invasiva (HUA *et al.*, 2012). Entre as vantagens do método, incluem-se ainda facilidade de manipulação, capacidade de preencher completamente defeitos teciduais e permeabilidade (SIVASHANMUGAM *et al.*, 2015).

A fotopolimerização é um processo que possibilita a formação da rede de hidrogel *in situ*, em temperatura e pH fisiológicos. A gelação em condições amenas permite a encapsulação de células entre a rede de forma que elas continuem viáveis (TAN, H.; MARRA, 2010). A produção desse tipo de hidrogel requer a presença de um FI com alta absorvância em comprimentos de onda específicos. Com a absorção, o FI gera radicais livres capazes de promover polimerização da solução, formando o hidrogel de maneira controlável em condições fisiológicas (KAEMMERER *et al.*, 2014; SARAIVA *et al.*, 2015). A seleção do FI para a produção dos hidrogéis é um fator importante dado que vai determinar a intensidade da radiação e o tempo necessário de exposição para a formação da rede. Esses fatores podem causar efeitos danosos sobre células, moléculas bioativas e cadeias poliméricas (LEVETT *et al.*, 2014).

3.4.2 Água em hidrogéis

O comportamento de intumescimento de um sistema de hidrogel é um parâmetro importante que governa sua aplicação, especialmente se ele estiver inserido em áreas como engenharia de tecido, indústria farmacêutica e oftalmologia. A presença de água na superfície de hidrogéis reduz a energia livre interfacial em meio fisiológico e, então, eleva suas propriedades biológicas (PATEL; MEQUANINT, 2011).

A quantidade total de água em um hidrogel e a fração de "água livre" determinam a extensão da absorção e difusão de soluto através do hidrogel. O caráter da água em um hidrogel pode determinar as características gerais de permeabilidade de nutrientes em direção à matriz e a permeabilidade de produtos celulares para fora dela (HOFFMAN, 2012).

Quando uma matriz seca começa a absorver água, as primeiras moléculas a entrarem na matriz hidratam os grupos mais polares/hidrofílicos da rede, levando à chamada água de ligação primária. À medida que os grupos polares vão sendo hidratados, a rede infla e expõe seus grupos mais hidrofóbicos, levando à formação de uma água de ligação secundária. Águas de ligação primária e secundária, juntas, são comumente chamadas de "água total ligada". Mesmo após a total interação dos sítios hidrofílicos e hidrofóbicos com as moléculas de água, a rede continua a absorver água adicional devido à osmose no sentido de promover maior diluição do meio. Essa absorção adicional é dificultada pelas reticulações químicas e físicas, levando a uma força de retração da rede elástica. Nesse ponto, o hidrogel atinge o equilíbrio de intumescimento. A água, absorvida após a total interação iônica (hidrofílica e hidrofóbica) da rede com as primeiras moléculas à permearem o hidrogel, é denominada "água livre" e ocupa o espaço existente entre as cadeias da rede polimérica, poros ou vazios. Poros podem ser formados por separação de fases durante a síntese ou podem aparecer como volumes vazios entre a rede polimérica. O tamanho médio de poros, a distribuição de tamanhos e sua interconectividade são fatores importantes muitas vezes difíceis de quantificar, sendo incluídos em um parâmetro chamado "tortuosidade" (HOFFMAN, 2012).

À medida que a rede intumescer, dependendo da natureza das cadeias ou ligações poliméricas, o gel começa a se desintegrar e a se dissolver em uma taxa dependente de sua composição (HOFFMAN, 2012). O conteúdo final de água em hidrogéis depende de parâmetros cinéticos e termodinâmicos (PATEL; MEQUANINT, 2011).

3.4.3 Cinética de intumescimento de hidrogéis

Embora o estudo da cinética de intumescimento de hidrogéis não seja foco deste trabalho, a compreensão dos parâmetros que influenciam o fenômeno se faz importante, visto que essa propriedade se relaciona não só com a eficiência da matriz em mimetizar

o ambiente extracelular, mas também com a viabilidade, diferenciação e proliferação celular.

O comportamento cinético do hidrogel no intumescimento deve-se principalmente à difusão e capilaridade da água em direção ao interior do hidrogel, sendo que o efeito capilar é mais rápido que o difusional. A ascensão de 1cm de água em um capilar de cerca de 100µm ocorre na ordem de milissegundos. A presença de poros entre 100µm a 300µm com boa distribuição e capilares, extensivamente interconectados em matrizes superporosas, faz do hidrogel um sistema vantajoso para aplicações específicas nas quais se deseja alta absorção. A relaxação da rede, limitada pela interação entre polímero e água, tem um importante papel no processo de difusão (PATEL; MEQUANINT, 2011). Para determinar a natureza da difusão de fluido na direção do hidrogel, dados da extensão do intumescimento ao longo de intervalos definidos podem ser relacionados de acordo com a equação de difusão de Fick (Equação 3.1) (RITGER; PEPPAS, 1987a, b):

$$f = \frac{W_t}{W_\infty} = Kt^n \quad (3.1)$$

em que f é a fração de água presente no hidrogel no tempo t , W_t e W_∞ são a massa do hidrogel no tempo t e no equilíbrio, respectivamente, K é a taxa característica dependente da estrutura do hidrogel e n é um número de transporte que indica se o mecanismo predominante é difusão ou relaxação no processo de intumescimento.

Percebe-se, pela lei de Fick, que a natureza (caráter e estrutura química) e a morfologia (características relacionadas principalmente à porosidade) do hidrogel influenciam as propriedades de intumescimento do material.

Hidrogéis contendo mais de 95% em água são denominados superabsorventes e apresentam grande biocompatibilidade. Esta característica advém da similaridade do material com a MEC tanto em composição como em características mecânicas (DELIGKARIS *et al.*, 2010). Em razão de seu potencial de aplicação biomédica, os hidrogéis estão sendo cada vez mais explorados não apenas para interagir com o corpo e auxiliar na cicatrização natural, mas também para o estudo das interações naturais entre células e interfaces de materiais (KIRSCHNER; ANSETH, 2013). Hidrogéis têm sido

aplicados como materiais-base de implantes estáticos e dinâmicos, matrizes bioativas, dispositivos para liberação controlada de drogas e plataformas para crescimento celular (HOARE; KOHANE, 2008; HUA *et al.*, 2012; KIRSCHNER; ANSETH, 2013).

3.4.4 Sinérese em hidrogéis

A sinérese é a expulsão da água do interior do hidrogel após sua transição para o estado sólido, o que pode levar o hidrogel ao colapso (MARQUARDT, 2014). Durante a polimerização, a sinérese ocorre quando a quantidade de água presente no meio é maior que a presente no equilíbrio de intumescimento. À medida que ocorre a polimerização, o excesso local de água é expulso da rede de polímero formada de modo que se atinja o equilíbrio termodinamicamente favorecido. É possível projetar um material microporoso por meio do efeito da sinérese (pela indução da separação de fases) durante a polimerização de um hidrogel na presença de excesso de água. Devido a fatores cinéticos, é difícil que se obtenha um material totalmente homogêneo. Isso porque o sistema bifásico (intercalação de fases rica em polímero e rica em água) é interligado por meio de ligações covalentes à medida que a rede se forma (BENTON *et al.*, 2009). A porosidade da rede formada, o tamanho dos poros e a espessura de paredes são proporcionais à taxa de polimerização (BENTON *et al.*, 2009).

3.4.5 Hidrogéis à base de quitosana e gelatina

A Quitosana é capaz de, por si própria, formar hidrogéis, sem a necessidade de aditivos (DAVID; DOMARD, 2008), mas é importante salientar que a funcionalização da estrutura da rede, assim como a adição de moléculas bioativas, podem auxiliar no desencadeamento de eventos de interesse para o crescimento do tecido, como estímulo de adesão seletiva, crescimento e diferenciação celular (DUARTE; MANO; REIS, 2009).

São diversas as formas de se obter hidrogéis de quitosana associada a outros materiais, sendo que a rede tridimensional pode ser originada por meio de ligações reversíveis, no caso de associações físicas, ou irreversíveis, por meio de ligações covalentes (DASH *et al.*, 2011).

Ligações físicas envolvem interações eletrostáticas, hidrofóbicas e ligações de hidrogênio (BERGER *et al.*, 2004). Estas podem ser dependentes de parâmetros tais quais pH, concentração e temperatura, o que gera certa instabilidade e faz desse tipo de gelação um processo reversível (CROISIER; JÉRÔME, 2013). Devido à natureza policatiônica da quitosana em meio ácido, podem-se obter hidrogéis por meio de ligações eletrostáticas tanto com pequenos poliânions quanto com polieletrólitos (BHATTARAI *et al.*, 2005) e outras moléculas carregadas negativamente. A força da interação será proporcional à quantidade de segmentos D-glucosaminas (unidades protonáveis da quitosana) e da concentração de íons. Grandes moléculas negativamente carregadas, como alguns polímeros naturais ou sintéticos, são capazes formar hidrogéis com quitosana. Dentre os naturais merecem destaque gelatina, colágeno, queratina e albumina (MAO *et al.*, 2004; YIN *et al.*, 1999). A limitação do uso de hidrogéis, envolvendo apenas ligações eletrostáticas, reside na instabilidade do conjunto em condições fisiológicas e na dificuldade de controle dos poros (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

Hidrogéis contendo redes quimicamente reticuladas são mais estáveis e apresentam gelação irreversível. A formação da rede envolve modificação da cadeia da quitosana e pode, portanto, alterar suas propriedades iniciais, sobretudo aquelas que se relacionam aos grupos amina envolvidos na reação. É preciso atentar sobre a possibilidade de resíduos tóxicos originários da reação de reticulação. Essa reação pode ocorrer com a participação de polímeros ou pequenas moléculas polifuncionais, como agentes de reticulação. Outra possibilidade é a alteração da cadeia de quitosana com adição de grupos funcionais antes da indução da reticulação, que pode ser iniciada por radiação ou catalisada por enzimas. Como os grupos amina são normalmente mais reativos que os grupos hidroxila (a depender das condições do meio de reação), a maior parte das reações de reticulação devem ocorrer nessas regiões. Considerando que alterações da cadeia, principalmente dos grupos amina, são capazes de alterar as propriedades da quitosana, recomenda-se utilizar de cadeias de quitosana com alto grau de desacetilação como matéria-prima (CROISIER; JÉRÔME, 2013).

A Figura 3.8 ilustra a formação de hidrogéis de quitosana de reticulações físicas por interações iônicas, secundárias, hidrofóbicas ou formação de cristais.

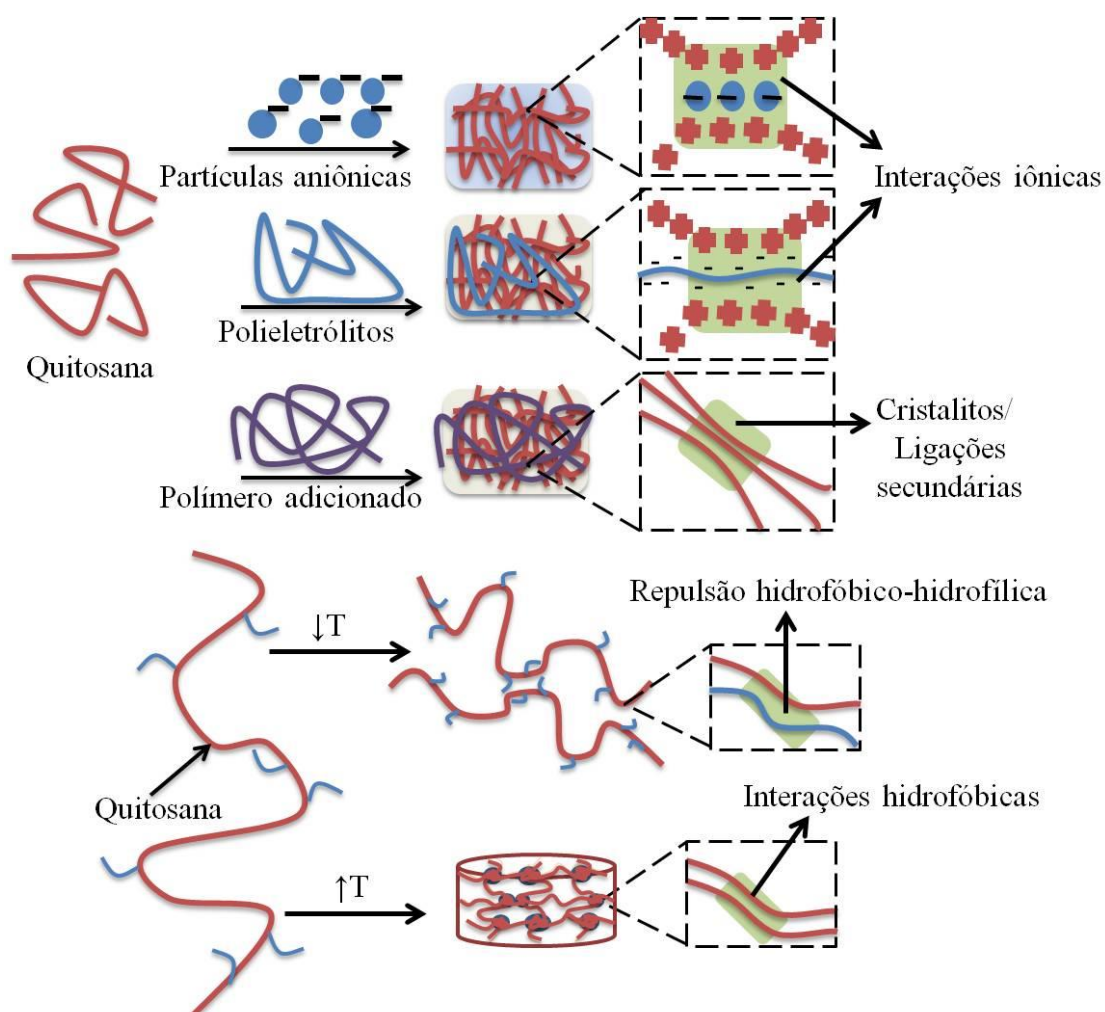


Figura 3.8: Reticulação física em hidrogéis à base de quitosana.

Fonte: Adaptado (DASH *et al.*, 2011).

Quando o objetivo é a recuperação e/regeneração de lesões na pele, constituintes de matriz extracelular, como colágeno e derivados, são frequentemente adicionados a matrizes de quitosana (CHEN *et al.*, 2009; FAIKRUA *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2009). Foi constatada a eficiência de hidrogéis físicos e acelulares de quitosana na regeneração de pele após queimaduras de terceiro grau em pele de suínos com recuperação permanente de derme e epiderme, mantendo funcionalidade e estética similar à da pele não lesionada (BOUCARD *et al.*, 2007).

A adição de quitosana à gelatina aprimora as propriedades mecânicas da gelatina e influencia a taxa de degradação do material. Por um lado, a quitosana com alto grau de desacetilação, modificada ou em conjunto com gelatina, apresenta maior

citocompatibilidade, aumenta a proliferação e reduz a apoptose celular. Por outro lado, cadeias flexíveis negativamente carregadas de gelatina reduzem a adesão celular induzida pela natureza catiônica da quitosana por meio de neutralização da carga. Como resultado, há maior mobilidade celular na superfície do material (MAO *et al.*, 2004; YUAN *et al.*, 2004). Redes tridimensionais de quitosana e gelatina têm sido extensivamente estudadas devido à sua processabilidade para formação de matrizes porosas exibindo citocompatibilidade e resposta celular favorável (MAO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2003).

Relatou-se que matrizes de gelatina e quitosana são promissoras quanto à aplicação como biomateriais para engenharia de tecido, a fim de serem usadas em diversas áreas como liberação controlada de drogas, curativos, suturas entre outras (LEE *et al.*, 2005; PULIERI *et al.*, 2008).

Hidrogéis de gelatina são promissores para aplicação em cultura celular *in vitro* e engenharia de tecidos, isso porque a gelatina é originária de um componente de matrizes extracelulares, tem sequências RGD e é um material de fácil acesso e baixo custo.

A adição de gelatina à quitosana para a formação de hidrogéis é promissora em relação ao desempenho biológico, já que contém sequências similares a sequências RGD, que promovem migração e adesão celular (BELLIS, 2011). A aplicabilidade de matrizes de quitosana e gelatina se baseia nas propriedades mecânicas e antimicrobianas da quitosana, de adesão celular da gelatina e suas características comuns tais como biocompatibilidade e biodegradabilidade (RATHNA, 2008). Estudos envolvendo hidrogéis de quitosana e gelatina foram feitos para avaliar a eficiência da combinação na regeneração de pele, cartilagem e osso (SARAIVA *et al.*, 2015). Hidrogéis compósitos de quitosana e gelatina também foram preparados para recuperação de tecido hepático (JIANKANG *et al.*, 2009). Biopolímeros, projetados a partir de reticulações químicas entre quitosana e gelatina, mostraram-se eficientes também no crescimento e na proliferação da população de células-tronco epiteliais límbicas (DE LA MATA *et al.*, 2013). Estudos do efeito de hidrogéis fotoreticulados de quitosana e gelatina na cicatrização de feridas de espessura total na pele de ratos revelaram a capacidade do material de auxiliar na recuperação do tecido lesionado. O uso do

hidrogel nas regiões de lesão acelerou contração e fechamento da lesão em relação ao grupo-controle (ISHIHARA *et al.*, 2001, 2002).

3.4.6 Fotoquímica e fotofísica de reticulação

A fotoquímica envolve reações iniciadas por incidência luminosa no sistema. A energia é absorvida ou emitida pela matéria de forma discreta por meio de fótons. O resultado da interação da radiação com a matéria depende diretamente da energia incidente. Esta é associada ao comprimento de onda da radiação eletromagnética, como pode ser observado na Equação 3.2:

$$E = h\nu \quad (3.2)$$

em que E representa energia da radiação incidente, h é a constante de Planck e ν a frequência da radiação.

A absorção da luz leva à excitação eletrônica, tirando espécies de seu estado de equilíbrio, conduzindo-as a um estado excitado e podendo formar radicais livres. Estes iniciam o processo de foto polimerização/fotorreticulação.

Geralmente a absorção da luz resulta em formação de radicais livres por dois caminhos (ODIAN, 2004):

1. Um composto presente no sistema é excitado pela absorção e se decompõe em dois radicais.
2. Um composto presente no sistema é excitado pela absorção de luz e interage com um segundo composto (por transferência de energia ou reação redox) para formar radicais derivados do segundo composto e/ou do original.

A eficiência e as consequências do processo dependem da estrutura química das moléculas envolvidas e de suas concentrações relativas, da energia (proporcional à frequência e inversamente ao comprimento de onda) e da intensidade da luz (DAVIS; BURDICK; ANSETH, 2003). Pelo fato de a absorção da luz gerar espécies excitadas, várias reações foto iniciadas podem ocorrer, sendo que a eficiência das reações depende da sua competição com fenômenos de desativação térmicos e/ou radioativos (fluorescência e fosforescência) (HE; SUSANTO; ULBRICHT, 2009).

A Tabela 3.2 relaciona energia, comprimento de onda e frequência de diferentes tipos de radiação.

Tabela 3.2: Energia, comprimento de onda e frequência de diferentes faixas de radiações eletromagnéticas.

Tipo de radiação	Comprimento de onda $\lambda = \text{nm}$	Energia $E = \text{Kcal mol}^{-1}$	Frequência $\nu = \text{Hz} = \text{s}^{-1}$
Ultravioleta (UV)	200-400	140-70	$1,5 \times 10^{15}$ a $7,5 \times 10^{14}$
Violeta	~400	70	$7,5 \times 10^{14}$
Verde	~500	60	$6,0 \times 10^{14}$
Vermelho	~700	40	$5,0 \times 10^{14}$
Infravermelho próximo (NIR)	~1000	30	$3,0 \times 10^{14}$

Fonte: (TURRO, 1978)

3.4.7 Estado fundamental, estados excitados e orbitais moleculares

Um estado eletrônico é uma configuração particular de elétrons: a configuração de mais baixa energia, na qual elétrons de mais baixa energia ocupam os orbitais de mais baixa energia (dois elétrons por orbital), é o estado fundamental. Todas as outras possibilidades de configuração eletrônica determinam estados excitados. Os orbitais descrevem a localização e a energia de elétrons individuais, estados descrevem a energia total e a configuração eletrônica geral de uma molécula (CUMMINGS, 2008).

Toda molécula possui diferentes estados eletrônicos, orbitais moleculares e níveis de energia correspondentes a cada estado eletrônico. Os orbitais podem ser classificados em diferentes tipos: π e σ (ligantes), n (não ligante), π^* e σ^* (antiligantes). Os orbitais antiligantes possuem maior energia que seus correspondentes ligantes. Diferentes transições podem ocorrer entre os orbitais quando os elétrons são excitados, como $n \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$, $\sigma \rightarrow \sigma^*$, etc. As transições são governadas por funções baseadas na mecânica quântica (DOGRA, 2007).

A Figura 3.9 esquematiza diferentes transições eletrônicas possíveis para ligações entre carbonos.

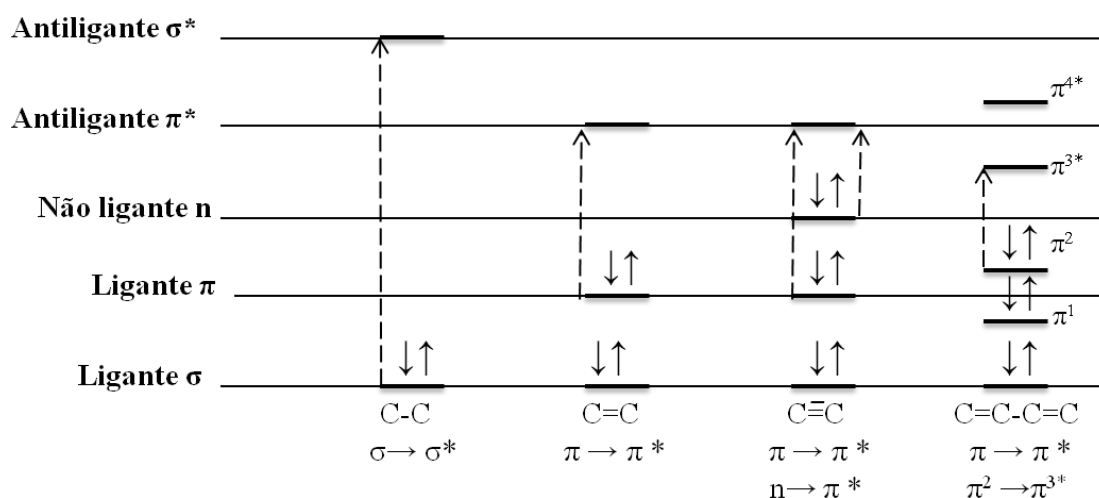


Figura 3.9: Transições eletrônicas possíveis para ligações entre carbonos.

Fonte: (DOGRA, 2007).

Nota-se pelo diagrama da Figura 3.9 que a diferença de energia (ΔE) entre orbitais segue a seguinte ordem: $\Delta E (n \rightarrow \pi^*) < \Delta E (\pi \rightarrow \pi^*) < \Delta E (\sigma \rightarrow \sigma^*)$, i.e. $\lambda_{\text{máx}} (n \rightarrow \pi^*) > \lambda_{\text{máx}} (\pi \rightarrow \pi^*) > \lambda_{\text{máx}} (\sigma \rightarrow \sigma^*)$. A transição $\sigma \rightarrow \sigma^*$ é geralmente observada em vácuo (DOGRA, 2007).

3.4.8 Fotorreticulação

Técnicas de fotopolimerização fornecem um grande número de vantagens quando comparadas a técnicas térmicas, incluindo velocidade de cura, baixa energia, reação em temperatura ambiente ou próxima a ela, formulações sem solvente e baixo custo (FERREIRA *et al.*, 2011).

Reações fotoquímicas de reticulação, em um senso geral, são aquelas induzidas por radiação UV (100–400nm), visível (400–760nm) e infravermelha (780–20000nm). Reações fotoinduzidas ocorrem majoritariamente em moléculas em estado excitado e a eficiência quântica (razão entre a quantidade de reagente consumido ou produto formado e a quantidade de fótons absorvidos, cada um com energia específica $E = h\nu$), é a medida da eficiência da fotoreação (sendo o máximo de eficiência quântica para reações simples igual a 1) (HE; SUSANTO; ULBRICHT, 2009).

A cura via radiação UV é um processo que transforma um monômero multifuncional em um polímero reticulado por reações em cadeia, iniciadas por espécies reativas, que

podem ser radicais livres ou íons, geradas pela radiação. Grande parte dos monômeros, quando submetidos à radiação, não produzem espécies reativas o suficiente para a reação, devendo um FI ser adicionado à formulação. Um FI eficiente deve ter alta absorção na região de emissão da fonte luminosa e gerar espécies reativas com um máximo possível de rendimento quântico (HE; SUSANTO; ULBRICHT, 2009).

O espectro de absorção do FI é um fator crucial no sistema de fotoiniciação: o intervalo de comprimento de onda de absorção do FI deve ser compatível ao espectro de emissão da fonte luminosa.

A absorvidade molar, ϵ , do grupo cromóforo determina o valor da intensidade da luz absorvida I_{abs} de um feixe de luz de intensidade I_0 em um dado comprimento de onda λ . Consequentemente, uma alta absorção é alcançada quando se usam moléculas que possuem elevado coeficiente de extinção, ou absorvidade molar (ϵ), e que são capazes de absorver radiação na região de emissão da fonte (ALLEN, 2010).

As transições $\pi \rightarrow \pi^*$ possuem elevados ϵ , contrariamente às transições $n \rightarrow \pi^*$, de baixo ϵ . A polaridade do solvente afeta a banda de absorção do FI. Geralmente, bandas de absorção associadas a transições $\pi \rightarrow \pi^*$ deslocam-se para regiões de maior comprimento de onda quando a polaridade do solvente aumenta (LIU *et al.*, 2014). Isso porque, se o estado excitado é polar, ele pode ser estabilizado pelo solvente, baixando, desse modo, sua energia e, consequentemente, a energia de transição (KUMAR, 2006; TOWNSEND, 2011).

Reações em cadeia iniciadas por radiação UV têm maiores taxas de iniciação quando comparadas àquelas desencadeadas por energia térmica (DECKER, 1996). A medição da taxa de reticulação pode ser feita por métodos tais quais FTIR, em tempo real ou convencional, fotocalorimetria (Foto-DSC) (ALLEN, 1996), UV-Vis (MANSUR, H. S.; MANSUR, 2011; SOLOMONS; FRYHLE, 2001), entre outros.

O mecanismo básico para a fotorreticulação por meio de radicais livres envolve a formação dos radicais pela absorção da luz pelo FI. Os radicais ativos atacam sítios do polímero mais propensos à reação (ex. maior facilidade de abstração de átomo de hidrogênio ou insaturações), que leva a uma posterior ligação entre átomos de diferentes cadeias, formando a reticulação. Na presença de oxigênio, há a possibilidade de

formação de hidroperóxidos. Nesse caso, o FI age como doador e transfere energia absorvida aos peróxidos (BOUSQUET; FOUASSIER, 1983).

A Figura 3.10 ilustra o mecanismo de reação entre um FI que se dissocia de seu estado excitado tripleto e uma cadeia polimérica.

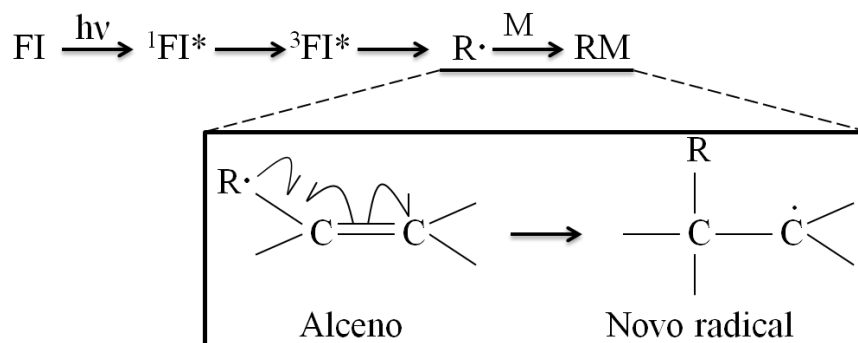


Figura 3.10: Mecanismo de reação possível entre um FI e uma cadeia polimérica.

Fonte: Adaptado (ALLEN, 2010).

A interação da radiação com a matéria envolve fenômenos físico-químicos que podem ser divididos em três etapas: física, físico-química e química (LOPERGOLO, 2002):

- A etapa física envolve a transferência de energia da radiação para o átomo ou molécula, resultando em excitação eletrônica e ionização. As espécies energizadas são instáveis e ocasionam reações secundárias na própria molécula ou com moléculas vizinhas.
- A etapa físico-química envolve a formação de espécies secundárias reativas.
- A etapa química inicia-se quando há reestabelecimento do equilíbrio térmico afetado na transferência de energia da radiação para o sistema. Nessa fase, há reação entre as moléculas reativas.

Análises cinéticas durante o estado estacionário indicam que a taxa de polimerização por um radical livre, induzido por radiação, é proporcional à raiz quadrada da intensidade da luz, o que indica que a reação é controlada por terminações entre duas moléculas. As propriedades fotoquímicas e fotofísicas dos iniciadores são, portanto, importantes no controle da reatividade da fotorreticulação. Entre as propriedades desejadas, pode-se citar: alta absorção na região de ativação; que depende da fonte

utilizada; alto rendimento quântico do radical formado; solubilidade adequada na resina utilizada no sistema; estabilidade durante o armazenamento; não apresentação de odor ou amarelamento; ser de fácil manipulação; preço acessível e atoxicidade (ALLEN, 1996).

Há duas categorias principais de FI: Tipos I e II. O tipo I sofre fotofragmentação (clivagem α na carbonila, mais comum, ou β , na alquila), quando absorve radiação na frequência adequada, iniciando a formação de radicais livres capazes de induzir polimerização/reticulação. O Irgacure 2959 [2-hidroxil-4-(2-hidroxietóxi)-2-metilfenona] é um FI tipo I que sofre clivagem dividindo-se em radicais cetil e benzoil. Ele apresenta alta eficiência para sistemas de cura UV e é amplamente utilizado devido à sua baixa toxicidade (WILLIAMS *et al.*, 2005), volatilidade e baixo odor e amarelamento (BENEDIKT *et al.*, 2015; MA *et al.*, 2014). Um FI tipo II sofre, primeiramente, um processo de abstração de um átomo de hidrogênio de alguma outra molécula do meio, podendo ser do solvente ou do polímero. Normalmente, usam-se aminas terciárias para aumentar a eficiência do processo (SEGUROLA *et al.*, 1999).

A esquematização do sistema de clivagem de FI de tipo I é representada na Figura 3.11.

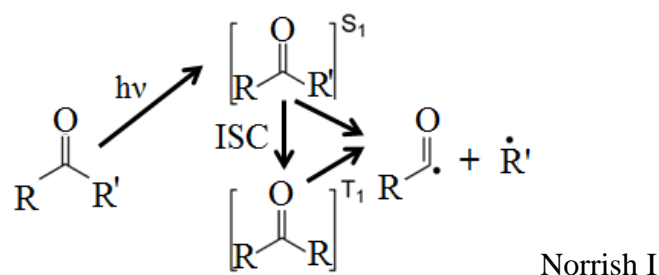


Figura 3.11 Ilustração do mecanismo de foto clivagem de FI tipo I.

3.4.9 Fotoiniciadores

Há uma gama de FI disponíveis no mercado para auxiliar a fotorreticulação de espécies poliméricas, entre os quais se pode citar o Irgacure 2959, Irgacure 651 (2,2-dimetoxi-2-fenilacetofenona), Irgacure 184 (1-hidroxi-ciclohexil-fenil-cetona).

A seleção do FI é um ponto determinante na produção do hidrogel visto que influencia a intensidade e o tempo de exposição à radiação (JEON *et al.*, 2009; LEVETT *et al.*, 2014). Esses fatores podem prejudicar células e biomoléculas além de influenciar propriedades mecânicas da rede (NGUYEN, 2002). A toxicidade do FI também é um fator de peso na determinação do sistema de fotorreticulação, devendo-se levar em consideração que há variação na citotoxicidade de um composto dependendo do tipo de célula envolvida no processo. As espécies reativas formadas pela clivagem dos FI oferecem risco às células e outras moléculas bioativas possivelmente presentes no meio visto que pode haver algum tipo de interação que prejudique suas atividades (Fedoroviquitosana *et al.*, 2009). Diferentes tipos celulares reagem de diferentes formas na presença de um mesmo FI (WILLIAMS *et al.*, 2005).

A avaliação da toxicidade de três FI frequentemente utilizados (Irgacure 2959, Irgacure 184 e Irgacure 651) em seis diferentes linhagens celulares indicou que Irgacure 2959 e 184 são indicados para fotorreticulação de materiais para engenharia de tecidos (WILLIAMS *et al.*, 2005). Especula-se que a citotoxicidade dos compostos se relaciona com sua hidrofobicidade, uma vez que a permeabilidade da bicamada de fosfolípidios das membranas celulares aumenta com a hidrofobicidade do composto. O resultado do estudo corrobora com a hipótese uma vez que o FI Irgacure 651, mais hidrofóbico devido aos seus dois grupos fenila apolares, mostrou-se mais tóxico, enquanto o Irgacure 2959, mais hidrofílico, revelou-se como o menos tóxico dos três. O Irgacure 2959 foi bem-tolerado por todas as seis linhagens celulares analisadas no estudo (WILLIAMS *et al.*, 2005).

3.4.10 Considerações sobre os componentes do sistema: FI, grupos funcionais e radiação.

A principal vantagem de uso sistemas de fotorreticulação é que a reticulação química só ocorre durante a exposição ao estímulo e, uma vez iniciada, a duração e a intensidade da reação podem ser controladas de acordo com o desejado (MIRONI-HARPAZ *et al.*, 2012). Especula-se que reações rápidas de reticulação tenham efeito positivo na reticulação *in vivo*, primeiramente por possibilitarem a cura em um ambiente rico em proteínas, e, também, por favorecerem a ligação entre grupos poliméricos nos grupos

vinil em detrimento de ligações em proteínas, protegendo, assim, as células residentes (MIRONI-HARPAZ *et al.*, 2012).

Embora grupos vinil reajam preferencialmente quando se inicia a polimerização via radicais livres, ligações C=C, presentes em outras posições da cadeia, também podem ser atacadas. Concentrações indicadas para alguns FI conhecidos, como no caso do Irgacure 2959, variam de 0,05% a 0,5% m/v. Estudos indicam um aumento gradual nas propriedades mecânicas para aumento de concentrações de FI até 0,2% m/v, não havendo grandes ganhos no módulo para valores superiores (BARTNIKOWSKI *et al.*, 2015).

A concentração do iniciador também tem relação direta com o tamanho dos poros no hidrogel tendo em vista que influencia na densidade de reticulações (BENTON *et al.*, 2009). Uma maior concentração de FI resulta em menor tamanho médio de poros, como pode ser observado na Figura 3.12. No experimento relativo à Figura 3.12, amostras de gelatina modificada com grupos metacrilamida foram reticuladas na presença de diferentes concentrações de Irgacure 2959.

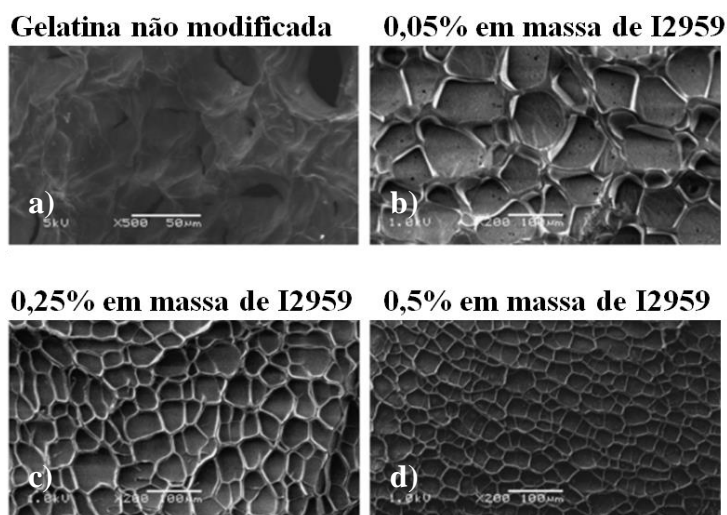


Figura 3.12: Imagens de MEV de redes de gelatina pura, item a) ou modificada com grupos metacrilamida, itens b), c) e d), formadas em diferentes proporções de Irgacure 2959 (I2959).

Fonte: (BENTON *et al.*, 2009).

A formação dos poros deve ser resultado da separação de fases na polimerização visto que esse tipo de estrutura não é observado em hidrogéis físicos naturais de gelatina (BENTON *et al.*, 2009).

A utilização de concentração de FI e/ou intensidade de radiação abaixo das ideais pode prejudicar a formação da rede polimérica, resultando em propriedades mecânicas inferiores ao desejado para o hidrogel. Comparativamente, a citocompatibilidade pode ser comprometida se houver exposição prolongada à presença de radicais livres citotóxicos ou se houver aumento excessivo de radicais em solução. Ambos os fatores dependem do tipo e da concentração do FI e da intensidade da radiação. Deve-se, então, otimizar as condições de fotopolimerização para alcançar a extensão desejada da rede polimérica sem prejudicar a encapsulação de células (caso seja o propósito do sistema) (MIRONI-HARPAZ *et al.*, 2012).

Não se sabe ao certo se a ameaça às células, eventualmente presentes no sistema quando da reticulação, relaciona-se predominantemente à exposição à radiação UV ou à ação excessiva de radicais livres durante o processo de formação da rede.

Um estudo sobre o efeito da concentração de FI (em relação à quantidade de grupos funcionais substituídos na gelatina metacrilamida) e da incidência de radiação UV na viabilidade celular de condrócitos concluiu que a concentração de FI deve ser ajustada para que haja excesso de grupos funcionais reativos nas cadeias poliméricas. O estudo concluiu também que a dosagem de radiação UV aparenta ter menores efeitos no comportamento celular quando comparado à toxicidade do FI em concentrações mais elevadas (BARTNIKOWSKI *et al.*, 2015). Na ausência de um radical iniciador, exposições por tempos relativamente curtos à radiação UV com comprimentos de onda relativamente longos (até 5 minutos com intensidade de 20mWcm^{-2} e comprimento de onda de 365 nm) não demonstraram toxicidade às células (MIRONI-HARPAZ *et al.*, 2012).

Um estudo, envolvendo fotorreticulação de poli(etileno glicol) funcionalizado com grupos acrilatos, revelou que entre os fatores que mais afetam propriedades mecânicas dos hidrogéis, estão o tipo e a concentração de FI, a concentração dos precursores e a intensidade da luz à qual o material é exposto na fotopolimerização. Para dada

concentração de FI e intensidade da luz, por exemplo, um aumento na concentração dos precursores resulta em maior módulo de armazenamento e tempo de gelação. Para uma concentração constante de precursores e aumento na intensidade da luz ou da concentração de FI, o módulo de armazenamento se revelou com um comportamento bifásico: inicialmente a taxa de iniciação e de geração de radicais aumenta, levando a uma maior eficiência na reticulação e à formação do gel. No entanto, se a geração de radicais aumenta demasiadamente, como em casos em que há altas concentrações de FI, há redução da eficiência de reticulação (MIRONI-HARPAZ *et al.*, 2012).

A compreensão da correlação entre o FI (suas características e concentração), as condições de radiação da luz (intensidade, tempo e energia) e as características finais da rede devem ser ajustadas para otimizar o sistema de modo que se obtenham hidrogéis com propriedades mecânicas adequadas e um máximo possível de viabilidade celular.

3.5 Uso de ácido ascórbico como desativador de radicais livres oriundos da exposição à radiação UV.

Os radicais livres podem estar presentes no sistema de fotorreticulação mesmo após a retirada da fonte de radiação, causando, talvez, danos à estrutura tridimensional almejada ou prejudicando células ou moléculas bioativas possivelmente presentes. Entre os mecanismos de morte celular devido à ação dos radicais livres, incluem-se a formação de espécies reativas quando da interação dos radicais com fosfolipídios e peroxidação de lipídios, que resultam em danos a proteínas e ao DNA. Também a quantidade de radicais livres formados por mol de iniciador, os produtos laterais de cada reação de fotoiniciação e a estabilidade dos radicais formados afetam a toxicidade do composto (WILLIAMS *et al.*, 2005).

Adicionando-se ao meio moléculas que atuem como antioxidantes ou desativadoras de estados excitados, inibe-se a ação de radicais livres. Um exemplo, natural e atóxico, é o ácido ascórbico. Sua capacidade de agir impedindo a proliferação de radicais livres é comprovada há décadas, podendo a molécula atuar, por exemplo, na desativação de moléculas reativas de oxigênio (CHOU; KHAN, 1983). A toxicidade do ácido ascórbico é mínima na maioria dos indivíduos e das condições. Ocorrendo a possibilidade de haver variação de toxicidade dependendo do indivíduo e de seu estado oxidativo. Além

disso, esse ácido é livremente filtrado no glomérulo de espécies animais que sintetizam a molécula, e também naqueles que têm uma dependência dietética da molécula como vitamina (ROSE; BODE, 1993).

O ácido ascórbico pode ser encontrado em diversos sistemas incluindo, entre outros, biomanufatura e engenharia de tecidos (SIGMA-ALDRICH, [S.d.]). Sua estrutura química permite que ele se oxide e se reduza reversivelmente em reações envolvendo átomos de oxigênio associados aos seus carbonos 2 e 3. Em meio fisiológico, ele existe primariamente como ânion ascorbato (ROCHA, M. F. G., 2009; ROCHA, M. F.; MANSUR; MANSUR, 2010).

Em sistemas *in vitro*, o ácido ascórbico é instável e reduz outros radicais que possam estar presentes, tais como hidroxil, alcoxil, peroxil, tocoferol, urato e íons ferro e cobre. Sua oxidação é praticamente instantânea e ele se torna um radical ascorbato com a perda de um elétron. O ácido ascórbico pode sofrer diferentes reações *in vitro*, incluindo (SIGMA-ALDRICH, [S.d.]):

- perda de outro elétron, de modo a formar desidroascorbato;
- ganho de outro elétron e um próton para regenerar o ânion ascorbato;
- reação com outro radical para formar um composto estável;
- dismutação, junto à outro radical ascorbato, para formar um ânion ascorbato e uma molécula desidroascorbato.

A Figura 3.13 ilustra a oxidação do ácido ascórbico em desidroascorbato.

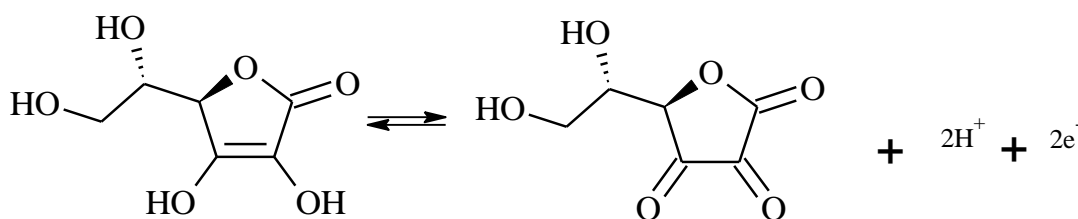


Figura 3.13 Oxidação do ácido ascórbico em desidroascorbato.

3.6 Caracterização de materiais e matrizes polimérica

As subseções seguintes tratam de técnicas de caracterização úteis para o estudo das

propriedades de hidrogéis destinados à utilização em sistemas biológicos.

3.6.1 Titulação potenciométrica

A titulação potenciométrica é um método prático e direto para caracterização da quitosana e, embora apresente certas limitações (BALÁZS; SIPOS, 2007), é um método útil por exigir pouca infraestrutura. Há uma série de formulações que conduzem ao resultado final da titulação, que envolve quantificar os grupos amina protonados em meio ácido através da titulação com uma base forte. A diferença entre os volumes de base gastos para neutralizar o excesso de ácido do meio e para neutralizar as aminas protonadas das unidades desacetiladas da quitosana permite a determinação do GD do material (TOLAIMATE *et al.*, 2000).

Entre os métodos matemáticos utilizados para determinação de GD, está a titulação linear. Esta extrapola a curva de titulação do excesso de ácido do meio para tentar eliminar erros causados pela precipitação da quitosana em $\text{pH} > 6$ (CZECHOWSKA-BISKUP *et al.*, 2012; JIANG; CHEN; ZHONG, 2003; TAN, S. C. *et al.*, 1998). Existem também fórmulas que levam em conta o volume de base utilizado para neutralizar apenas o excesso de ácido do meio (COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008), e fórmulas que levam em conta a diferença entre os volumes de base utilizados para neutralizar excesso de ácido e grupos amina protonados da quitosana (COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008; GUPTA, K. C.; JABRAIL, 2006; TOLAIMATE *et al.*, 2000; TORRES, 2006).

A Tabela 3.3 resume algumas fórmulas desenvolvidas/empregadas por diversos autores para determinação do GD da quitosana por titulação potenciométrica.

Tabela 3.3: Fórmulas utilizadas por diversos autores para determinação do GD da quitosana por titulação potenciométrica.

Método	Fórmulas	Termos	Autores que utilizaram o método
I	$DD(\%) = \frac{C_b \times (V_2 - V_1) \times 161}{w} \times 100$	<p>Nb = concentração da base em mol/L.</p> <p>V_1 = volume do primeiro ponto de inflexão.</p> <p>V_2 = volume do segundo ponto de inflexão.</p>	(COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008; TORRES, 2006)

		W = massa da amostra.	
II	$DD(\%) = \left(\frac{203Q}{1 + 42Q} \right) \times 100$ $Q = \frac{C_a(V_2 - V_1)}{w}$	<p>V₁ = volume do primeiro ponto de inflexão. V₂ = volume do segundo ponto de inflexão. w = massa da amostra.</p>	(CZECHOWSK A-BISKUP <i>et al.</i> , 2012; GUPTA, K. C.; JABRAIL, 2006; TOLAIMATE <i>et al.</i> , 2000)
III	$DD(\%) = \frac{d}{\left(\frac{w - 161d}{204} + d \right)} \times 100$ $d = \frac{(C_a V_a - C_b V_b)}{1000}$	<p>C_b = concentração da base em mol/L. C_a = concentração do ácido em mol/L. V_b = volume da base no fim da titulação do excesso de ácido. V_a = volume total de ácido adicionado. w = massa da amostra.</p>	(COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008)
IV	$DD(\%) = \frac{d_e}{\left(\frac{w - 161d}{204} + d \right)} \times 100$ $d_e = \frac{(C_a V_a - C_b V_e)}{1000}$ $Y' = \left(\frac{V_0 + V}{C_B} \right) ([H^+] - [OH^-])$ $V = V_e - Y'$	<p>C_b = concentração da base em mol/L. C_a = concentração do ácido em mol/L. V é o volume de base em um determinado ponto da titulação. V_e = volume da base obtido pela extrapolação do gráfico de V em função de Y' em um determinado intervalo de pH. V_a = volume total de ácido adicionado. V₀ = volume inicial da solução de quitosana w = massa da amostra.</p>	(JIANG; CHEN; ZHONG, 2003; TAN, S. C. <i>et al.</i> , 1998)

No caso do método IV, titulação linear, pode-se adicionar um sal altamente dissociável para manutenção da força iônica durante a titulação, de forma que se possa aplicar a

Equação 3.3 para cálculo da $[H^+]$ na titulação linear (INGMAN; STILL, 1966; JIANG; CHEN; ZHONG, 2003):

$$[H^+] = \alpha_H^+ \times 10^{0.08} \quad (3.3)$$

sendo que α_H^+ tem o valor de 10^{-pH} .

Muitas vezes, a adição de KCl é feita para manter a força iônica constante durante a primeira titulação.

3.6.1.1 Espectroscopia no infravermelho

A região do infravermelho (IR) no espectro eletromagnético engloba radiações com números de onda entre 12800cm^{-1} e 10cm^{-1} , ou com comprimentos de onda de $0,78\mu\text{m}$ a $1000\mu\text{m}$ (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). A energia proveniente da radiação nesse intervalo não é suficiente para romper ligações moleculares, sendo que ela provoca uma alteração nos modos de vibração molecular com a absorção da energia (REUSCH, 2013).

A excitação vibracional ocorre devido à variação periódica de dipolos elétricos na molécula durante as vibrações. A transferência de energia se dá, então, por interação desses dipolos oscilatórios com o campo elétrico oscilatório da radiação infravermelha, a depender de sua frequência (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

Há dois modos de vibração primários: estiramento e dobramento (REUSCH, 2013). Uma vibração de estiramento é caracterizada por um movimento ao longo do eixo de ligação com o aumento e a diminuição da distância interplanar. Vibrações de dobramento consistem em uma alteração do ângulo de ligação entre os átomos ou no movimento de um grupo de átomos em relação ao restante da molécula acompanhado de uma mudança de ângulo de ligação. Modos de estiramento têm maior energia que os modos de dobramento (REICHENBÄCHER; POPP, 2012). As frequências de ressonância de uma ligação química estão relacionadas com a força de ligação e a massa dos átomos das extremidades, de modo que cada frequência pode ser relacionada a um tipo de ligação, fazendo com que o espectro resultante da absorção seja como uma impressão digital da molécula (REUSCH, 2013).

A complexidade dos espectros de infravermelho nas regiões entre 1450cm^{-1} a 600cm^{-1} faz com que se torne difícil separar todas as bandas de absorção no intervalo e, por causa dos padrões originais ali encontrados, a região é, muitas vezes, chamada de região de impressão digital. Bandas de absorção presentes no intervalo de 4000cm^{-1} a 1450cm^{-1} são geralmente relativas a vibrações de estiramento de unidades diatômicas. Esse intervalo é chamado, frequentemente, de região de frequência de grupos (REUSCH, 2013).

Apenas espécies moleculares, que apresentem ao menos pequenas diferenças de energia entre os vários estados vibracionais e rotacionais, absorvem radiação no IR. É essencial que haja mudança no momento dipolo para que a molécula absorva esse tipo de radiação. A absorção leva a uma mudança na amplitude das movimentações da espécie absorvedora (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

O espectro resultante da absorção IR segue algumas tendências gerais (REUSCH, 2013):

- Frequências de estiramento são mais fortes que as frequências de dobramento (é mais fácil dobrar uma ligação do que esticá-la ou comprimi-la).
- Ligações envolvendo hidrogênio têm maiores frequências de estiramento quando comparadas a átomos mais pesados.
- Ligações triplas têm maiores frequências de estiramento que ligações duplas, que, por sua vez, apresentam maiores frequências que as correspondentes ligações simples (exceto para ligações de hidrogênio).

A Figura 3.14 ilustra a tendência de comportamento vibracional de diferentes ligações quando submetidas à radiação na região do IR.

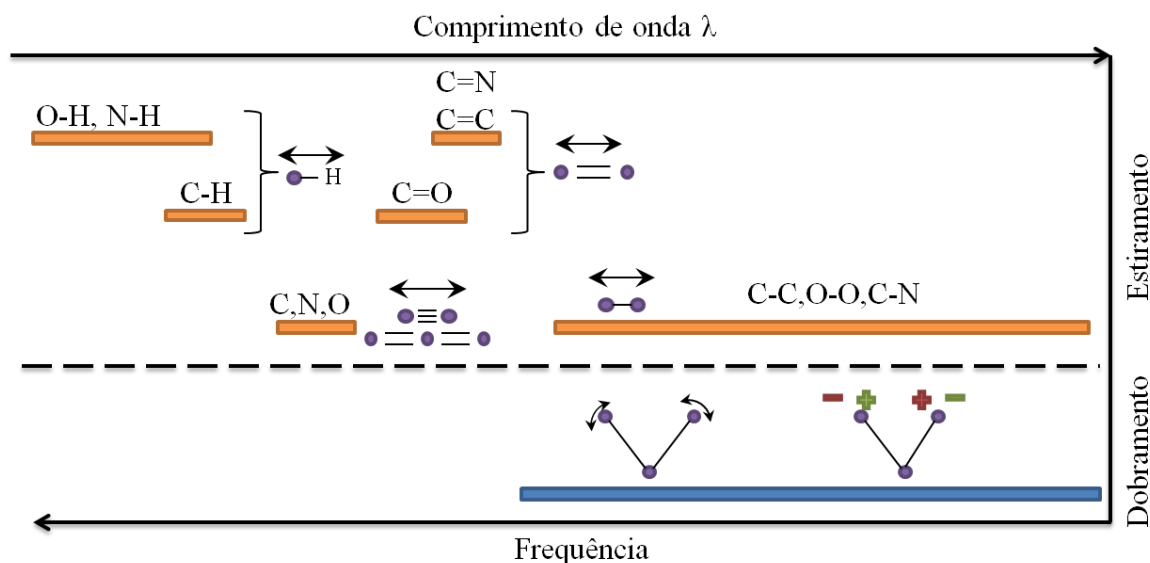


Figura 3.14: Regiões do espectro infravermelho de vários tipos de bandas vibracionais.

Fonte: (REUSCH, 2013).

Um espectro típico de quitosana metacrilada apresenta picos característicos em (LIEN; KO; HUANG, 2009; MONIER *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2015):

- 3277cm^{-1} , relativo a ligações O-H dos grupos amida.
- 1652cm^{-1} , relativo às ligações C=O dos grupos amida I.
- 1538cm^{-1} , associado a ligações N-H de grupos amida II.
- 1062cm^{-1} , associado a ligações C-O.

$1620\text{-}1660\text{cm}^{-1}$, associado à ligação C=C.

Em relação à gelatina, os picos característicos para o material não modificado se localizam em (BILLIET *et al.*, 2013; PENG; MARTINEAU; SHEK, 2008; SARAIVA *et al.*, 2015; SAREM *et al.*, 2013):

- $\sim 3280\text{cm}^{-1}$, relativo à Amida A (vibração de estiramento da ligação N-H).
- $\sim 1630\text{cm}^{-1}$, relativo ao grupo Amida I (estiramento da ligação C=O).
- $\sim 1547\text{cm}^{-1}$, relativo à Amida II (dobramento da ligação N-H e estiramento da ligação C-H).
- $\sim 1240\text{cm}^{-1}$, relativo à Amida III (estiramento da ligação C-N em fase com dobramento da ligação N-H).

A incorporação do grupo funcional gerando metacrilamida é caracterizada pela presença

de picos de absorção típicos de grupo vinil (vibração de estiramento da ligação C=C) em $1680-1629\text{cm}^{-1}$. No entanto, esses picos podem se localizar na mesma região de picos relativo à amida I (ligação C=O). No caso de substituição de grupos amina primária por grupos acrilamida ou metacrilamida, como no da funcionalização da gelatina com anidridos acrílico e metacrílico, a presença de ligação C=C pode ser detectada pela ampliação do sinal relativo aos picos de amida I, II e III atribuída à vibração de ligações amida acopladas à dos grupos C=C (BILLIET *et al.*, 2013).

A Figura 3.15 apresenta o espectro no infravermelho destacando a presença de grupos amida I, II, III e A para gelatina pura, funcionalizada com anidrido metacrílico e funcionalizada com anidrido acrílico. Como mencionado, o aumento da intensidade dos picos de amida I, II e III pode ser relacionado com a presença de grupos vinil (ligação C=C) dos grupos funcionais adicionados, que apresentam frequência de vibração nessas mesmas regiões, quando expostos à radiação IR (BILLIET *et al.*, 2013).

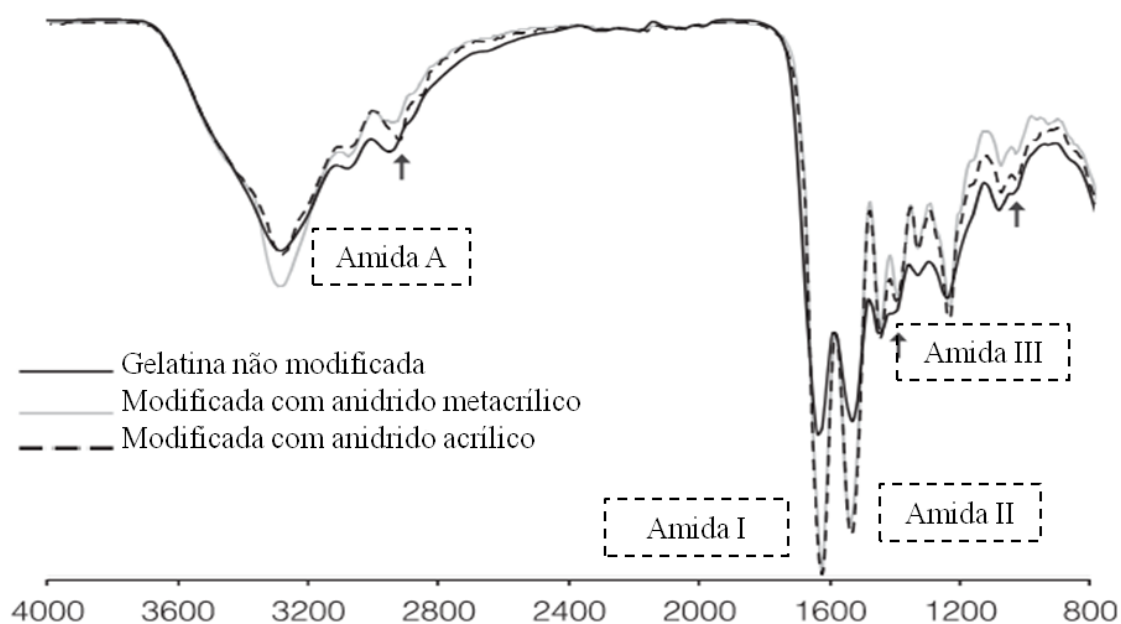


Figura 3.15: Espectro no infravermelho destacando a presença de grupos amida I, II, III e A para gelatina pura, funcionalizada com anidrido metacrílico e funcionalizada com anidrido acrílico.

Fonte: (BILLIET *et al.*, 2013).

A amida A origina-se de uma ressonância entre vibrações de estiramento da amida II e da ligação N-H pura (perto de 95% de contribuição), dependendo mais da força de

ligação de hidrogênio do que da conformação da cadeia polimérica (JABS, 2013).

Considerando que mudanças em ligações moleculares e adição de novos grupos a moléculas geram uma alteração do espectro infravermelho, é possível que se detecte, pela técnica, adições de grupos funcionais e mudanças de ligações químicas em cadeias poliméricas. A caracterização da composição química dos hidrogéis pode então ser realizada por IR, comparando-se os espectros obtidos antes e após a funcionalização dos polímeros, e antes e após a reação de reticulação (COSTA-JÚNIOR *et al.*, 2009; MANSUR *et al.*, 2008).

3.6.1.2 Espectroscopia UV-vis

A região correspondente ao espectro visível compreende energias de fótons que variam de 36 a 72 kcal.mol⁻¹; a região próxima ao ultravioleta, com comprimentos de onda de até 200nm, estende essa faixa de energia até 143kcal.mol⁻¹ (REUSCH, 2013). Essas energias são suficientes para promover ou excitar um elétron para uma orbital molecular de energia mais elevada. Consequentemente, a espectroscopia de absorção realizada nessa região pode também ser chamada de "espectroscopia eletrônica" (REUSCH, 2013).

Na espectroscopia UV-Vis, quando as moléculas da amostra são expostas à luz com uma energia que corresponda a uma possível transição eletrônica, uma parte da energia da luz é absorvida e um elétron é promovido para um orbital de energia mais elevada. Um espectrômetro óptico registra os comprimentos de onda em que ocorre a absorção, juntamente com o grau de absorção em cada comprimento de onda. Como são diversas as possibilidades de transições eletrônicas quando um material é exposto à radiação UV-vis, cada transição eletrônica consiste em um vasto número de linhas tão pouco espaçadas que o espectrômetro não é capaz de resolver. O instrumento traça, então, uma curva que envolve as transições como um todo, gerando um espectro de transições combinadas que consiste basicamente em uma banda mais ampla centrada próxima ao comprimento de onda em que há maior transição (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

A Figura 3.16, item a), ilustra as principais transições envolvendo alguns tipos de substâncias e a tendência energética de acordo com o tipo de transição. A substituição de hidrogênios em uma estrutura cromófora, por exemplo, muda a posição e a

intensidade de bandas obtidas por espectroscopia UV-Vis. O grupo substituto não necessariamente dá origem à absorção de radiação na região analisada, mas sua presença pode alterar a absorção do cromóforo principal (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). A adição de duplas ligações à estrutura, formando conjugação, por exemplo, gera uma redução no espaçamento entre níveis energéticos. Como resultado, a energia necessária para que ocorra uma transição é reduzida e, conseqüentemente, o comprimento de onda no qual o material absorve radiação é deslocado no sentido de menor energia. Esse efeito é ilustrado na Figura 3.16, item b). Mudanças nas bandas de absorção do material podem, portanto, ser utilizadas como indicativo da ocorrência de reações químicas no material.

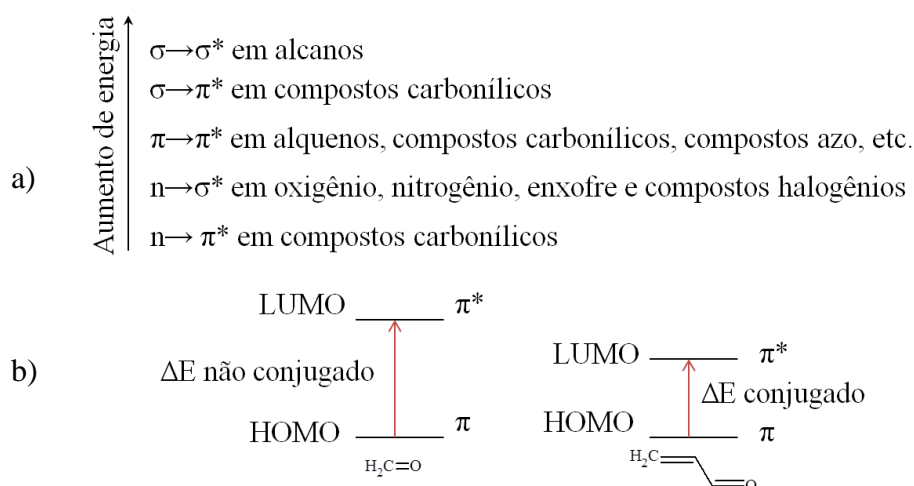


Figura 3.16: Principais transições envolvendo alguns tipos de substâncias com indicação da tendência energética de acordo com o tipo de transição, a), e o efeito da conjugação na energia de transições eletrônicas, b).

Como a absorvância de uma amostra será proporcional ao número de moléculas absorventes no feixe de luz espectrômetro (por exemplo, a sua concentração molar no tubo de ensaio), é necessário corrigir esse valor e outros aspectos operacionais para que diferentes soluções possam ser comparadas em relação à absorvância. O valor de absorção corrigido é a absorvidade molar/coeficiente de absorção molar (já mencionado na seção relativa à fotofísica e fotoquímica de reticulação), e é particularmente útil para que sejam comparados espectros de soluções diferentes e para determinar a eficiência dos cromóforos existentes na amostra em absorver o feixe luminoso (REUSCH, [S.d.]).

Na espectroscopia UV-Vis, pode-se determinar absorvidade molar como na Equação 3.4:

$$\varepsilon = A/cL \quad (3.4)$$

em que A é absorvância, c é a concentração [mol.L⁻¹] e L o caminho ótico [cm]. Para uma mesma espessura do absorvedor (caminho ótico), quanto maior o valor de ε maior a sensibilidade do método. A absorvidade molar (ε) depende da substância, do comprimento de onda utilizado, da temperatura e do solvente (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

A relação entre a luz incidente, luz absorvida, concentração e caminho ótico pode ser feita pela equação de Beer-Lambert (Equação 3.5):

$$\text{Log}_{10} I_0/I = A = \varepsilon \cdot c \cdot L \quad (3.5)$$

sendo ε absorvidade molar [L.mol⁻¹.cm⁻¹], L o caminho ótico [cm] e c a concentração [mol.L⁻¹];

3.6.1.3 Grau de intumescimento

O grau de intumescimento (*ID*) do hidrogel é uma propriedade importante devido à relação que ele tem com a capacidade de mimetizar o meio extracelular e atuar na drenagem de exsudados durante a cicatrização e recuperação tecidual, assim como em outros processos envolvendo difusão. A propriedade pode ser mensurada por meio da pesagem do material antes e após a imersão em um volume pré-determinado de uma solução de interesse, a uma temperatura definida, em diferentes intervalos de tempos, como indicado na Equação 3.6 (EBARA *et al.*, 2014; LIEN; KO; HUANG, 2009; MANSUR, H. S. *et al.*, 2008):

$$GI(\%) = \frac{M_{hi} - M_{hs}}{M_{hs}} \times 100 \quad (3.6)$$

sendo M_{hs} a massa do polímero seco e M_{hi} a massa do polímero intumescido.

Em matrizes tridimensionais porosas, o aumento de volume é mais complexo do que somente a mudança na massa pela presença de líquido no interior do material mas, neste

trabalho, a absorção de líquido será considerada como parâmetro para medidas de intumescimento.

3.6.1.4 Microscopia eletrônica de varredura: caracterização morfológica da arquitetura do hidrogel

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) possibilita a visualização da amostra em três dimensões. Ela se baseia na interação de um feixe de elétrons gerado por efeito termoiônico- que é acelerado devido à diferença de potencial- com a superfície da amostra. É essencial, portanto, que a amostra não seja transparente aos elétrons. O feixe de elétrons é colimado por meio de uma coluna termoiônica e conduzido até a amostra. Na região da análise, os sinais emitidos como resposta à incidência do feixe primário (elétrons secundários, retroespalhados, raios X característicos) são captados e amplificados para o tratamento de dados e formação da imagem. À medida que o feixe varre a área em análise, uma imagem virtual se forma ponto a ponto (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012).

A preparação da amostra é uma etapa crucial da caracterização. A amostra deve estar livre de umidade, ser estável em alto vácuo e, no caso de materiais não condutores, como é o de matrizes poliméricas e materiais biológicos, deve-se aplicar um fino recobrimento, comumente de ouro. Para preservação da integridade de amostras mais sensíveis, devem-se evitar tensões de aceleração muito elevadas. Informações sobre arquitetura da amostra, como tamanho, distribuição e interconectividade (qualitativa) de poros podem ser obtidas por meio de MEV, com variação de ampliação de 100 x a 1000x e de aceleração de 8kV a 20kV (COSTA-JÚNIOR, E. S. *et al.*, 2009; KATHURIA *et al.*, 2009; NAGAHAMA *et al.*, 2009; WEN *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2010; ZHU, C. *et al.*, 2009).

A avaliação do processo de produção de matrizes tridimensionais destinadas à engenharia de tecidos deve incluir um estudo detalhado das características morfológicas do produto final. Essas características incluem porosidade, tamanho dos poros, relação entre área superficial e volume, interconectividade, anisotropia (LIN *et al.*, 2003). A MEV permite medições diretas do tamanho do poro e da espessura de paredes de matrizes tridimensionais porosas. Uma estimativa visual da interconectividade, da área

da seção transversal e da anisotropia também pode ser feita por essa técnica. Para determinação de diâmetro médio e distribuição de poros, pode-se realizar a varredura em diferentes áreas da amostra e analisá-las com auxílio de um *software* de análise de imagens (KATHURIA *et al.*, 2009). No entanto, para examinar o interior de uma matriz tridimensional, é necessário seccioná-la, o que pode introduzir defeitos em sua arquitetura (HO; HUTMACHER, 2006). A Figura 3.17 ilustra imagens obtidas por MEV de membranas de quitosana com porosidade induzida por adição de partículas de sílica em diferentes proporções. Essa ilustração tem, neste trabalho, o objetivo de mostrar a importância desse tipo de microscopia na caracterização de matrizes com estrutura tridimensional porosa e a necessidade de seccionar a amostra para visualização de sua estrutura interna.

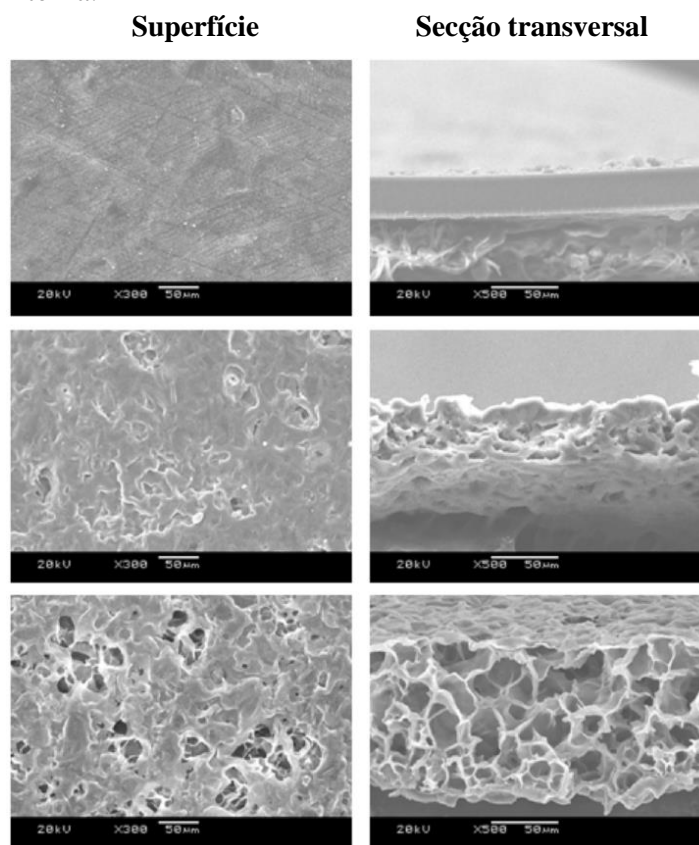


Figura 3.17: Vistas superior e da secção transvesal de membranas com diferentes graus de indução de porosidade. Imagens obtidas por MEV.

Fonte: (MEI *et al.*, 2012)

Em estudos envolvendo semeadura de células, a morfologia, distribuição e proliferação celulares podem ser analisadas por MEV, fornecendo assim informações sobre a biocompatibilidade e bioatividade do material (DUMONT *et al.*, 2016; MANSUR, H.

S. *et al.*, 2009). Um exemplo de análise de adesão e proliferação celular por MEV pode ser observado na Figura 3.18.



Figura 3.18: Aderência e espalhamento de células VERO semeadas em matrizes de quitosana e PVA para o ensaio de biocompatibilidade. (A) Desenhos animados do processo de interação celular: adesão, propagação, proliferação; (B), (C) e (D): imagens de MEV que ilustram a morfologia típica de células semeadas em blends de quitosana, PVA e glutaraldeído.

Fonte: (MANSUR, H. S. *et al.*, 2009).

3.6.1.5 μ -CT

Em engenharia de tecido, baseada em estruturas tridimensionais, as características da arquitetura são estudadas após seu projeto e fabricação. Entre essas características, pode-se citar porosidade, tamanho de poro, razão entre área e volume, interconectividade entre poros, anisotropia, espessura de parede, entre outras. Várias técnicas podem ser utilizadas para avaliá-las, entre elas MEV, fluxo e porosimetria de mercúrio, picnometria de gás e adsorção de gases. Apenas recentemente se têm empregado microtomografia computadorizada (μ -CT) no estudo de matrizes tridimensionais (HO; HUTMACHER, 2006; JONES *et al.*, 2009; MALAFAYA; REIS, 2009; TUAN; HUTMACHER, 2005). A μ -CT utiliza a mesma técnica da tomografia hospitalar, porém em pequena escala e com aumento exponencial da resolução

(BRUKER, 2016). Trata-se de uma técnica de imagem de transmissão de raios-X, em que estes, emitidos por um gerador, viajam através de uma amostra e são registrados por um detector no outro lado para produzir a radiografia (conhecida como imagem de projeção). A amostra é, então, rotacionada por uma fração de grau, e outra imagem de projeção é tomada na nova posição. Esse procedimento é iterado até que a amostra tenha girado 180° ou 360° produzindo uma série de imagens de projeção (HO; HUTMACHER, 2006; MICRO PHOTONICS INC., 2016).

O processo de obtenção de imagens por μ -CT pode ser dividido basicamente em quatro (HO; HUTMACHER, 2006; MICRO PHOTONICS INC., 2016):

- a. Gerar raios-X;
- b. Transmitir raios-X através da amostra;
- c. Girar a amostra para adquirir uma série de imagens de projeção;
- d. Reconstruir as imagens de projeção em fatias virtuais.

O processo de computação da informação estrutural interna, a partir das imagens de projeção, é conhecido como reconstrução. Esse procedimento resulta em uma pilha de imagens de reconstrução (também referidas como "imagens de corte transversal" ou "fatias"). Essas imagens podem ser usadas para visualizar as características internas, auxiliando na análise do material estudado (MICRO PHOTONICS INC., 2016).

Matrizes com estruturas interiores complexas são passíveis de serem analisadas usando μ -CT, isso porque qualquer localização espacial da arquitetura do material pode ser digitalmente isolada pela técnica. Isso é crucial para matrizes com heterogeneidades geométricas. Características como volume e área de superfície também são mensuráveis pela técnica. Como a μ -CT emprega raios-X penetrantes, os poros fechados também são visualizados, permitindo assim o cálculo da proporção entre porosidades aberta e fechada. A possibilidade de visualização e ampliação de qualquer parte da matriz permite não apenas a observação da forma e a medição do tamanho de poros, assim como a determinação das espessuras de parede. A flexibilidade da análise de μ -CT permite a avaliação de matrizes das mais diversas composições e geometrias (HO; HUTMACHER, 2006).

Através de MEV, podem ser medidos os tamanhos dos poros e a espessura de parede das matrizes, mas essa técnica só oferece informações qualitativas sobre a porosidade e a interconectividade (HO; HUTMACHER, 2006). A detecção e medição da interconectividade entre os poros se fazem necessárias, uma vez que uma matriz, ainda que altamente porosa, pode apresentar poros não interligados, diminuindo, assim, a eficiência de difusão de nutrientes e outros componentes do sistema biológico (HO; HUTMACHER, 2006).

Por μ -CT, medindo-se os volumes total de poros e de porosidade aberta, a interconectividade é obtida pela Equação 3.7 (F. WANG, L. SHOR, A. DARLING, S. KHALIL, W. SUN, S. GÜÇERI, 2003).

$$\text{Interconectividade} = \frac{\text{Volume de poros abertos}}{\text{Volume de poros fechados} + \text{Volume de poros abertos}} \quad (3.7)$$

Por meio de μ -CT, é possível que se avalie outras características importantes de matrizes, tal qual a distribuição de fases. Uma vez que a técnica utiliza um feixe de raios-X para determinar a arquitetura da amostra, e que o coeficiente de atenuação de uma fase ao longo do feixe de raios-X é dependente da composição local - principalmente da densidade e do número atômico- imagens de μ -CT permitem obter a distribuição das fases ao longo do material escaneado (DUMONT *et al.*, 2016).

3.6.1.6 Viabilidade celular/citotoxicidade *in vitro*- Ensaio MTT

Os testes de citotoxicidade que usam culturas de células são aceitos como primeiro passo na identificação de compostos ativos e/ou como testes de biosegurança (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). A norma ISO 10993-5:2009 (Biological evaluation of medical devices: Tests for *in vitro* cytotoxicity) estipula as condições para a realização dos ensaios e, segundo o órgão responsável pela sua elaboração, apenas depois de comprovada a não toxicidade de um material por testes *in vitro* é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ser conduzido em animais de laboratório.

A citotoxicidade pode ser avaliada por dois métodos, designados "por extrato" e "por contato direto" de amostra. Ambos os métodos são equivalentes e globalmente aceitos para a avaliação da citotoxicidade de materiais para aplicações biomédicas. A escolha

está essencialmente associada à estabilidade da amostra no meio do ensaio (DUMONT *et al.*, 2016).

Em relação aos ensaios disponíveis, há uma série de técnicas diferentes cuja escolha dependerá dos objetivos do estudo e da conveniência na realização. Técnicas tais quais avaliação de secreção de óxido nítrico por macrófagos ativados com citocina interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeo (LPS) são frequentemente utilizadas para verificação da viabilidade celular e biocompatibilidade de materiais destinados à aplicação biomédica (MANSUR, H. S. *et al.*, 2009). Outros ensaios, como o de liberação da Lactato Desidrogenase (LDH) e o de incorporação de vermelho neutro, também são amplamente utilizados para avaliação da citotoxicidade de materiais. O LDH é baseado na medição da atividade de lactato desidrogenase, que é uma enzima citosólica, no meio extracelular. O ensaio consiste em retirar o sobrenadante das células e medir a atividade da enzima liberada oferecendo seu substrato. A perda de LDH intracelular e a sua liberação para o meio de cultura são um indicadores de morte celular irreversível devido a danos na membrana celular (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). O ensaio de incorporação de vermelho neutro é também utilizado para analisar a viabilidade celular. Nele, as células vivas absorvem o corante vermelho neutro, que é concentrado dentro dos lisossomas. A quantidade de corante incorporado pode ser medida, após extração, por sua absorbância a 540nm. (FOTAKIS; TIMBRELL, 2006).

O ensaio MTT é um método simples e eficaz capaz de detectar células vivas em crescimento. O método se baseia na conversão de um reagente, o sal de 3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio) - MTT, de coloração inicialmente amarela e solúvel em água, num produto azul-escuro, o formazan, insolúvel em água. A conversão é realizada por enzimas desidrogenases localizadas nas mitocôndrias de células viáveis (ORÉFICE; PEREIRA; MANSUR, 2012). Ao ser metabolizado pelas células, o MTT tem seus derivados acumulados na forma de cristais de tetrazólio e formazana que podem ser quantificados com auxílio de um espectrofotômetro. A depender da contagem, pode-se ter uma ideia da viabilidade celular, medida em porcentagem. Quanto maior a leitura, maior a viabilidade celular (COSTA-JÚNIOR, 2008). Para o teste, podem ser utilizadas células do sangue periférico humano, células obtidas do baço de camundongos ou linhagens celulares pré-estabelecidas (ORÉFICE;

PEREIRA; MANSUR, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 Etapas do Procedimento Experimental

As etapas que constituem o procedimento experimental são expostas de forma resumida no diagrama ilustrado na Figura 4.1 em que 'ChMA' representa quitosana funcionalizada com anidrido metacrílico, 'Gel' representa gelatina e FTIR representa Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier.

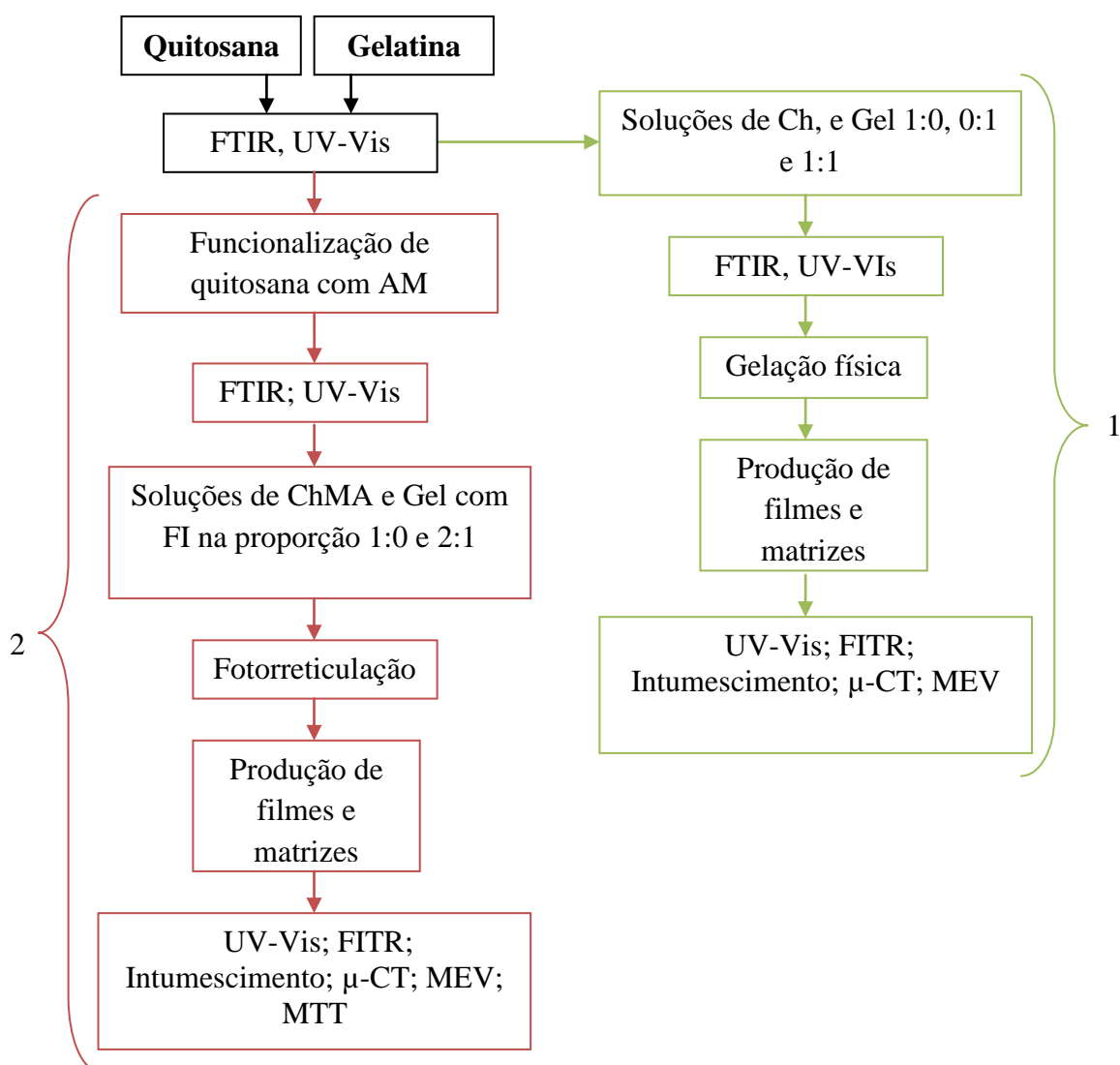


Figura 4.1 Fluxograma de procedimento experimental.

4.2 Materiais

Quitosana de alta massa molecular (GD>75%, lote 10305DD Sigma-Aldrich); Gelatina tipo A ("bloom ou força de gelificação" ~300, Sigma-Aldrich G1890, lote SLBQ2365V); Irgacure 2959 (Sigma-Aldrich); Ácido clorídrico (HCl, 37%, Synth), Hidróxido de sódio (NaOH 99% microperolada, Synth), Cloreto de potássio (KCl 99-100%, Synth); Ácido acético glacial PA-ACS (Synth A1019.01.BJ); Anidrido Metacrílico (94% MM 154,16g/mol, Sigma-Aldrich); Água DI 18mΩcm⁻¹; Água destilada; Membrana para diálise (Sigma-Aldriquitosana 23-14kDa); Células de linhagem de rim de embrião humano, HEK293 T, (gentilmente cedidas pela Profa. M.F Leite, Departamento de Fisiologia e Biofísica - UFMG); 'Dulbecco's modified eagle medium' (DMEM), soro fetal bovino (SFB), sulfato de estreptomicina, penicilina G sódica, anfotericina-b e tampão fosfato-salino (PBS), (fornecidos pela Gibco BRL, NY, EUA); Reagente MTT (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

4.3 Métodos

4.3.1 Espectroscopia no infravermelho

Todos os espectros de FTIR, presentes neste trabalho, foram obtidos pelo modo ATR (reflexão total atenuada), na faixa de número de onda de 4000cm⁻¹ a 650cm⁻¹, durante 32 varreduras, com resolução de 4cm⁻¹ (FTIR Nicolet 6700 - Thermo Fischer).

4.3.2 Determinação do grau de desacetilação

4.3.2.1 Cálculo de GD por titulação potenciométrica

4.3.2.1.1 Sem ajuste de força iônica

Dissolveu-se 0,2g de quitosana em 20mL de HCl 0,1M, diluiu-se em mais 10mL de água destilada e, com adição gradual de NaOH 0,01M, elevou-se o pH até 2. A partir de pH 2 iniciou-se a titulação da solução com NaOH 0,01M (TAN, S. C. *et al.*, 1998).

Em todos os casos, as titulações foram realizadas até um pH maior que 9, consideravelmente acima do pKa (~6,5) das aminas primárias presentes na quitosana.

4.3.2.1.2 Com ajuste de força iônica

Dissolveu-se 0,20g de quitosana em 30mL de HCl 0,1M e completou-se o volume para 100mL com água destilada e adicionou-se, então, uma quantidade de KCl para ajustar a força iônica para 0,1. Utilizou-se, como titulante inicial, NaOH 0,1M contendo 0,1M de KCl. Sob agitação constante, adicionou-se o titulante até que o pH atingisse 2. Em seguida, adicionou-se NaOH 0,1M, gota a gota, parando de 0,5 em 0,5mL para registro de pH. A titulação foi interrompida quando o pH chegou a 6 (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003).

4.3.2.1.3 Tratamento dos dados obtidos nas titulações

Os resultados obtidos nas titulações foram aplicados a todas as fórmulas indicadas na Tabela 3.3 para comparação dos valores e determinação do melhor método, em um momento posterior, por meio da comparação com resultados de outras técnicas de determinação do GD da quitosana. Para cada titulação, foi plotada uma curva típica de pH em função do volume de titulante (NaOH) adicionado. Para cada curva, foi calculada a curva derivada de forma a explicitar os valores dos pontos de inflexão (V_1 e V_2 , respectivamente), que representam os volumes de base utilizados para neutralizar o excesso de ácido e para desprotonar os grupos amina das cadeias de quitosana. No caso das titulação lineares (método IV da Tabela 3.3), os intervalos de pH 2-3, 2-6 e 2,5-5,8 foram considerados para a regressão linear a fim de se obter o valor de V_e . O intervalo de pH 2,5-5,8 é indicado por se mostrar confiável para realização de titulação de amostras de até 0,23g de quitosana, independentemente do seu grau de desacetilação (JIANG; CHEN; ZHONG, 2003).

4.3.2.2 Cálculo de GD por espectroscopia no infravermelho

Para determinação do grau de desacetilação, foram escolhidas como referência as bandas localizadas em 1420cm^{-1} (deformação simétrica da ligação C-H), 1030cm^{-1} e 1070cm^{-1} (estiramento da ligação C-OH), visto que elas apresentam maiores vantagens para o grau de desacetilação teórico determinado pelo fornecedor (maior que 75% de desacetilação) (KASAAI, 2008). Como picos de prova, foram escolhidos aqueles centrados em 1550cm^{-1} (Ligação N-H de NH_2) e 1640cm^{-1} (grupo acetil, $-\text{C}=\text{O}$). Para a

relação $\frac{1640}{1030}$ e $\frac{1640}{1070}$, obtém-se o grau de acetilação (GA) do material, já que o pico de prova é relativo a grupos acetil. O GD deve, pois, ser calculado como na equação 4.1.

$$GD = 1 - GA \quad (4.1)$$

4.3.2.3 Cálculo de GD por Ressonância nuclear magnética (RNM)

Para determinação do grau de funcionalização por RNM, as amostras foram preparadas, solubilizando 20 mg de cada material em 1,4 mL de D₂O, acidificada com HCl. Os espectros de RMN de H 1 da quitosana foram adquiridos em Espectrômetro de RMN Bruker AVANCEIII nanobay 400, de 400 MHz, utilizando uma sonda Dual. Para cada análise foram utilizados 64 scans e os espectros foram analisados pelo programa TopSpin 3.1. O grau de desacetilação foi determinado a partir do artigo Lavertu, et.al. 2003, Equação 4.2 (LAVERTU *et al.*, 2003):

$$\left(1 - \left[\frac{\frac{1}{3}HAc}{\frac{1}{6}H2-H6} \right] \times 100 \right) = \%GD \quad (4.2)$$

4.3.3 Modificação da matéria-prima - Síntese de quitosana metacrilamida (ChMA)

Dissolveu-se quitosana (3% m/v) em ácido acético (2% v/v) sob agitação por 24h. Dissolvida a quitosana, adicionou-se anidrido metacrílico, AM, (0,6g para cada 1g de quitosana) a uma taxa de 0,5mL.min⁻¹ e deixou-se que a solução reagisse por 4h. Após completado o tempo de reação, a solução foi submetida à diálise (membrana de 12 a 14 kDa) por 5 dias, com troca de água destilada 2x ao dia. Ao fim da diálise, congelou-se o material (-4°C por 24h em congelador doméstico), para posterior liofilização (72h, à temperatura de -50°C e pressão de 300µbar - ModulyoD, Thermo Electron Corporation). A Figura 4.2 ilustra o processo de funcionalização da quitosana.

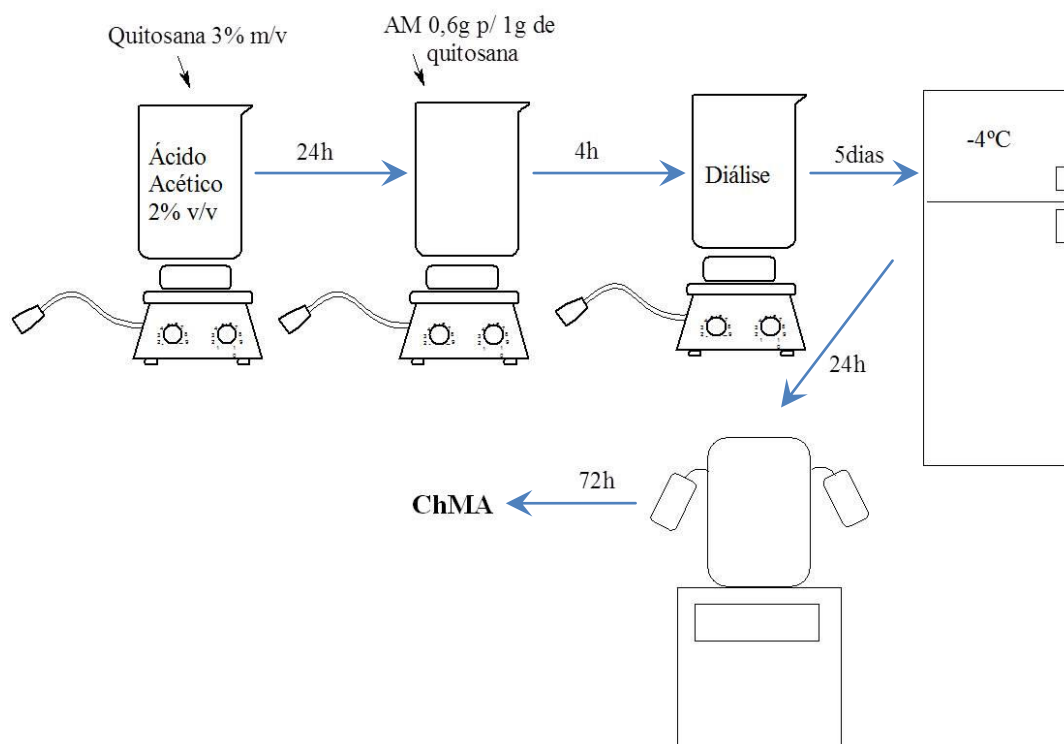


Figura 4.2: Esquema ilustrativo da funcionalização da quitosana com AM.

A determinação da quantidade de anidrido metacrílico adicionada foi baseada na quantidade de grupos amina primária presentes nas cadeias de quitosana, ou seja, na porção de meros glucosamina determinada pelo grau de desacetilação da quitosana, e no título do anidrido metacrílico utilizado.

4.3.3.1 Análise da efetividade da reação

Para verificação da funcionalização, foram calculadas as áreas relativas aos picos de interesse (prova e referência) e comparou-se a razão $\frac{\text{Área}_{\text{prova}}}{\text{Área}_{\text{referência}}}$ para a quitosana não modificada e funcionalizada.

A efetividade da reação de funcionalização foi analisada por espectroscopias no infravermelho e UV-Vis. Para as análises, foram utilizados filmes dos materiais variando de 0,05 a 0,19mm de espessura para ChMA e GelChMA, respectivamente.

Para melhor avaliação da efetividade da reação e obtenção de resultados semiquantitativos, uma ferramenta útil é a relação entre as magnitudes de picos de prova e referência (ROCHA, M. F.; MANSUR; MANSUR, 2010). No caso da

verificação da funcionalização de quitosana, tomou-se, como pico de prova, aquele centrado em 1550cm^{-1} , relativo à ligação N-H, e, como referência, o pico centrado em 897cm^{-1} , relativo ao estiramento da ligação C-O, pouco afetado pela funcionalização da matéria-prima.

Os espectros de UV-Vis foram obtidos por meio do equipamento Perkin-Elmer (Lambda EZ-210, Waltham, MA, USA), através da medida de absorbância abrangendo uma faixa de comprimentos de onda de 600nm a 190nm. Utilizou-se o aparato para encaixe de filmes para fixação das amostras. Para verificação da funcionalização, identificaram-se as transições presentes e avaliou-se o deslocamento da curva de absorção do espectro UV-vis para quitosana não modificada e funcionalizada.

4.3.3.2 Estimativa do grau de funcionalização da quitosana

Para estimar a extensão da funcionalização da quitosana na sua reação com AM, foram utilizados, como métodos, titulação potenciométrica e espectroscopia no infravermelho.

4.3.3.2.1 Estimativa do grau de funcionalização da quitosana por titulação potenciométrica

O procedimento realizado na titulação potenciométrica de ChMA foi similar ao realizado para o cálculo de GD da quitosana. Dissolveu-se 0,2g de ChMA em 30mL de HCl 0,1M e, em seguida, completou-se o volume para 100mL com água destilada. Homogeneizada a solução, houve adição gradual de NaOH 0,1M até que se atingisse pH 2. A partir de pH 2, iniciou-se a titulação da solução com NaOH 0,1M.

Para cada titulação, foi plotada uma curva típica de pH em função do volume do titulante (NaOH) adicionado. Para cada curva, foi calculada a curva derivada a fim de explicitar os valores dos pontos de inflexão que representam os volumes de base utilizados para neutralizar o excesso de ácido e para desprotonar os grupos amina das cadeias de quitosana (V_1 e V_2 , respectivamente). Os resultados obtidos nas titulações foram aplicados à Equação I da Tabela 3.3 para determinação da porção de meros glucosamina presentes nas cadeias de ChMA.

Calculando-se a diferença entre a proporção de meros glucosamina, presentes na quitosana original, e a proporção de meros glucosamina, presentes na quitosana

funcionalizada, chega-se a um valor estimado para o grau de funcionalização (GF). A relação é válida uma vez que o sítio de reação de funcionalização da quitosana é restrito aos meros glucosamina. Entre todas as equações explicitadas na Tabela 3.3, a Equação I foi escolhida para determinação do GF, uma vez que ela só leva em conta a massa molar dos meros de glucosamina para o cálculo da porção desses grupos na cadeia de quitosana.

4.3.3.2.2 Estimativa do grau de funcionalização por espectroscopia no infravermelho

O cálculo do grau de funcionalização da quitosana por FTIR foi feito de forma semelhante àquela usada para o cálculo do grau de desacetilação para esse polissacarídeo. Para tal, razões entre picos de prova e de referência foram calculadas para estimar a proporção de grupos laterais amina presentes na ChMA. O cálculo para o GF foi baseado na diferença obtida entre a proporção de grupos amina presentes na quitosana original e na funcionalizada. Como pico de prova, foi selecionado o pico centrado em 1550cm^{-1} , relativo à ligação N-H, e, como referência, o pico centrado em 1070cm^{-1} , relativo à ligação C-OH. O pico centrado em aproximadamente 1640cm^{-1} , relativo aos grupos acetil na quitosana original e utilizado como pico de referência para o cálculo de GD da quitosana neste trabalho, não foi utilizado para o cálculo de GF, uma vez que a ligação C=C, presente na ChMA, vibra com frequências similares. As intensidades e áreas referentes aos picos utilizados como prova e referência foram calculadas por dois métodos diferentes: integração automática pela ferramenta de análises de picos pelo aplicativo Origin[®], e pela deconvolução dos picos, que foram selecionados manualmente.

4.3.3.2.3 Estimativa do grau de funcionalização por Ressonância nuclear magnética

Os espectros RMN foram adquiridos em Espectrômetro de RMN Bruker AVANCEIII nanobay 400, de 400 MHz, utilizando uma sonda Dual. Para cada análise foram utilizados 64 scans e os espectros foram analisados pelo programa TopSpin 3.1. Os hidrogênios foram identificados e o grau de funcionalização (grau de metacrilção-DM) foi determinado a partir da integral dos sinais dos hidrogênios de interesse pela Equação 4.3 (SARAIVA *et al.*, 2015).

$$DM(\%) = \frac{\text{Áreas das integrais dos hidrogênios H2-H6}}{\text{Área da integral dos hidrogênios metilênicos}} \quad (4.3)$$

4.3.4 Produção de hidrogéis de ChMA e GelChMA

Para produção dos hidrogéis de ChMA, dissolveu-se ChMA em água DI de forma a se obter uma solução 2% m/v. Dissolvida ChMA, adicionou-se o FI, Irgacure 2959 (0,2% m/v), sob agitação, até que houvesse homogeneização da solução (aproximadamente 1h). Verteu-se, em seguida, a solução no recipiente dedicado à formação dos filmes (1mL em discos plásticos) ou matrizes (1,5mL em *Eppendorfs*). Os recipientes contendo volume adequado de hidrogel foram, então, expostos à radiação UV dentro de uma câmara adequada ($4,78mW.cm^{-2}$, 254nm, BOIT-LUB01, Boitton) por 1, 5, 10 e 30min. Ao término da exposição, adicionou-se 1mL de solução de ácido ascórbico (1% m/v). No caso dos filmes, estes foram deixados em estufa por 24h, a 40°C, para evaporação do solvente. A fim de desenvolver uma estrutura tridimensional no interior das soluções reticuladas destinadas à produção das matrizes, essas foram mantidas a $-4\pm 2^{\circ}C$ por 24h em congelador doméstico e, posteriormente, submetidas à liofilização. As soluções congeladas foram liofilizadas por 24h, à temperatura de $-50\pm 2^{\circ}C$ e pressão de $300\pm 50\mu\text{bar}$ (ModulyoD, Thermo Electron Corporation). As condições de operação do liofilizador são constantes, não podendo ser alteradas pelo operador.

No caso dos hidrogéis de GelChMA, dissolveu-se gelatina (20% m/v) em água DI, à 50°C, sob agitação por 60min. Adicionou-se, em sequência, a gelatina à solução de ChMA (2% m/v) na proporção 2:1 v/v ChMA:Gel e homogeneizou-se por 30min. Após a homogeneização da solução de GelChMA, adicionou-se o FI, sob agitação, por aproximadamente 1h. Os procedimentos seguintes foram os mesmos dos hidrogéis de ChMA.

A Tabela 4.1 explicita os parâmetros no procedimento experimental para a produção dos hidrogéis à base de quitosana metacrilamida (ChMA) e sua blenda com gelatina (GelChMA).

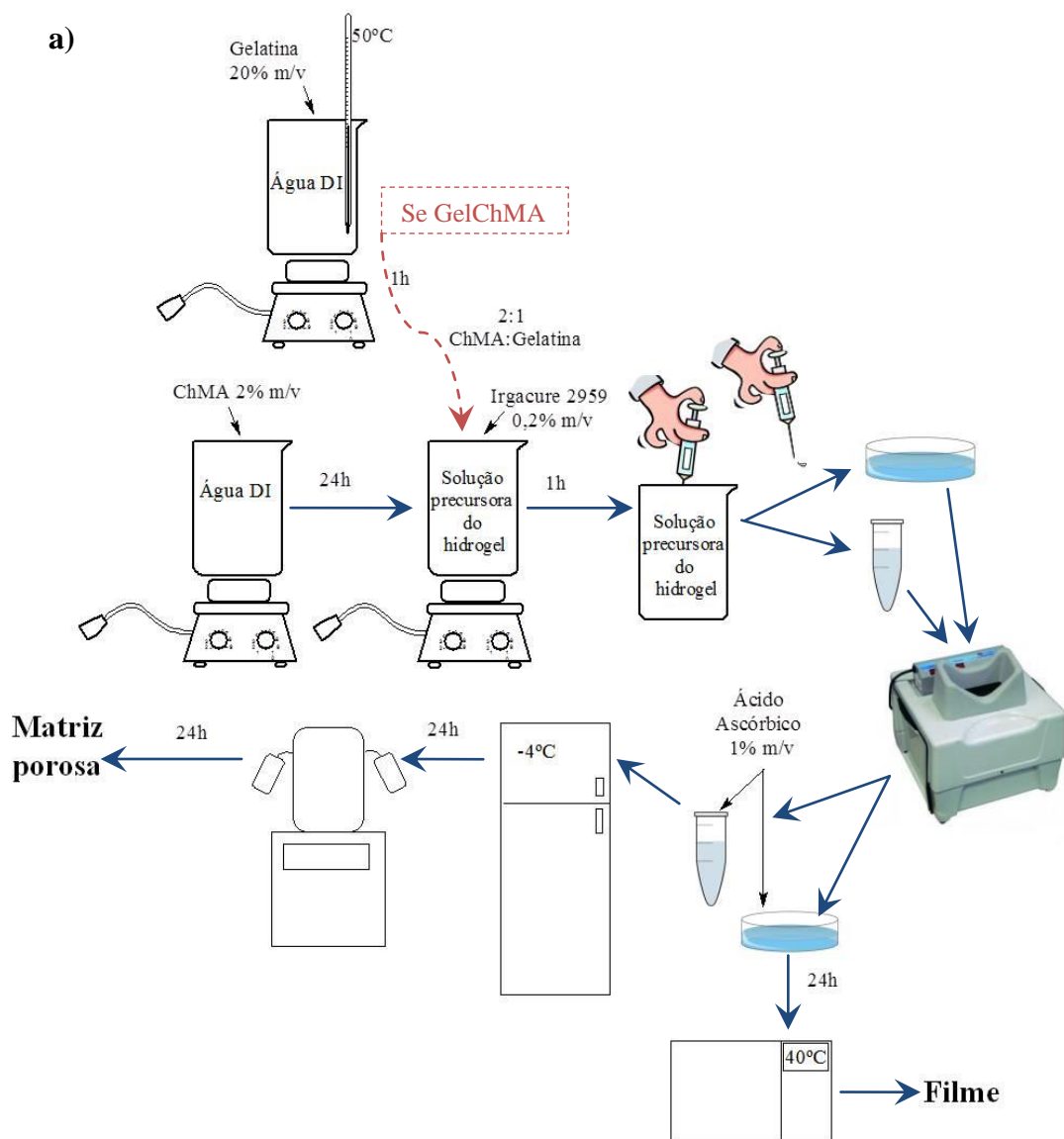
Tabela 4.1: Parâmetros envolvidos no procedimento experimental.

Parâmetros fixos	Valores
Proporção de AM	0,6g por 1g de quitosana
Concentração de solução de ChMA	2% m/v
Concentração de solução de Gelatina	20% m/v
Proporções de solução de ChMA e Gelatina	1:0; 2:1
Proporção mássica ChMA e Gelatina em GelChMA	1:5
Concentração de AA	1% m/v
Comprimento de onda	254nm
Tempo de exposição	10min

A escolha da proporção 2:1 das soluções de ChMA:Gel foi feita com base na baixa estabilidade dos hidrogéis contendo maiores conteúdos de gelatina.

Na formação dos hidrogéis, em ambos os casos (hidrogéis de ChMA e GelChMA) notou-se aumento da dificuldade de escoamento do material após a exposição à radiação, o que é um indicativo de formação da rede tridimensional, isto é, formação do gel. Ao fim de cada procedimento de formação de hidrogéis, ácido ascórbico foi adicionado com o intuito de estabilizar o sistema, funcionando como desativador de espécies ativas (ex. radicais livres) que podem estar presentes nos hidrogéis recém formados mesmo após o fim da exposição à radiação.

O esquema representado na Figura 4.3 ilustra o processo de produção dos hidrogéis de ChMA e GelChMA, item a), e detalha a etapa de liofilização, item b).



b)

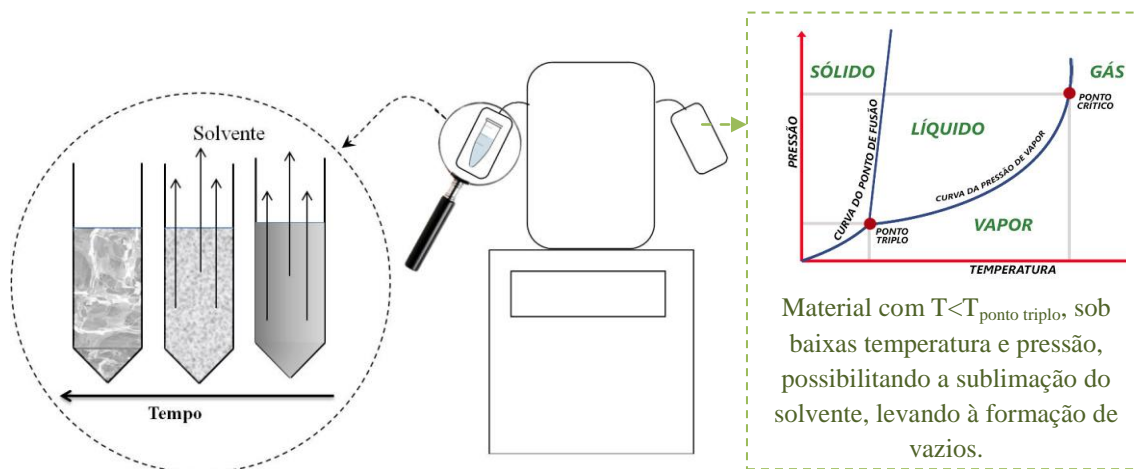


Figura 4.3: Esquema ilustrativo da produção dos hidrogéis na forma de matrizes porosas e filmes, item a), e detalhe para o processo de liofilização, item b).

4.3.4.1 Análise da efetividade da reação de fotorreticulação

A efetividade da reação de fotorreticulação das amostras foi analisada por espectroscopia no infravermelho. Para as análises, foram utilizados filmes dos materiais variando de 0,05 a 0,19mm de espessura, para ChMA e GelChMA, respectivamente.

Para verificação da ocorrência de fotorreticulação entre as cadeias, foi feita relação entre áreas de picos de prova e de referência. O pico escolhido como pico de prova, tanto para análise da reticulação de ChMA quanto para o caso de GelChMA, foi o pico centrado em aproximadamente 1640cm^{-1} , relacionado à ligação C=C (BILLIET *et al.*, 2013). No caso de ChMA, o pico de referência escolhido foi o relativo a ligações glicosídeas, C-O, centrado em 897cm^{-1} e, no caso da GelChMA, o pico de prova escolhido foi o centrado em 1030cm^{-1} , relacionado à ligação C-OH. Para ambos os picos de referência, não se espera que haja influência das reações de reticulação em ligações químicas com vibrações características nessas regiões. Para o cálculo da razão entre as áreas, duas formas de cálculo de área de picos foram utilizadas: pela integração do espectro e determinação dos picos presentes pelo método de máximo local pelo aplicativo Origin® e pela área calculada pela deconvolução das curvas em questão.

4.3.5 Caracterização Morfológica

Para análise morfológica, a parte medial de cada matriz porosa, obtida por meio de liofilização (Figura 4.4), foi caracterizada por MEV e μ -CT.



Figura 4.4: Ilustração da porção de material caracterizada morfolologicamente após a liofilização.

4.3.5.1 MEV

As amostras liofilizadas foram recobertas com uma fina camada de ouro. As imagens foram geradas por meio de feixe elétrons secundários (FEI, INSPECT™ S50) para análise morfológica dos materiais. Utilizaram-se ampliações de 50, 100, 300 e 2000 vezes. A tensão utilizada foi de 15kV. As análises morfológicas via MEV foram feitas em conjunto com EDS (EDAX GENESIS) em triplicata.

4.3.5.2 μ -CT

As amostras foram escaneadas utilizando *scanner* Micro-CT (SkyScan 1174, Bruker μ -CT, Belgium), com tensão de 35k da fonte, corrente de 800 μ A e tamanho de 12,18 μ m pixel. Não foram utilizados filtros. As amostras foram acopladas em um aparato capaz de girar 180° com geração de imagens a cada 0.7°. Reconstruíram-se, em fatias 2D, as projeções adquiridas (formato 16-bit TIFF), utilizando a interface do *software* do equipamento (v.1.6.9.18, Skyscan, Bruker micro-CT, Belgium). Análises quantitativas foram realizadas por meio dos aplicativo CTAn *software* (v.1.15.4.0, Bruker μ -CT, Belgium) e a visualização das imagens 3D foram feitas com auxílio do aplicativo CTVol (v.2.3.1.0, Skyscan, Bruker μ -CT, Belgium).

4.3.6 Intumescimento

Para o ensaio de intumescimento, filmes formados a partir de soluções de gelatina (20% m/v) e quitosana(2% m/v), filmes de ChMA (2% m/v) e GelChMA (ChMA 2% m/v e GelChMA 20% m/v, na proporção 2:1 v/v), foram cortados em quadrados de 10x10mm de área superficial e espessura variando de 0,04 a 0,25mm, dependendo da composição. Os filmes foram pesados e mergulhados em um volume de 10mL das soluções de interesse por tempos pré-determinados (1h, 4h e 24h). Matrizes tridimensionais de ChMA e GelChMA, com diâmetro de 13,3mm e espessura de 13mm, também foram submetidas ao procedimento. Para cada meio de imersão, três filmes foram ensaiados para cada intervalo de tempo. Após cada tempo de imersão, os filmes tiveram o excesso de umidade retirado com auxílio de papel-filtro, fora pesados e em seguida secos em estufa, a 40°C por 24h. Após a secagem, as amostras foram pesadas e submetidas a um segundo procedimento de intumescimento (*reintumescimento*), nas mesmas condições do primeiro procedimento. Os resultados das pesagens, obtidos em cada etapa do

processo, são utilizados para cálculo do grau de intumescimento (GI) e índice de degradação (ID) do material durante o procedimento por meio das Equações 4.2 e 4.3, respectivamente:

$$GI(\%) = \frac{M_{hi} - M_{hs}}{M_{hs}} \times 100 \quad (4.4)$$

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

em que M_{hs} a massa do hidrogel seco, M_{hi} a massa do hidrogel intumescido, M_{si} a massa do hidrogel seco inicial e M_{sf} a massa do hidrogel seco ao final do processo.

4.3.7 Toxicidade e viabilidade celular - MTT

As amostras, na forma de filme e matriz tridimensional de ChMA e GelChMA, foram colocadas em contato direto com as células embrionárias de rim humano (células HEK293 T). Prepararam-se as amostras seguindo as normas 10993-5:2009 ('Biological evaluation of medical devices: Tests for *in vitro* cytotoxicity') para o ensaio de contato direto. Foi utilizado o tempo de tratamento de 24h e a análise de citotoxicidade foi realizada através do ensaio de MTT. Utilizaram-se, como modelo não tumoral, células HEK 293 T. Como controles, empregaram-se:

- - Controle referência = Células + meio de cultura + soro fetal bovino.
- - Controle positivo = Triton x100 (1% v/v em PBS).
- - Controle negativo = lascas de tubos *Eppendorf* estéreis.

4.3.7.1 Cultura celular

Células de linhagem de rim de embrião humano, HEK293 T, foram cultivadas em DMEM com SFB (10% v/v), sulfato de estreptomicina (10mg.mL^{-1}), penicillina G sódica ($10\text{ unidades.mL}^{-1}$), e anfotericina-b ($0,025\text{mg.mL}^{-1}$), em estufa com 5% de CO_2 à 37°C .

4.3.7.2 MTT ('3-(4,5-dimethylthiazol-2yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide')

O tamanho de todas as amostras foi de (4,0 x 4,0mm²), com espessura média de 2mm para as matrizes, de 0,16 ± 0,03mm para os filmes de GeChMA e de 0,06 ± 0,01mm para os filmes de ChMA. O método de esterilização foi lavagem das amostras com álcool 70° por 2h, seguida de lavagem com PBS na geladeira (8±2°C) por 2h. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços, e, a seguir, células HEK293 T foram semeadas (3x10⁵ células/poço) sobre as amostras. As populações celulares foram sincronizadas, em um momento anterior, em meio sem soro durante 24h. Controles de células e DMEM com 10% de SFB foram utilizados como referência. Como controle positivo, foi utilizado Triton X-100 (1% v/v em tampão fosfato salino), e, como controle negativo, lascas estéreis de tubos de Eppendorf de polipropileno (1 mg.mL⁻¹, Eppendorf, Hamburgo, Alemanha). Após 24h, o meio foi aspirado e substituído por 60µL de meio de cultura com soro em cada poço, e as células foram fotografadas utilizando microscópio óptico invertido (Leica DMIL LED, Alemanha). Foram adicionados, a cada poço, 50µL de reagente MTT (5 mg.mL⁻¹, m/v em tampão fosfato salino). As amostras foram em seguida incubadas, durante 4h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, 40µL de solução de metanol/ HCl (4% v/v) foram colocados em cada poço. Em seguida, 100µL foram removidos de cada poço e transferidos para uma placa de 96 poços, para quantificar a absorbância em espectrofotômetro (I-Mark, Bio-Rad), com filtro de 595nm. Os valores obtidos foram expressos como percentagem de células viáveis de acordo com a Equação 4.4.

$$\mathbf{Viabilidade\ celular\ (\%)} = \frac{\mathbf{Absorção\ das\ amostras}}{\mathbf{Absorção\ controle}} \times \mathbf{100} \quad \mathbf{(4.6)}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da matéria-prima

5.1.1 Espectroscopia no infravermelho

A Figura 5.1 apresenta o espectro no infravermelho de um filme de quitosana preparado a partir de uma solução 2% m/v de quitosana em ácido acético 2% v/v.

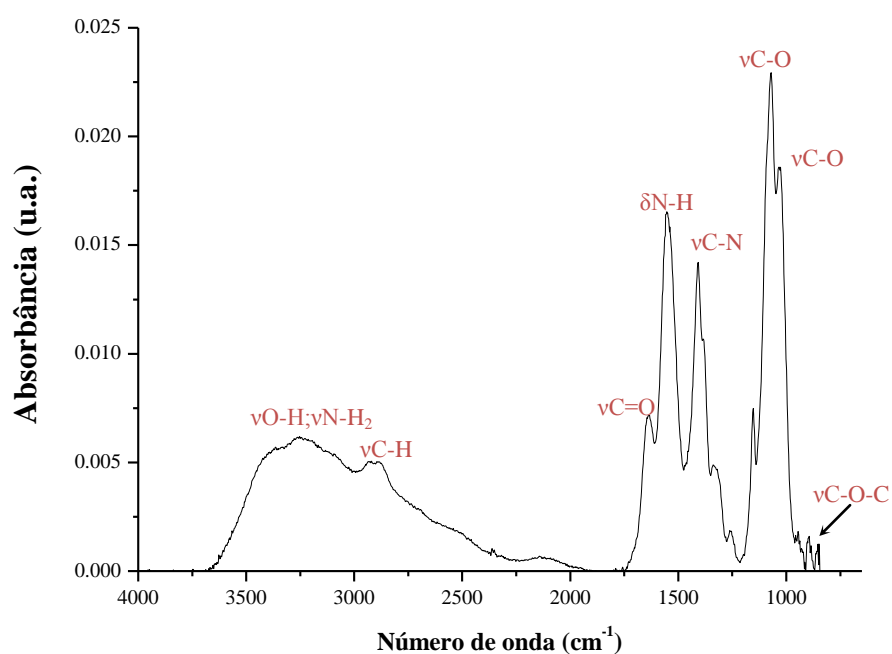


Figura 5.1: Espectro no infravermelho de filme de quitosana 2% m/v.

A Figura 5.2 ilustra o espectro no infravermelho de um filme de gelatina.

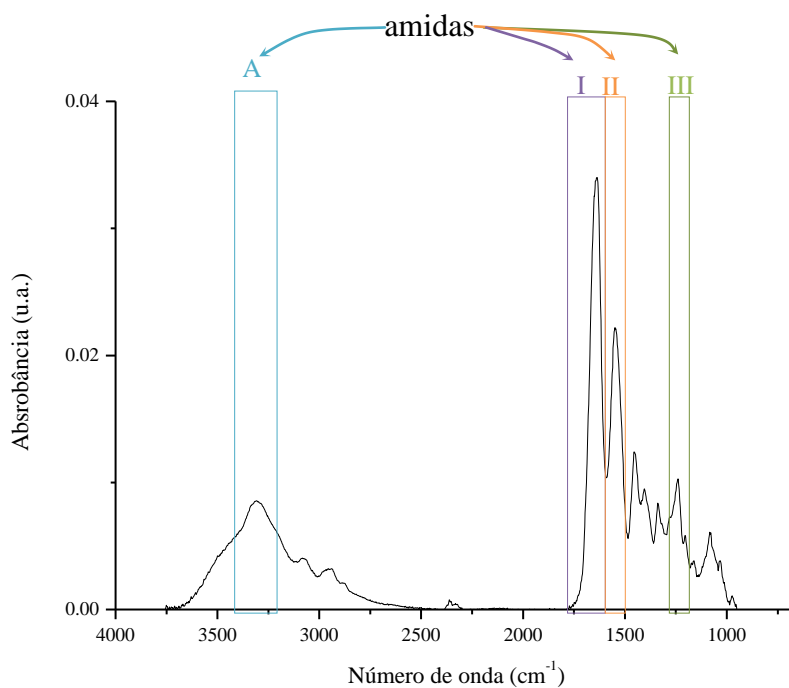


Figura 5.2: Espectro no infravermelho para filme de gelatina.

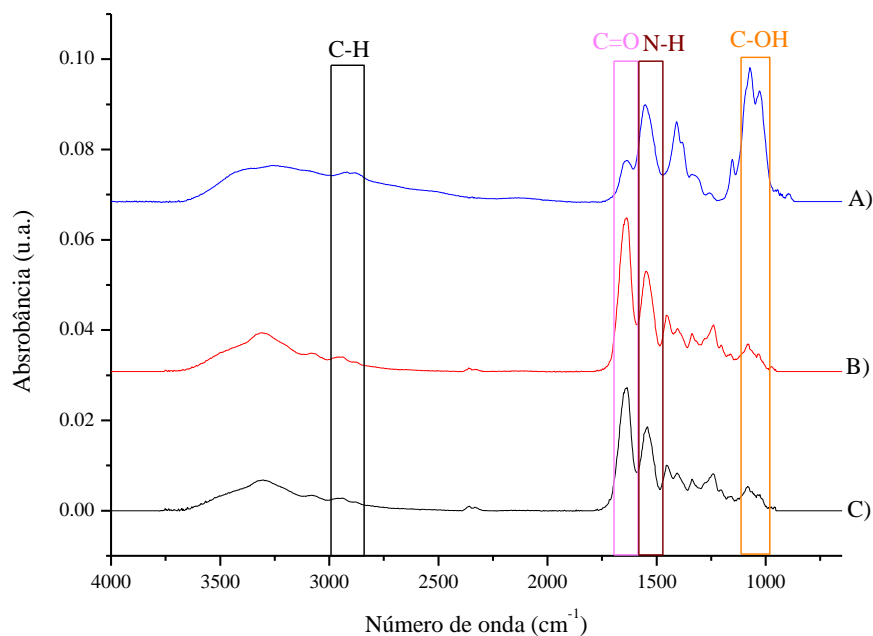


Figura 5.3: Destaque para as regiões onde se localizam as principais bandas de interesse para matérias primas e blenda. A) quitosana, B) blenda 1:1 quitosana:gelatina, C) gelatina.

O espectro de infravermelho da quitosana analisada apresenta um largo pico de absorção próximo a 3300cm^{-1} , que é associado à ligação NH, à ligação de hidrogênio e ao estiramento OH. Na banda do estiramento do CH, entre 2800cm^{-1} e 2900cm^{-1} , o pico de 2900cm^{-1} corresponde à vibração assimétrica, e o pico de 2870cm^{-1} , à vibração simétrica (COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008). Próximo a 1560cm^{-1} , o pico é referente à sobreposição de aminas, amida e carboxilato. Na região de 1400cm^{-1} , identificam-se grupos alquilas e carboxilatos (O-C-O) (BEPPU; ARRUDA; SANTANA, 1999; COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008). As vibrações fora do plano da ligação C-O, correspondente à estrutura sacarídea, aparecem em 897cm^{-1} (COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008). O pico próximo a 3450cm^{-1} , relativo a ligações OH, sobrepõe-se ao pico relativo a ligações NH, centrado em 3300cm^{-1} . Estes se encontram deslocados, assim como o pico 1640cm^{-1} , em direção a menores frequências. Sugere-se que a mudança esteja relacionada com um aumento de interações do tipo ligação de hidrogênio/reticulações físicas entre as cadeias com o processo de congelamento e liofilização.

O espectro da gelatina evidencia picos relevantes na região de absorção devido ao estiramento de C=O em 1640cm^{-1} (amida I), de estiramento NH em 1540cm^{-1} (amida II) e estiramento de CN e NH em 1240cm^{-1} (amida III) (DE LA MATA *et al.*, 2013; PEREDA *et al.*, 2011).

Comparando os espectros dos três materiais, nota-se um deslocamento da banda de 1640cm^{-1} no sentido de menor frequência no espectro da blenda em relação ao espectro da quitosana (Figura 5.3), o que pode indicar interação entre grupos funcionais da quitosana e grupos carboxilas da gelatina (GUO; ZHOU; LV, 2013).

5.1.2 Determinação do grau de desacetilação

5.1.2.1 Titulação potenciométrica

Figura 5.4 ilustra a curva referente a uma das titulações potenciométricas de quitosana e sua curva derivada, a fim de evidenciar seus pontos de inflexão.

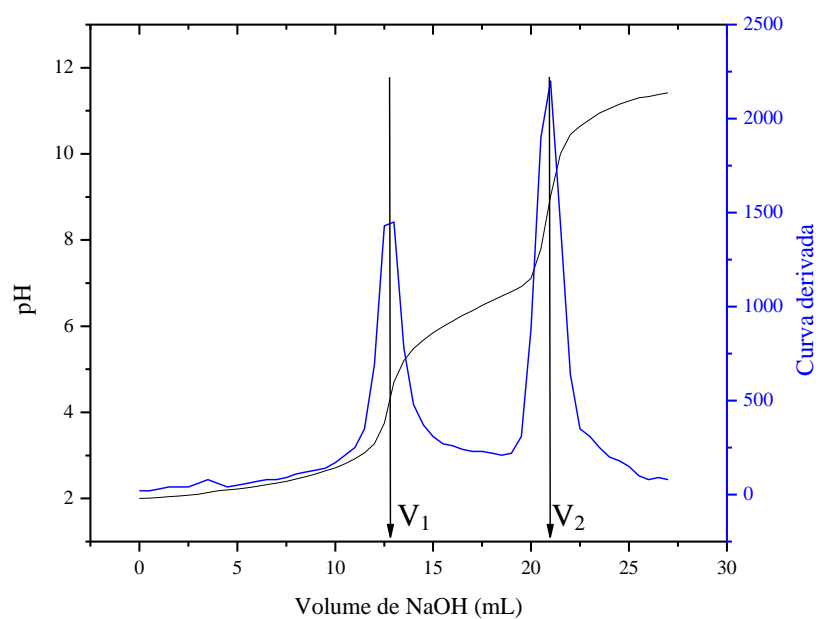


Figura 5.4: Curva de titulação e sua curva derivada para titulação potenciométrica da quitosana.

A Figura 5.5 apresenta as curvas e regressões da titulação potenciométrica de quitosana (método IV da Tabela 3.3) em intervalos de pH variando de 2 a 6.

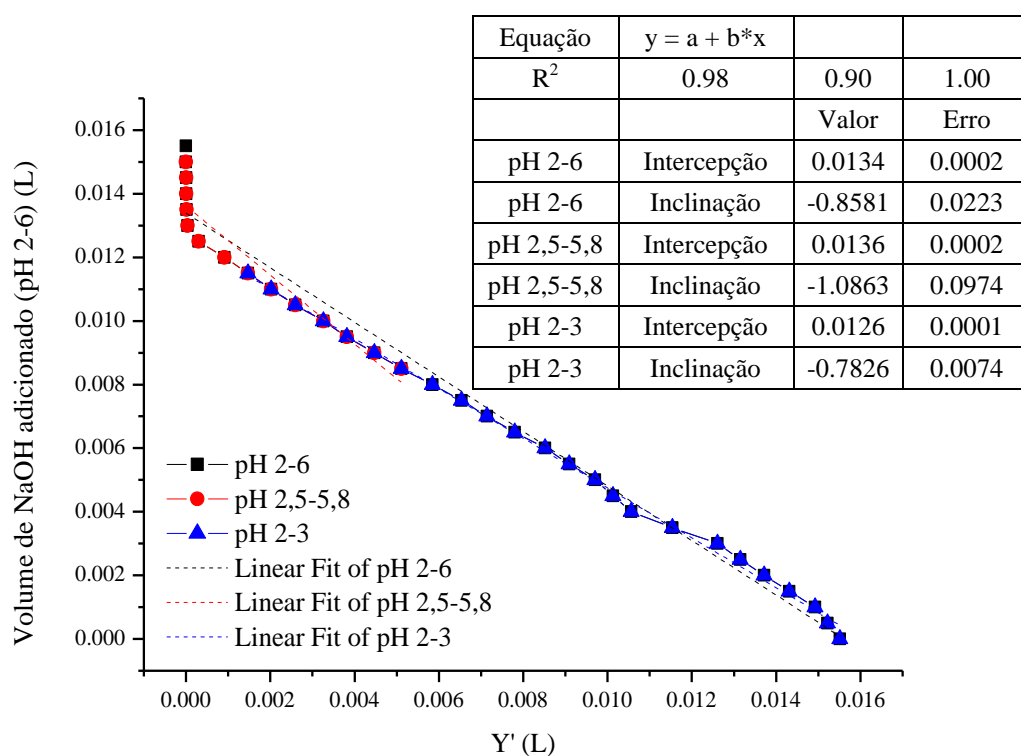


Figura 5.5: Regressões e resultados obtidos para V_e em intervalos de pH 2-3, 2-6 e 2,5-5,8 para a titulação potenciométrica de quitosana para determinação de GD.

Embora os volumes de base encontrados para titular a quitosana tenham sido diferentes em cada procedimento, a diferença da quantidade de base gasta ($C_b V_b$) entre os pontos de inflexão se manteve constante em todos os casos.

Devido à semelhança entre a relação $C_b V_b$, os valores de GD, obtidos para cada amostra utilizando as fórmulas que levam em conta a diferença entre os volumes nos pontos de inflexão (métodos I e II da Tabela 3.3), foram muito próximos ou idênticos para as três titulações.

Aplicando-se os resultados nas fórmulas apresentadas na Tabela 3.3, foram obtidos diferentes valores para GD. Algumas das técnicas se mostram melhores que outras dependendo da GD do material em questão, da massa da amostra e das condições do procedimento (BALÁZS; SIPOS, 2007; JIANG; CHEN; ZHONG, 2003). O método mais apropriado para o cálculo, de acordo com a reprodutibilidade dos resultados, a concordância com os valores determinados pelo fornecedor e com os resultados encontrados por espectroscopia, é o método IV, determinando-se um GD de $86 \pm 2\%$.

5.1.2.2 Determinação do GD por espectroscopia no infravermelho

A Tabela 5.1 destaca os valores de grau de desacetilação obtidos de acordo com a razão de absorbâncias entre picos de prova e de referência escolhidos com base na literatura (BRUGNEROTTO *et al.*, 2001; KASAAI, 2008, 2009). A Tabela 5.2 explicita os resultados obtidos para o cálculo do GD de acordo com a razão entre áreas dos picos de prova e de referência para filmes e matriz de quitosana.

Tabela 5.1: Valores de grau de desacetilação obtidos de acordo com a razão entre absorbâncias entre picos de prova e de referência listados na literatura.

Razão entre picos	Grau de desacetilação		Média dos valores		Grau de desacetilação
	Filme	Matriz	Filme	Matriz	
A_{1640}/A_{1070}	84	86	79 ± 6	84 ± 1	82 ± 5
A_{1640}/A_{1030}	80	84			
A_{1320}/A_{1420}	72	83			

Tabela 5.2: Relação entre área dos picos de prova e de referência para cálculo de grau de desacetilação.

Resultado	Razão entre picos			
	$\frac{1550}{1070}$	$\frac{1550}{1030}$	$\frac{\sim 1640}{1070}$	$\frac{\sim 1640}{1030}$
Média	0,97	0,76	0,17	0,13
Desvio-padrão	0,02	0,01	0,02	0,02
GD	0,97	0,76	0,83	0,87
Média	0,86			
Desvio-padrão	0,09			
GD(%)	86 ± 9			

A forma e intensidade do pico relativo à flexão da ligação CH_2 em 1420cm^{-1} podem variar dependendo da cristalinidade da quitosana e do rearranjo de ligações de hidrogênio na posição de grupos OH primários (HARISH PRASHANTH; KITTUR; THARANATHAN, 2002), o que torna possível justificar a diferença dos valores de desacetilação encontrados para a matriz e o filme de quitosana.

5.1.2.3 Determinação do GD - Comparação entre técnicas.

Técnicas como titulação potenciométrica e FTIR são semi-quantitativas e, para análise quantitativa, técnicas complementares, como Ressonância nuclear magnética (RNM), são necessárias (SARAIVA *et al.*, 2015). Assim sendo, foi realizado RNM para determinação do GD e comparação entre as outras técnicas utilizada de forma a se obter informações sobre qual método tem melhor benefício em relação a facilidade de execução, infraestrutura necessária e confiabilidade do resultado. Os valores obtidos para GD por comparação entre valores obtidos pelas razões entre bandas de absorção (Tabela 5.1 e Tabela 5.2), levando em conta a intensidade ou a área dos picos de prova e de referência, estão de acordo com os valores obtidos por titulação potenciométrica, sendo o GD estabelecido como 85 ± 2 . A comparação entre os valores obtidos por cada método pode ser encontrada na Tabela 5.3.

Tabela 5.3: Resultados obtidos para o grau de desacetilação da quitosana com base na titulação potenciométrica e na análise do espectro de infravermelho das amostras em forma de filme e matriz porosa.

Método	GD
Titulação Potenciométrica	86 ± 2
Por média entre razões de absorbância	82 ± 5
Razão entre áreas dos picos de prova e referência	86 ± 9
RNM	80.24

A titulação linear no intervalo de pH entre 2.6-5.8 mostrou-se um método rápido, de baixo custo e pouca infraestrutura necessária para a execução. Os resultados obtidos foram próximos ao valor encontrado por RMN, sendo então uma ótima opção para a caracterização da quitosana em relação ao GD.

5.2 Funcionalização química da quitosana por anidrido metacrílico

5.2.1 Verificação da funcionalização por espectroscopia UV-Vis

Os espectros obtidos para a matéria-prima original e funcionalizada são representados na Figura 5.6.

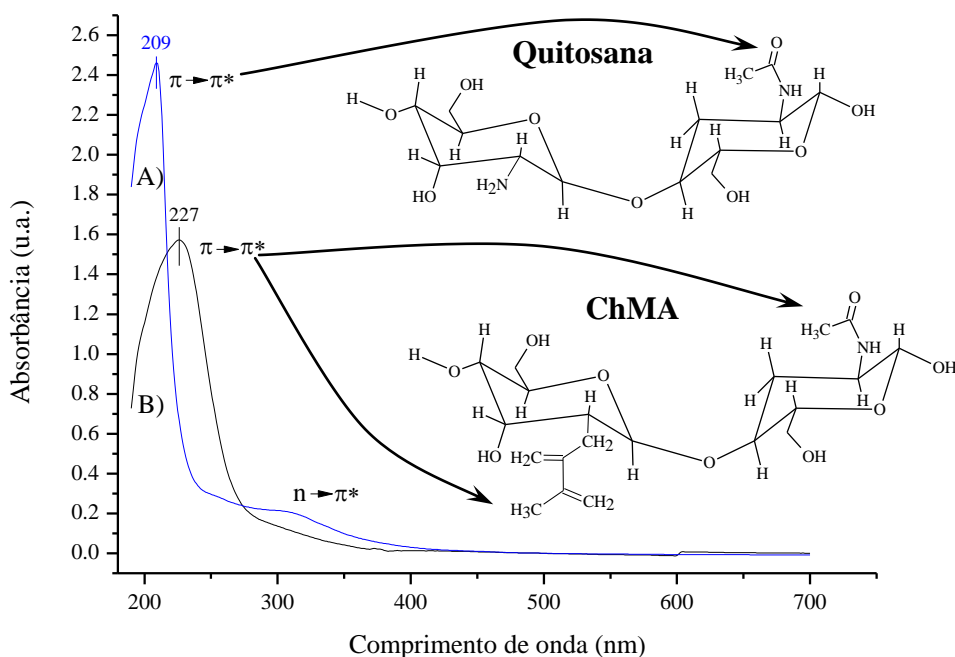


Figura 5.6: Espectro UV-Vis da matéria-prima, quitosana, curva A), e da matéria-prima funcionalizada, ChMA, curva A).

Como pode ser observado a partir das curvas obtidas por espectroscopia UV-Vis, houve mudança no centro do pico da banda de absorção, o que é um indicativo da funcionalização da matéria-prima (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). No caso da funcionalização da quitosana com grupos metacrilamida- que contêm ligações duplas conjugadas- a reação de substituição deve ocorrer em hidrogênios ligados a amins primárias. A ocorrência da reação pode ser identificada por um deslocamento da banda de absorção no sentido de maior comprimento de onda. Esse deslocamento é justificado pela presença de grupos contendo ligações duplas conjugadas (REUSCH, 2013). A mudança na intensidade de absorção pode ser justificada por uma possível variação da espessura dos filmes utilizados para a espectroscopia.

A técnica em questão, nesse caso, é qualitativa e serve como primeira etapa na validação da efetividade da enxertia de segmentos conjugados.

5.2.2 Verificação da funcionalização por espectroscopia no infravermelho.

A Figura 5.7 compara os espectros obtidos para a matéria-prima original e funcionalizada, indicando as regiões de maior alteração, que envolvem ligações relativas à amina ($\sim 1350\text{cm}^{-1}$, 1550cm^{-1}), e aos grupamentos vinil C=C ($1620\text{-}1640\text{cm}^{-1}$) (ESCOBAR-BARRIOS *et al.*, 2012; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001; REUSCH, 2013).

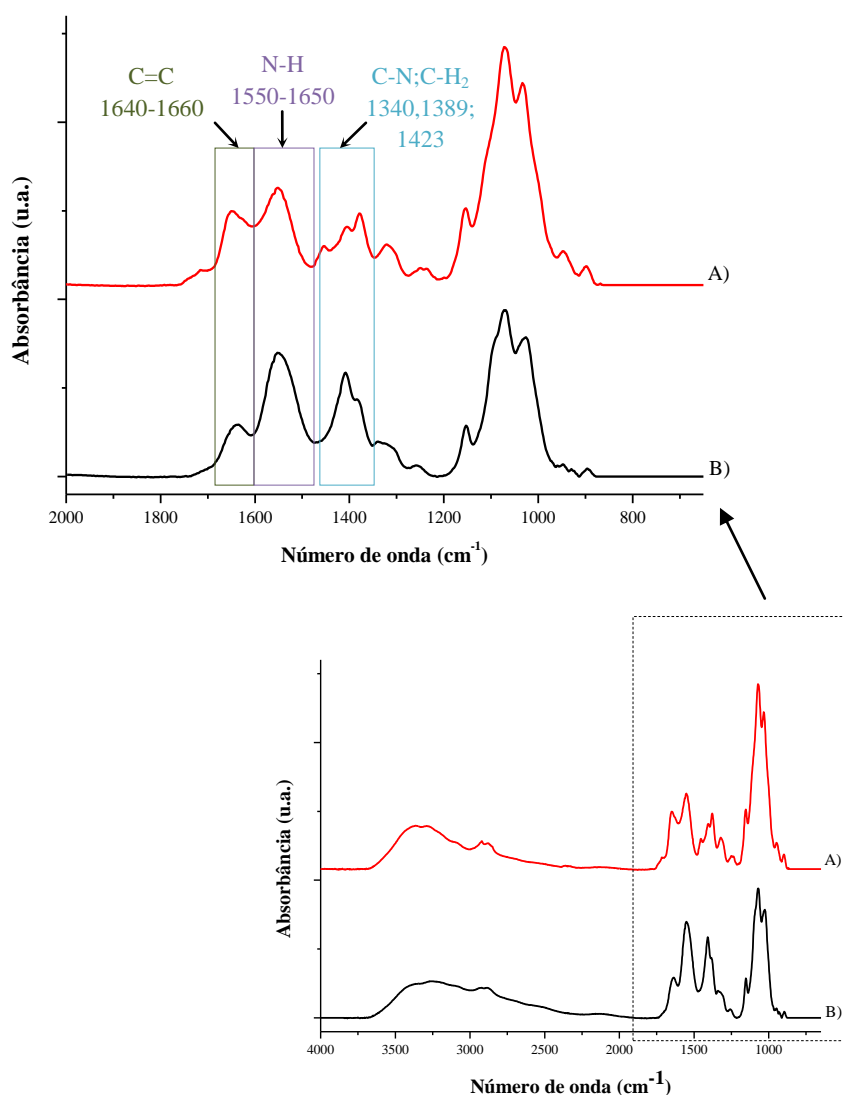


Figura 5.7: Comparação dos espectros obtidos para a matéria-prima original e funcionalizada, indicando as regiões de maior alteração com o procedimento de funcionalização. A) ChMA, B) quitosana.

O resultado da razão entre as áreas do pico de prova e referência é evidenciado no gráfico da Figura 5.8.

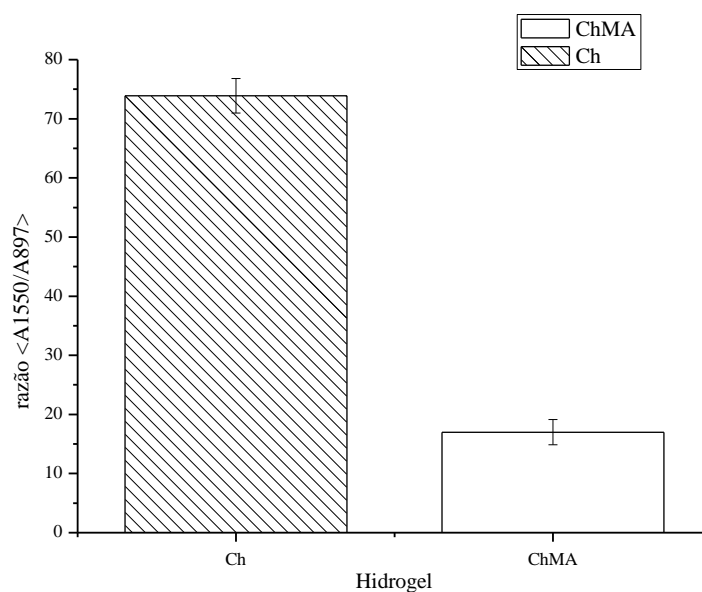


Figura 5.8: O resultado da razão entre as áreas do pico de prova (1550cm^{-1}) e referência (897cm^{-1}) para matéria-prima original e funcionalizada com grupos metacrilamida.

Em uma análise comparativa, relacionando o espectro da matéria-prima original e o da matéria funcionalizada, nota-se facilmente a redução da banda centrada em 1550cm^{-1} quando comparada às demais bandas. A banda centrada em 1640cm^{-1} , por sua vez, mostra-se mais protuberante. O ocorrido está de acordo com o esperado para a funcionalização de quitosana com AM, quando se espera que haja um consumo de ligações do tipo NH, relacionadas ao sítio de reação de funcionalização, identificado por uma redução do pico centrado em 1550cm^{-1} , e um aumento na banda relativa a ligações C=C, que coincide com a região de absorção de amida em aproximadamente 1650cm^{-1} (BILLIET *et al.*, 2013; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

A redução da razão entre áreas é um indicativo do consumo de grupamentos amina primária e, portanto, da efetividade da reação de funcionalização.

5.2.3 Estimativa do grau de funcionalização das cadeias de quitosana

5.2.3.1 Estimativa do grau de funcionalização por titulação potenciométrica

A Figura 5.9 ilustra a curva referente a uma das titulações potenciométricas de ChMA e sua curva derivada, a fim de evidenciar seus pontos de inflexão.

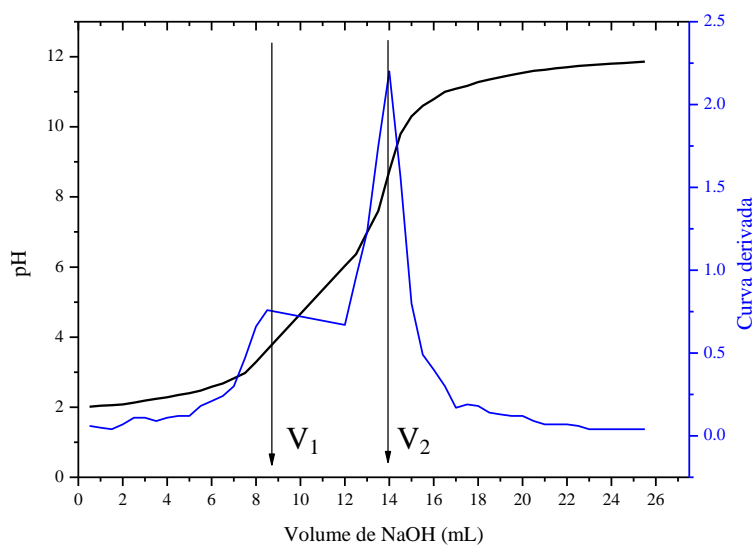


Figura 5.9: Curvas de titulação e derivada para titulação potenciométrica da ChMA.

Assim como no caso do grau de desacetilação da quitosana, os pontos de inflexão da curva do pH da solução em função da quantidade do titulante adicionado (NaOH 0,1M) foram levados em consideração para estimar a quantidade de grupos laterais amina presentes nas cadeias de ChMA. A diferença entre o volume de titulante, gasto para neutralizar o excesso de ácido (V_1) presente na solução, e o volume, utilizado para desprotonar os grupos NH_3^+ (V_2), presentes nos meros remanescentes de glucosamina, foi calculada e usada como base para determinação do grau de substituição por titulação potenciométrica. Aplicando-se os volumes V_1 e V_2 na Equação I da Tabela 3.3, concluiu-se que, em média, 45% dos meros presentes na matéria-prima funcionalizada são glucosamina. Calculando-se a diferença entre a proporção de meros glucosamina, presentes na quitosana original, e a proporção de meros glucosamina, presentes na quitosana funcionalizada, chega-se a um valor de $\sim 22\%$ para o grau de funcionalização (GF).

5.2.3.2 Estimativa do grau de funcionalização por espectroscopia no infravermelho

Os espectros utilizados para análise do GF da ChMA foram aqueles representados na Figura 5.7. A Tabela 5.4 explicita os valores de GD, que é equivalente à porção de meros glucosamina presentes nas cadeias, para quitosana e ChMA e os resultados obtidos para o GF.

Tabela 5.4: Resultados de grau de funcionalização obtidos por espectroscopia no infravermelho e titulação potenciométrica.

Método	Grandeza	Picos <Prova/Ref.>	Quitosana	ChMA	GF
			GD		
Integração automática de picos pelo Origin®	Área dos picos	1550/1070	1,06	0,54	0,52
	Intensidade dos picos	1550/1070	0,74	0,41	0,33
Deconvolução de picos	Área dos picos	1550/1070	0,99	0,43	0,56
	Intensidade dos picos	1550/1070	0,77	0,40	0,38
Resultado			0,89±0,15	0,45±0,06	0,45±0,10

A Figura 5.10 ilustra o processo de funcionalização da quitosana com grupos metacrilamida.

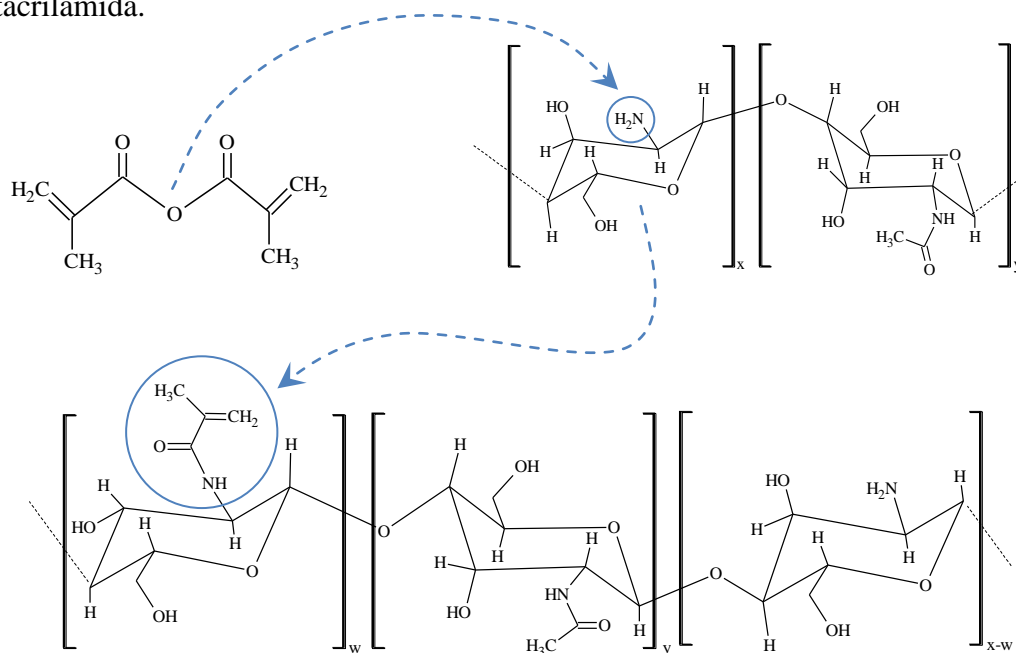


Figura 5.10: Esquema ilustrativo do processo de funcionalização da quitosana com grupos metacrilamida. Sendo $x = 0.85$, $y = 0.15$ and $w = 0.85 \cdot (\text{grau de substituição})$.

5.2.3.3 *Resultado geral da estimativa do grau de funcionalização das cadeias de quitosana*

Os resultados obtidos por titulação potenciométrica e por espectroscopia no infravermelho foram consideravelmente discrepantes, o que é compreensível uma vez que se tratam de métodos semiquantitativos. Foi então realizada a análise do grau de funcionalização de ChMA por RNM. Esta técnica gerou um valor de 21.84% para a propriedade em questão, muito próximo ao valor obtido por titulação potenciométrica. A titulação mostrou-se, assim como no caso da determinação do grau de desacetilação de quitosana, uma técnica bastante viável para determinação da extensão de seguimentos modificados pela funcionalização desse polímero. O valor obtido para GF foi próximo ao encontrado por outros autores (SARAIVA *et al.*, 2015; VALMIKINATHAN *et al.*, 2012; YU; KAZAZIAN; SHOICHET, 2007).

5.3 **Reticulação de ChMA e GelChMA**

5.3.1 *Caracterização da reticulação química por espectroscopia no infravermelho*

Os resultados de análise no infravermelho para verificação da ocorrência de fotorreticulação dos hidrogéis são apresentados na Figura 5.11, para as amostras de ChMA e na Figura 5.12, para as amostras de GelChMA. Ambas foram expostas por 0min, 1min, 5min, 10min e 30min à radiação UV.

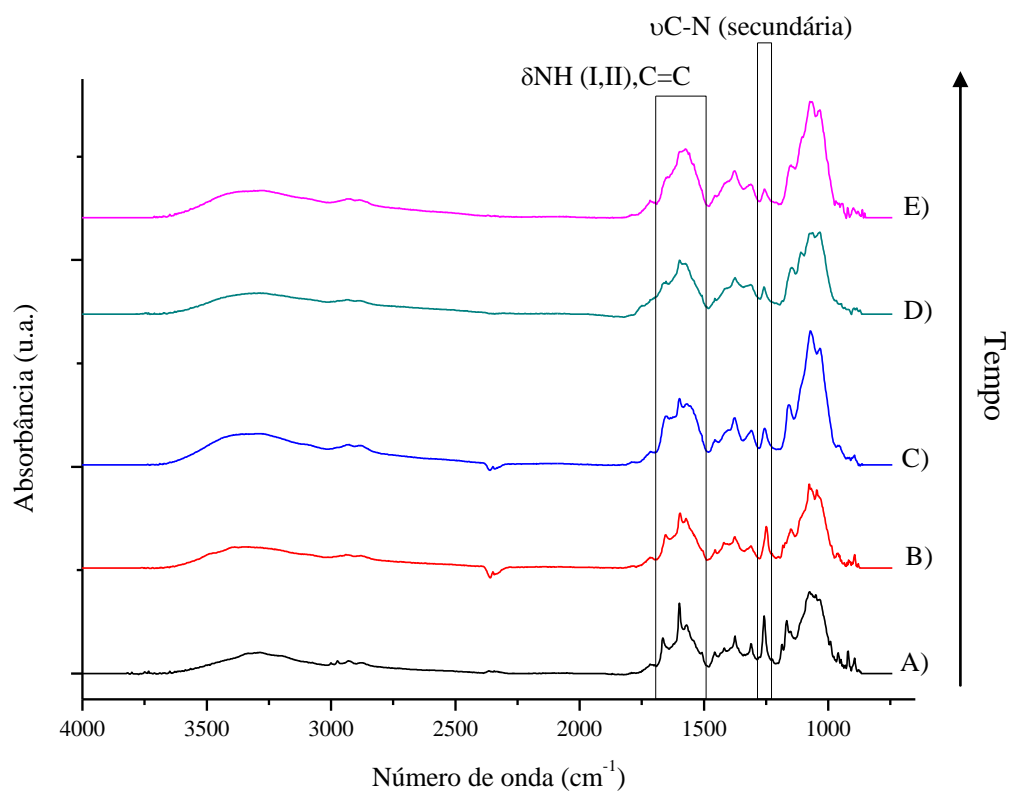


Figura 5.11: Comparação dos espectros de ChMA encontrados para amostras expostas por A) 0min; B) 1 min; C) 5; D) 10min; e E)30 min à radiação UV.

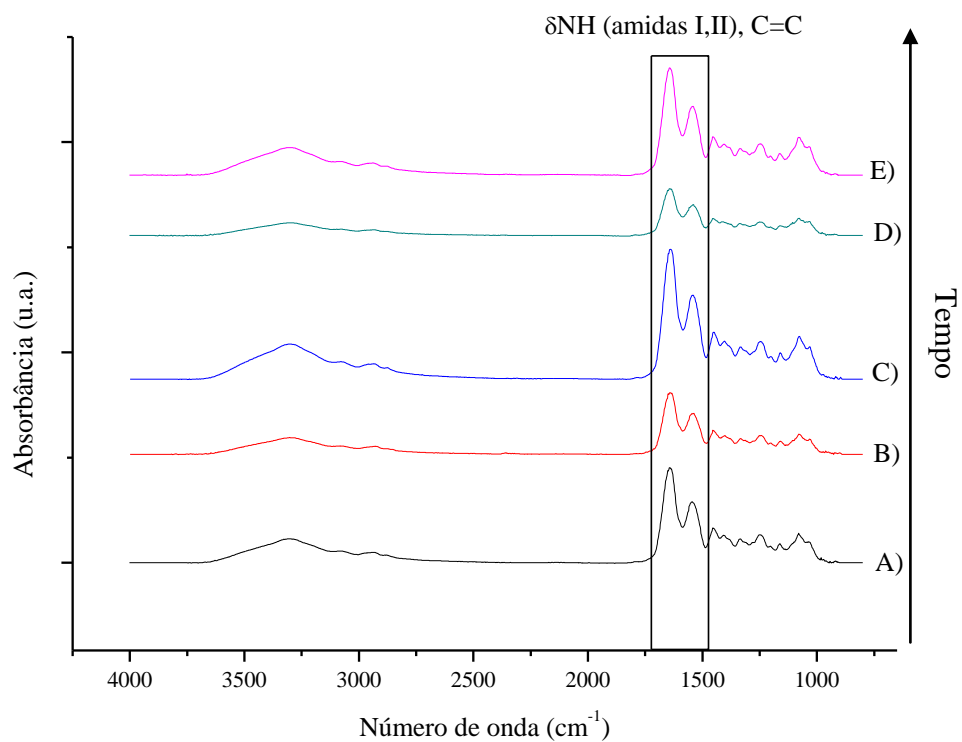


Figura 5.12: Comparação dos espectros de GelChMA encontrados para amostras expostas por A) 0min; B) 1 min; C) 5min; D) 10min; e E) 30 min à radiação UV.

A Figura 5.13 compara a variação da intensidade relativa do pico centrado em $\sim 1640\text{cm}^{-1}$ para uma amostra de GelChMA não exposta diretamente à radiação UV e uma amostra exposta por 30 minutos à radiação UV.

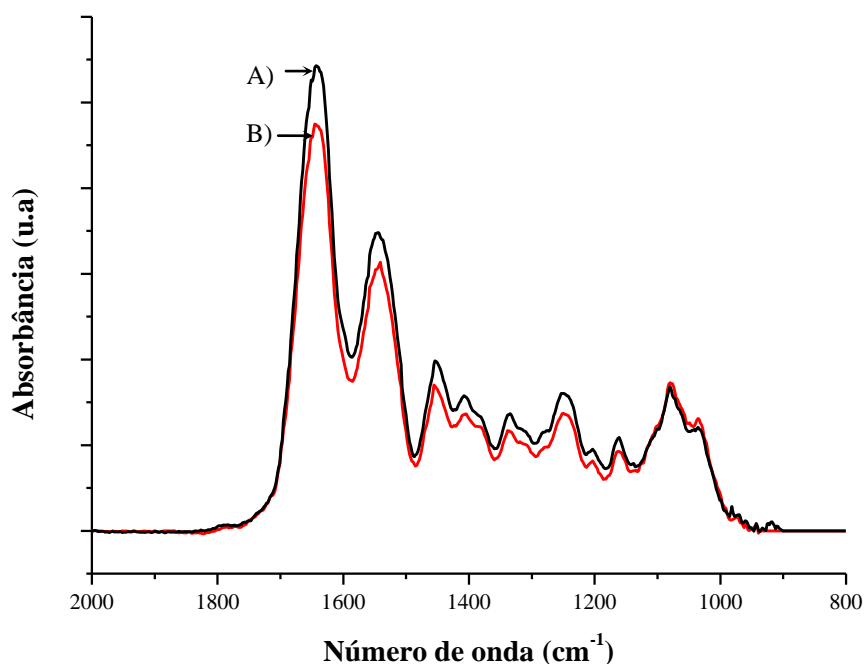


Figura 5.13: Comparação da variação da intensidade relativa do pico centrado em $\sim 1630\text{cm}^{-1}$ para amostras de GelChMA A) não exposta diretamente à radiação UV e B) exposta por 30 minutos à radiação UV.

Os resultados da análise semiquantitativa, obtidos por meio do cálculo da área de picos pelo Origin®, com identificação dos picos pelo método do máximo local, estão representados na Figura 5.14. Os resultados obtidos por meio do cálculo da área de picos, a partir da deconvolução de regiões dos picos de interesse, podem ser observados no gráfico representado na Figura 5.15, item a). A Figura 5.15 ilustra também as curvas obtidas pela deconvolução nos itens b) e c), para ChMA e GelChMA, respectivamente.

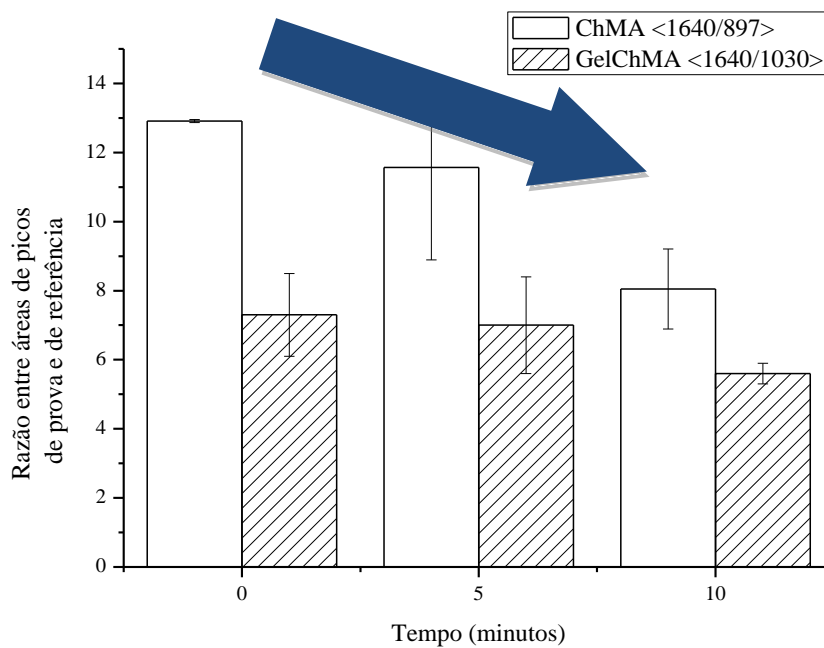
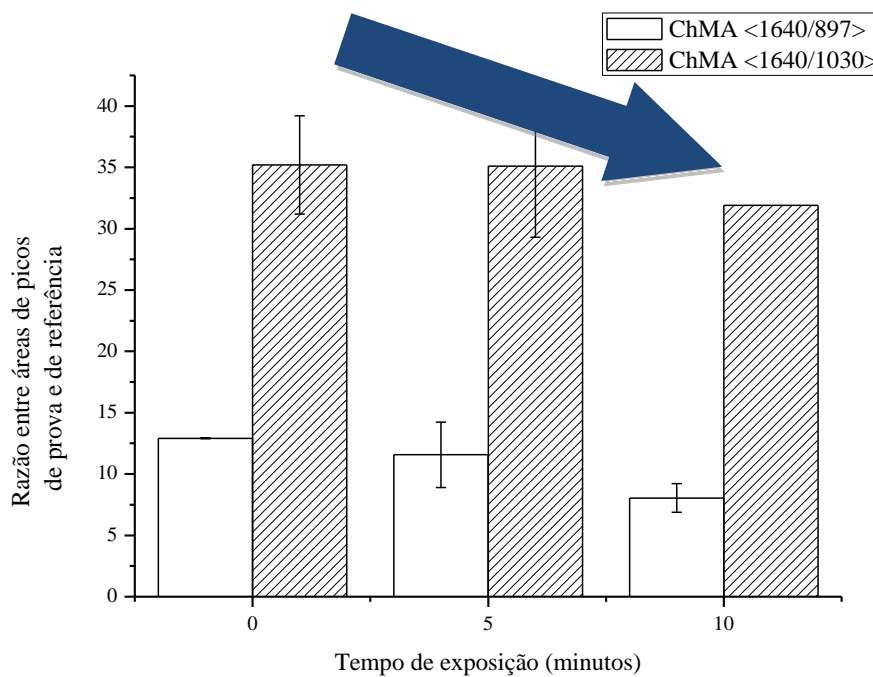
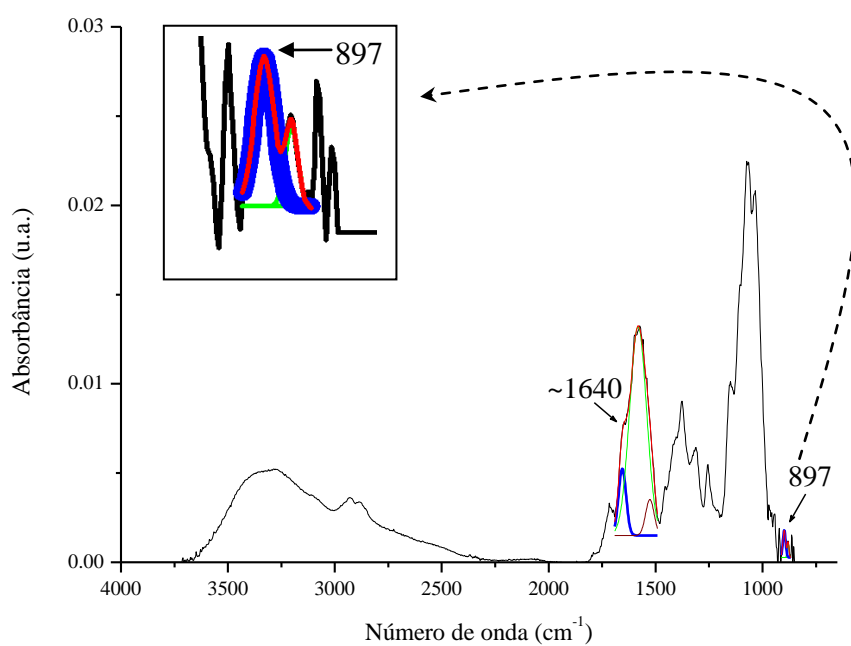


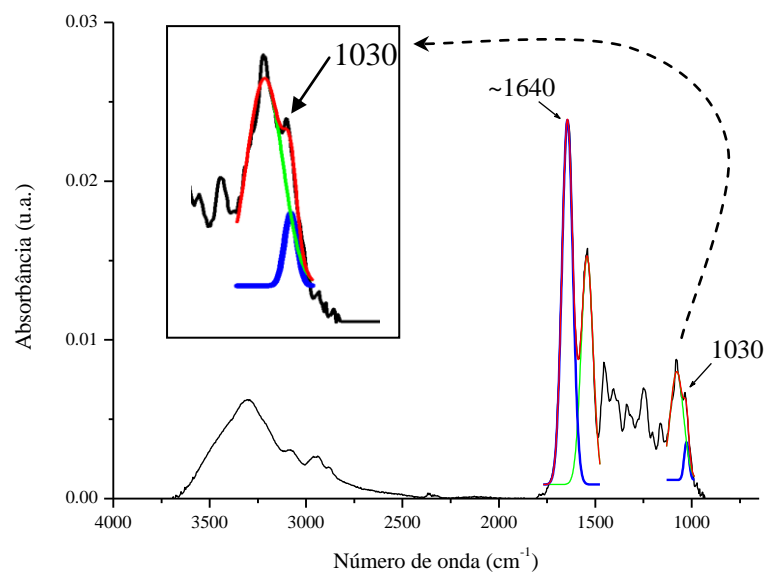
Figura 5.14: Resultado das razões entre áreas de picos de prova e de referência pela integração do espectro e determinação dos picos presentes pelo método de máximo local pelo aplicativo Origin®.



a)



b)



c)

Figura 5.15: O resultado obtido a partir da deconvolução de regiões dos picos de interesse, item a) e as curvas obtidas pela deconvolução das curvas de interesse para ChMA e GelChMA, expostas por 30 minutos à radiação UV, nos itens b) e c), respectivamente.

Comparando os espectros ilustrados na Figura 5.11, obtidos ao longo dos tempos de exposição, notam-se, principalmente, variações nas bandas centradas em aproximadamente 1640cm^{-1} , que podem ser relacionadas à ligação C=C, consumida durante a fotorreticulação das cadeias. Notam-se, também, alterações na região de 1250cm^{-1} , relativa à ligação C-N (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001). Essa variação indica que pode haver reação entre radicais livres e os grupamentos químicos, mudando características da ligação na região. As mudanças no espectro para ambos os grupos indicam um possível consumo desses grupamentos devido à redução da intensidade relativa dos picos, que podem ser interpretadas como sítio de formação de novas ligações entre cadeias e ou moléculas livres presentes no meio. Observa-se, também, um leve deslocamento do centro do pico relativo à ligação C=C no sentido de maiores frequências (menor número de onda), que pode ser relacionado à quebra da conjugação presente no grupo metacrilamida com o ataque dos radicais livres (PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 2001).

A análise dos espectros de GelChMA apresentou, além de picos característicos de ChMA, os principais picos de absorvância para a gelatina, caracterizada pelo pico de amida A (vibração de estiramento da ligação N-H) em 3280cm^{-1} , o pico de amida I (estiramento C=O) próximo a 1640cm^{-1} , o pico de amida II (dobramento da ligação N-H e alongamento da ligação C-H) a 1547cm^{-1} e o pico da amida III (dobramento da ligação C-N em fase com estiramento de ligação N-H) em 1240cm^{-1} . A região de vibração da ligação dupla C=C ($1680\text{-}1620\text{cm}^{-1}$) coincide com a região de vibração das amidas, presentes em grande quantidade nas cadeias de gelatina. Dessa forma, a variação da quantidade de insaturações pode ser relacionada com mudanças relativas na intensidade da banda em questão, devido ao acoplamento das vibrações características de cada ligação (BILLIET *et al.*, 2013).

A única mudança expressiva que se nota na comparação dos espectros representados na Figura 5.13 é em relação à intensidade do pico centrado em aproximadamente 1640cm^{-1} , que indica uma redução de vibrações relativas à ligação C=C, visto que não se esperam reações envolvendo os demais grupos químicos que vibram nessa mesma frequência. O consumo de insaturações indica presença de reticulação química entre as cadeias com o decorrer do tempo de exposição à radiação.

A menor variação entre os picos de prova e referência para diferentes tempos de exposição para amostras de GelChMA pode ser justificada pela maior interferência de outros grupamentos químicos (amidas), que vibram na mesma região que a ligação utilizada como prova da reação química de reticulação. A menor proporção de sítios de reticulação para os hidrogéis de GelChMA também justifica a menor diferença entre os picos devido ao fato de apenas as cadeias de quitosana terem sido modificadas com o grupo metacrilamida.

Em ambas as formas de cálculo utilizadas, a razão entre as áreas do pico de prova e do pico de referência tornou-se menor com o aumento do tempo de exposição à luz UV, o que é um indicativo do consumo de ligações C=C e, conseqüentemente, de formação de reticulação química. O esquema ilustrativo da fotorreticulação das cadeias de ChMA é representado na Figura 5.16.

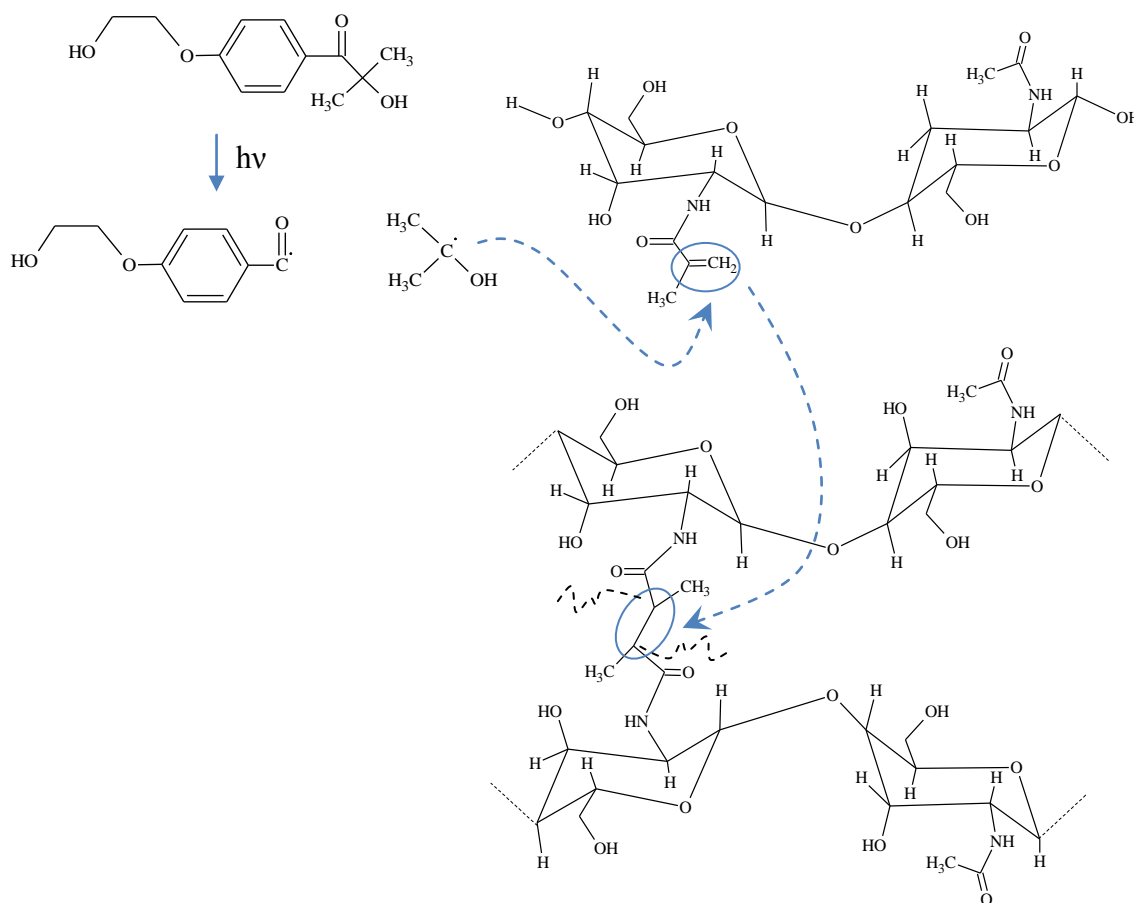


Figura 5.16: Esquema ilustrativo da fotorreticulação das cadeias de ChMA.

5.4 Caracterização morfológica

5.4.1 Quitosana

A análise da morfologia de matrizes tridimensionais de quitosana, obtidas por meio da liofilização da solução de quitosana (2% m/v), revelou elevada porosidade, com presença de poros interconectados de tamanho médio de $146\mu\text{m}$. Imagens da matriz obtidas por fotografia (Figura 5.17), $\mu\text{-CT}$ (Figura 5.19) e MEV (Figura 5.19) foram utilizadas para análise da arquitetura das matrizes.

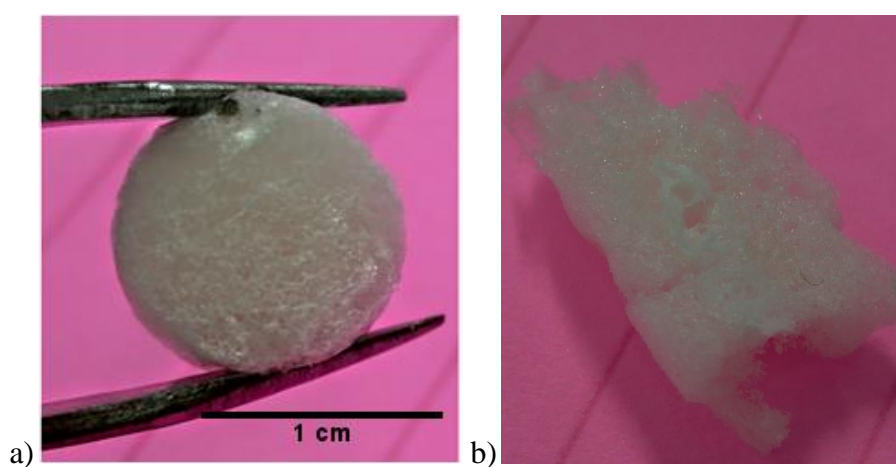


Figura 5.17: Corpos de prova de quitosana liofilizados em a) corte transversal e b) longitudinal.

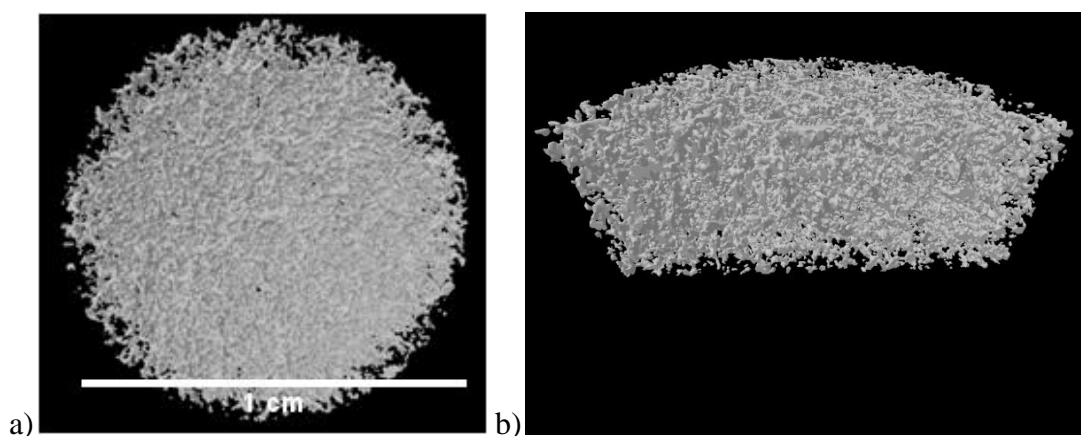


Figura 5.18: Imagem de matriz de quitosana obtida por $\mu\text{-CT}$ em corte a) transversal e b) longitudinal.,

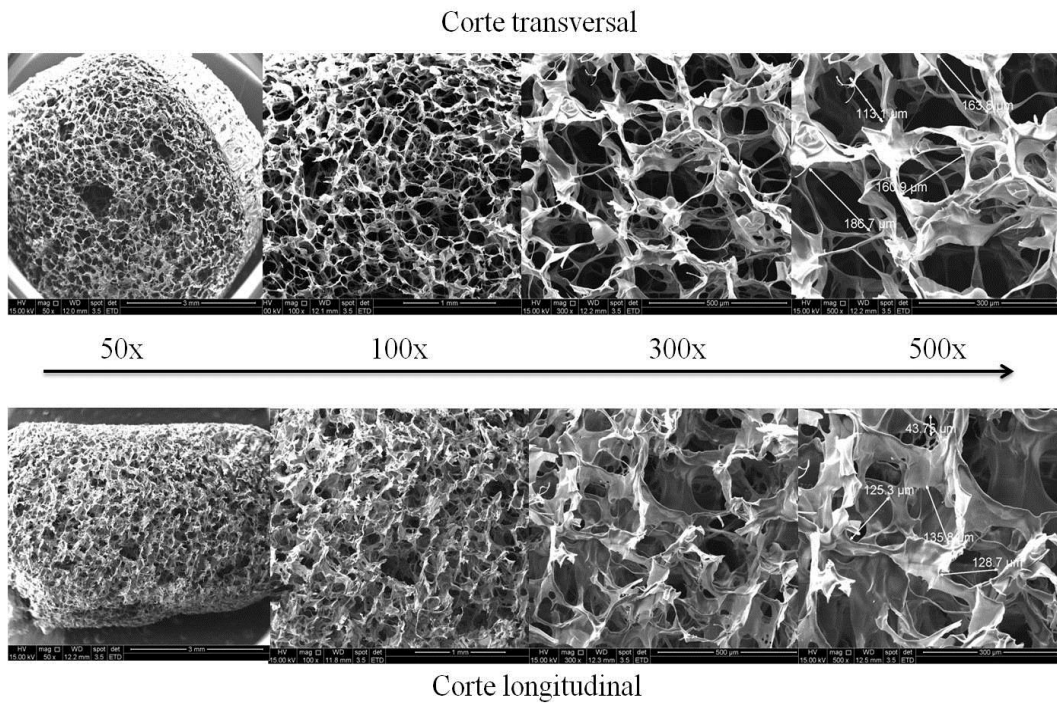


Figura 5.19: Imagens obtidas por MEV para matriz de quitosana (corte longitudinal) em aumentos de 50, 100, 300 e 500 vezes.

O gráfico representado na Figura 5.20 ilustra a distribuição de poros da matriz de quitosana obtida por μ -CT.

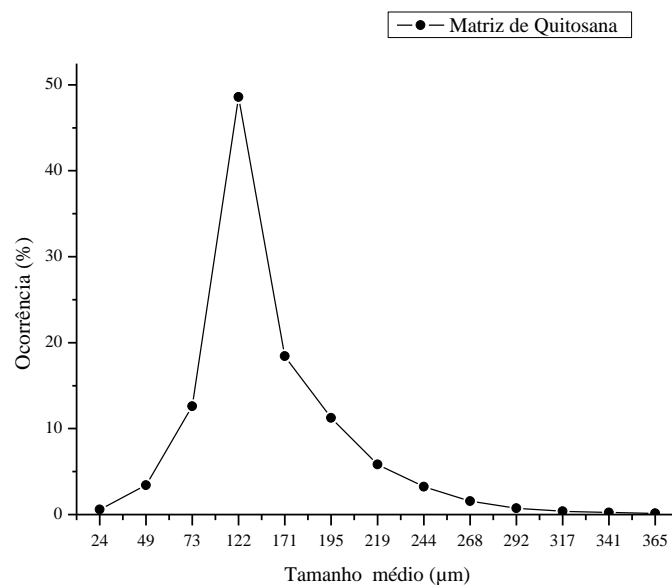


Figura 5.20: Gráfico de distribuição de tamanho de poros para matriz de quitosana. Os dados foram obtidos por μ -CT.

A faixa encontrada para a porosidade e o tamanho médio de poros está de acordo com a literatura (SEOL *et al.*, 2004; YANG, B. *et al.*, 2010). Sabe-se que a as condições de produção da matriz porosa, incluindo o método de congelamento do material, influencia no tamanho, na interconectividade entre os poros e na porosidade total (ANNABI *et al.*, 2010). O tamanho médio de poro está de acordo com o descrito na literatura para a temperatura do congelamento pré-lyofilização (MADIHALLY; MATTHEW, 1999).

5.4.2 Gelatina

A solução 20% m/v de gelatina, após congelada e lyofilizada, apresentou grande heterogeneidade, com formação de uma parede espessa nas extremidades e um núcleo tipicamente oco, como pode ser observado na fotografia das Figura 5.21 e Figura 5.22, obtidas por μ -CT.

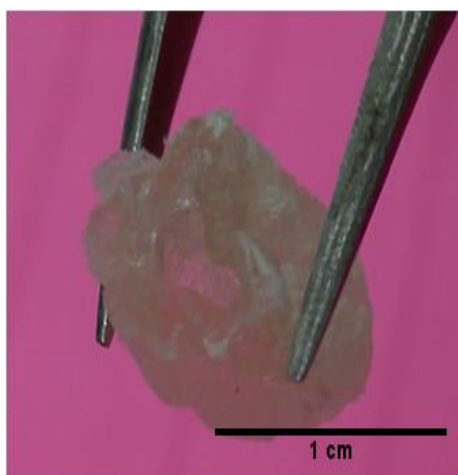


Figura 5.21: Matriz de gelatina não quimicamente reticulada em corte transversal após lyofilização.

Não se observa, em grande parte da matriz, a formação de poros interconectados como no caso da quitosana pura e da blenda de quitosana e gelatina, mas são vistos aglomerados de material denso, intercalados com grandes vazios formados com a evaporação do solvente, como pode ser observado na Figura 5.23 e na Figura 5.24.

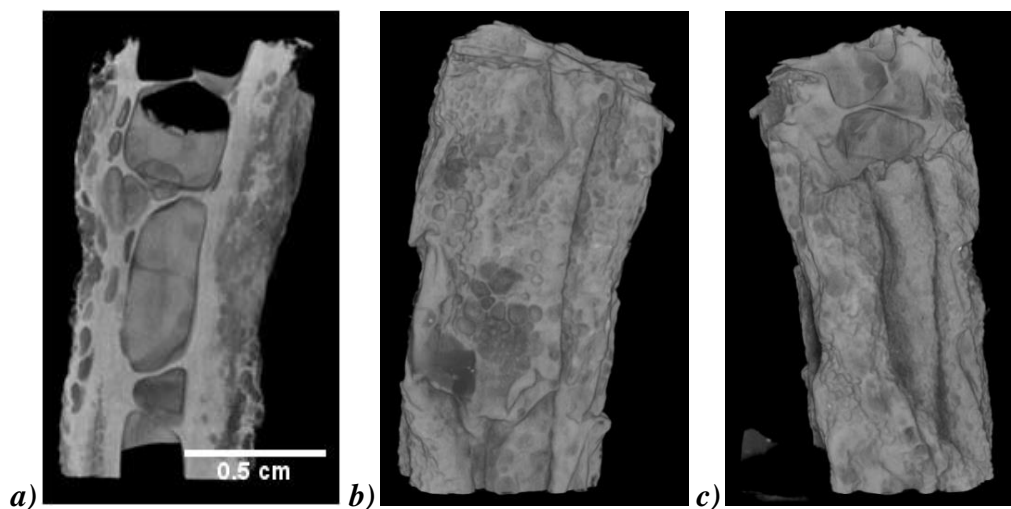


Figura 5.22: Imagem de matriz de gelatina obtida por μ -CT em a) corte longitudinal e b) e c) em vista frontal.

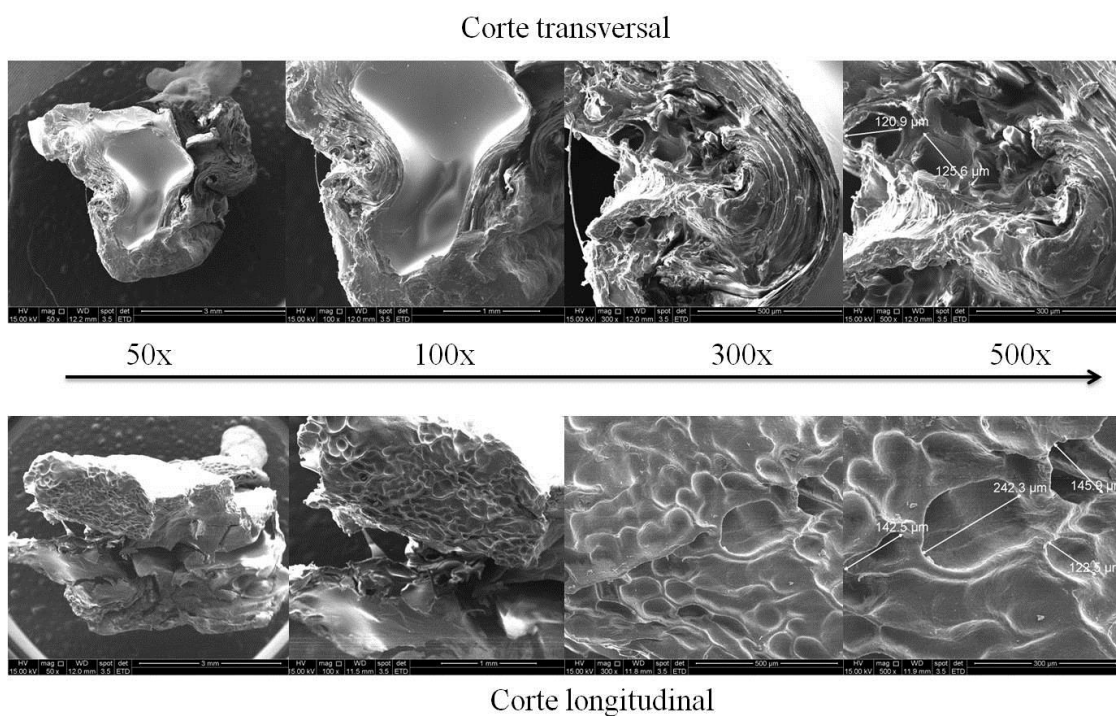


Figura 5.23: Imagens obtidas por MEV para matriz de gelatina em ampliações variando de 50x a 500x.

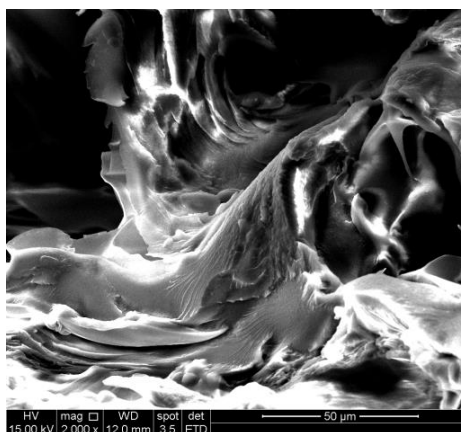


Figura 5.24: Imagem de matriz de gelatina obtida por MEV com aumento de 2000 vezes.

A distribuição de poros, como esperado após a análise morfológica, apresenta grande heterogeneidade, com diâmetros variando de 120 μm a 1700 μm , sendo impróprio determinar um tamanho médio de poro nessa situação.

Em uma solução aquosa de gelatina, as moléculas de água são separadas por macromoléculas de gelatina, o que dificulta seu arranjo durante o processo de congelamento. Com o aumento da concentração de gelatina, há também um acréscimo na viscosidade da solução, o que torna ainda mais difícil o arranjo e a distribuição do solvente no meio, limitando a nucleação e o crescimento de cristais (WU, X. *et al.*, 2010). Esse fenômeno é capaz de justificar a dificuldade de formação e falta de homogeneidade dos poros na matriz de gelatina, localizados principalmente nas extremidades das amostras. Os grandes vazios, formados principalmente no centro da estrutura durante a liofilização, podem ser originários de uma separação de fases durante o congelamento das amostras pela dificuldade de formação e crescimento dos cristais, como acima mencionado.

5.4.2.1 *Blenda 1:1 de gelatina e quitosana.*

A análise da morfologia de matrizes tridimensionais da blenda, formada pela união de soluções de gelatina (20% m/v) e quitosana (2% m/v), em proporção 1:1 v/v, revelou elevada porosidade, com presença de poros interconectados. Imagens da matriz obtidas por fotografia (Figura 5.25), μ -CT (Figura 5.26) e MEV (Figura 5.27) foram utilizadas para análise da arquitetura das matrizes



Figura 5.25: Seção longitudinal de matriz de blenda de quitosana e gelatina.

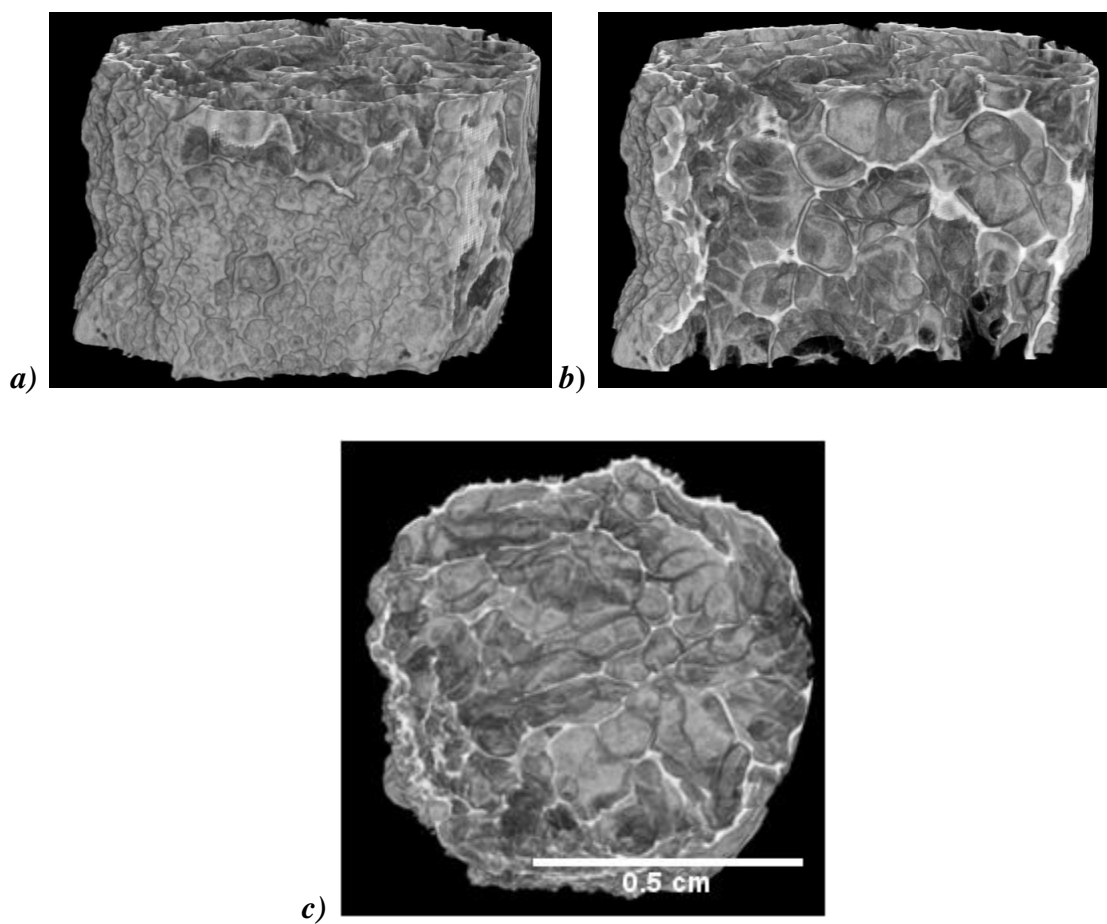


Figura 5.26: Imagem de matriz de gelatina obtida por μ -CT em a) vista frontal, b) corte longitudinal e c) corte transversal.

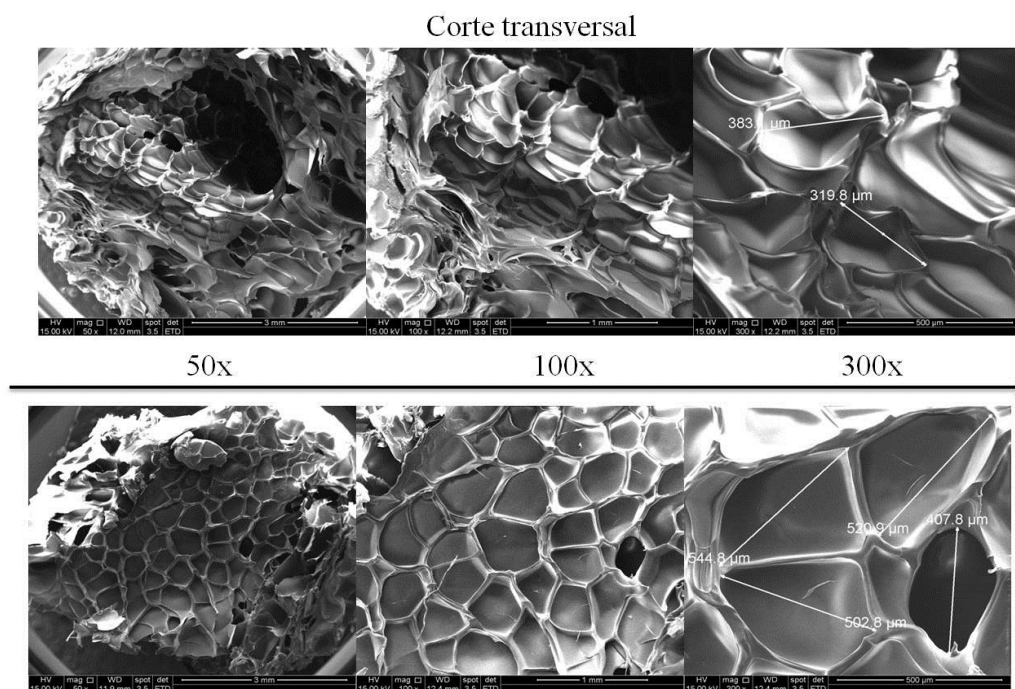


Figura 5.27: Imagens obtidas por MEV para matriz de gelatina em aumentos variando de 50x a 500x.

A matriz obtida a partir da blenda apresenta ampla distribuição de tamanho de poros, como pode ser observado na Figura 5.28.

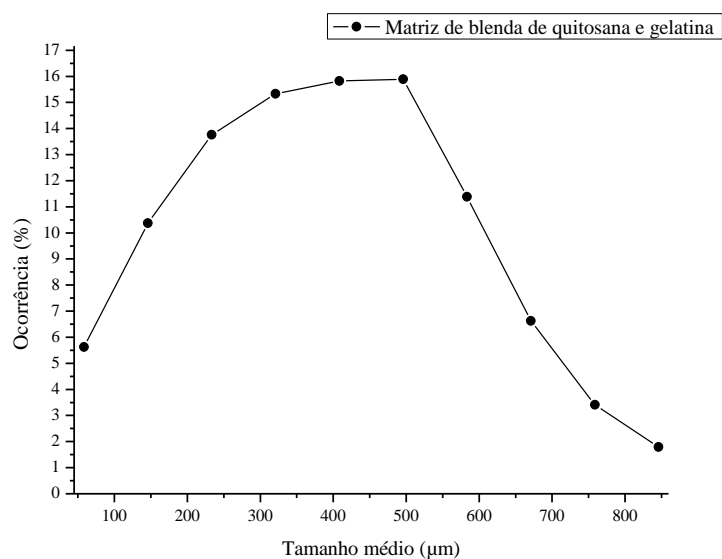
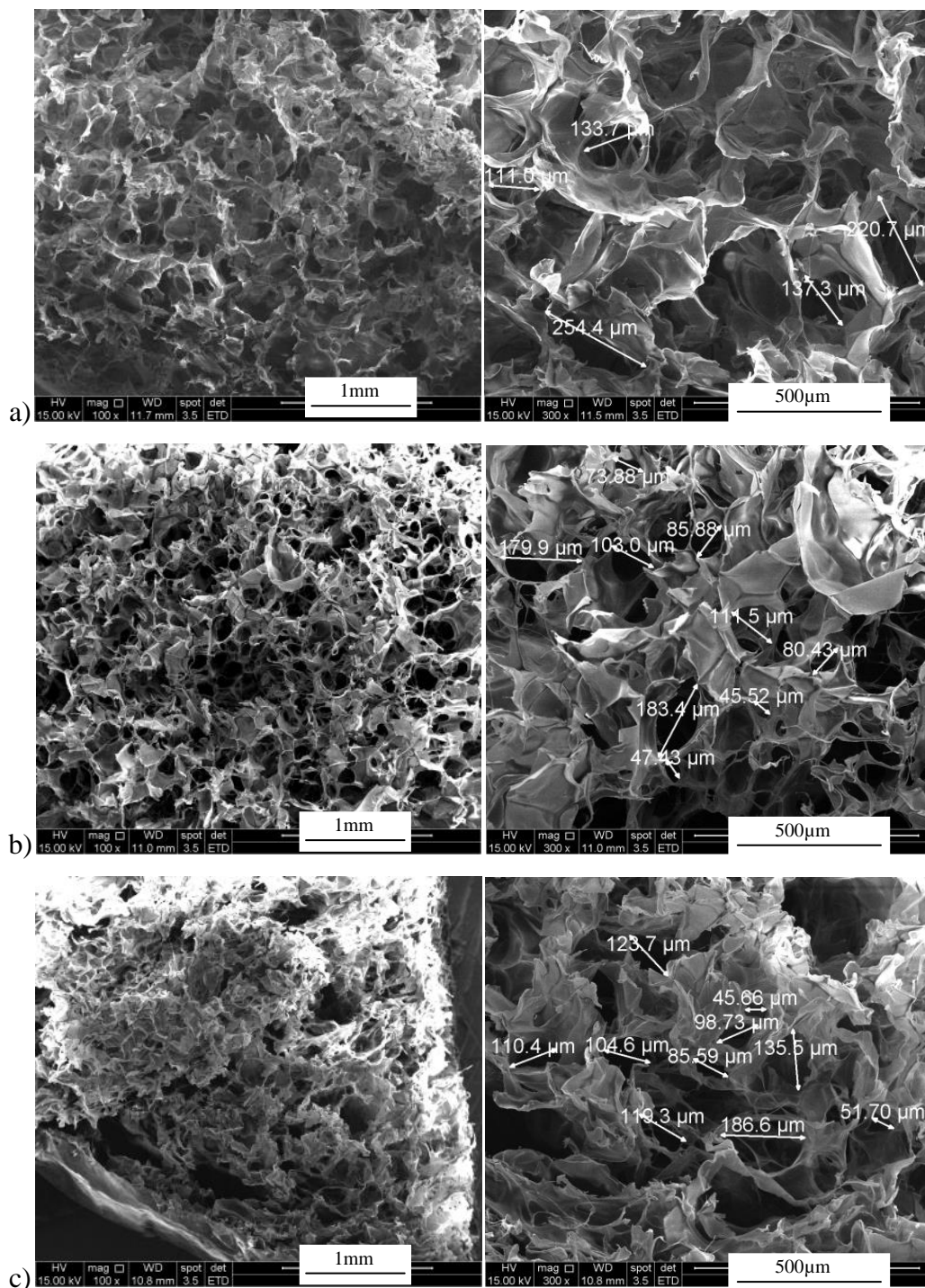


Figura 5.28: Gráfico de distribuição de tamanho de poros para matriz de blenda de quitosana e gelatina. Os dados foram obtidos por μ -CT.

5.4.3 Hidrogéis fotoreticulados: ChMA e GelChMA.

Os resultados de MEV e EDS de matrizes de ChMA e GelChMA expostas por 0min, 5min e 10min à radiação encontram-se nas imagens representadas na Figura 5.29 (ChMA) e na Figura 5.30 (GelChMA). EDS foi feito com intuito de detectar eventual presença de contaminantes.



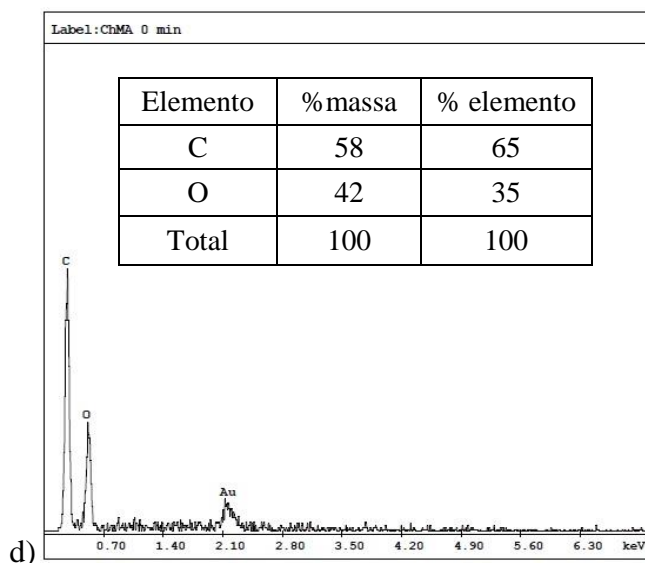
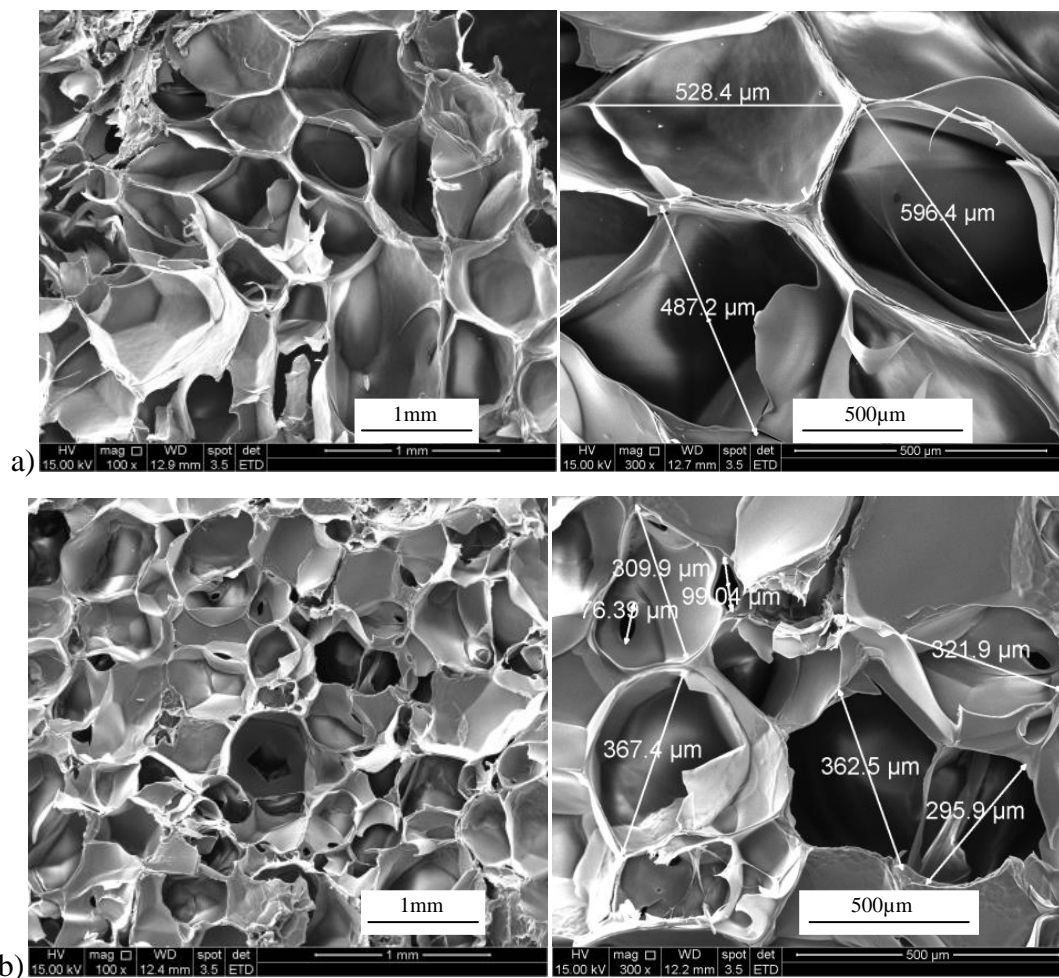


Figura 5.29: Microscopia eletrônica de varredura acoplada de amostras de ChMA expostas por 0, 5 e 10 minutos à radiação UV. Item a), não exposta; item b), exposta por 5 minutos e item c), exposta por 10 minutos. O item d) apresenta o resultado de EDS para a formulação.



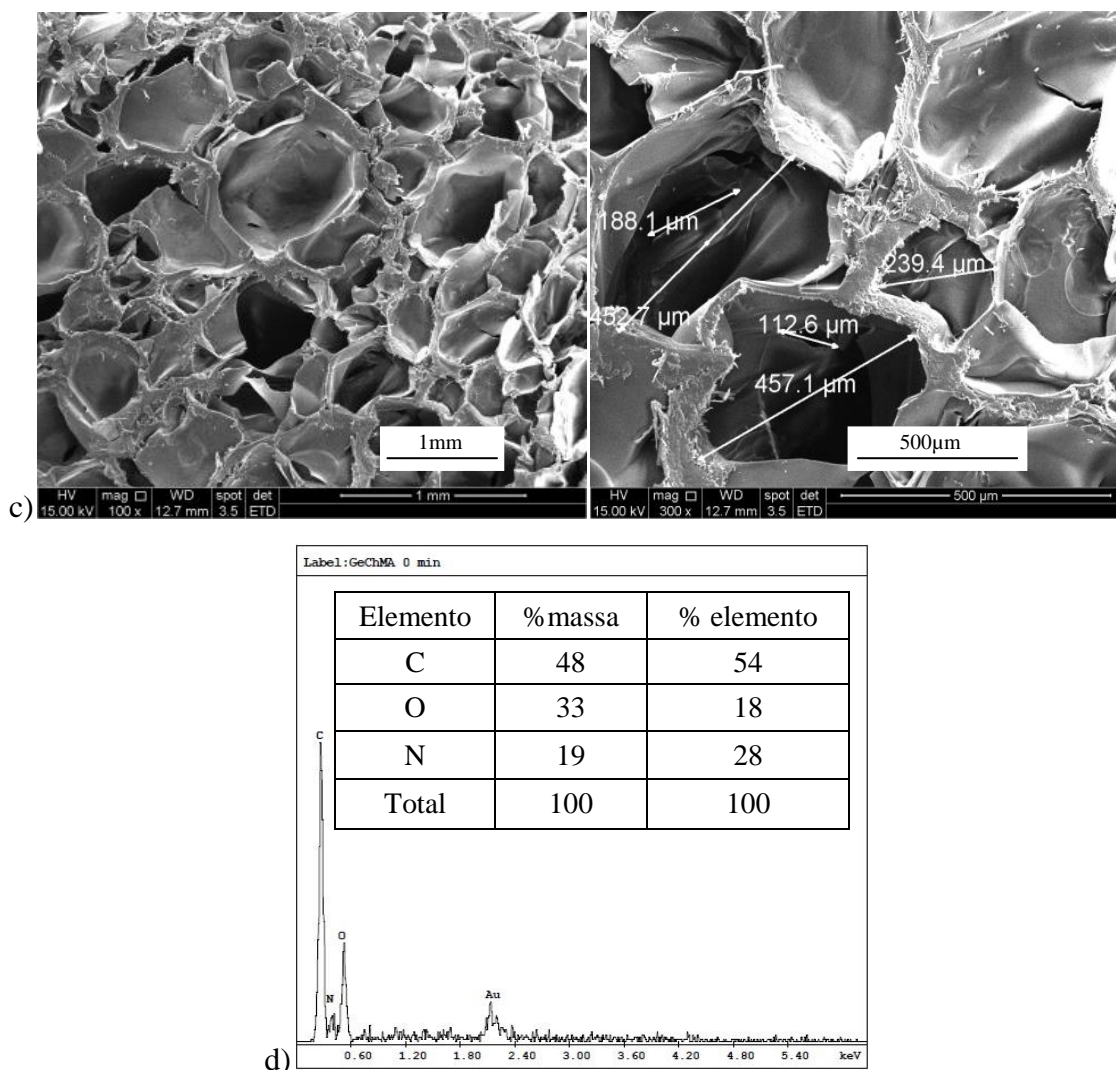
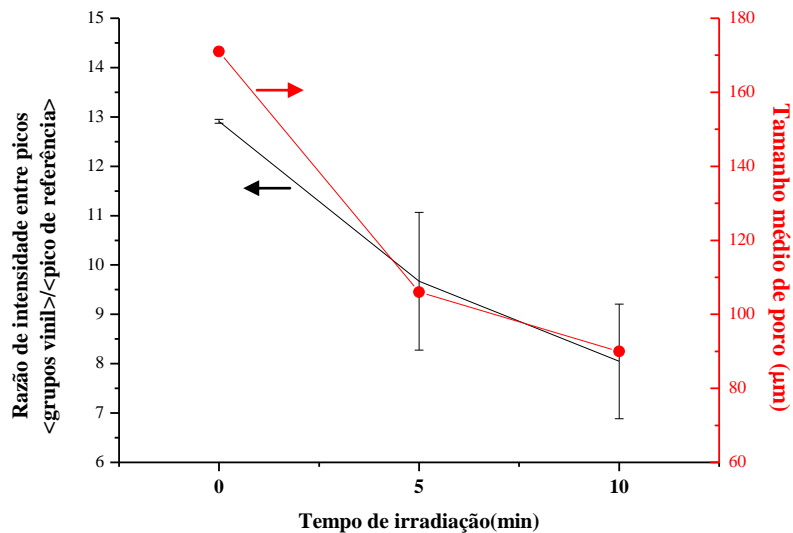


Figura 5.30: Microscopia eletrônica de varredura de amostras de GelChMA expostas por 0, 5 e 10 minutos à radiação UV. Item a), exposta; item b), exposta à 5 minutos e item c), exposta por 10 minutos. O item d) apresenta o resultado de EDS para a formulação.

A Figura 5.31 correlaciona o consumo de sítios de reticulação entre cadeias de ChMA, o tempo de exposição à radiação (estimados por espectroscopia no infravermelho) e a estrutura morfológica obtida para cada tempo de exposição para hidrogéis de ChMA. A Figura 5.32 faz a mesma correlação para hidrogéis de GelChMA.



a)

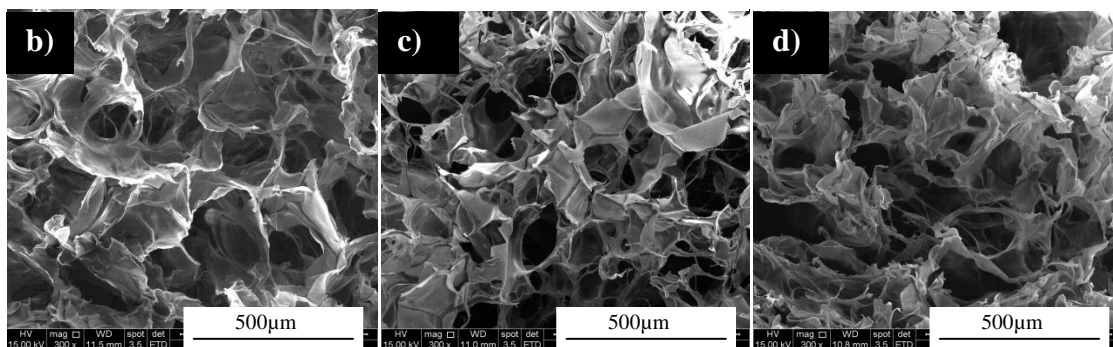
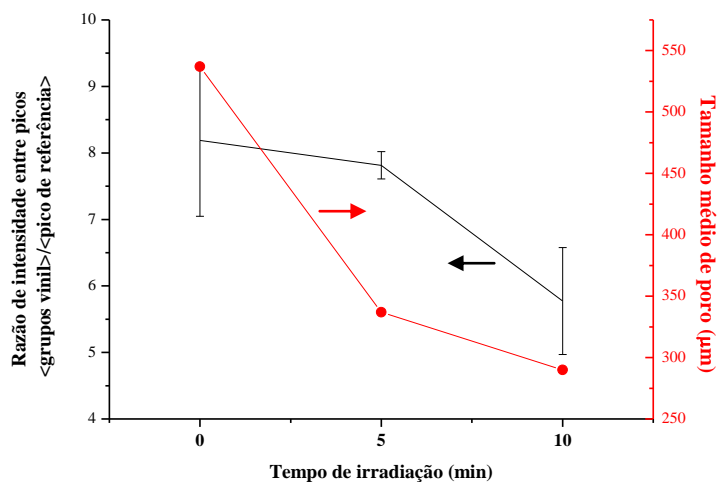


Figura 5.31: Gráfico relacionando consumo de sítios de reticulação entre cadeias de ChMA e o tempo de exposição à radiação (item a)) e a estrutura morfológica obtida para cada tempo de exposição à radiação (itens b) 0min, c) 5min e d) 10min) para hidrogéis de ChMA.



a)

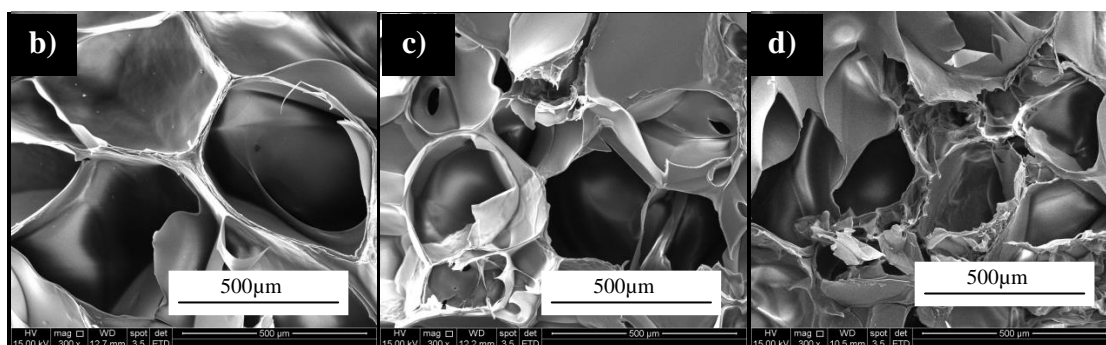


Figura 5.32: Gráfico relacionando consumo de sítios de reticulação entre cadeias de ChMA e o tempo de exposição à radiação (item a)) e a estrutura morfológica obtida para cada tempo de exposição à radiação (itens b)0min, c)5min e d)10min) para hidrogéis de GelChMA.

A Tabela 5.5 explicita a redução dos tamanhos de poros identificados por MEV com o aumento do tempo de exposição das amostras de ChMA e GelChMA à radiação UV. Foram feitas cinco medidas de diâmetros de poros para cada amostra em aumentos de 300x.

Tabela 5.5: Redução, em porcentagem acumulada, do tamanho médio de poros determinado qualitativamente por MEV para amostras de ChMA e GelChMA expostas por 0min, 5min e 10min à radiação UV.

Tempo de reticulação (min)	% de redução acumulada	
	ChMA	GelChMA
0	-	-
5	38	37
10	53	51

Nota-se, com o aumento do tempo de exposição à radiação UV, uma redução no tamanho dos poros identificados na microscopia eletrônica de varredura, o que é esperado desde que se estima que haja maior formação de reticulação química entre as cadeias da matéria-prima para tempos mais longos, dando origem a orifícios menores. Identifica-se, também, a presença de poros com interconectividade entre si.

A redução no tamanho de poros para ambas as amostras, ChMA e GelChMA, com o aumento no tempo de exposição à radiação UV, acompanha a tendência de consumo de sítios para reticulação (C=C), identificada por espectroscopia no infravermelho. A redução percentual do tamanho médio de poro obtido por MEV, comparando o intervalo de 0-5min e o de 5-10min, indica uma redução substancialmente maior no primeiro intervalo de exposição (0-5min), o que pode ser relacionado com a maior concentração de sítios de reticulação e do FI presente no meio durante esse primeiro intervalo de tempo.

Considerando as amostras de GelChMA, nota-se, comparando o item a) da Figura 5.32 com a redução percentual do tamanho médio de poro obtido por MEV (Tabela 5.5), que há uma certa discrepância entre a taxa de consumo de sítios de reticulação (análise qualitativa da inclinação da reta entre os intervalos de tempo estudados) e o valor da redução percentual do tamanho médio de poros para cada intervalo analisado. No entanto, essa discrepância pode ser justificada pelo elevado desvio-padrão da razão $\langle A1640/A1030 \rangle$ das amostras de GelChMA, principalmente da amostra não exposta à radiação, e pelo fato de as medições de diâmetro de poros por MEV, ainda que se tomem vários pontos da amostra para medição, serem localizadas.

A análise por μ -CT das amostras de ChMA não gerou imagens de boa definição devido à baixa densidade do material, como pode ser observado na Figura 5.33, que traz a vista superior e a longitudinal das amostras de ChMA expostas a 0min, itens a) e d); 5min, itens b) e e), e 10min, itens c) e f), respectivamente.

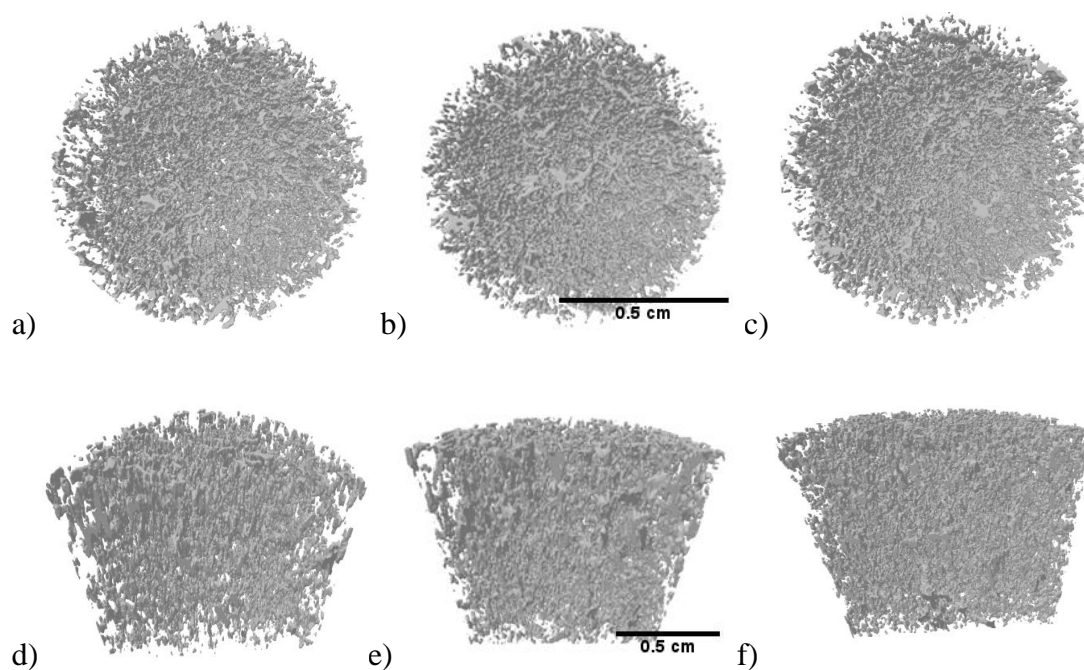


Figura 5.33: Vistas superior e longitudinal obtidas por μ -CT das amostras de ChMA expostas a 0 minuto, itens a) e d); 5 minutos, itens b) e e), e 10 minutos, itens c) e f), respectivamente.

Nota-se, na Figura 5.33, uma redução dos tamanhos de poros com a elevação do tempo de exposição à radiação UV para amostras de ChMA, principalmente comparando-se os itens d), e) e f).

As imagens geradas por μ -CT para as amostras de GelChMA mostraram-se bem-definidas, facilitando a análise morfológica pela técnica, como pode ser observado na Figura 5.34, que compara as morfologias das amostras de GelChMA expostas por 0, 5 e 10 minutos à radiação UV.

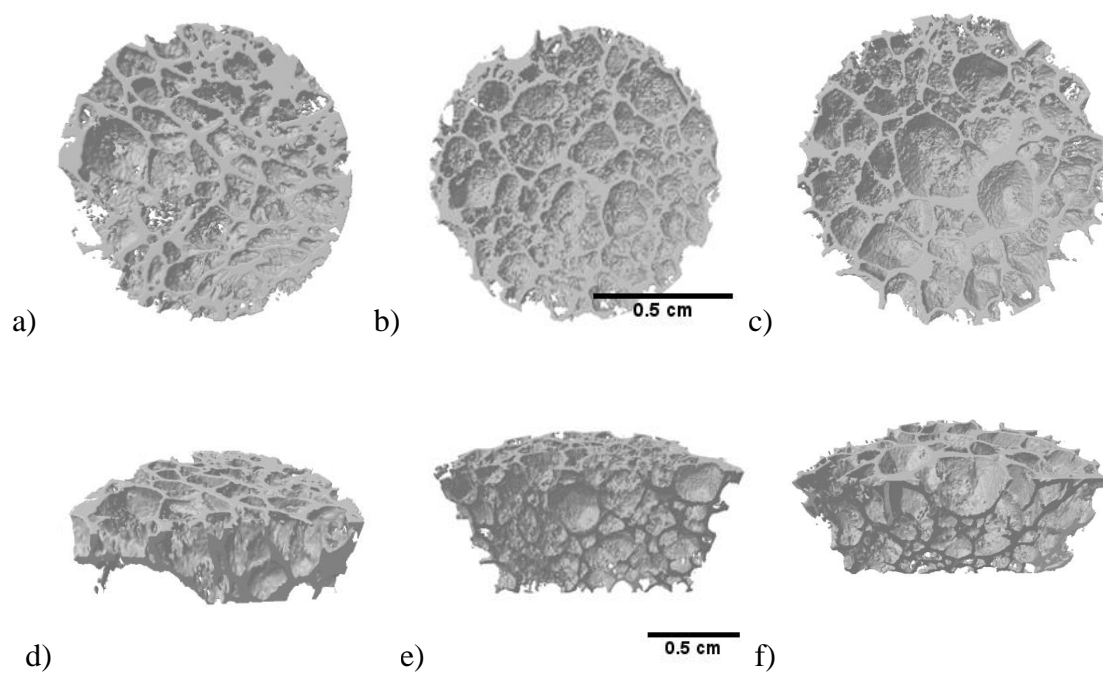
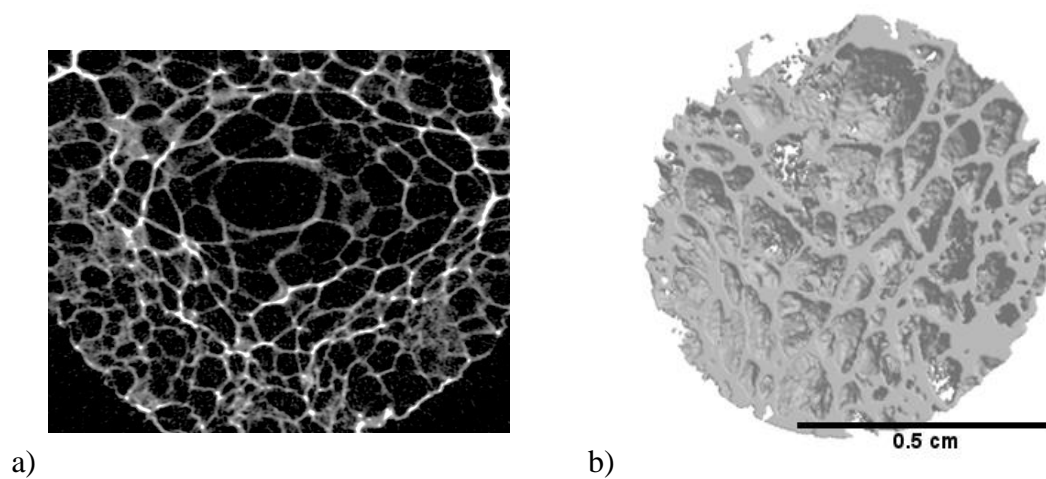


Figura 5.34: Vistas superior e longitudinal obtidas por μ -CT das amostras de GelChMA expostas a 0 minuto, itens a) e d); 5 minutos, itens b) e e), e 10 minutos, itens c) e f), respectivamente.

A Figura 5.35 compara a morfologia da amostra não exposta à radiação à da amostra exposta por 30min à radiação.



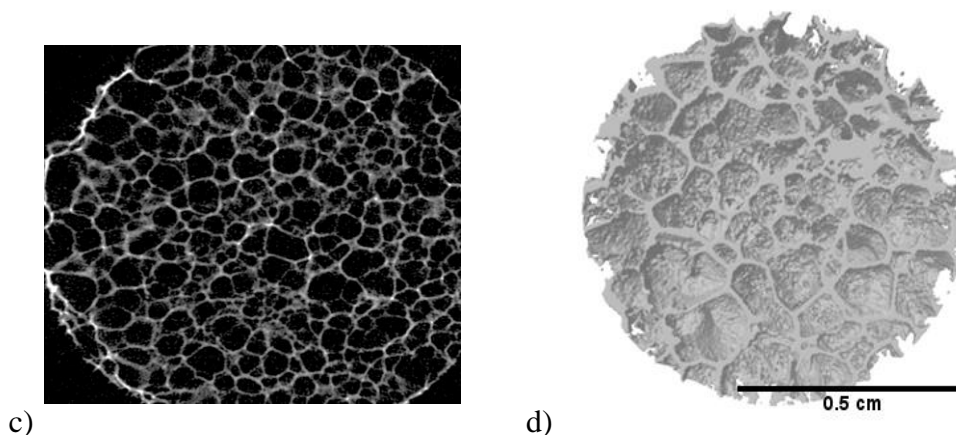
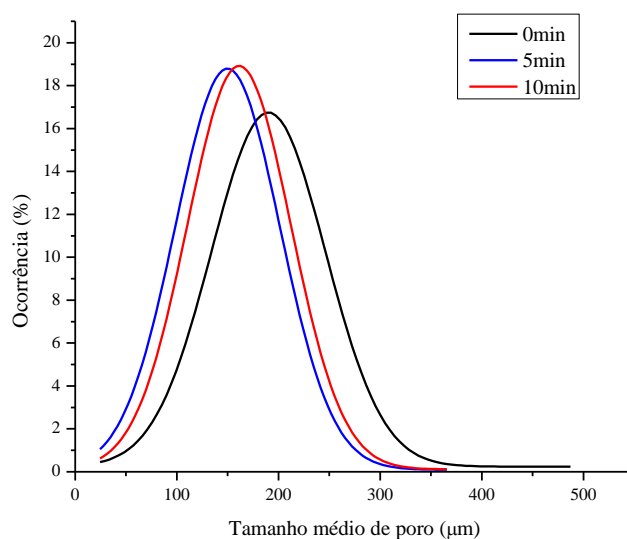


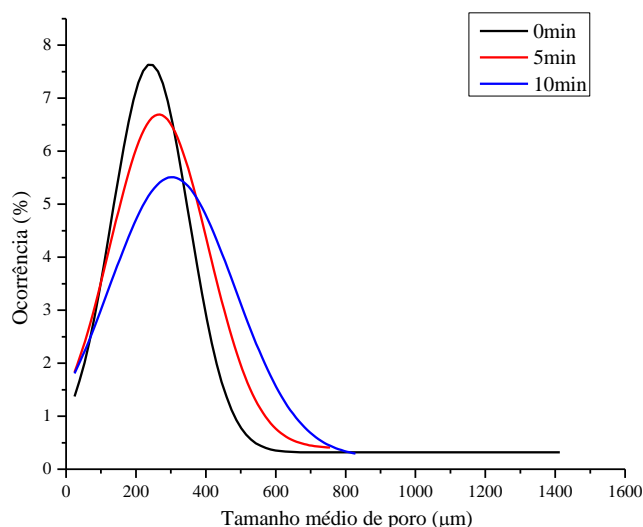
Figura 5.35: Comparativo de morfologias obtidas por μ -CT para amostras de GelChMA expostas por 0 minutos, itens a) e b), e 30 minutos, itens c) e d), à radiação UV.

Analisando comparativamente os itens a) e c), e b) e d) da Figura 5.35 observa-se que, com o aumento do tempo de exposição, há tanto uma redução no tamanho de poro obtido como uma homogeneização dos tamanhos e formato dos poros para amostras constituídas de GelChMA.

A Figura 5.36 exhibe os gráficos comparativos para tamanho médio de poro, item a), e para espessura média de parede, item b), das amostras de ChMA e GelChMA, obtidos por μ -CT.



a)



b)

Figura 5.36: Distribuição do tamanho médio dos poros, obtido por μ -CT, de matrizes ChMA e Gel ChMA expostas à luz UV por diferentes tempos. Os dados obtidos por μ -CT foram tratados pelo aplicativo Origin[®] (modelagem Gaussiana) para obtenção das curvas representadas. Item a) ChMA ($R^2=0.99$) e item b) GelChMA ($R^2=0.98$).

A análise por μ -CT indicou uma diminuição na distribuição do tamanho de poros, ou seja, uma tendência à homogeneização do tamanho de poro dos hidrogéis. O fenômeno pode ser percebido pela redução do desvio-padrão dessa grandeza nas amostras expostas a 5min e 10min de radiação quando comparada ao desvio da amostra de hidrogel não exposta. Nota-se, também pelos resultados de μ -CT, que não há redução significativa na média geral dos tamanhos de poro, mas sim uma redução do tamanho máximo de poro em ambas as composições de hidrogéis.

A Tabela 5.6 resume as principais características morfológicas (HO; HUTMACHER, 2006) de matrizes analisadas por μ -CT.

Tabela 5.6: Características morfológicas de matrizes porosas de ChMA e GelChMA a partir de análise μ -CT

Propriedades (por μ -CT)	Hidrogel	
	ChMA	GeChMA

Interconectividade (%)	>90	>90
Porosidade aberta (%)	89	69
Tamanho médio de poro (μm)	169 \pm 21	325 \pm 24

O efeito do tempo de radiação no tamanho médio dos poros não foi detectado pela análise de u-CT. Contudo, o efeito da adição do elemento misturador foi notório: a adição de gelatina à ChMA levou a um aumento no tamanho médio obtido dos poros, independentemente do tempo de exposição à radiação. Poros com diâmetro entre 36 e 377 μm foram detectados por μ -CT para amostras de ChMA, ao passo que, para amostras de GelChMA, o tamanho dos poros variou de 36 a 743 μm .

Como pode ser observado na Tabela 5.6, a análise de μ -CT revelou alta porosidade e interconectividade entre os poros para as matrizes ChMA e GelChMA. Os valores encontrados são interessantes, uma vez que a porosidade de uma matriz destinada à recuperação tecidual determina sua eficiência em promover migração e adesão celulares e a difusão de nutrientes. Assim como a porosidade, a interconectividade entre os poros afeta o transporte molecular (HO; HUTMACHER, 2006). Pela caracterização morfológica, observou-se, igualmente, que os hidrogéis de ChMA e GelChMA têm poros com diâmetros na escala de micrométrica (Tabela 5.6, Figura 5.29 e Figura 5.30). Isso é particularmente interessante, uma vez que a maioria das células de mamíferos têm também dimensões micrométricas (BENTON *et al.*, 2009).

Os tamanhos de poro identificados por MEV corroboram com os valores encontrados por μ -CT para todas as matrizes analisadas. As matrizes apresentam porosidade elevada, alta interconectividade entre os poros e uma distribuição de tamanho de poros adequada para sua utilização como matrizes para crescimento e diferenciação celular. A menor porosidade para o hidrogel contendo gelatina está de acordo com o obtido por Saraiva *et al.*, assim como os intervalos de valores obtidos para porosidade ao longo do tempo, ainda que as condições de fotoreticulação tenham sido um pouco diferentes (SARAIVA *et al.*, 2015).

A porosidade total dos hidrogéis, bem como o tamanho das estruturas porosas, está dentro do intervalo encontrado na literatura para matrizes contendo quitosana em sua

composição e destinadas ao auxílio de regeneração da pele (MA, L. *et al.*, 2003; MIGUEL *et al.*, 2014). A arquitetura da estrutura formada é adequada para a absorção de excesso de exsudado (KUMAR, P. T. S. *et al.*, 2014), para a permeação de nutrientes e oxigênio (15–40 μ m) (YANG, C. *et al.*, 2010) e para o crescimento e proliferação de diversos tipos celulares como células endoteliais (<80 μ m) e fibroblastos (38–150 μ m) (IVANOVA; BAZAKA; CRAWFORD, 2014; SARAIVA *et al.*, 2015).

A porosidade da rede, o tamanho dos poros e a espessura da parede estão diretamente relacionados à taxa de polimerização, que varia principalmente com mudanças na concentração de FI e na intensidade da radiação (BENTON *et al.*, 2009). Como neste estudo apenas o tempo de exposição à radiação foi variado, é justificável que não tenham havido maiores diferenças entre tamanho médio de poros e espessura média de parede. Houve, entretanto, uma redução dos tamanhos máximos de poro para todas as amostras e uma tendência à homogeneização da estrutura. Em um sistema envolvendo células fotoencapsuladas na estrutura do hidrogel, essa tendência do comportamento morfológico em relação à porosidade pode ter algumas implicações interessantes na direção do comportamento celular, uma vez que as células encapsuladas estariam mais uniformemente dispersas em toda a rede (BENTON *et al.*, 2009).

O processo de liofilização pode também alterar a porosidade do material, mas, como se mantiveram as mesmas condições para este processo, espera-se que não tenha havido influência do processo de liofilização na diferença entre as morfologias encontradas para cada amostras.

5.5 Intumescimento

5.5.1 Filmes de quitosana não reticulada

Os procedimentos de intumescimento (Intumescimento e reIntumescimento) de quitosana não reticulada em PBS foram realizados a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Os valores de grau de intumescimento (GI) e índice de degradação (ID), obtidos para os intervalos de 1h, 4h e 24h, encontram-se nos gráficos representados na Figura 5.37 e na Figura 5.38, respectivamente.

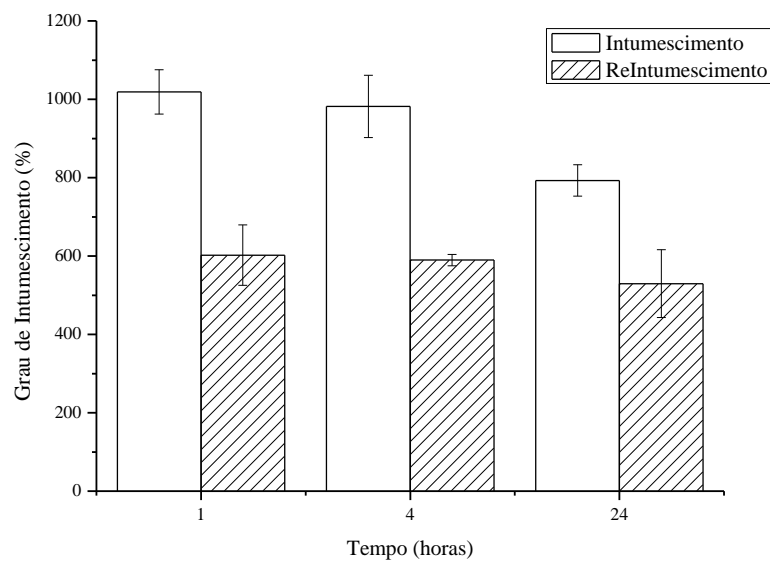


Figura 5.37: Gráfico de GI em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$ para filmes de quitosana não reticulada.

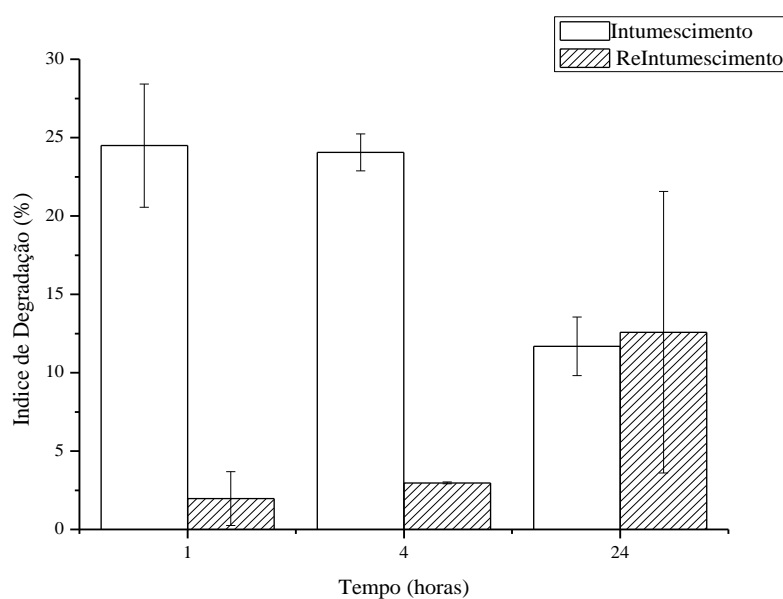


Figura 5.38: Gráfico de ID no processo de intumescimento em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$ para filmes de quitosana não reticulada.

Nota-se, pela análise dos valores encontrados, que, a partir de 1h, já não há elevação significativa no GI do material, podendo-se dizer que há equilíbrio de intumescimento após esse intervalo de tempo. As variações nos valores, nesse caso, podem ser

atribuídas ao processo de retirada de excesso de água no momento anterior à pesagem do material intumescido. Identifica-se, pela comparação dos pesos secos antes e após os procedimentos de intumescimento, que há perda de material durante o processo, o que pode ser atribuído à degradação e/ou à dissolução, visto que o material não é quimicamente reticulado. Os valores para os índices de degradação variam de 10-25% no caso do primeiro processo de intumescimento (Intumescimento) e de 3-11% no caso do segundo procedimento (reIntumescimento). Os valores encontrados estão compatíveis com a literatura (COSTA-JÚNIOR, E. DE S., 2008; NAGAHAMA; MAEDA; *et al.*, 2009).

No caso dos filmes submetidos a 24h de intumescimento, tidos como padrão, os valores parciais para o GI foram registrados e podem ser encontrados no gráfico representado na Figura 5.39. O procedimento foi realizado para assegurar que os procedimentos de retirada de excesso de água do material não influenciasse significativamente na análise do GI.

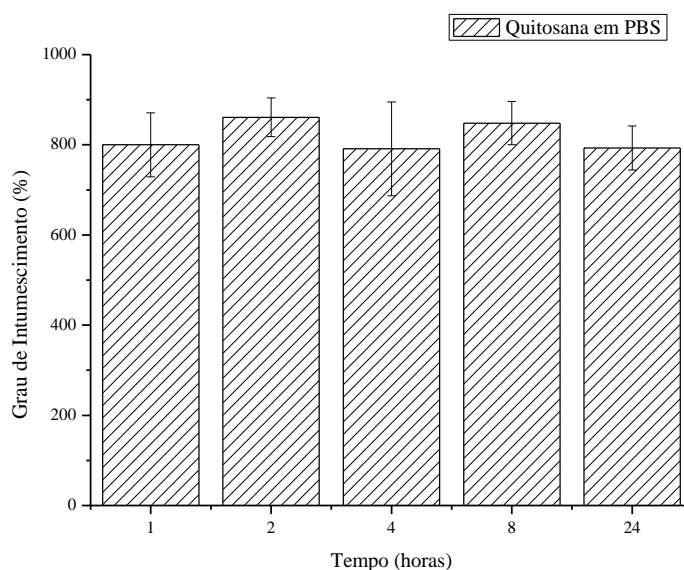


Figura 5.39: GI de filmes de quitosana não reticulada submetidos a 24h de intumescimento.

Os valores encontrados para cada intervalo de tempo de intumescimento dos filmes-padrão são compatíveis em relação ao GI e corroboram com a hipótese de que após 1h o equilíbrio de intumescimento é atingido.

5.5.2 Filmes de gelatina não reticulada

Os filmes de gelatina não reticulados submetidos a intumescimento em solução de PBS dissolveram-se por completo, sendo que, após 1h mergulhados na solução salina, já não é possível identificar nenhuma formação coesa de gelatina. O resultado era esperado visto que o ensaio foi realizado em temperatura próxima à corporal ($37 \pm 1^\circ\text{C}$), e que a gelatina apresenta temperatura de transição sol-gel entre 30 e 35°C (BENTON *et al.*, 2009; DJABOUROV; LEBLOND; PAPON, 1988), a depender da composição do polipeptídeo, do pH do meio e de sua massa molar (DJABOUROV; LEBLOND; PAPON, 1988).

5.5.3 Filmes de quitosana e gelatina não reticulada

Os filmes formados a partir da blenda de Quitosana e gelatina submetidos à intumescimento em PBS (pH7,4) em temperatura próxima a corporal ($37 \pm 1^\circ\text{C}$) dissolveram-se parcialmente após 1h mergulhados na solução. Identifica-se a formação de um aglomerado viscoso, com o formato similar ao do filme inicial porém maior, como pode ser observado na Figura 5.40.



Figura 5.40: Filme de quitosana e gelatina não reticuladas antes e após o intumescimento em PBS, a 37°C , por 1h.

O material não apresenta coesão suficiente para permitir sua manipulação, escoando e perdendo sua forma característica, como pode ser observado na Figura 5.41.



Figura 5.41: Perda da coesão de filme de quitosana e gelatina não reticuladas após tentativa de manipulação do material para pesagem.

Por um lado, a não completa dissolução dos filmes da blenda no meio de intumescimento até o período de 1h pode ser justificada pela reticulação física entre as cadeias de quitosana -não solúvel nas condições de pH e temperatura da solução- e de gelatina. Por outro lado, a elevada dissolução pode ser justificada pela grande proporção em massa de gelatina, dez vezes maior que a de quitosana, que não é suficiente para manter a coesão do material no meio.

5.5.4 Filmes de ChMA reticulados por radiação UV

A Figura 5.42 apresenta a fotografia de um filme de ChMA destinado ao ensaio de intumescimento. A caneta serve como escala comparativa.



Figura 5.42: Filme fotorreticulado de ChMA destinado ao ensaio de intumescimento em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$.

O gráfico apresentado na Figura 5.43 compara os procedimentos de intumescimento e reintumescimento para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.

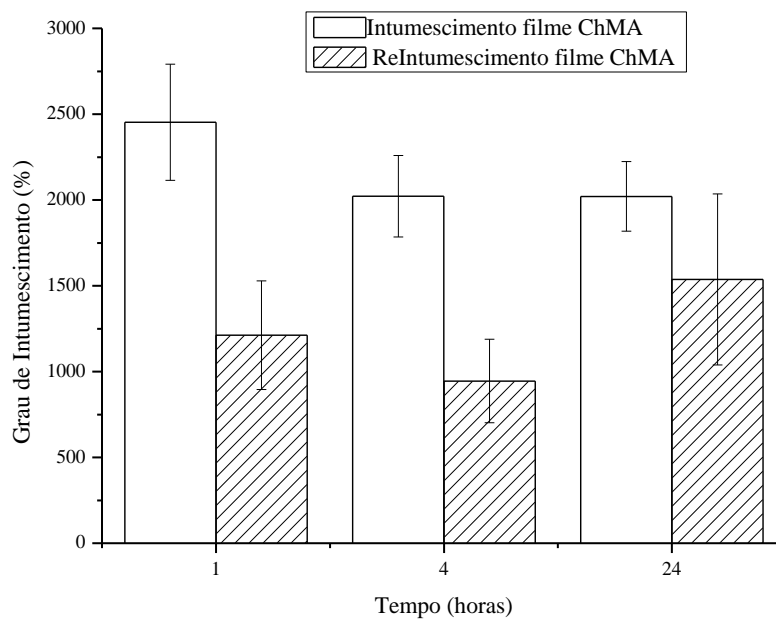


Figura 5.43: Comparação entre primeiro e segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de filme de ChMA de acordo com os tempos de imersão.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se dizer que, após 1h de imersão, já se observa um máximo de grau de intumescimento para as amostras, que ultrapassa

2500%. O maior GI de ChMA em comparação com os valores obtidos para quitosana pura pode ser justificado pela maior solubilidade de ChMA em soluções aquosas em pHs próximos ao pH neutro, como no caso do PBS.

A Figura 5.44 apresenta os resultados do cálculo de ID para os filmes de ChMA fotoreticulados.

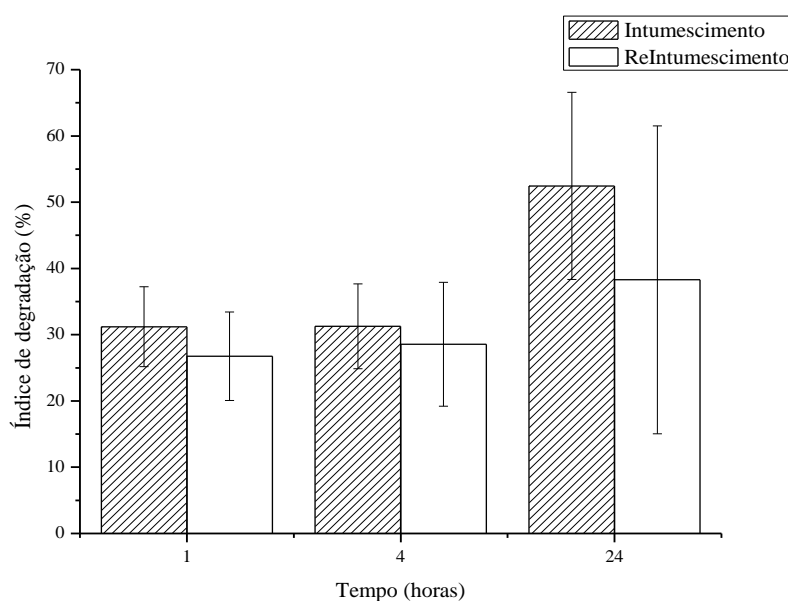


Figura 5.44: Resultados do cálculo de ID para os filmes de ChMA fotoreticulados.

Para o segundo procedimento de intumescimento, observa-se menor média de ID quando comparado ao primeiro procedimento, mas, levando em consideração o elevado desvio-padrão, pode-se dizer que há a mesma proporcionalidade de degradação do material no intumescimento e no reintumescimento.

5.5.5 Filmes de GelChMA por radiação UV

O gráfico ilustrado na Figura 5.45 compara o primeiro e o segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.

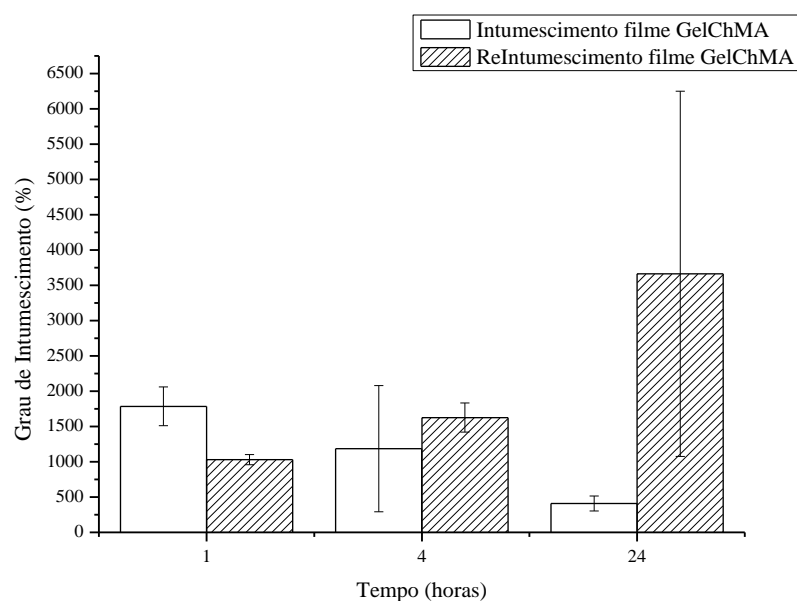


Figura 5.45: Comparação entre primeiro e segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.

O gráfico representado na Figura 5.46 ilustra o resultado obtido para o ID dos filmes de GelChMA.

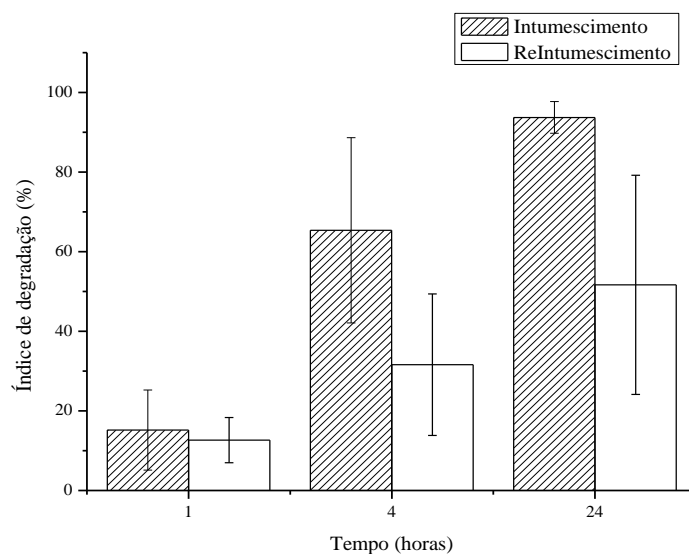


Figura 5.46: Resultados do cálculo de ID para os filmes de GelChMA fotorreticulados.

Obteve-se um elevado GI para o filme de GelChMA, principalmente após 24h de imersão. O alto GI obtido pode ser relacionado à elevada perda de massa ao longo do procedimento, muito provavelmente devido à alta solubilidade da gelatina e não reticulação química de suas cadeias, que pertencem a uma rede semi-interpenetrante.

Os filmes de GelChMA apresentaram maior ID quando esse ID é comparado ao ID dos filmes de ChMA, chegando a valores de aproximadamente 90% após 24h de imersão. Quando o ID dos filmes de GelChMA é comparado ao ID de filmes da blenda de quitosana e gelatina não reticulados, nota-se a efetividade da resistência relativa da rede interpenetrante à dissolução em PBS à $37\pm 1^\circ\text{C}$. Isso porque, para a blenda não reticulada, houve total dissolução no material já nas primeiras horas de intumescimento.

A Figura 5.47 apresenta um filme de GelChMA intumescido, após 1h de imersão em PBS a $37\pm 1^\circ\text{C}$, item a), e após sua secagem em estufa por 24h a 40°C , item b).

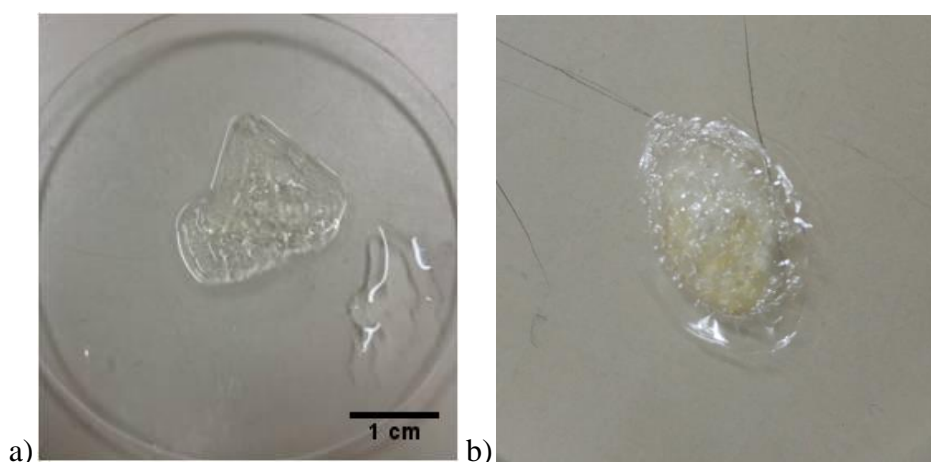


Figura 5.47: Filme de GelChMA intumescido, após 1h de imersão em PBS a $37\pm 1^\circ\text{C}$, no item a), e após sua secagem em estufa por 24h a 40°C , no item b).

Observando o item b) da Figura 5.47, nota-se a presença de gelatina parcialmente diluída ao redor de um miolo mais denso, provavelmente constituído de cadeias reticuladas de quitosana. O alto grau de degradação obtido pode ser relacionado à elevada proporção em massa de gelatina na blenda, quando comparada à porção presente de ChMA.

5.5.6 Matrizes de quitosana metacrilamida reticulada por radiação UV

O gráfico representado na Figura 5.48 apresenta os resultados de GI para as matrizes de ChMA.

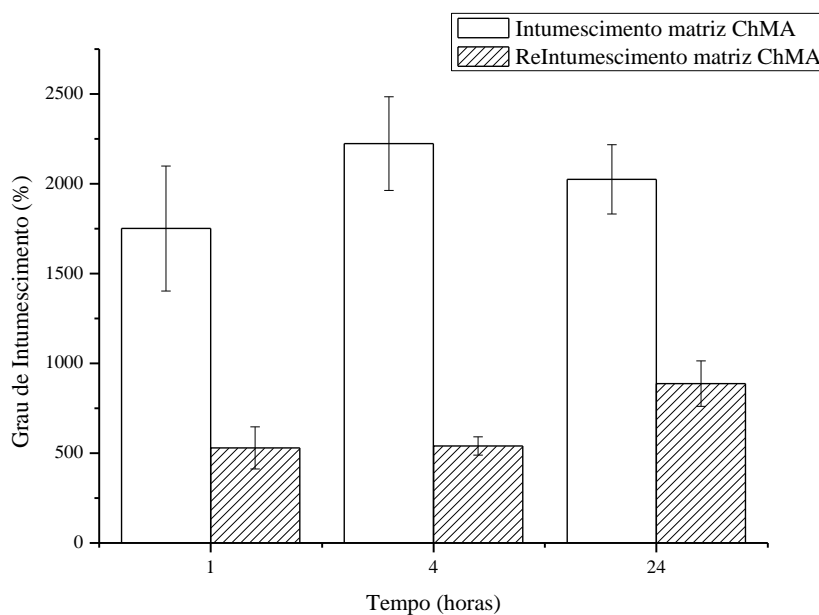


Figura 5.48: Comparação entre primeiro e segundo procedimentos de intumescimento para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.

As tendências em relação à capacidade de intumescimento de matrizes de ChMA são similares às obtidas para os filmes (comparação detalhada feita no item 5.5.8).

A Figura 5.49 apresenta os resultados para o ID calculado para 1h, 4h e 24h de imersão do material em PBS à $37 \pm 1^\circ\text{C}$.

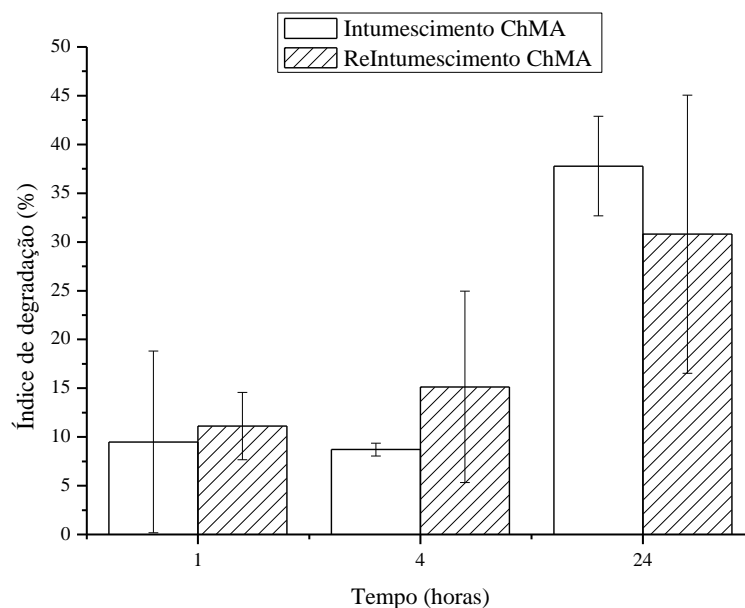


Figura 5.49: Resultados do cálculo de ID para matrizes de ChMA fotoreticuladas.

De acordo com os resultados obtidos para o GI em relação ao tempo de imersão em solução de PBS, pode-se dizer que, a partir de 1h, atinge-se o GI máximo do material. O maior GI obtido após 24h de imersão pode ser justificado pela perda de massa devido à dissolução parcial do material no meio durante o tempo de ensaio.

Os resultados obtidos para GI foram similares a resultados obtidos para matrizes tridimensionais envolvendo ChMA (SARAIVA *et al.*, 2015).

A Figura 5.50 apresenta, em a), a matriz de ChMA pronta para o ensaio de intumescimento; em b), a mesma matriz imersa na solução de PBS, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$; e em c), no seu estado intumescido após a retirada da solução de imersão.



Figura 5.50: Matriz de ChMA pronta para o ensaio de intumescimento, a); A mesma matriz imersa na solução de PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$, em b); e no seu estado intumescido após a retirada da solução de imersão, em c).

Observa-se, pela fotografia apresentada no item b) da Figura 5.50, a presença de poros da estrutura preenchidos com a solução utilizada no procedimento de intumescimento. Obtiveram-se IDs relativamente altos para matrizes de ChMA, principalmente após 24h de imersão. O resultado pode ser justificado, assim como no caso dos filmes preparados com o mesmo material, pela solubilidade de ChMA no meio em questão. A não completa dissolução é justificada pela presença de reticulações químicas entre as cadeias.

5.5.7 Matrizes de GelChMA reticulada por radiação UV

O gráfico apresentado na Figura 5.51 apresenta a comparação entre *intumescimento* e *reintumescimento* para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.

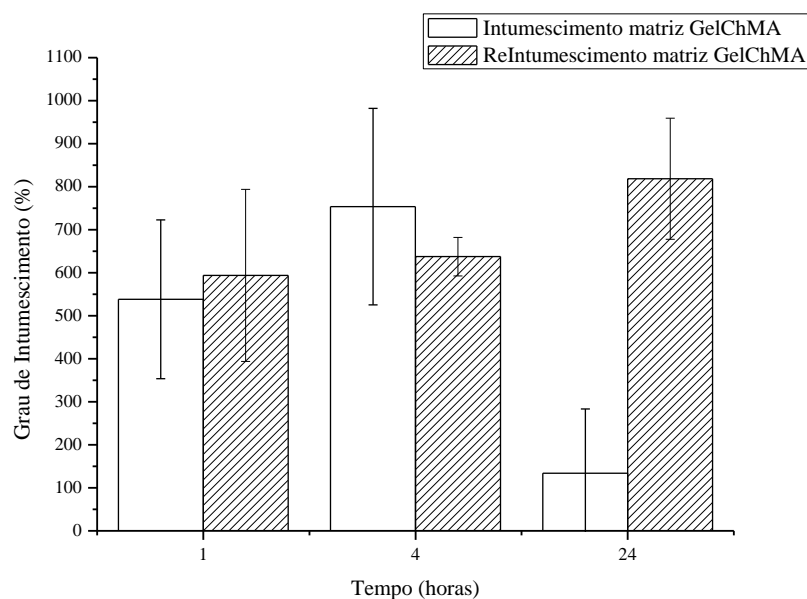


Figura 5.51: Comparação entre *intumescimento* e *reintumescimento* para cada amostra de acordo com os tempos de imersão.

As matrizes de GelChMA apresentam comportamento similar ao dos filmes preparados com mesmo material, apresentando até 90% de ID após 24h de imersão. O resultado está expresso no gráfico representado na Figura 5.52.

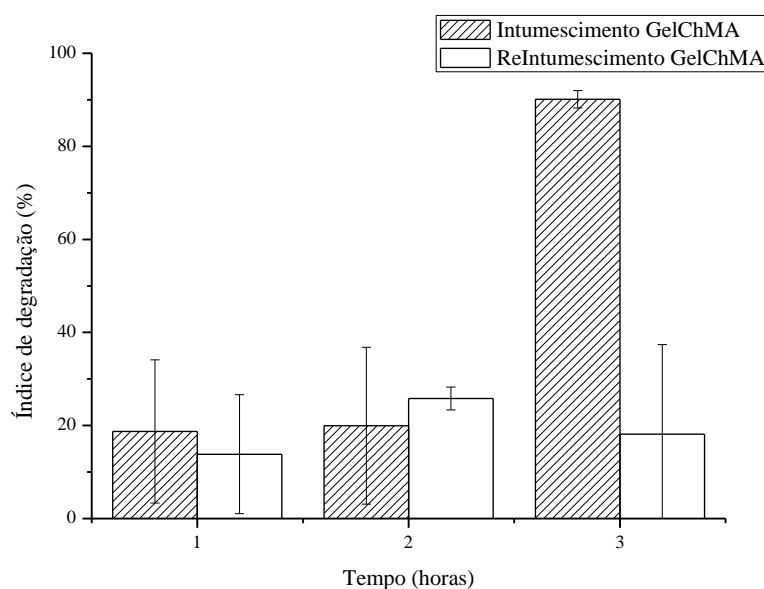


Figura 5.52: Resultados do cálculo de ID para matrizes de GelChMA fotoreticuladas.

A adição de gelatina à blenda, como no caso dos filmes, levou a um maior ID por parte das matrizes, o que já era esperado devido à solubilidade da gelatina nas condições do ensaio. A Figura 5.34 ilustra matrizes de GelChMA submetidas a 24h de imersão em PBS durante o primeiro procedimento de intumescimento, a); após a retirada da solução de PBS, b); e após seca em estufa por 24h a 40°C.

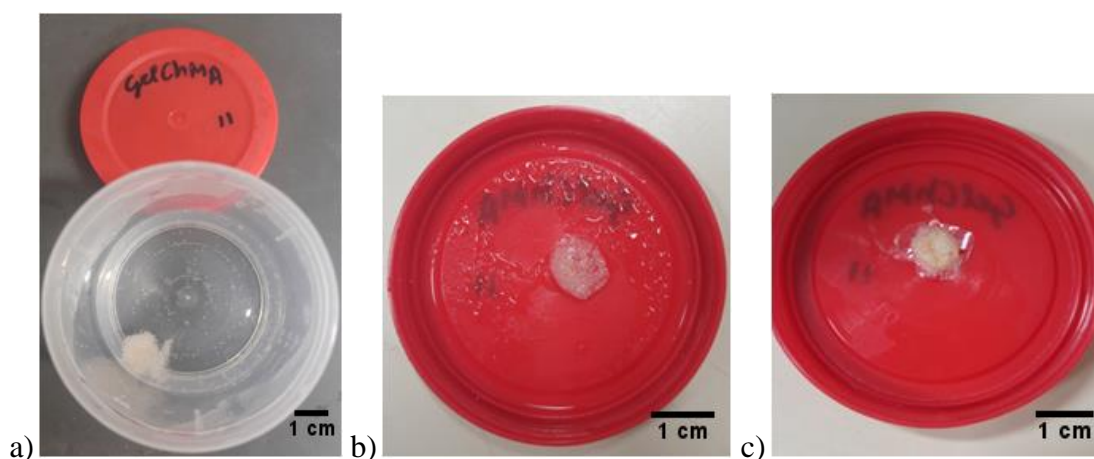
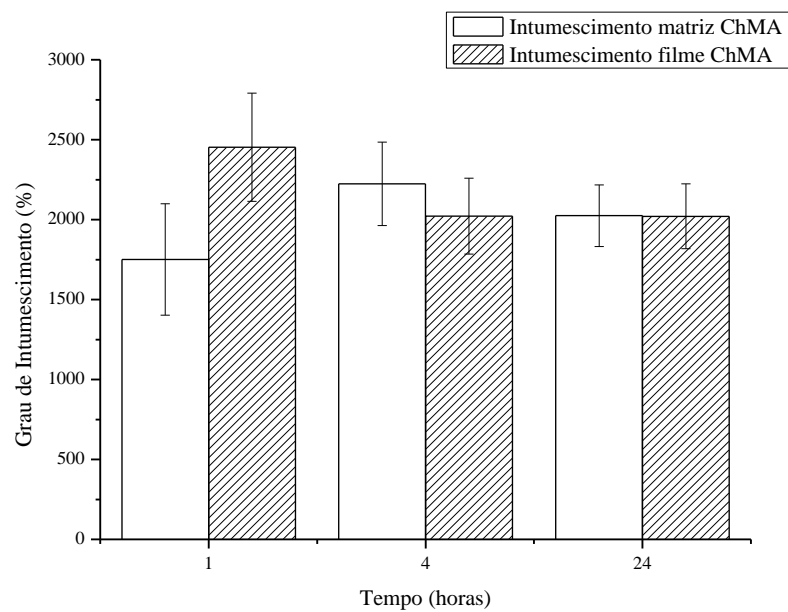


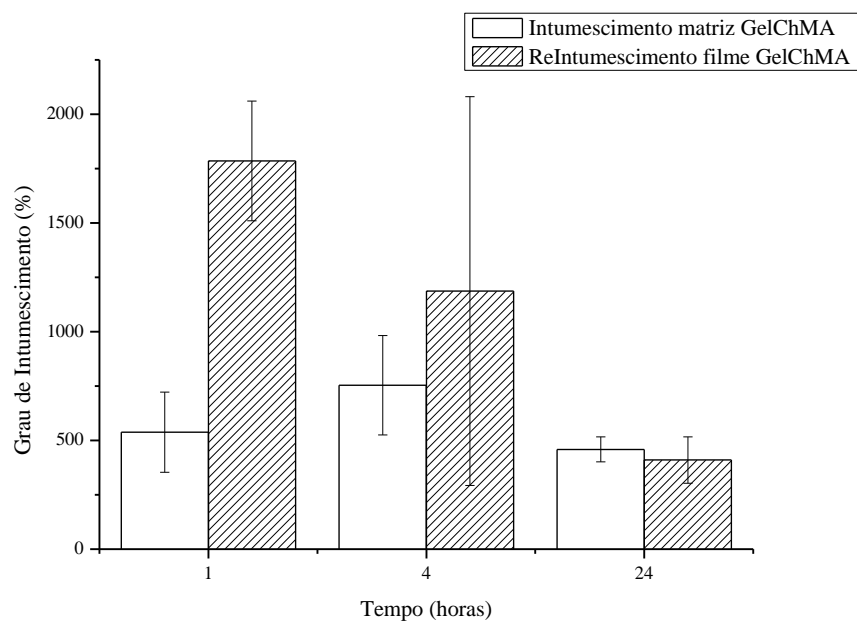
Figura 5.53: Matrizes de GelChMA submetidas a 24h de imersão em PBS durante o primeiro procedimento de intumescimento, a); após a retirada da solução de PBS, b); e após desidratada em estufa por 24h a 40°C.

5.5.8 Comparativo da capacidade de intumescimento para ChMA e GelChMA na forma de filmes e matrizes.

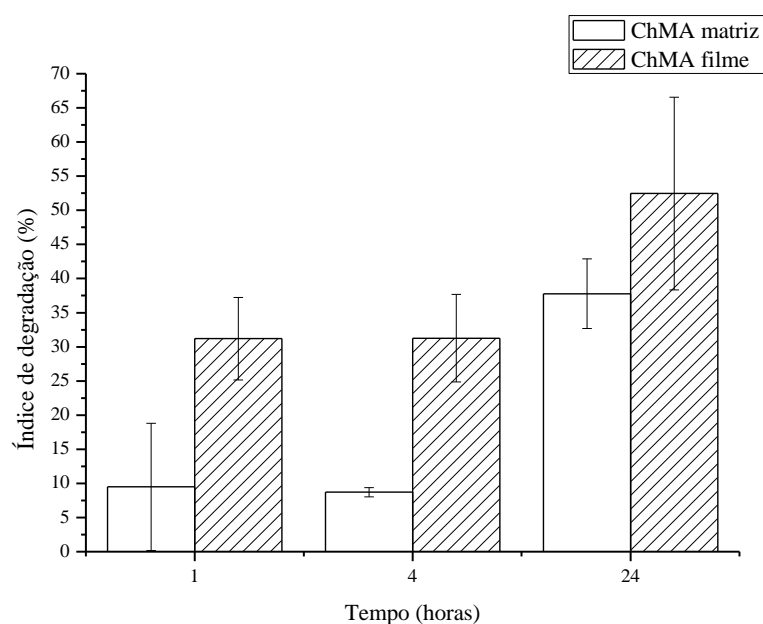
Os gráficos comparativos para diferentes morfologias, filme e matriz, de ChMA e GelChMA, em relação à GI estão expostos na Figura 5.54.



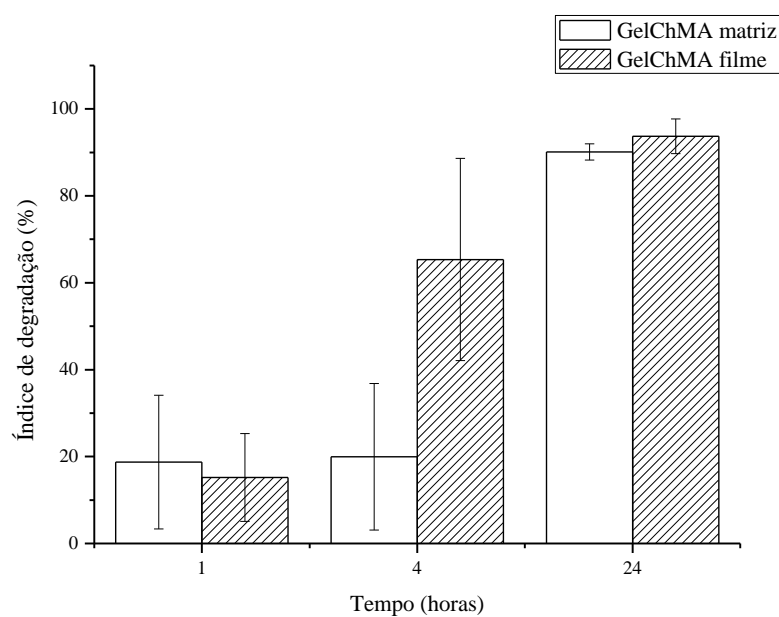
a)



b)



c)



d)

Figura 5.54: Gráficos comparativos para diferentes morfologias, filme e matriz, de ChMA e GelChMA. a) GI para ChMA; b) GI para GelChMA; c) ID para ChMA; d) ID para GelChMA.

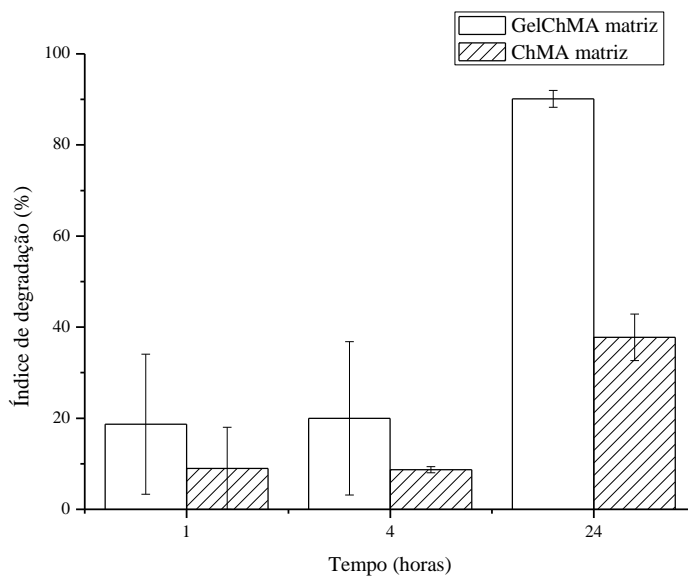
Comparando-se os GIs obtidos para as diferentes morfologias e composições das amostras, nota-se que as amostras de ChMA têm uma capacidade de intumescimento consideravelmente maior que a das amostras contendo gelatina. O resultado está de acordo com trabalhos que estudaram a variação de GI de acordo com a porção de

gelatina em blendas contendo ChMA (SARAIVA *et al.*, 2015). No trabalho de Saraiva *et al.*, a gelatina presente na blenda foi previamente modificada com grupos metacrilamida para também participar do processo de fotorreticulação. Até onde se sabe, não há registros de trabalhos que utilizaram gelatina não modificada para formação de rede interpenetrante com ChMA. Usou-se, portanto, esse trabalho como referência para comparação da variação GI com mudanças no conteúdo de gelatina da blenda.

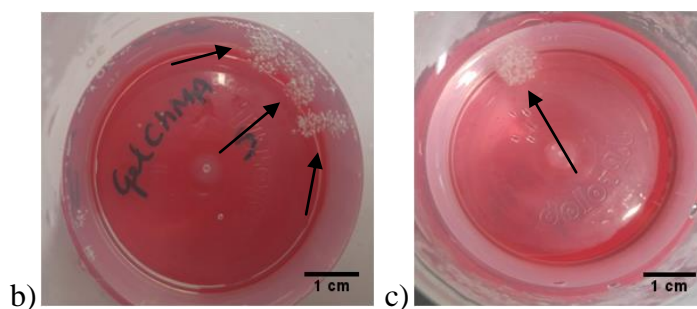
Comparando os valores de GI obtidos para diferentes morfologias de uma mesma composição, conclui-se que os filmes atingem mais rápido seu máximo de intumescimento, principalmente no caso de filmes de ChMA. O comportamento instável das amostras de GelChMA ao longo do tempo de imersão pode estar relacionado com a elevada dissolução de material no meio de intumescimento.

Observa-se, na Figura 5.55, que tanto para ChMA como para GelChMA, as matrizes, obtidas a partir da mesma solução inicial que os filmes, resistem melhor à solubilização na solução de PBS nas condições do ensaio. A justificativa para o fenômeno pode ser relacionada à reticulação física mais intensa proporcionada pelo processo de liofilização do material, uma vez que as condições de reticulação química foram as mesmas para todos as amostras.

A Figura 5.55, item a), explicita a comparação entre os ID das diferentes amostras de matrizes em relação à composição e morfologia. Nota-se, a partir da quarta hora de imersão, um aumento significativo da degradação/solubilização das amostras contendo gelatina. O item b) da Figura 5.55 ilustra uma amostra de matriz de GelChMA imersa por 24h em PBS, a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Observa-se, nessa imagem, a dissolução parcial da matriz formada pela rede interpenetrante. O item c), por sua vez, evidencia a manutenção da integridade da estrutura da matriz de ChMA imersa nas mesmas condições. O item d) compara a situação das amostras desidratadas ao final dos dois procedimentos de intumescimento, por diferentes tempos, com amostras não imersas.

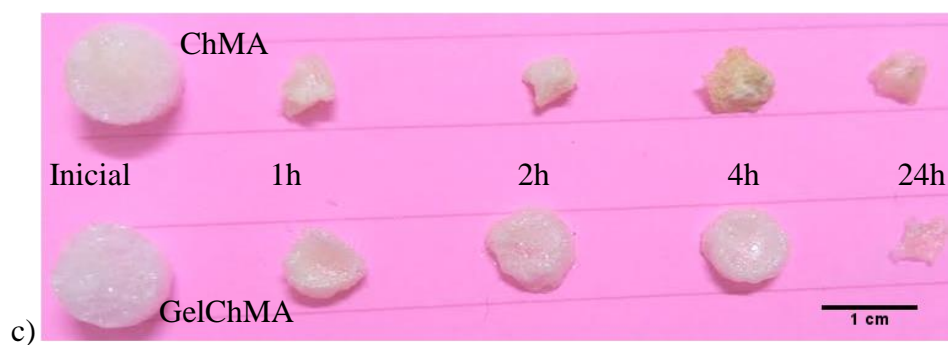


a)



b)

c)



c)

Figura 5.55: Resultado comparativo dos ID para amostras de ChMA e GelChMA, item a). Amostras de matriz de GelChMA, item b) e ChMA, item c) imersas por 24h, em PBS, a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, item b). Comparação entre matrizes de ChMA e GelChMA desidratadas após o segundo procedimento de intumescimento para os diferentes tempos de imersão, item d).

5.6 Ensaio de toxicidade e viabilidade celular- MTT

As células HEK293 T, em contato direto com a amostra de filme GelChMA, apresentaram uma diminuição de $11,4 \pm 2,5\%$ na viabilidade celular em relação ao grupo-controle. Entretanto, as células HEK293 T, em contato direto com as amostras de filme e matriz de ChMA e matriz de GelChMA, não apresentaram diferença significativa na viabilidade celular em relação ao grupo-controle. Portanto, as amostras desenvolvidas não foram citotóxicas no tempo de tratamento de 24h. O resultado do ensaio MTT pode ser observado no gráfico apresentado na Figura 5.56. A Figura 5.57 apresenta as microfotografias das células HEK293 T, pode-se notar que a morfologia das células tratadas por contato direto com as amostras desenvolvidas após 24h não apresentou diferença em relação à condição controle não tratada. Observou-se que os valores apresentados nos controles-referência foram similares ao controle negativo e o controle positivo sempre esteve abaixo de 50%, o que tornou os resultados confiáveis.

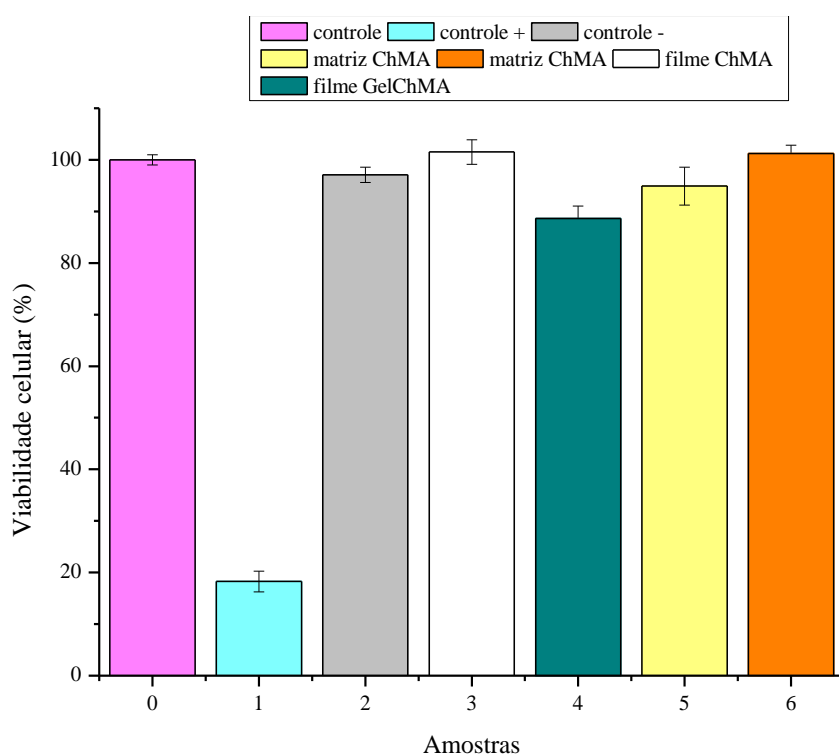


Figura 5.56: Gráficos MTT após 24h de tratamento por contato direto das amostras desenvolvidas.

A menor viabilidade celular no filme de GelChMA pode ser justificada pela solubilidade do material, que pode levar à perda de células junto ao material na manipulação das amostras.

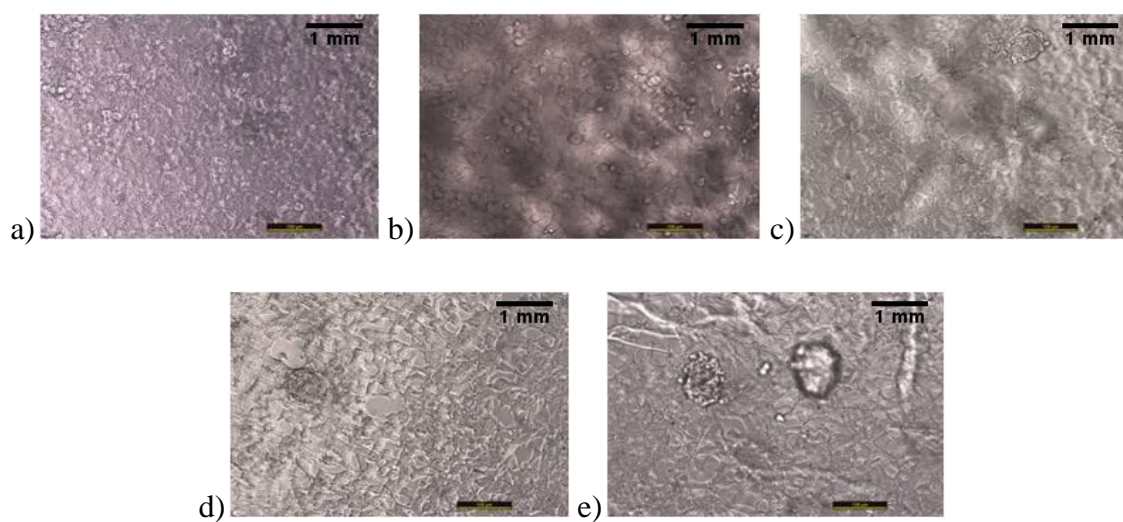


Figura 5.57: Imagens de microscopia após 24 h de tratamento por contato direto das amostras desenvolvidas. a) controle, b) filme de ChMA, c) filme de GelChMA, d) matriz de ChMA, e) matriz de GelChMA.

Os estudos acima sugerem que após 24h de tratamento os biomateriais desenvolvidos não foram tóxicos para as células analisadas pelo contato direto.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, foram preparados hidrogéis a partir de ChMA e de sua blenda com gelatina. As matérias-primas originais- quitosana, gelatina e sua blenda- a quitosana modificada com grupos metacrilamida (ChMA) e as blends de ChMA com gelatina (GelChMA) foram extensamente caracterizadas física, química e morfológicamente. Todos os procedimentos realizados ao longo do trabalho, incluindo a caracterização e modificação das matérias primas, produção dos hidrogéis e sua análise, seja na forma de filmes, seja na forma matrizes, obtiveram êxito na execução e nos resultados obtidos. As mudanças nos sistemas puderam ser identificadas por diferentes métodos, como espectroscopia no UV-Vis e no infravermelho.

Observou-se que as propriedades físico-químicas e morfológicas do hidrogel podem ser controladas por meio da quantidade de gelatina adicionada à rede interpenetrante, variando, portanto, o perfil das características de intumescimento, degradação e tamanho de poros observados na estrutura desidratada. Os materiais produzidos têm potencial para serem utilizados em sistemas biológicos como, por exemplo, curativos para auxílio na cicatrização de feridas (*wound healing dressings*), mostrando-se atóxicos pelo ensaio de MTT.

A presença de sítios para modificação química das cadeias de polímeros naturais nos hidrogéis formados a partir de ChMA e GelChMA fornecem ainda potencial para modificação das cadeias com moléculas de interesse, de forma a otimizar sua atuação na aplicação pretendida, sendo um material robusto em relação às possibilidades de aplicação.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- I. Utilização das matrizes idealizadas e confeccionadas durante o programa de Mestrado como parte da primeira fase da produção de matrizes tridimensionais para atuar como comunicadoras na interação célula-material em processos de regeneração tecidual.
- II. *Design* de um polipeptídeo contendo sequências de aminoácidos com potencial para atuar de forma sinérgica na comunicação célula/material e seu uso como agente de funcionalização de matrizes tridimensionais.
- III. Utilização do polipeptídeo projetado como elemento base na produção de hidrogéis de sistemas poliméricos e híbridos.

8 CONTRIBUIÇÃO COM A LITERATURA

Carvalho IC, Mansur HS. **Engineered 3D-Scaffolds of Photocrosslinked Chitosan-Gelatin Hydrogel Hybrids for Chronic Wound Dressings and Skin Repair.** Mater Sci Eng C.; 2017;78: 690–705. DOI:10.1016/j.msec.2017.04.126

Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0928493117304253>

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, E. M. Hydrogel : Preparation , characterization , and applications : A review. *Journal of advanced Reasearch*, v. 6, p. 105–121, 2015.
- ALLEN, N. S. *Photochemistry and Photophysics of Polymers Materials*. New Jersey: Jhon Wiley & Sons, Inc., 2010.
- ALLEN, N. S. Photoinitiators for UV and visible curing of coating: Mechanisms and properties. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 100, p. 101–107, 1996.
- ANNABI, N. *et al.* Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, v. 16, n. 4, p. 371–383, 2010.
- BALAKRISHNAN, B.; JAYAKRISHNAN, A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3941–3951, 2005.
- BALÁZS, N.; SIPOS, P. *Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. Carbohydrate Research*. [S.l: s.n.], 2007
- BARROS, J. A. G. *Reticulação da Poli (N-vinil-2- pirrolidona) e copolímeros por processos químicos*. 2007. 200 f. Universidade de São Paulo, 2007.
- BARTNIKOWSKI, M. *et al.* Protective effects of reactive functional groups on chondrocytes in photocrosslinkable hydrogel systems. *Acta Biomaterialia*, v. 27, p. 66–76, 2015.
- BELLIS, S. L. Advantages of RGD peptides for directing cell association with biomaterials. *Biomaterials*, v. 32, n. 18, p. 4205–4210, 2011.
- BENEDIKT, S. *et al.* Highly efficient water-soluble visible light photoinitiators. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, p. n/a-n/a, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pola.27903>>.
- BENTON, J. A. *et al.* Photocrosslinking of Gelatin Macromers to Synthesize Porous Hydrogels That Promote Valvular Interstitial Cell Function. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, n. 11, p. 3221–3230, 2009.
- BEPPU, M. M.; ARRUDA, E. J.; SANTANA, C. C. Síntese e caracterização de estruturas densas e porosas de quitosana. *Polímeros*, v. 9, n. 4, p. 163–169, 1999.
- BERGER, J. *et al.* Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.
- BHATTARAI, N. *et al.* PEG-grafted chitosan as an injectable thermosensitive hydrogel for sustained protein release. *Journal of Controlled Release*, v. 103, n. 3, p. 609–624,

2005.

BILLIET, T. *et al.* Quantitative contrasts in the photopolymerization of acrylamide and methacrylamide-functionalized gelatin hydrogel building blocks. *Macromolecular Bioscience*, v. 13, n. 11, p. 1531–1545, 2013.

BOUCARD, N. *et al.* The use of physical hydrogels of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, v. 28, n. 24, p. 3478–3488, 2007.

BOUSQUET, J. A.; FOUASSIER, J. P. Mechanism of photo-oxidation of an elastomer. *Polymer degradation and stability*, v. 5, p. 113–133, 1983.

BOWMAN, C. N.; KLOXIN, C. J. Toward an Enhanced Understanding and Implementation of Photopolymerization Reactions. *AIChE Journal*, v. 54, n. 11, p. 2775–2795, 2008.

BRUGNEROTTO, J. *et al.* An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*, v. 42, n. 8, p. 3569–3580, 2001.

BRUKER. *Microtomografia Computadorizada (Micro CT) de Raios X*. Disponível em: <<https://www.bruker.com/pt/products/microtomography/micro-ct-for-sample-scanning.html>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*, v. 22, n. 3, p. 261–268, 2001.

CHEN, K. Y. *et al.* Asymmetric chitosan membrane containing collagen I nanospheres for skin tissue engineering. *Biomacromolecules*, v. 10, n. 6, p. 1642–1649, 2009.

CHEN, X. G. *et al.* The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts. *Biomaterials*, v. 23, n. 23, p. 4609–4614, 2002.

CHO, Y.-W. *et al.* Preparation and solubility in acid and water of partially deacetylated chitins. *Biomacromolecules*, v. 1, n. 4, p. 609–614, 2000.

CHO, Y. W. *et al.* Water-soluble chitin as a wound healing accelerator. *Biomaterials*, v. 20, n. 22, p. 2139–2145, 1999.

CHOU, P. T.; KHAN, A. U. L-ascorbic acid quenching of singlet delta molecular oxygen in aqueous media: Generalized antioxidant property of vitamin C. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 115, n. 3, p. 932–937, 1983.

CHUNG, Y. C.; CHEN, C. Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, v. 99, n. 8, p. 2806–2814, 2008.

COSTA-JÚNIOR, E. DE S. *Desenvolvimento de matriz de Quitosana/PVA, quimicamente reticulado para aplicação potencial em engenharia de tecido epitelial*. 2008. 151 f. Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

COSTA-JÚNIOR, E. S. *et al.* Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl

alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 3, p. 472–481, 2009.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 49, p. 780–792, 2013.

CUI, F. *et al.* Development of chitosan-collagen hydrogel incorporated with lysostaphin (CCHL) burn dressing with anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and promotion wound healing properties. *Drug delivery*, v. 18, n. 3, p. 173–180, 2011.

CUMMINGS, S. *The chemistry of multielectron excited states*. Disponível em: <<https://www.quia.com/files/quia/users/eburns2/Excited-States>>. Acesso em: 29 abr. 2016.

CZECHOWSKA-BISKUP, R. *et al.* Determination of Degree of Deacetylation of Chitosan - Comparaison of Methods. *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives*, v. 17, p. 5–20, 2012.

DASH, M. *et al.* Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 36, n. 8, p. 981–1014, 2011.

DAVID, L.; DOMARD, A. Multi-membrane hydrogels. *Nature*, v. 452, n. 7183, p. 76–79, 2008. Disponível em: <[file:///Users/pspicer/Patrick/References/PDF Articles/Multi-membrane onion hydrogels.pdf](file:///Users/pspicer/Patrick/References/PDF%20Articles/Multi-membrane%20onion%20hydrogels.pdf)>.

DAVIS, K. A.; BURDICK, J. A.; ANSETH, K. S. Photoinitiated crosslinked degradable copolymer networks for tissue engineering applications. *Biomaterials*, v. 24, n. 14, p. 2485–2495, 2003.

DE LA MATA, A. *et al.* Chitosan-gelatin biopolymers as carrier substrata for limbal epithelial stem cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 24, n. 12, p. 2819–2829, 2013.

DE SOUZA, R. J. S. A. P. *et al.* Estimativa do custo do tratamento do câncer de pele tipo não-melanoma no estado de são paulo - Brasil. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 86, n. 4, p. 657–662, 2011.

DECKER, C. Photoinitiated crosslinking Polymerisation. *Frog. Polym Sci*, v. 21, p. 593–650, 1996.

DELIGKARIS, K. *et al.* Hydrogel-based devices for biomedical applications. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 147, n. 2, p. 765–774, 2010.

DERGUNOV, S. A.; MUN, G. A. Gama-irradiated chitosan-polyvinyl pyrrolidone hydrogels as pH-sensitive protein delivery system. *Radiation Physics and Chemistry*, v. 78, n. 1, p. 65–68, 2009.

DIAS, L. L. S. *et al.* Synthesis and characterization of chitosan-polyvinyl alcohol-bioactive glass hybrid membranes. *Biomatter*, v. 1, n. 1, p. 114–119, 2011.

DJABOUROV, M.; LEBLOND, J.; PAPON, P. Gelation of aqueous gelatin solutions. I. Structural investigation. *Journal de Physique*, v. 49, p. 319–332, 1988.

DOGRA, S. K. *Physical chemistry*. Disponível em:

<http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/251/1/Photochemistry_revised.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

DU, Y. *et al.* Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, v. 10, n. 1, p. 103–107, 2009.

DUARTE, A. R. C.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Preparation of chitosan scaffolds loaded with dexamethasone for tissue engineering applications using supercritical fluid technology. *European Polymer Journal*, v. 45, n. 1, p. 141–148, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2008.10.004>>.

DUMONT, V. C. *et al.* Glycol chitosan/nanohydroxyapatite biocomposites for potential bone tissue engineering and regenerative medicine. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 10, p. 9–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.030>>.

EBARA, M. *et al.* Smart Hydrogels. In: NATIONAL INSTITUTE FOR MATERIALS SCIENCE (Org.). *Smart Biomaterials - NIMS Monographs*. [S.l.]: Springer Japan, 2014. p. 373.

EL-HEFIAN, E. A.; NASEF, M. M.; YAHAYA, A. H. Chitosan-based polymer blends: Current status and applications. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, v. 36, n. 1, p. 11–27, 2014. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84899052283&partnerID=tZOtx3y1>>.

ESCOBAR-BARRIOS, V. A. *et al.* FTIR – An Essential Characterization Technique for Polymeric Materials. *Infrared Spectroscopy - Materials Science, Engineering and Technology*, p. 195–212, 2012. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/infrared-spectroscopy-materials-science-engineering-and-technology/ftir-an-essential-characterization-technique-for-polymeric-materials>>.

F. WANG, L. SHOR, A. DARLING, S. KHALIL, W. SUN, S. GÜÇERİ, A. L. PRECISION EXTRUDING DEPOSITION AND CHARACTERIZATION OF CELLULAR POLY- ϵ -CAPROLACTONE TISSUE SCAFFOLDS. *Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures*, p. 573–584, 2003.

FAIKRUA, A. *et al.* Properties of B-glycerol phosphate/collagen/chitosan blend scaffolds for application in skin tissue engineering. *ScienceAsia*, v. 35, n. 3, p. 247–254, 2009.

FAN, H. *et al.* Enhanced differentiation of mesenchymal stem cells co-cultured with ligament fibroblasts on gelatin/silk fibroin hybrid scaffold. *Biomaterials*, v. 29, n. 8, p. 1017–1027, 2008.

FARRIS, S. *et al.* Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, n. 8, p. 316–332, 2009.

FEDOROVICH, N. E. *et al.* The effect of photopolymerization on stem cells embedded in hydrogels. *Biomaterials*, v. 30, n. 3, p. 344–353, 2009.

FERREIRA, P. *et al.* Photocrosslinkable Polymers for Biomedical Applications. In: FAZEL, R. (Org.). *Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. [S.l.]: InTech, 2011. p. 55–74. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biomedical-engineering-frontiers-and-challenges/photocrosslinkable-polymers-for-biomedical-applications>>.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays : Comparison of LDH , neutral red , MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. v. 160, p. 171–177, 2006.

FOUASSIER, J. P.; LALEVÉE, J. Photochemical production of interpenetrating polymer networks; Simultaneous initiation of radical and cationic polymerization reactions. *Polymers*, v. 6, n. 10, p. 2588–2610, 2014.

GALLO, L. A. *Aminoácidos e Proteínas*. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallos/aminoacidos.html>>. Acesso em: 9 jun. 2016.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science and Technology*, v. 20, n. 1, p. 3–16, 2009.

GÓMEZ-GUILLÉN, M. C. *et al.* Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 8, p. 1813–1827, 2011.

GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. In: PROF. ROSARIO PIGNATELLO (Org.). *Biomaterials Applications for Nanomedicine*. 1. ed. Ljubljana: InTech, 2011. p. 19–52. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/biomaterials-applications-for-nanomedicine/collagen-vs-gelatine-based-biomaterials-and-their-biocompatibility-review-and-perspectives>>.

GROEBER, F. *et al.* Skin tissue engineering - In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 63, n. 4, p. 352–366, 2011.

GULREZ, S. K. .; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O. Hydrogels: Methods of Preparation, Characterisation and Applications in Molecular and Environmental Bioengineering. *Progress in Molecular and Environmental Bioengineering - From Analysis and Modelling to Technology Applications*, p. 646, 2011. Disponível em: <<http://epubs.glyndwr.ac.uk/phrc/6>>.

GUO, C.; ZHOU, L.; LV, J. Effects of expandable graphite and modified ammonium polyphosphate on the flame-retardant and mechanical properties of wood flour-polypropylene composites. *Polymers and Polymer Composites*, v. 21, n. 7, p. 449–456, 2013.

GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres.

Carbohydrate Polymers, v. 66, n. 1, p. 43–54, 2006.

GUPTA, P.; VERMANI, K.; GARG, S. Hydrogels: from controlled release to pH responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, v. 7, n. 10, p. 569–579, 2002.

HAN, F. *et al.* Photocrosslinked layered gelatin-chitosan hydrogel with graded compositions for osteochondral defect repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, n. 4, 2015.

HAN, F. *et al.* Preparation, characteristics and assessment of a novel gelatin – chitosan sponge scaffold as skin tissue engineering material. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 476, n. 1–2, p. 124–133, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.09.036>>.

HARISH PRASHANTH, K. V.; KITTUR, F. S.; THARANATHAN, R. N. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, n. 1, p. 27–33, 2002.

HE, D.; SUSANTO, H.; ULBRICHT, M. Photo-irradiation for preparation, modification and stimulation of polymeric membranes. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 34, n. 1, p. 62–98, 2009.

HE, P.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. In vitro evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 166, n. 1, p. 75–88, 1998.

HENNINK, W. E.; VAN NOSTRUM, C. F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, n. SUPPL., p. 223–236, 2012.

HERSEL, U.; DAHMEN, C.; KESSLER, H. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*, v. 24, p. 4385–4415, 2003.

HILDERBRAND, A. M. *et al.* Biomaterials for 4D stem cell culture. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, v. 20, n. 4, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135902861630016X>>.

HO, S. T.; HUTMACHER, D. W. A comparison of micro CT with other techniques used in the characterization of scaffolds. *Biomaterials*, v. 27, n. 8, p. 1362–1376, 2006.

HOARE, T. R.; KOHANE, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, v. 49, n. 8, p. 1993–2007, 2008.

HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 18–23, 2012.

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

HOLZAPFEL, B. M. *et al.* How smart do biomaterials need to be? A translational science and clinical point of view. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 4, p. 581–603, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.07.009>>.

- HUA, J. *et al.* Visible light crosslinkable chitosan hydrogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 5, p. 1730–1738, 2012.
- HUANG, D. *et al.* Antibacterial chitosan coating on nano-hydroxyapatite/polyamide66 porous bone scaffold for drug delivery. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, v. 22, n. 7, p. 931–944, 2011.
- HUANG, X. *et al.* Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 8, p. 4816–4824, 2013.
- INGMAN, F.; STILL, E. GRAPHIC METHOD FOR THE DETERMINATION OF TITRATION END-POINTS. *Talanta*, v. 13, n. 1966, p. 1431–1442, 1966.
- ISHIHARA, M. *et al.* Acceleration of wound contraction and healing with a photocrosslinkable chitosan hydrogel. *Wound Repair and Regeneration*, v. 9, n. 6, p. 513–521, 2001.
- ISHIHARA, M. *et al.* Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. *Biomaterials*, v. 23, n. 3, p. 833–840, 2002.
- IVANOVA, E. P.; BAZAKA, K.; CRAWFORD, R. J. *Natural polymer biomaterials: advanced applications*. [S.l: s.n.], 2014.
- IWASAKI, N. *et al.* Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: Evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan. *Biomacromolecules*, v. 5, n. 3, p. 828–833, 2004.
- JABS, A. *Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)*. Disponível em: <http://www.imb-jena.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html>. Acesso em: 10 maio 2016.
- JAYAKUMAR, R. *et al.* Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnology Advances*, v. 29, n. 3, p. 322–337, 2011.
- JEON, O. *et al.* Photocrosslinked alginate hydrogels with tunable biodegradation rates and mechanical properties. *Biomaterials*, v. 30, n. 14, p. 2724–2734, 2009.
- JI, C.; KHADEMHOSEINI, A.; DEHGHANI, F. Enhancing cell penetration and proliferation in chitosan hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, v. 32, n. 36, p. 9719–9729, 2011.
- JIANG, X.; CHEN, L.; ZHONG, W. A new linear potentiometric titration method for the determination of deacetylation degree of chitosan. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, n. 4, p. 457–463, 2003.
- JIANKANG, H. *et al.* Preparation of chitosan-gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 1, p. 453–461, 2009.
- JONES, A. C. *et al.* The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical

properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*, v. 30, n. 7, p. 1440–1451, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.056>>.

KAEMMERER, E. *et al.* Gelatine methacrylamide-based hydrogels: An alternative three-dimensional cancer cell culture system. *Acta Biomaterialia*, v. 10, n. 6, p. 2551–2562, 2014.

KASAAI, M. R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, v. 71, n. 4, p. 497–508, 2008.

KASAAI, M. R. Various methods for determination of the degree of N-acetylation of chitin and chitosan: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 57, n. 5, p. 1667–1676, 2009.

KATHURIA, N. *et al.* Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan-gelatin cryogels for tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 1, p. 406–418, 2009.

KIM, I. Y. *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnology advances*, v. 26, n. 1, p. 1–21, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884325>>.

KIM, T. H. *et al.* Chemical modification of chitosan as a gene carrier in vitro and in vivo. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 32, n. 7, p. 726–753, 2007.

KIRSCHNER, C. M.; ANSETH, K. S. Hydrogels in healthcare: From static to dynamic material microenvironments. *Acta Materialia*, v. 61, n. 3, p. 931–944, 2013.

KRAJEWSKA, B. Membrane-based processes performed with use of chitin/chitosan materials. *Separation and Purification Technology*, v. 41, n. 3, p. 305–312, 2005.

KUHN, L. T. Biomaterials. In: ENDERLE, J. D.; BRONZINO, J. D. (Org.). *Introduction to Biomedical Engineering*. 3^a ed. [S.l.]: Elsevier Inc., 2012. p. 1253.

KUMAR, P. T. S. *et al.* Flexible, micro-porous chitosan–gelatin hydrogel/nanofibrin composite bandages for treating burn wounds. *RSC Adv.*, v. 4, n. 110, p. 65081–65087, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4RA11969J>>.

KUMAR, R. *et al.* Chitosan chemistry and pharmaceutical perspective. *Chemical reviews*, v. 104, p. 6017–6084, 2004.

KUMAR, S. *Organic Chemistry - Spectroscopy of Organic Compounds*. Amritsar: Guru Nanak Dev University., 2006

KURITA, K. Controlled functionalization of the polysaccharide chitin. *Progress in Polymer Science*, v. 26, p. 1921–1971, 2001.

LAMARQUE, G. *et al.* New Route of Deacetylation of a - and -b Chitins by Means of Freeze - Pump Out - Thaw Cycles. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1380–1388, 2005.

- LAVERTU, M. *et al.* A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 32, n. 6, p. 1149–1158, 2003.
- LEE, S. B. *et al.* Study of gelatin-containing artificial skin V: Fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method. *Biomaterials*, v. 26, n. 14, p. 1961–1968, 2005.
- LEVETT, P. A. *et al.* Chondrocyte redifferentiation and construct mechanical property development in single-component photocrosslinkable hydrogels. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 102, n. 8, p. 2544–2553, 2014.
- LIEN, S. M.; KO, L. Y.; HUANG, T. J. Effect of pore size on ECM secretion and cell growth in gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 2, p. 670–679, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2008.09.020>>.
- LIN, A. S. P. *et al.* Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. *Biomaterials*, v. 24, n. 3, p. 481–489, 2003.
- LIU, M. *et al.* Time-resolved spectroscopic and density functional theory study of the photochemistry of Irgacure-2959 in an aqueous solution. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 118, n. 38, p. 8701–8707, 2014.
- LIU, X. F. *et al.* Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 79, n. March, p. 1324–1335, 2000.
- LOPERGOLO, L. C. *Estudo da estrutura e dos parâmetros de reticulação de membranas hidrofílicas à base de poli(n-vinil-2-pirrolidona) induzidas por radiação*. 2002. 164 f. Univerisade de São Paulo, 2002.
- MA, A. B. *et al.* Impact of skin cancer screening and secondary prevention campaigns on skin cancer incidence and mortality: A systematic review. *Journal of American Dermatology*, v. 76, n. 1, p. 129–139.e10, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.07.045>>.
- MA, L. *et al.* Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials*, v. 24, n. 26, p. 4833–4841, 2003.
- MA, Z. *et al.* Synthesis of novel macrophotoinitiator for the photopolymerization of acrylate. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 131, n. 11, p. 1–8, 2014.
- MADIHALLY, S.; MATTHEW, H. Porous chitosan scaffold for tissue engineering. *Biomaterials*, v. 20, p. 1133–1142, 1999.
- MALAFAYA, P. B.; REIS, R. L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor. *Acta Biomaterialia*, v. 5, n. 2, p. 644–660, 2009.
- MANSUR, A. A.; MANSUR, H. S. Quantum dot/glycol chitosan fluorescent nanoconjugates. *Nanoscale research letters*, v. 10, n. 1, p. 172, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0->

84928348707&partnerID=tZOtx3y1>.

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A. P.; SORIANO-ARAÚJO, A.; LOBATO, Z. I. P. Beyond biocompatibility: an approach for the synthesis of ZnS quantum dot-chitosan nano-immunoconjugates for cancer diagnosis. *Green Chem.*, v. 17, n. 3, p. 1820–1830, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4GC02072C>>.

MANSUR, H. S. *et al.* Cytocompatibility evaluation in cell-culture systems of chemically crosslinked chitosan/PVA hydrogels. *Materials Science and Engineering C*, v. 29, n. 5, p. 1574–1583, 2009.

MANSUR, H. S. *et al.* FTIR spectroscopy characterization of poly (vinyl alcohol) hydrogel with different hydrolysis degree and chemically crosslinked with glutaraldehyde. *Materials Science and Engineering C*, v. 28, n. 4, p. 539–548, 2008.

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A. P.; SORIANO-ARAÚJO, A.; LOBATO, Z. I. P.; *et al.* Water-soluble nanoconjugates of quantum dot-chitosan-antibody for in vitro detection of cancer cells based on “enzyme-free” fluoroimmunoassay. *Materials Science and Engineering C*, v. 52, p. 61–71, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.03.022>>.

MANSUR, H. S.; MANSUR, A. A. P. CdSe quantum dots stabilized by carboxylic-functionalized PVA: Synthesis and UV-vis spectroscopy characterization. *Materials Chemistry and Physics*, v. 125, n. 3, p. 709–717, 2011.

MAO, J. S. *et al.* A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. *Biomaterials*, v. 25, n. 18, p. 3973–3981, 2004.

MARQUARDT, M. *Hydrogel Breaks Down in Presence of New Bone Growth*. Disponível em: <<http://www.materials360online.com/newsDetails/46593>>. Acesso em: 10 maio 2016.

MASON, M. N. *et al.* Predicting Controlled-Release Behavior of Degradable PLA- b -PEG- b -PLA Hydrogels. *Macromolecules*, v. 34, n. 13, p. 4630–4635, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org.ezproxy.lib.utexas.edu/doi/abs/10.1021/ma010025y>>.

MEI, L. *et al.* Preparation, characterization and evaluation of chitosan macroporous for potential application in skin tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 51, n. 5, p. 992–997, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.08.004>>.

METTERS, A. T.; BOWMAN, C. N.; ANSETH, K. S. Verification of Scaling Laws for Degrading PLA- b -PEG- b -PLA Hydrogels. *AIChE Journal*, v. 47, n. 6, p. 1432–1437, 2001.

MICRO PHOTONICS INC. *How does a micro-CT scanner work ?* Disponível em: <<https://www.microphotonics.com/how-does-a-microct-scanner-work/>>. Acesso em: 10 dez. 2016.

MIGUEL, S. P. *et al.* Thermoresponsive chitosan-agarose hydrogel for skin

- regeneration. *Carbohydrate Polymers*, v. 111, p. 366–373, 2014.
- MIRONI-HARPAZ, I. *et al.* Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomaterialia*, v. 8, n. 5, p. 1838–1848, 2012.
- MOHANTY, B.; BOHIDAR, H. B. Microscopic structure of gelatin coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 36, n. 1–2, p. 39–46, 2005.
- MOHANTY, B.; BOHIDAR, H. B. Systematic of alcohol-induced simple coacervation in aqueous gelatin solutions. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 4, p. 1080–1086, 2003.
- MONIER, M. *et al.* Synthesis and characterization of photo-crosslinkable hydrogel membranes based on modified chitosan. *Polymer*, v. 51, n. 5, p. 1002–1009, 2010.
- MOREIRA, C. D. F. *et al.* Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Materials Science and Engineering C*, v. 58, p. 1207–1216, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.075>>.
- MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional Polymers*, v. 68, n. 6, p. 1013–1051, 2008.
- MOURYA, V. K.; INAMDAR, N. N. Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 20, n. 5, p. 1057–1079, 2009.
- NAGAHAMA, H. *et al.* Novel biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, n. 2, p. 295–302, 2008.
- NAGAHAMA, H.; RANI, V. V. D.; *et al.* Preparation, characterization, bioactive and cell attachment studies of α -chitin/gelatin composite membranes. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 44, n. 4, p. 333–337, 2009.
- NAGAHAMA, H.; MAEDA, H.; *et al.* Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. *Carbohydrate Polymers*, v. 76, n. 2, p. 255–260, 2009.
- NGUYEN, K. T.; WEST, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials*, v. 23, p. 4307–4314, 2002.
- NICHOL, J. W. *et al.* Cell-laden microengineered gelatin methacrylate hydrogels. *Biomaterials*, v. 31, n. 21, p. 5536–5544, 2010.
- OBARA, K. *et al.* Photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 stimulates wound healing in healing-impaired db/db mice. *Biomaterials*, v. 24, p. 3437–3444, 2003.
- ODIAN, G. Radical Chain Polymerization. *Principles of Polymerization*. 4^a ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2004. p. 198–349. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/047147875X.ch3>>.

- ONG, S. Y. *et al.* Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials*, v. 29, n. 32, p. 4323–4332, 2008.
- ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. DE M.; MANSUR, H. S. *Biomateriais*. 1^a, Reimpr ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012.
- PACHECO, N. *et al.* Effect of temperature on chitin and astaxanthin recoveries from shrimp waste using lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, v. 100, n. 11, p. 2849–2854, 2009.
- PACHECO, N. *et al.* Structural Characterization of Chitin and Chitosan Obtained by Biological and Chemical Methods. *Biomacromolecules*, v. 12, p. 3285–3290, 2011.
- PATEL, A.; MEQUANINT, K. Hydrogel Biomaterials. In: FAZEL, R. (Org.). . *Hydrogel Biomaterials, Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges*. [S.l.]: InTech, 2011. p. 276–296. Disponível em: <http://www.intechopen.com/source/pdfs/17653/InTech-Hydrogel_biomaterials.pdf>.
- PAUL, W.; SHARMA, C. Chitosan and alginate wound dressings: a short review. *Trends Biomater Artif Organs*, v. 18, n. 1, p. 18–23, 2004. Disponível em: <<http://medind.nic.in/taa/t04/i1/taat04i1p18.pdf>>.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to Spectroscopy*. 3^a ed. Washington: Thomson Learning Inc., 2001.
- PAVINATTO, F. J.; CASELI, L.; OLIVEIRA, O. N. Chitosan in nanostructured thin films. *Biomacromolecules*, v. 11, n. 8, p. 1897–1908, 2010.
- PB GELATINS. *Gelatina - Composição de aminoácidos*. Disponível em: <http://www.pbgelatins.com/pt/sobre_gelatinas/fisico?quimicasal?properties/composicao_de_aminoacidos/>. Acesso em: 1 abr. 2016.
- PENG, H. T.; MARTINEAU, L.; SHEK, P. N. Hydrogel-elastomer composite biomaterials: 3. Effects of gelatin molecular weight and type on the preparation and physical properties of interpenetrating polymer networks. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 3, p. 997–1007, 2008.
- PEPPAS, N. A.; BURES, P.; *et al.* Hydrogels in pharmaceutical formulations. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 50, n. 1, p. 27–46, 2000.
- PEPPAS, N. A.; HUANG, Y.; *et al.* Physicochemical, foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology. *Annu. Rev. Biomed*, v. 2, n. 1, p. 9–29, 2000.
- PEREDA, M. *et al.* Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. *Food Hydrocolloids*, v. 25, n. 5, p. 1372–1381, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.001>>.
- PULIERI, E. *et al.* Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 86, n. 2, p. 311–322, 2008.
- RATHNA, G. V. N. Gelatin hydrogels: Enhanced biocompatibility, drug release and cell viability. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 19, n. 6, p. 2351–

2358, 2008.

REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 6, p. 362–369, 2015.

REICHENBÄCHER, M.; POPP, J. *Challenges in Molecular Structure Determination*. [S.l.: s.n.], 2012.

REUSCH, W. *Infrared Spectroscopy*. Disponível em: <<https://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/Spectrpy/InfraRed/infrared.htm>>.

REUSCH, W. *Visible and ultraviolet spectroscopy*. Disponível em: <<http://www2.chemistry.msu.edu/faculty/reusch/virttxtjml/spectrpy/uv-vis/spectrum.htm>>. Acesso em: 22 maio 2016.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603–632, 2006. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0079670006000530>>.

RITGER, P.; PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs. *Journal of Controlled Release*, v. 5, n. 1, p. 23–36, 1987a.

RITGER, P.; PEPPAS, N. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *Journal of controlled release*, v. 5, n. 1, p. 37–42, 1987b.

ROCHA, M. F. G. *Análises do envelhecimento acelerado e da ação estabilizadora do ácido ascórbico na degradação oxidativa do polietileno de ultra-elevada massa molar para aplicação biomédica*. 2009. 166 f. UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS CURSO, 2009.

ROCHA, M. F.; MANSUR, A. A. P.; MANSUR, H. S. FTIR investigation of UHMWPE oxidation submitted to accelerated aging procedure. *Macromolecular Symposia*, v. 296, n. 1, p. 487–492, 2010.

ROSE, R. C.; BODE, A. M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. *Faseb J*, v. 7, n. 12, p. 1135–1142, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8375611>%5Cn<http://www.fasebj.org/content/7/12/1135.full.pdf>>.

ROSIK, J. M.; YOSHII, F. Hydrogels and their medical applications. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, v. 151, n. 1–4, p. 56–64, 1999.

RUOSLAHTI, E.; PIERSCHBACHER, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science (New York, N.Y.)*, v. 238, n. 4826, p. 491–497, 1987.

RUTSCH, W. *et al.* Recent developments in photoinitiators. *Progress in Organic Coatings*, v. 27, n. 1–4, p. 227–239, 1996.

- SADAT EBRAHIMI, M. M.; SCHONHERR, H. Enzyme-sensing chitosan hydrogels. *Langmuir*, v. 30, n. 26, p. 7842–7850, 2014.
- SAMAL, S. K. *et al.* Cationic polymers and their therapeutic potential. *Chemical Society Reviews*, v. 41, p. 7147–7194, 2012.
- SANTORO, M.; TATARA, A. M.; MIKOS, A. G. Gelatin carriers for drug and cell delivery in tissue engineering. *Journal of Controlled Release*, v. 190, p. 210–218, 2014.
- SARAIVA, S. M. *et al.* Synthesis and characterization of a photocrosslinkable chitosan–gelatin hydrogel aimed for tissue regeneration. *RSC Adv.*, v. 5, n. 78, p. 63478–63488, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA10638A>>.
- SARAVANAN, S. *et al.* Preparation, characterization and antimicrobial activity of a bio-composite scaffold containing chitosan/nano-hydroxyapatite/nano-silver for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 49, n. 2, p. 188–193, 2011.
- SAREM, M. *et al.* Optimization strategies on the structural modeling of gelatin/chitosan scaffolds to mimic human meniscus tissue. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 8, p. 4777–4785, 2013.
- SASHIWA, H.; AIBA, S. I. Chemically modified chitin and chitosan as biomaterials. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 29, n. 9, p. 887–908, 2004.
- SEGUROLA, J. *et al.* Photochemistry and photoinduced chemical crosslinking activity of acrylated prepolymers by several commercial type I far UV photoinitiators. *Polymer degradation and stability*, v. 65, p. 153–160, 1999.
- SEOL, Y.-J. *et al.* Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology letters*, v. 26, p. 1037–1041, 2004.
- SHARMA, C. *et al.* Fabrication of quaternary composite scaffold from silk fibroin, chitosan, gelatin, and alginate for skin regeneration. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 44, p. 1–12, 2015. Disponível em: <http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=General Search&qid=19&SID=Z2flyRCrX33egBku4TA&page=1&doc=8>.
- SIGMA-ALDRICH. *Ascorbate in Cell Culture*. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life?science/cell?culture/learning?center/media?expert/ascorbate.html>>. Acesso em: 31 maio 2016.
- SIVASHANMUGAM, A. *et al.* An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*, v. 72, p. 543–565, 2015.
- SMITH, J.; WOOD, E.; DORNISH, M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharmaceutical research*, v. 21, n. 1, p. 43–49, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984256>>.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. *Química Organica 1*. 7^a ed. Rio de Janeiro: LTC -Livros Técnicos e Científicos Editora S. A, 2001.

- SPERLING, L. H. *Introduction to Physical Polymer Science*. 4. ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- SUN, L. P. *et al.* Biological evaluation of collagen-chitosan scaffolds for dermis tissue engineering. *Biomedical materials (Bristol, England)*, v. 4, p. 055008–055014, 2009.
- SUPP, D. M.; BOYCE, S. T. Engineered skin substitutes: Practices and potentials. *Clinics in Dermatology*, v. 23, n. 4, p. 403–412, 2005.
- TAN, H.; MARRA, K. G. Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications. *Materials*, v. 3, n. 3, p. 1746–1767, 2010.
- TAN, S. C. *et al.* The degree of deacetylation of chitosan: Advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. *Talanta*, v. 45, n. 4, p. 713–719, 1998.
- TOLAIMATE, A. *et al.* On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer*, v. 41, n. 7, p. 2463–2469, 2000.
- TORRES, M. A. *Produção e caracterização de microesferas de quitosana natural e modificada quimicamente e o seu uso na adsorção das proteínas BSA e lisozima*. 2006. 146 f. Universidade Estadual de Campinas, 2006.
- TOWNSEND, T. *Electronic Spectroscopy*. Disponível em: <http://chemwiki.ucdavis.edu/Core/Physical_Chemistry/Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy/Electronic_Spectroscopy:_Interpretation>. Acesso em: 2 maio 2016.
- TU, Y. *et al.* Preparation and characterization of thermosensitive artificial skin with a Sandwich structure. *Materials Letters*, v. 147, p. 4–7, 2015.
- TUAN, H. S.; HUTMACHER, D. W. Application of micro CT and computation modeling in bone tissue engineering. *CAD Computer Aided Design*, v. 37, n. 11, p. 1151–1161, 2005.
- TURRO, N. J. Molecular Photochemistry of Organic Compounds: an Overview. *Modern Molecular Photochemistry*. New York: Benjamin/Cummings Pub. Co, 1978. p. 1–20. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.2012.01178.x>>.
- UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, p. 105–115, 2001.
- VALMIKINATHAN, C. M. *et al.* Photocrosslinkable chitosan based hydrogels for neural tissue engineering. *Soft Matter*, v. 8, n. 6, p. 1964, 2012.
- VAN VLIERBERGHE, S. *et al.* Affinity study of novel gelatin cell carriers for fibronectin. *Macromolecular Bioscience*, v. 9, n. 11, p. 1105–1115, 2009.
- VAN VLIERBERGHE, S. *et al.* Correlation between cryogenic parameters and physico-chemical properties of porous gelatin cryogels. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, v. 20, n. 10, p. 1417–38, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19622280>>.

- VAN VLIERBERGHE, S.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: A review. *Biomacromolecules*, v. 12, n. 5, p. 1387–1408, 2011.
- VANDERHOOFT, J. L. *et al.* Rheological properties of cross-linked hyaluronan-gelatin hydrogels for tissue engineering. *Macromolecular Bioscience*, v. 9, n. 1, p. 20–28, 2009.
- WALKER, E. *et al.* Rapid visualization of nonmelanoma skin cancer. *Journal of American Dermatology*, v. 76, n. 2, p. 209–216.e9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.09.008>>.
- WAN, A. C. . A.; TAI, B. C. U. Chitin - A promising biomaterial for tissue engineering and stem cell technologies. *Biotechnology advances*, v. 31, n. 8, p. 1776–85, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080076>>.
- WANG, F. *et al.* Collagen/chitosan based two-compartment and bi-functional dermal scaffolds for skin regeneration. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, v. 52, p. 155–62, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115001952>>.
- WANG, X. H. *et al.* Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. *Biomaterials*, v. 24, n. 19, p. 3213–3220, 2003.
- WEISHARDT INTERNATIONAL –NA *et al.* *Gelatin Handbook*. 1. ed. [S.l.]: Gelatin Manufacturers Institute of America, 2012. Disponível em: <http://www.gelatin-gmia.com/images/GMIA_Gelatin_Manual_2012.pdf>.
- WEN, P. *et al.* Fabrication of Chitosan Scaffolds with Tunable Porous Orientation Structure for Tissue Engineering. *Journal of biomaterials science. Polymer edition*, v. 22, n. September 2014, p. 37–41, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20557692>>.
- WILLIAMS, C. G. *et al.* Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials*, v. 26, n. 11, p. 1211–1218, 2005.
- WU, M.-Y. *et al.* Chitosan/Alginate Multilayer Scaffold Encapsulating Bone Marrow Stromal Cells In Situ on Titanium. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 24, n. 4, p. 301–315, 2009. Disponível em: <<http://jbc.sagepub.com/cgi/content/abstract/24/4/301>>.
- WU, X. *et al.* Preparation of aligned porous gelatin scaffolds by unidirectional freeze-drying method. *Acta Biomaterialia*, v. 6, n. 3, p. 1167–1177, 2010.
- YAN, S. *et al.* Novel Physically Crosslinked Hydrogels of Carboxymethyl Chitosan and Cellulose Ethers: Structure and Controlled Drug Release Behavior. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 119, p. 2350–2358, 2011.
- YANG, B. *et al.* Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold. *Carbohydrate Polymers*, v. 80, n. 3, p. 860–865, 2010.
- YANG, C. *et al.* A green fabrication approach of gelatin/CM-chitosan hybrid hydrogel

for wound healing. *Carbohydrate Polymers*, v. 82, n. 4, p. 1297–1305, 2010.

YANG, J. A. *et al.* In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Progress in Polymer Science*, v. 39, n. 12, p. 1973–1986, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.07.006>>.

YI, H. *et al.* Biofabrication with chitosan. *Biomacromolecules*, v. 6, n. 6, p. 2881–2894, 2005.

YIN, Y. J. *et al.* Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin. *Polymer International*, v. 433, n. November 1998, p. 429–432, 1999.

YU, L. M. Y.; KAZAZIAN, K.; SHOICHET, M. S. Peptide surface modification of methacrylamide chitosan for neural tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 82, n. 4, p. 243–255, 2007.

YUAN, Y. *et al.* The interaction of Schwann cells with chitosan membranes and fibers in vitro. *Biomaterials*, v. 25, n. 18, p. 4273–4278, 2004.

ZHANG, T. *et al.* Three-dimensional Gelatin and Gelatin/Hyaluronan Hydrogel Structures for Traumatic Brain Injury. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 22, n. 1, p. 19–29, 2007. Disponível em: <<http://jbc.sagepub.com/content/22/1/19>>.

ZHANG, X. *et al.* Chemical Cross-Linking Gelatin with Natural Phenolic Compounds as Studied by High-Resolution NMR Spectroscopy. *Biomacromolecules*, v. 11, p. 1125–1132, 2010.

ZHAO, F. *et al.* Preparation and histological evaluation of biomimetic three-dimensional hydroxyapatite/chitosan-gelatin network composite scaffolds. *Biomaterials*, v. 23, n. 15, p. 3227–3234, 2002.

ZHAO, L. *et al.* Radiation synthesis and characteristic of the hydrogels based on carboxymethylated chitin derivatives. *Carbohydrate Polymers*, v. 51, n. 2, p. 169–175, 2003.

ZHU, C. *et al.* Initial investigation of novel human-like collagen/chitosan scaffold for vascular tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 89, n. 3, p. 829–840, 2009.

ZHU, X. *et al.* Effect of argon-plasma treatment on proliferation of human-skin-derived fibroblast on chitosan membrane in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 73, n. 3, p. 264–274, 2005.

ZHU, Y. *et al.* Surface modification of polycaprolactone membrane via aminolysis and biomacromolecule immobilization for promoting cytocompatibility of human endothelial cells. *Biomacromolecules*, v. 3, n. 6, p. 1312–1319, 2002.