

Universidade Federal de Minas Gerais
Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Tese de Doutorado

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

Autora: Viviane Mota Bispo

Orientador: Prof. Herman Sander Mansur
Dezembro /2009

Universidade Federal de Minas Gerais

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Curso de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas

Viviane Mota Bispo

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

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

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

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG

2009

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

Agradecimentos

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

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

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

Aos meus irmãos pela amizade.

À meus amigos que fizeram minha vida repleta de contentamento.

A Alexandra Mansur por colaborar nessas pesquisas.

SUMÁRIO

	Lista de Figuras	Vii
	Lista de Tabelas	Xii
	Lista de Notações	Xiii
	Lista de Figuras	Xvi
	Lista de Tabelas	Vii
1	Introdução	1
2	Objetivo	5
2.1	Objetivo Principal	5
2.2	Objetivos Específicos	5
3	Revisão Bibliográfica	7
3.1	Biopolímeros para Aplicações Biomédicas	7
3.1.1	Quitosana	11
3.1.2	Poli(Álcool Vinílico)	14
3.2.	Blendas	15
3.3	Modificação de Biopolímeros ou Blendas	18
3.3.1	Formação da Estrutura Reticulada	18
3.3.2	Hidrogéis	20
3.3.3.	Agente Reticulante Natural: Genipin	21
3.4	Aplicações de Biopolímeros	24
3.4.1	Suporte para Crescimento de Tecidos	24
3.4.2	Requisitos e Características Gerais	26
3.4.3	Filmes para Pele Artificial e suas Características	29
3.5	Estrutura do Tegumento (Pele)	32
3.5.1	Epiderme	32
3.5.2	Derme	35
3.5.3	Tecido Subcutâneo	35
3.6	A Cicatrização	36
4	Procedimento Experimental	39
4.1	Etapas de Desenvolvimento do Trabalho	39
4.2	Matérias Primas	40

4.21	Caracterização das Matérias Primas	40
4.3	Preparação dos Filmes de Hidrogel por Evaporação de Solvente	41
4.3.1	Caracterização dos Filmes de Hidrogel	43
4.3.1.1	Caracterização Qualitativa	43
4.3.1.2	Comportamento Mecânico	43
4.3.1.3	Grau de Intumescimento	43
4.3.1.4	Ângulo de Contato	45
4.3.1.5	Viabilidade de Células Vero <i>In Vitro</i> por Mtt	46
4.3.1.6	Adesão de Células Vero	47
5	Resultados e Discussão	48
5.1	Caracterização das Matérias-Primas: Quitosana e PVA	48
5.1.1	Espectroscopia na Região do Infravermelho	48
5.2	Caracterização dos Filmes de Hidrogel	56
5.2.1	Avaliação Qualitativa	56
5.2.2	Caracterização dos Filmes Espectroscopia na Região do Infravermelho	61
5.2.3	Grau de Intumescimento	69
5.2.4	Teste Mecânico	76
5.2.5	Determinação do Ângulo de Contato	82
5.5	Quitosana / PVA Citocompatibilidade Ensaio com Culturas de Células Vero	83
5.6	Quitosana / PVA Biocompatibilidade através Ensaio de Adesão Celular e Espalhamento	86
6	Conclusão	97
7	Contribuições Originais ao Conhecimento	98
8	Trabalhos Futuros	99
9	Referências	100

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1	Planta gardênia (a) Flor da gardênia (b) Folhas da gardênia (c) Fruta da gardênia (d) Fruta da gardênia no estágio inicial (e) Flores da gardênia	26
FIGURA 3.2	Fórmula estrutural do genipin.	27
FIGURA 3.3	Lesões revestidas para cicatrização e lesões abertas	37
FIGURA 3.4	Estrutura do tegumento (pele).	40
FIGURA 3.5	Estrutura da pele e o tecido subcutâneo	42
FIGURA 4.1.	Fluxograma das etapas do trabalho	46
FIGURA 5.1	Fórmulas estruturais de (a) quitosana, (b)genipin e (c) PVA.	55
FIGURA 5.2	Espectro de FTIR de quitosana com grau de desacetilação calculado em 80%.	57
FIGURA 5.3	Espectro de FTIR de PVA com grau de hidrólise de 80%.	59
FIGURA 5.4	Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (a) PVA (1:0:0); (b) quitosana (0:1:0); (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0.5); (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1); (e) PVA/Qui/Ge (1:1:0.5;) e (f) PVA/qui/Ge (1:1:1) fundo branco.	61
FIGURA 5.5	Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (g) PVA (3:1:0); (h) quiitosana (3:1:0,5); (i) PVA/Qui/Ge (3:1:1) fundo branco.	62
FIGURA 5.6	Intermediários formados na reação de genipin com grupamentos amina	64

- FIGURA 5.7** Intensidade das bandas dos filmes de quitosana; (a) filme de quitosana sem reticulante, (b) filme 0.5% de genipin com quitosana e (c) filme 1% de genipin com quitosana. 67
- FIGURA 5.8** Intensidade das bandas das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes. 68
- FIGURA 5.9** Intensidade das bandas das aminas formadas pela reação de genipin com quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes. 68
- FIGURA 5.10** Reações de grupos aminas de polímeros como quitosana com genipin. 69
- FIGURA 5.11** Blendas de quitosana e PVA sem reticulação PVA/Qui/Ge 70
- FIGURA 5.12.** Blendas de quitosana e PVA com reticulação PVA/Qui/Ge. 71
- FIGURA 5.13** Intensidade das bandas das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$). 72
- FIGURA 5.14** Intensidade das bandas das aminas formadas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana. 73
- FIGURA 5.15** Intensidade das bandas de acetato formadas pela reação hidrolítica entre PVA e o meio ácido da solução de genipin nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm^{-1} ($\delta\text{ CH}_2$). 73
- FIGURA 5.16** Blendas PVA / Qui / Ge a) 1:0:0 b) 1:0:0.5 c) 1:0:1 . 74

FIGURA 5.17	Grau de intumescimento de quitosana sem reticulante	75
FIGURA 5.18	Efeito do teor de quitosana nas blendas sem reticulação	78
FIGURE 5.19	Efeito do grau de intumescimento de blendas de PVA /Quit (3:1) sem reticulante	81
FIGURA 5.20	Efeito da taxa de intumescimento de blendas de PVA /Quit (3:1)	81
FIGURA 5.21	Tensão x deformação dos filmes	83
FIGURA 5.22	A influência da concentração de quitosana na tensão máxima dos filmes	84
FIGURA 5.23	Gráfico da influência da concentração do reticulante na tensão máxima de tração dos filmes PVA/Qui/Ge (0:1:0) com 0% genipin (a) e PVA/Qui/Ge (0:1:1) com 1% de genipin (b).	85
FIGURA 5.24	A formação de aglomerados nos filmes de quitosana e PVA.	89
FIGURA 5.25	Ângulo de contato em relação ao teor de quitosana nos filmes.	90
FIGURA 5.26	Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) (0:1:0); (b) (1:0:0) (1:3:0,5); (c) (1:1:0), (d) (1:3:0),(e) (3:1:0)	92
FIGURA 5.27	Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) Ge (a) (0:1:1); (b) (1:0:1) (1:3:1); (c) (1:1:1), (d) (1:3:1),(e) (3:1:1)	92
FIGURA 5.28	Registro por MET de MTT do filme de quitosana (a) (0:1:0) sem genipin (b) (0:1:1) com genipin(100x).	94
FIGURA 5.29	Registro por MET de MTT do filme de PVA (a) (1:0:0) sem genipin (b) (1:0:1) com genipin 100x	94
FIGURA 5.30	Registro por MET de MTT do filme de PVA (a) (1:1:0) sem genipin (b) (1:1:1) com genipin 100x.	95

- FIGURA 5.31** Viabilidade e disseminação de células do ensaio de 97
biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada
por células VERO semeado em matrizes de quitosana reticuladas
sem genipin(a) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 250x; (b)
PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 400x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0)
aumento de 800x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 1500x
- FIGURA 5.32** Viabilidade e disseminação de células do ensaio de 98
biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada
por células VERO semeado em matrizes de quitosana reticuladas
com genipin (a) PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 150x; (b)
PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 500x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:1)
aumento de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1) aumento de 2000x.
- FIGURA 5.33** Viabilidade e de disseminação de células VERO do ensaio de 99
biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada
por células VERO semeado em matrizes de PVA/Qui/Ge sem
genipin(a) (1:3:0) aumento de 300x; (b) PVA/Qui/Ge
(1:3:0) aumento de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (1:3:0) aumento de
2000x.
- FIGURA 5.34** Viabilidade e de disseminação de células VERO do ensaio de 100
biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada
por células VERO semeado em matrizes de PVA/Qui/Ge com
genipin(a) (1:3:0) aumento de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:1)
aumento de 500x (c) PVA/Qui/Ge (1:3:1) aumento de 1500x e (d)
PVA/Qui/Ge (1:3:1) aumento de 2000x.
- FIGURA 5.35** Viabilidade e de disseminação de células VERO do ensaio de 101
biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada
por células VERO semeado em matrizes de PVA/Qui/Ge sem
genipin (a) (3:1:0) aumento de 100x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:0)
aumento de 800x (c) PVA/Qui/Ge (3:1:0) aumento de 1000x e (d)
PVA/Qui/Ge (3:1:0) aumento de 2500x.

FIGURA 5.36 Viabilidade e de disseminação de células VERO do ensaio de 102
biocompatibilidade para a viabilidade das células foi realizada
por células VERO semeado em matrizes de PVA/Qui/Ge (a) 1%
Genipin (3:1:1) aumento de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:1)
aumento de 500x (c) PVA/Qui/Ge (3:1:1) aumento de 1500x e (d)
PVA/Qui/Ge (3:1:1) aumento de 2500x.

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1	Grupos característicos no infravermelho para a quitosana	15
TABELA 3.2	Grupos característicos no infravermelho do PVA	18
TABELA 3.2	Grupos característicos do genipin por FTIR	29
TABELA 4.1	Filmes produzidos	49
TABELA 4.2	Concentração iônica das soluções de PBS, SBF, Plasma Sanguíneo e TRIS	51
TABELA 5.1	Os principais grupos funcionais envolvidos nas transições vibracionais no infravermelho da quitosana encontradas no espectro da Figura 5.2.	58
TABELA 5.2	Com as principais grupos funcionais do PVA representados no espectro da Figura 5.3.	59
TABELA 5.3	Avaliação visual das blendas	53
TABELA 5.4	Tensão máxima (MPa) e desvio padrão(dp)	88
TABELA 5.5	Deformação total (elástica e plástica) (%) e desvio padrão	88
TABELA 5.6	Módulo de elasticidade e desvio padrão	88

LISTA DE NOTAÇÕES

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

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

t	Tempo
UV	Ultravioleta
X	Proporção de PVA na blenda
Y	Proporção de quitosana na blenda
Z	Proporção de genipin em relação a massa total de polímero
α	Absorção
θ	Ângulo de contato
μm	Micrometro
σ	Tensão de tração
V	Volume
VERO	Linhagem celular oriunda de rim de macaco verde africano

RESUMO

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

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

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

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

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

A finalidade de alguns biomateriais é o de crescimento de tecidos e a ocorrência do desenvolvimento deste se deve tanto às características genéticas das células quanto do material de suporte onde ocorre seu desenvolvimento. Para que o suporte tenha aplicação prática alguns requisitos devem ser levados em consideração como permeabilidade a água, afinidade a proteínas, biodegradabilidade, disponibilidade de grupos funcionais reativos para reações diretas com tecido vivo e para modificações químicas, hidrofília, capacidade de promover o desenvolvimento tissular e facilidade no preparo (Bispo, 2004; Buckley, 2004; Souza, 2008).

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

fator influenciará a resposta celular imediata. Para a biodegradação controlada, se torna preponderante o entendimento de fatores como a proliferação celular e a porosidade do material, visto que estes a influenciam grandemente. O progresso do crescimento de tecidos depende então de estruturas adequadas para os arranjos tridimensionais das células, requerendo, portanto, a síntese de materiais apropriados. A estrutura define formas para o tecido em crescimento e até guia a sua formação (Lenza, 2002; Silva, 2006).

Suportes para crescimento de tecidos têm sido produzidos de vários materiais. A escolha de um ou mais polímeros como componente de um biomaterial é importante levando em consideração as propriedades finais requeridas. Muitas pesquisas foram desenvolvidas com polímeros sintéticos, especialmente sobre o poli (álcool vinílico) (PVA). O hidrogel de PVA possui excelente transparência, consistência macia quando na forma de uma membrana, e é biocompatível e biologicamente inerte. O PVA é um polímero obtido por polimerização do acetato de vinila, seguido pela reação de hidrólise do acetato de vinila (PVAc) em Poli (álcool vinílico - co-acetato de vinila) (PVA). A relação existente entre o percentual de hidroxilas no copolímero final, após a reação de hidrólise, e o número total de acetato é o grau de hidrólise (DH) do PVA. O grau de hidrólise é importante para caracterizar as propriedades dos polímeros que irão influenciar a citocompatibilidade. Um aumento do DH resulta também em queda da solubilidade em água e aumento da viscosidade e resistência à tração. O PVA não é mutagênico, nem citotóxico e não tem atividade carcinogênica (Sung, 1999; Berger, 2004; Isenberg, 2006; Costa, 2008).

A quitosana também tem ganhado importância como um polímero constituinte de matrizes para o desenvolvimento de tecidos. A quitosana tem sido objeto de vários estudos devido às suas diversas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, afinidade a notável a proteínas, a aceleração da recuperação de lesões, diminuição do colesterol no sangue, hemostática, além de suas características bacteriostáticas e fungicidas (Sung, 1999; Kaihara, 2000; Shen 2000; Shin, 2004; Berger, 2006; Isenberg, 2006; Li, 2009; Mao, 2009). Todas estas características tornam a quitosana adequado para uso em matrizes para engenharia de tecidos. No entanto, existem propriedades de difícil controle, tais como propriedades mecânicas. Sua resistência mecânica e sua maleabilidade são limitadas

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

As pesquisas na elaboração de materiais biocompatíveis, que serão utilizados para regeneração de pele, são importantes para o tratamento de pacientes no mundo todo. Como o maior órgão do corpo, a pele é exposta a agentes químicos, físicos e biológicos de diversos tipos (Craecker *et al.*, 2008). O trauma à pele pode ser causado por agentes químicos, físicos, energia térmica, elétrica, nuclear entre outras. Doenças como diabetes que diminuem a circulação e também causam sérias lesões do tegumento. Cerca de 2,6 milhões de pacientes, anualmente, são acometidos por lesões da pele com difícil cicatrização somente nos Estados Unidos. Cerca de 1,5 milhões de lesões são relacionadas a queimaduras (Sung, 1999; Kaihara, 2000; Shen 2000; Seal, 2001; Shin, 2004; Berger, 2006; Isenberg, 2006; Costa, 2008; Li, 2009; Mao, 2009).

Estima-se que no Brasil em 2001 aconteceram cerca de 1.000.000 acidentes por queimadura (Seal, 2001). Para grandes queimaduras o transplante de pele é indicado. O procedimento de retirada e o processamento de pele, para transplante, são técnicas utilizadas pela rede pública de saúde já na atualidade. Além de diminuir o sofrimento dos

pacientes, é uma terapia que pode aumentar a sobrevida. Estes tratamentos ganham maior importância pelo fato de as queimaduras extensas serem muito prevalentes em crianças (Seal, 2001; Costa, 2008; Ministério da Saúde, 2009).

A evolução dos tratamentos médicos depende do desenvolvimento dos biomateriais. Polímeros como quitosana e PVA, por apresentarem várias propriedades apropriadas para a produção de suporte de desenvolvimento de tecido epitelial, vêm sendo modificados e pesquisados. O controle das propriedades dessas blendas pode ser conseguido por alterações nas concentrações dos polímeros e por reticulação com agentes como genipin. O genipin é alvo de várias pesquisas como agente de reticulação para biomateriais. Sendo um reticulante natural e de baixa citotoxicidade, pode ser utilizado para integrar produtos que modulem o crescimento tecidual. Para o tratamento de lesões cutâneas, como queimaduras ou diabetes que exigem um número elevado de intervenções, o suporte contribuiria para aumento da qualidade de vida do paciente, diminuindo o período de internação e diminuindo o custo global da terapia (Sung *et al.*, 1998; Sung, 2001; Butler, 2003; Jin *et al.*, 2004, Onuki *et al.*, 2008).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

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

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

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

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

CAPÍTULO 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOPOLÍMEROS PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

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

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

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

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

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

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

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

mediadores celulares seriam incorporados nos polímeros e depois liberados durante a implantação (Mikos e Langer, 1996; Carvalho *et al.*, 2001; Ayres, 2002; Nuttelman *et al.*, 2002; Miles *et al.*, 2003; Jang *et al.*, 2005; Chan *et al.*, 2009; Darea, 2009).

A escolha de um determinado polímero biodegradável deve levar em conta o tipo de degradação ao qual o mesmo é mais susceptível. No meio biológico, os meios de degradação mais comuns são a hidrólise e a degradação enzimática. A degradação por enzimas pode ser altamente variável de pessoa para pessoa, pois os níveis enzimáticos podem diferir bastante. Na escolha de um determinado polímero, o mecanismo degradativo de escolha deveria ser preferencialmente a hidrólise, já que todos os indivíduos possuem água em excesso no organismo (Langer, 1995). A degradação pode ser vista como um conjunto de processos, estimulados por agentes externos, que levam a modificações da estrutura dos polímeros, as quais trarão alterações também nas propriedades do material. Caso a degradação não seja controlada e não prevista, esses processos podem causar comprometimentos no desempenho do biomaterial (Langer, 1995, Ratner, 2005, Chan *et al.*, 2009):

1. Aumento da duração dos processos inflamatórios
2. Alteração dimensional dos dispositivos
3. Redução das propriedades mecânicas
4. Produção de produtos de massa molar tóxicos e móveis, etc.

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

degradação pode ser originada por causas físicas (térmica, mecânica, fotoquímica ou radiação) ou por causas químicas (oxidação, hidrólise ou ozonólise) (Langer, 1995, Ratner *et al.*, 2005; Jalili *et al.*, 2009).

Desse modo, polímeros biodegradáveis são aqueles que apresentam uma redução da massa molar quando em contato com o ambiente corpóreo. As degradações podem ser originadas tanto da atuação de entidades biológicas como células, microorganismos, enzimas, como do ataque de espécies iônicas, radicais livres ou água. Polímeros biodegradáveis apresentam interesse cada vez maior, visto que não precisam ser removidos e não causam indesejáveis efeitos em longo prazo. Existem várias aplicações para estes tipos de biopolímeros: suturas, dispositivos para liberação de fármacos, fixação de dispositivos ortopédicos, vasos sanguíneos temporários e matriz para engenharia de tecidos. Eles devem ser um meio adequado para o crescimento dos tecidos, guiando a resposta tissular, favorecendo a fixação e proliferação celular e controlando a resposta inflamatória e imunológica (Mikos *et al.*, 1993; Anseth *et al.*, 2002; Boccafoschi, 2005; Jalili *et al.*, 2009, Darea, 2009).

Existem pesquisas que estudam os polímeros naturais derivados de proteínas e vegetais, que são processados, e usados em aplicações biomédicas. Apesar de haver também inúmeros estudos com polímeros sintéticos, os polímeros naturais tem ganhado grande destaque em pesquisas recentes. O colágeno, por exemplo, depois de purificado é usado em implantes cardiovasculares e como matriz para crescimento de tecidos. A celulose modificada é utilizada na imobilização e desenvolvimento de células e a quitosana também vem sendo utilizada para matrizes de engenharia de tecido. Isto se dá porque muitos destes polímeros naturais tem conseguido aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) nos Estados Unidos (Anseth *et al.*, 2002; Oliveira, 2002; Boccafoschi, 2005; Jalili *et al.*, 2009; Darea, 2009).

Várias pesquisas utilizam também polímeros sintéticos para fabricar biomateriais. Como a produção de espumas de poliuretano. As espumas de poliuretano são altamente porosas, biodegradáveis, são suporte para a infiltração celular e formação de tecido novo, degrada a produtos não-citotóxico, e provocam inflamação mínima. São elastoméricos e podem

promover o contato profundo com os limites da ferida. Existem no mercado, filmes de poliuretano na espessura de 0,2 mm, semipermeável, flexível, com fácil adaptação aos contornos do corpo. Entretanto só podem ser utilizados em ferimentos superficiais (Lee *et al.*, 2001; Hafeman, 2008).

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

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

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

3.1.1 QUITOSANA

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

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

obtenção de quitosana de massa molar elevada. A prática industrial mais comum, e que também é bastante empregada em laboratórios de pesquisa, é aquela na qual a desacetilação da quitina é realizada em suspensão de solução aquosa de hidróxido de sódio, sendo que a concentração dessa solução, o excesso de álcali, o tempo e a temperatura da reação são variáveis, conforme o procedimento adotado. Entretanto, é reconhecido que os principais fatores que afetam a eficiência da desacetilação e as características das quitosanas obtidas são (Campana e Signini, 2001):

1. Temperatura e tempo de reação;
2. Concentração da solução de álcali e adição de diluente (alcoóis de cadeia curta e cetonas são empregados);
3. Razão quitina/álcali;
4. Tamanho das partículas de quitina;
5. Atmosfera da reação e presença de agentes que evitem a despolimerização.

Na preparação de soluções de quitosana deve-se observar não somente o grau médio de desacetilação, mas também a distribuição dos grupos acetil, além da massa molar. A análise da protonação da quitosana na presença de ácidos e seus efeitos sobre a solubilidade mostraram que o grau de ionização depende do pH e do pK do ácido. A solubilização em HCl da quitosana com alto grau de desacetilação e grau de ionização médio em torno de 0,5 corresponde a um pH entre 4,5 e 5 (Rinaudo, 1998).

Devido às suas propriedades, quitosana vem sendo utilizada em medicina. A quitosana permite o sangue coagular rapidamente, e ganhou aprovação recentemente nos EUA para uso em bandagens e outros agentes hemostáticos. Quitosana purificada do exoesqueleto de camarão é usada em um produto hemostático feito por *Medtrade Biopolymers Inc.* O produto reduz perda de sangue em comparação à gaze e aumenta a sobrevivência do

paciente. Foram vendidos estes produtos ao Exército dos Estados Unidos que já usaram as bandagens. Quitosana é hipoalergênico, e tem propriedades antibacterianas naturais. Entre as aplicações, vem sendo utilizada também para membranas de hemodiálise. (Marconi *et al.*, 1996; Rinaudo, 1998; Sohn *et al.*, 2009).

A utilização como suporte de imobilização de enzima é produzido à base de quitina e quitosana na forma de pós, flocos e géis de diferentes configurações geométricas. Os pós de quitina/quitosana e flocos estão disponíveis como produtos comerciais da Sigma-Aldrich, Fluka, Polymar entre outros e quitosana em pastilha gel (quitopérolas) da Fuji Spinning Co. Ltd. (Tóquio, Japão). Géis de quitosana são fáceis de fabricar pelo fato que a quitosana dissolve prontamente em soluções diluídas na maioria dos ácidos orgânicos, incluindo fórmico, acético, tartárico e ácidos cítricos, para formar soluções viscosas que se precipitam com o aumento do pH e pela formação de complexos ionotrópicos insolúveis em água com polieletrólitos aniônicos. Deste modo, podem ser fabricados géis de quitosana na forma de membranas, matrizes, cápsulas, fibras e esponjas (Marconi *et al.*, 1996; Campana e Signini, 2001).

Algumas pesquisas tentaram melhorar as propriedades mecânicas de quitosana. A modificação de propriedade mecânicas de quitosana pode ocorrer através da formação da ligação cruzada. A ligação cruzada ou reticulação pode melhorar as propriedades físicas de polímeros. A mistura de quitosana e óxido de polietileno $(C_2H_4O)_n$, por exemplo, podem melhorar as propriedades mecânicas também (Campana e Signini, 2001).

Estudos procuraram caracterizar os grupamentos químicos da quitosana. As vibrações correspondentes aos grupos químicos principais para quitosana, encontradas na literatura, pelo método de espectroscopia de infravermelho são listadas na tabela 5.1.

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

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

3.1.2. POLI (ÁLCOOL VINÍLICO)

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

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

O PVA tem sido amplamente usado em fibras, adesivos, emulsificantes, em aplicações na indústria têxtil e de papel, como protetor de colóide (Okaya, 1999), na obtenção de membranas anfífilas para imobilização de enzimas (Liu *et al.*, 1995) e na obtenção do poli (vinil butiral) (Marten, 1985). Em estudos recentes, o PVA tem sido utilizado como carreador de medicamento, devido às suas propriedades de degradabilidade e não toxicidade (Batyrbekov, 1998). Algumas aplicações visam alterar a permeabilidade a gases (Marten, 1985), a biocompatibilidade, a permeabilidade e a biodegradabilidade (Liu *et al.*, 1995; Okaya, 1999; Isenberg, 2006).

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

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

hidrólise, do grau de polimerização e da temperatura da solução (Finch, 1973; Liu *et al.*, 1995; Isenberg, 2006).

Além disso, o efeito da temperatura na solubilidade está associado à quebra das ligações de hidrogênio intra e intermoleculares. Com o aumento da temperatura, as ligações de hidrogênio são rompidas diminuindo as forças intra- e intermoleculares e, com isso, a solubilidade aumenta. Por outro lado, o aumento da temperatura pode quebrar também as ligações de hidrogênio com a água diminuindo a solubilidade (Liu *et al.*, 1995, Oliveira, 2003).

Analisando o PVA 98% hidrolisado, a solubilidade aumenta com a diminuição do grau de polimerização. Para o PVA parcialmente hidrolisado (88%), a solubilidade é relativamente independente do grau de polimerização. Para o PVA 80% hidrolisado, a solubilidade a baixa temperatura é muito maior que para o 88% hidrolisado, mas decresce rapidamente a partir de 30°C (Liu *et al.*, 1995; Okaya, 1999; Isenberg, 2006).

A hidrólise reduz os grupamentos acetato nos polímeros. Estes grupos acetato e hidroxila existentes no PVA são relacionados a bandas características e podem ser verificados por espectroscopia de infravermelho. As vibrações correspondentes aos grupos químicos principais para PVA foram descritas na literatura e são listadas na tabela 3.2 (Aranha, 2001; Mansur, 2007; Costa 2008):

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

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

3.2. BLENDA

As blendas são uma classe especial de materiais. Em sentido amplo, são definidos como materiais constituídos por fases macroscópicas diferenciáveis e com propriedades mecânicas iguais ou melhores que as de cada componente considerado isoladamente, obtidos por mistura física. A mistura pode resultar em um produto homogêneo de uma só fase ou heterogênea de duas ou mais fases. Uma vantagem da utilização destes materiais é que eles podem ser quimicamente modificados de modo a permitirem controle do padrão de degradação, de intumescimento, modulação de propriedades mecânicas, hidroflicidade. A mistura de polímeros também fornece maior capacidade de deformação, muitas vezes necessária para aplicação em tecidos humanos (Costa, 2008).

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

Quitosana e poli vinil pirrolidona (PVP) foram utilizados para preparar redes semi-interpenetrantes das blendas. Os hidrogéis foram reticuladas usando genipin. Propriedades de intumescimento (expansão) destes hidrogéis foram estudadas nos meios de diferentes concentrações hidrogenionicas e temperaturas. O comportamento de intumescimento dos hidrogéis foi dependente da temperatura e do pH. O conteúdo total de água nos hidrogéis aumenta com aumento do teor de PVP. Este parâmetro estudado é importante para a modulação de comportamento de biomateriais. De modo geral, os resultados obtidos dos materiais sugerem que possuem potencialidade para várias aplicações: como biomaterial, por exemplo, matrizes poliméricas para liberação controlada de fármacos, curativos para ferimentos mais leves, outros (Brant, 2008).

Blendas de quitina e quitosana foram produzidas por Kuo e Lin (2006) em várias porcentagens de agente reticulante (genipin) sob diferentes temperaturas e secas

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

Rodas (2004) avaliou a mistura de três polímeros, poli (álcool vinílico) e poli (vinilpirrolidona) com a quitosana para a obtenção de produtos demo-epidérmicos reticulados por radiação gama ou glutaraldeído. A porção epidérmica formada por queratinócitos cultivados *in vitro* que melhor interagiram com as células foram aquelas preparadas com quitosana e reticuladas com GA, porém não apresentaram boas características mecânicas à manipulação (Rodas, 2004).

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

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

A fim de conseguir boas propriedades mecânicas, biocompatibilidade e desenvolvimento das células, Kong e colaboradores produziram uma matriz com multicamadas imitando a estrutura do osso. Uma matriz composta de quitosana e hidroxiapatita porosa foi feita, com

uma camada de quitosana compacta. Comparado com a matriz porosa uniforme a matriz com multicamada de mesmo tamanho tem um aumento na força mecânica e maior tamanho de poro no centro. E mais células são observadas crescendo no centro da matriz em multicamadas que em uma matriz uniforme porosa sobre as mesmas condições. Finalmente, as matrizes foram implantadas em um defeito de fíbula de coelho a avaliar a osteocondutividade da matriz. Em 12 semanas após a operação houve a formação de vasos sanguíneos e de tecido ósseo (Kong *et al.*, 2007).

3.3 MODIFICAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS OU BLENDS

3.3.1 FORMAÇÃO DA ESTRUTURA RETICULADA

A polimerização na solução, a polimerização no próprio monômero, e a reação do polímero com agentes reticulantes são geralmente as formas utilizadas para se produzir um gel. O termo vem do latim, *gelare*, que quer dizer coagular, resfriar, congelar, cristalizar. Ao longo de muitas décadas, muitos cientistas procuraram definir apropriadamente o termo, dessa forma é possível concluir que existem numerosas definições. Aplicando uma definição básica sugerida por Gehrke (2000), o gel pode ser entendido como uma estrutura macroscópica contínua, com características sólidas, exibindo inclusive resposta elástica à força aplicada sobre sua superfície. Os géis podem ser entendidos também como compostos de polímeros ligados em uma estrutura de rede por interações químicas ou físicas. Essas interações incluem forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, interações de van der Waals (não específicas ou hidrofóbicas), cristalitos insolúveis, emaranhados formados fisicamente, ligações químicas. Em geral, esses géis têm algumas regiões de ordem local embora elas não ocorram em grande extensão (Flory, 1953; Gehrke, 2000; Peppas *et al.*, 2004).

A obtenção de géis por polimerização no próprio monômero (polimerização em massa) pode ser realizada se outros reagentes, agente reticulante ou de ligação cruzada e iniciadores forem também nele solúveis. Na polimerização em solução, o monômero, o agente reticulante e os iniciadores são todos solubilizados em um solvente em comum,

formando apenas uma fase. A formação de uma estrutura reticulada, com um polímero através de utilização de agente reticulante, é feita geralmente em solução contendo um solvente em comum para os reagentes (Billmeyer, 1984; Gehrke, 2000; Peppas *et al.*, 2004; Bispo, 2004).

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

A concentração de agente reticulante por peso ou mols de polímero também é essencial para se obter uma estrutura de rede macroscopicamente uniforme e com a flexibilidade apropriada para as várias aplicações a que são destinados os hidrogéis. Outros fatores que entram na decisão para a escolha de um iniciador são a segurança, o custo, a solubilidade, a

facilidade da iniciação e o controle da reação (Oliveira, 1992; Gerhke, 2000; Oliveira, 2000; Oliveira, 2003).

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

Quando a cadeia polimérica é iniciada, ela tende a crescer independentemente. Quando a reação procede, as diferentes cadeias são conectadas umas às outras. Num dado momento da reação, compreendida como conversão crítica, há a formação da rede polimérica tridimensional. Este momento é chamado de ponto gel ou transição sol-gel. Com o decorrer da reação, as cadeias tornam-se bastante conectadas formando uma estrutura de rede, que é o que denominamos de gel. Uma quantidade substancial de monômeros não está ainda interligada à rede. Estas espécies são chamadas de sol e contrastam com a rede já sintetizada. Com o desenrolar da reação a quantidade de sol declina a medida que ele é incorporado dentro da rede. Quando a reação cessa, uma quantidade significativa de sol pode ainda permanecer na rede. A significância prática de tudo isso é que o tempo de reação irá influenciar pronunciadamente as propriedades do gel resultante (Billmeyer, 1984; Gehrke, 2000). Quando o módulo de cisalhamento e, conseqüentemente, as eficiências de formação de ligação cruzada são baixas, o grau de expansão se torna alto, para géis que tiveram a reação cessada no ponto gel, em comparação a aqueles que tiveram o prosseguimento na síntese (Gehrke, 2000). Um fato muito interessante é que os mais diversos tipos de géis apresentam uma grande similaridade entre si no ponto de gel. É verificado experimentalmente que a eficiência de reticulação se torna mais alta para soluções mais concentradas de monômeros e para grandes taxas de agente reticulante por monômero (Gehrke, 2000; Nguyen, 2009).

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

3.3.2 HIDROGÉIS

Hidrogéis são conhecidos como uma classe especial de géis poliméricos, eles possuem uma forte afinidade pela água e a maioria das soluções aquosas. Hidrogéis podem ser sintetizados via monômeros bifuncionais e com agentes reticulantes multifuncionais. Qualquer polímero pode, a princípio, ser usado para se sintetizar uma rede polimérica, isto inclui polímeros biológicos como polissacarídeos e proteínas. Polímeros lineares solúveis em água podem ser usados para produzir um gel. A ligação cruzada pode ocorrer por meio de reação química, radiação ionizante (gerando radicais livres que podem recombinar formando junções entre as cadeias de polímeros) ou através de interações físicas como emaranhados e cristalitos. Deve-se apenas observar que esses géis devem ser suficientemente hidrofílicos para absorver certa quantidade de água. A hidrofilicidade vem da inclusão na rede de grupos como hidroxila, sulfonato, carboxilato e outros grupos que interagem suficientemente bem com a água. Um hidrogel pode ser convertido também de um tipo a outro através de reações químicas em seus grupos funcionais. Desse modo, podemos obter uma infinidade de hidrogéis para todas as mais variadas características que desejarmos (Peppas e Lustig, 1986; Gehrke e Lee, 1990; Gehrke, 2000; Oliveira *et al.*, 2002; Peppas *et al.*, 2004; Nguyen, 2009).

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

3.3.3 AGENTE RETICULANTE NATURAL: GENIPIN

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

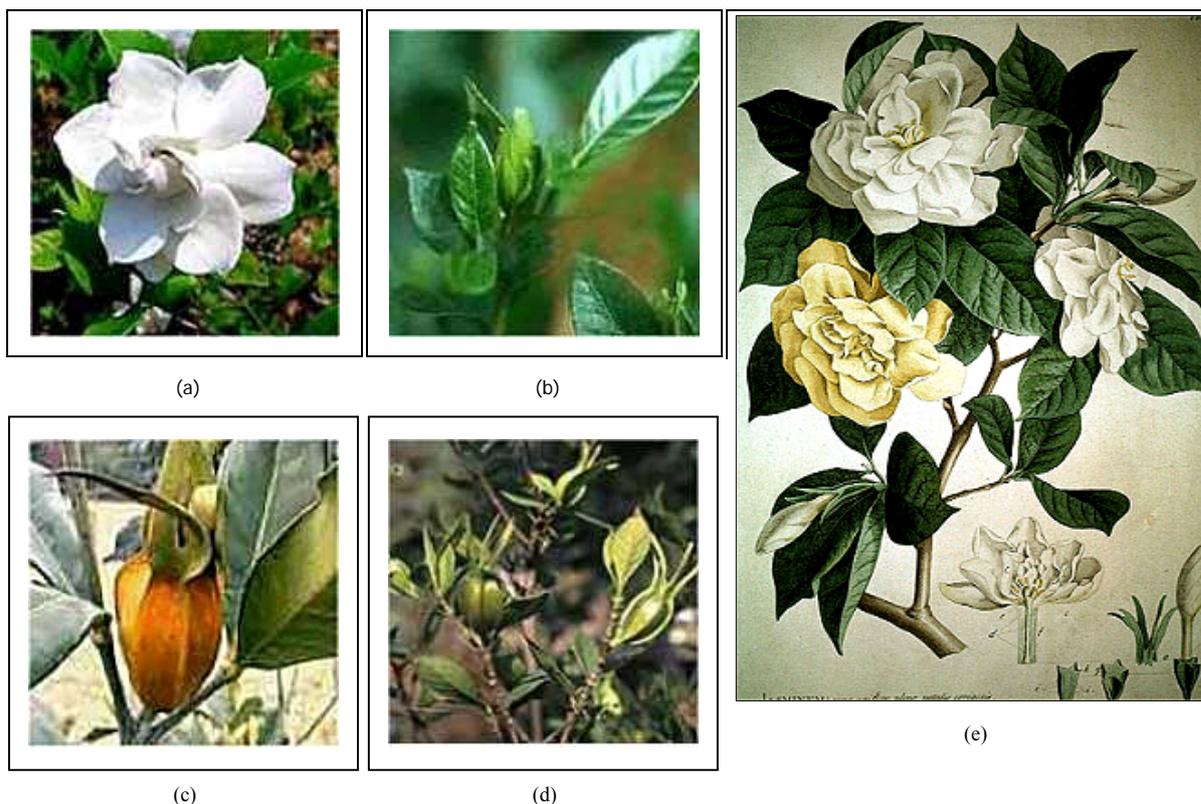


FIGURA 3.1. Planta gardênia (a) Flor da gardênia (b) Folhas da gardênia (c) Fruta da gardênia (d) Fruta da gardênia no estágio inicial (e) Flores da gardênia (Dharmananda, 2003).

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

glutaraldeído é tóxico. Sung e colaboradores verificaram que genipin como agente de reticulação do colágeno. Neste trabalho, verificou-se que o genipin era 10 000 vezes menos citotóxico que glutaraldeído, o que justifica seu uso em biomateriais (Jin *et al.*, 2004; Sung *et al.*, 1998, Sung, 2001).

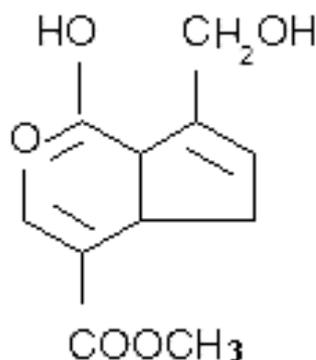


FIGURA 3.2: Fórmula estrutural do genipin.

O mecanismo de reticulação de genipin com quitosana e moléculas que contêm amins primárias não é entendido bem, até o presente momento, e ainda está sob investigação. Dois esquemas são propostos na literatura para explicar este tipo de reação. Foi observado que compostos contendo grupamentos amina, a quitosana por exemplo, num ataque nucleófilo, irá se ligar ao carbono do grupo éster do genipin. Ocorre a troca do grupo éster pelo grupo amida no fim desta reação (Butler *et al.*, 2003; Kuo e Lin, 2006).

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

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

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

Quitosana também foi utilizado no trabalho de Jin e colaboradores. No trabalho deles foram formados filmes usando quitosana pura e blendas de quitosana e polietileno. O estudo demonstrou que comparando a blenda de quitosana/PEO não reticulada, a aquela reticulada, a última apresentava propriedades mecânicas melhores. Genipin produziu redes que eram insolúveis em meio ácido e em meio alcalino, mas foram hábeis para expandir em meio aquoso. O grau de expansão dos filmes mudou ao alterar o pH e a temperatura do meio onde se encontravam (Jin *et al*, 2004).

Para um melhor entendimento da molécula de genipin e de sua reatividade com outros compostos, os principais grupos funcionais do genipin envolvidos nas transições vibracionais por espectroscopia de infravermelho foram estudados e as bandas dos grupos associados são apresentados na tabela 3.3.

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

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

3.4. APLICAÇÕES DE BIOPOLÍMEROS

3.4.1 SUPORTE PARA CRESCIMENTO DE TECIDOS

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

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

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

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

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

O material polimérico é desenvolvido de forma a suportar física e mecanicamente as células, no organismo hospedeiro. O polímero é remodelado pela degradação *in vivo*, numa razão proporcional ao crescimento celular e à solicitação mecânica. Sua função é proporcionar suporte para o crescimento celular e adicionalmente servir como substituto estrutural do tecido original até a formação do novo tecido e sua reabsorção completa (Barbanti, 2005).

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

3.4.2 REQUISITOS E CARACTERÍSTICAS GERAIS

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

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

Recentemente, a otimização das propriedades de superfície de biomateriais, como grau de pureza, rugosidade, porosidade e degradabilidade têm sido explorada para melhorar suas propriedades. Muitas alterações têm sido propostas como técnicas que inserem materiais bioativos em polímeros, levando a formação de híbridos e compósitos (Harris *et al.*, 2002).

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

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

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

Um substrato pode ser considerado ideal quando mimetiza a matriz extracelular do tecido hospedeiro de forma que ele possa agir como um guia tridimensional para promover ataque, multiplicação, migração e função por parte das células. Dentre as características importantes ressalta-se (Ratner *et al.*, 2005; Brandl *et al.*, 2007):

1. o substrato deve ser biocompatível ou bioativo;
2. deve ser biodegradado à medida que o processo de reparação ou regeneração acontece;
3. deve ser poroso e permeável para permitir uma difusão apropriada;
4. deve possuir um tamanho de poro adequado para o crescimento do tipo celular a que se destina;
5. deve possuir adequada propriedade mecânica para o meio a que se destina;
6. deve oferecer uma superfície condutiva para a aderência celular;

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

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

3.4.3 FILMES PARA PELE ARTIFICIAL E SUAS CARACTERÍSTICAS

Em artigos publicados em 1980, Yannas e Burke descreveram os princípios do seu conceito de *wound healing* ou pele artificial. A idéia era dividir o tratamento dos pacientes queimados em dois estágios. No estágio 1, o objetivo era o fechamento das feridas, eliminando o risco de infecção ou perda de líquido. Utilizavam um material à base de colágeno-glicosaminoglicano (C-GAG) para cobrir a ferida. As propriedades da matriz foram escolhidas para que a mesma se desintegrasse na medida em que as células proliferassem. No primeiro dia de aplicação do C-GAG, uma "epiderme" de *Silastic*® (materiais do grupo dos compostos de silicone) era colocada sobre a matriz, protegendo-a até que os queratinócitos e melanócitos cultivados em laboratório a partir de biópsias cutâneas do próprio paciente estivessem prontos para a semeadura (o estágio 2 do processo). Os queratinócitos são células diferenciadas do tecido epitelial e melanócitos são células que produzem melanina, substância pigmentar que envolve a célula protegendo seu núcleo dos raios solares (Bell *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1981; Nerem, 1992; Beumer, 1994).

O cultivo destas células são feitas por técnicas que foram elaboradas na década de 80 por pesquisadores da Harvard Medical School chefiados pelo Dr. Howard Green. A técnica de Green consiste em semear queratinócitos humanos em uma camada de fibroblastos derivados de rato, deixando o restante do trabalho por conta do próprio corpo. É possível que a técnica funcione por imitar o que ocorre na pele verdadeira, cuja camada mais inferior (a derme) é composta predominantemente de fibroblastos (cuja principal função é produzir o colágeno e a elastina que dão sustentação à pele). Para assegurar que apenas os queratinócitos cresceriam na malha, Green irradiou os fibroblastos, interrompendo seu processo de divisão. O produto resultante de todo o processo, batizado de *Epicef*™, atualmente encontra-se licenciado para tratamento de queimaduras e úlceras vasculares e de estase. A estase vascular acontece quando o fluxo sanguíneo vem a diminuir, podendo haver eventual e completa estagnação (Bell *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1981; Nerem, 1992; Beumer, 1994; Dallan, 2005).

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

Uma composição muito utilizada desta pele é composta por uma camada de colágeno em forma de gel misturada com células de tecidos. Esta primeira camada constituída de colágeno protege a segunda contendo células. Outro método emprega polímeros sintéticos, moldados e posicionados em áreas onde há falta de tecido. Neste caso, células adjacentes invadem os polímeros, que se degradam e são absorvidos. Estes polímeros ou materiais biodegradáveis também podem ser misturados a células cultivadas em laboratório (Bell *et al.*, 1981; Burke *et al.*, 1981; Beumer, 1994). As características relevantes em da pele artificial, é que devem ser isentos de produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material deve ser não-tóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico (Hondurilla, 2002, Dallan, 2005).

A pele artificial atual avançou no sentido que se procura recriar a derme e a epiderme, mas não leva em conta a regeneração da intrincada estrutura e funções de folículo capilar e glândulas sudoríparas e sebáceas, sensores mecânicos e térmicos. A pele é um órgão com funções e propriedades complexas, assim na elaboração de pele artificial é preciso um estudo físico-químico para a produção de material que possua características semelhantes aos tecidos vivos e para a compreensão de seu funcionamento e interação quando em contato com o corpo (Costa, 2008; Harris, 2009).

O corpo tem a capacidade de regenerar a epiderme desde que a derme permaneça intacta. Porém, vítimas severamente queimadas e pacientes que sofrem com úlceras diabéticas, freqüentemente têm uma derme lesionada. Atuais soluções envolvem enxertos de pele. Mas existe o risco de contaminação e de rejeição do tecido. De forma ideal, os materiais de enxertos devem aderir ao sitio ferido, ser poroso o suficiente para conduzir a difusão de excreções (rejeitos), nutrientes, prevenir a desidratação, deve ser barato, flexível, de fácil

manuseio. O material deve permitir a migração celular e ter propriedades mecânicas semelhantes às da pele original, promover uma regeneração dérmica e epidérmica, para prevenir infecção bacteriana. Estes parâmetros propõem um enorme desafio a qualquer tipo de material (Sheridan, 1999; Seal, 2001).

Choi e colaboradores (2001), por exemplo, prepararam uma matriz composta de gelatina e hialuronato de sódio (HA). Devido a sua forma estável, a matriz é mais capaz de resistir a mudanças que ocorrem durante o processo de cicatrização. Os resultados foram promissores e mostraram o aumento de cura das lesões (Choi *et al.*, 2001).

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

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

Embora pareça o contrário, mantendo um curativo no local por vários dias o processo de cura ocorrerá mais cedo, porque a lesão é deixada intacta. Isto é importante porque proporciona um ambiente úmido, bem como mantém à temperatura do corpo, as condições necessárias para promover a cicatrização. As freqüentes mudanças de curativos esfriarão a temperatura de uma úlcera por exposição ao ar. Isso retarda o processo de cicatrização até que o corpo pode re-aquecer a área. Assim, curativos trocados com menor freqüência ajudam no processo de cicatrização. A figura 3.4 mostra lesão revestida e sem revestimento (Mandelbaum *et al.*, 2003).

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

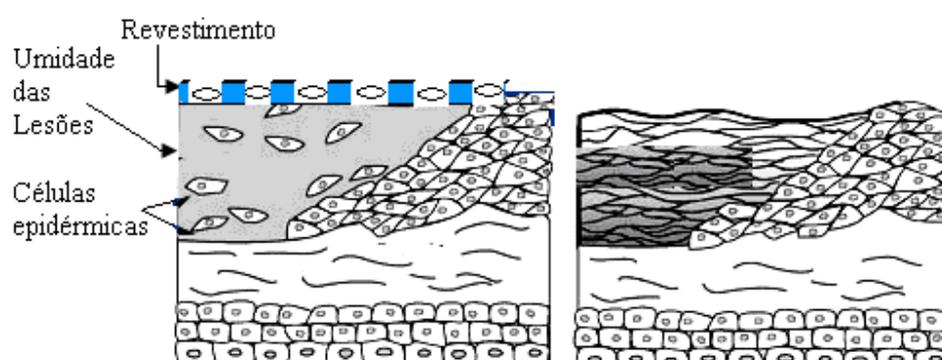


FIGURA 3.3. Lesões revestidas para cicatrização e lesões abertas.

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

3.5. ESTRUTURA DO TEGUMENTO (PELE)

O tegumento humano, mais conhecido como pele, é formado por camadas distintas, unidas entre si: a epiderme, a derme, a hipoderme. As suas principais funções são a proteção dos tecidos subjacentes, a regulação da temperatura somática e ainda contem terminações nervosas sensitivas com funções distintas. A pele é constituída de biopolímeros contendo 72% de colágeno e 2% de elastina. Além destes compostos da pele, compõe a matriz extracelular os glicosaminoglicanos que são poliânions contendo sulfatos e carbonatos, que atraem água e cátions que ajudam na manutenção da arquitetura estrutural. Os glicosaminoglicanos são um gel hidrófilico, semifluido que permite a circulação de nutrientes, gases e hormônios. A pele é um material complexo e pode ser descrito como material com propriedades elásticas, viscosas e plásticas. O colágeno confere resistência a pele e a elastina extensibilidade. As propriedades mecânicas da pele são determinadas principalmente pela camada da derme. A tensão máxima na ruptura vai de 2,5 a 16 MPa para o tecido epitelial (Bear, 2008; Harris, 2009).

3.5.1. EPIDERME

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

A superfície cutânea está provida de terminações nervosas capazes de captar estímulos térmicos, mecânicos ou dolorosos. Essas terminações nervosas ou receptores cutâneos são

especializados na recepção de estímulos específicos. Alguns podem captar estímulos de natureza distinta. Porém na epiderme não existem vasos sanguíneos. Os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme (Bear, 2008; Harris, 2009).

Nas regiões da pele providas de pêlo, ocorrem terminações nervosas específicas nos folículos capilares e outras chamadas terminais ou receptores de Ruffini. As primeiras, formadas por axônios que envolvem o folículo piloso, captam as forças mecânicas aplicadas contra o pêlo. Os terminais de Ruffini, com sua forma ramificada, são receptores térmicos de calor (Bell *et al.*, 1981; Bear, 2008; Harris, 2009).

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

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

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

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

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

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

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

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

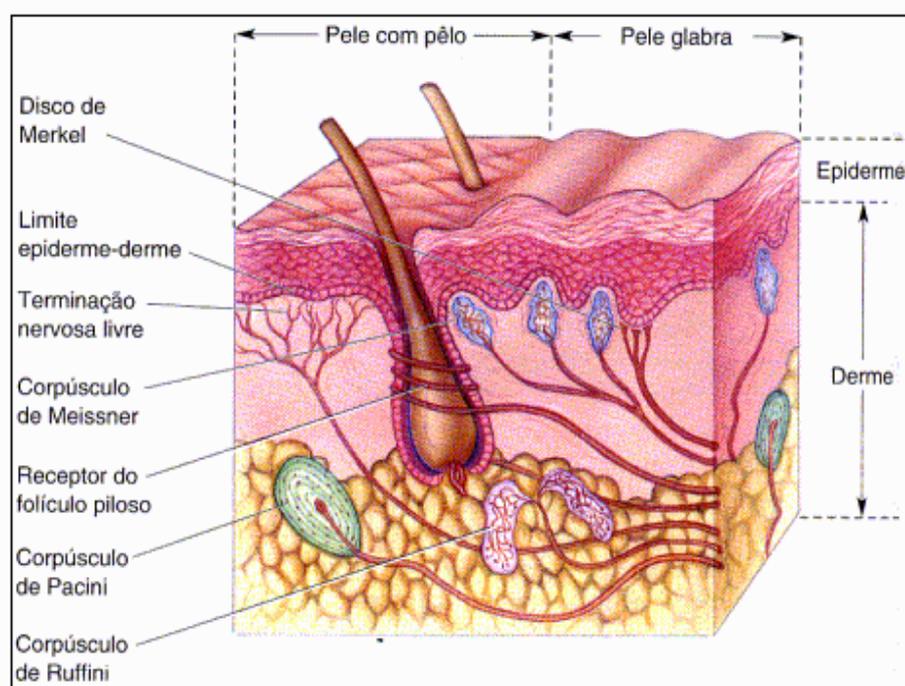


FIGURA 3.4. Estrutura do tegumento (pele) (Bear, 2008).

As glândulas anexas – sudoríparas e sebáceas – encontram-se mergulhadas na derme, embora tenham origem epidérmica. O suor (composto de água, sais e um pouco de uréia) é

drenado pelo duto das glândulas sudoríparas, enquanto a secreção sebácea (secreção gordurosa que lubrifica a epiderme e os pêlos) sai pelos poros de onde emergem os pêlos. A transpiração ou sudorese tem por função refrescar o corpo quando há elevação da temperatura ambiental ou quando a temperatura interna do corpo sobe, devido, por exemplo, ao aumento da atividade física (Bear, 2008).

3.5.2 DERME

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

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

3.5.3 TECIDO SUBCUTÂNEO

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

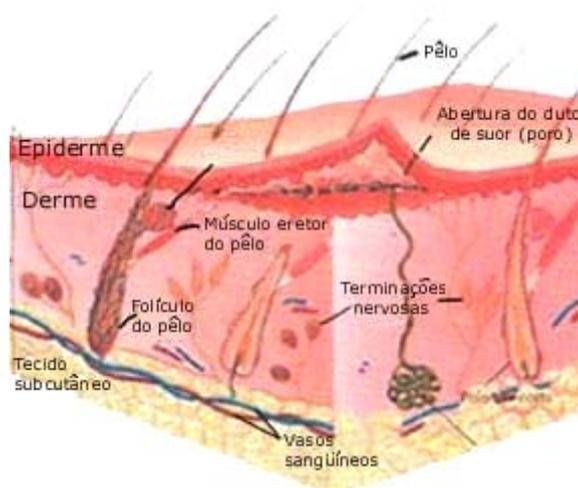


FIGURA 3.5. Estrutura da pele e o tecido subcutâneo (Bear, 2008).

3.6 A CICATRIZAÇÃO

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

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

1. Coagulação: inicia-se imediatamente após o surgimento da ferida. Depende da atividade plaquetária e da cascata de coagulação. Ocorre uma complexa liberação de produtos. Substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases são liberadas e ditam o desencadeamento de outras fases. A formação do coágulo serve não apenas para captar as bordas da ferida, mas também para cruzar a fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam ingressar na ferida (Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006).

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

3. Proliferação: dividida em 3 subfases, é responsável pelo “fechamento” da lesão.

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

3.2 – Fibroplasia e formação da matriz: extremamente importante na formação do tecido de granulação, que é uma coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno. A formação do tecido de granulação depende do fibroblasto, que longe de ser apenas produtor de colágeno, produz também elastina, fibronectina, glicosaminoglicanase e proteases, estas últimas responsáveis pelo desbridamento e remodelamento fisiológico (Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006; Harris, 2009).

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

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

5. Remodelamento: ocorre no colágeno e na matriz. Dura meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema. Reformulação nas fibras de colágeno, melhoria nos seus componentes e reabsorção de água são eventos que permitem uma conexão que aumenta a força da cicatriz e diminui sua espessura. A neovascularização diminui, e tardiamente a cicatriz é considerada avascular. Uma cicatriz normal tem aproximadamente 80% da força de tensão da pele normal, não é volumosa e é plana (Fazio *et al.*, 2000; Mandelbaum *et al.*, 2003, Nitz *et al.*, 2006; Harris, 2009).

CAPÍTULO 4

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Para o desenvolvimento deste trabalho foram realizadas etapas de caracterização dos polímeros formadores dos filmes e das filmes produzidos. Os filmes produzidos foram obtidos com e sem reticulação por genipin para aplicação potencial como pele artificial e também foram caracterizados por testes físicos, químicos, mecânicos e biológicos. Procurou-se com estes testes o conhecimento das propriedades dos materiais sintetizados e a verificação da similaridade com as propriedades do tecido epitelial.

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

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

Testes mecânicos foram realizados para verificar tensão máxima na ruptura, módulo de elasticidade e tenacidade dos materiais. Estes foram comparados com as propriedades mecânicas da pele, com a finalidade de verificar sua viabilidade para uso como tecido epitelial artificial.

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

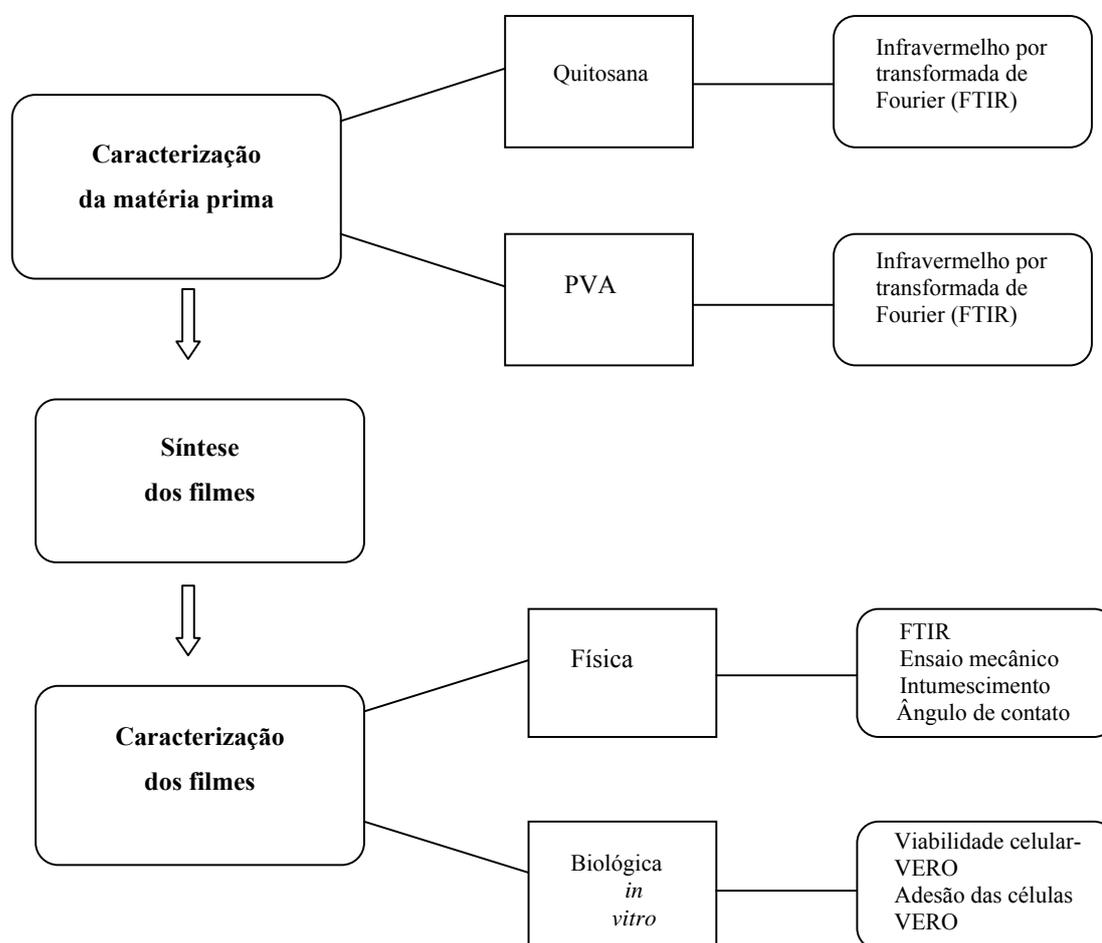


FIGURA 4.1. Fluxograma das etapas do trabalho.

4.2 MATERIAIS

Todos os sais e reagentes foram utilizados em grau analítico (P.A.) e água Milli-Q foi utilizada em todas as soluções com resistividade mínima de (18,0M Ω . cm) a 25°C. Quitosana em pó (Cat.#419419, Sigma-Aldrich Chemical, Milwaukee, Wisconsin, USA, massa molar (MM) = 161.000g/mol, Grau de desacetilação (GD) =75,6%, viscosidade = 1406cP –1,0% em 1% de ácido acético). Poli(álcool vinílico-co-acetato de vinila) PVA (GH=80% e massa molar(MM) de 9.000 a 10.000g/mol, Sigma-Aldrich, Cat.#360627). Genipin (ou nome da IUPAC: Metil-2-hidroxi-9-(hidroximetil)-3-oxabicyclonona-4,8-dieno-5-carboxilato, Ge, pureza > 98% analisado em cromatografia líquida de alta performance (HPLC-*High Performance Liquid Chromatography*), Challenge Bioproducts, Taiwan) foi o agente reticulante químico. Ácido acético (CH₃COOH - Cat.#49199, Sigma-Aldrich).

4.2.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS PRIMAS

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

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

A determinação do grau de desacetilação da quitosana foi realizada através de FTIR. A partir das intensidades das bandas de infravermelho nas frequências 1655 e 3450 cm⁻¹ (α_1 e α_2 na Equação 1, respectivamente), foi calculado o grau de desacetilação médio deste polímero.

A equação (1) é usada com a intensidade da absorção do espectro de infravermelho para obter o grau de desacetilação.

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

Onde α_1 e α_2 representam a absorção no espectro de infravermelho em 1655 e 3450 cm^{-1} respectivamente, representam do espectro da quitosana (Lima, 2005).

4.3 PREPARAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL POR EVAPORAÇÃO DE SOLVENTE

Uma solução de 1,0% (em massa) de quitosana foi preparada pela dissolução de 2,5g em 250mL de solução de CH_3COOH 2% (em massa). Para a solubilização e homogeneização, a solução foi agitada magneticamente por um período 48h.

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

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

As amostras de PVA/Qui quimicamente reticuladas foram identificadas por PVA/Qui/Ge (X:Y:Z) onde X corresponde ao teor de PVA, Y ao teor de quitosana e Z ao genipin em porcentagem de massa de polímero (p%).

A tabela 4.1 com as membranas, em diversas concentrações dos polímero e de reticulante, produzidos é apresentada.

TABELA 4.1 Filmes Produzidos.

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

4.3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL

4.3.1.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICA

As análises qualitativa e dimensional foram executadas através de observações visuais levando-se em conta a solubilidade, miscibilidade e segregação de fase nas blendas além de se verificar a espessura dos filmes que foi obtida com um micrômetro Mitotoyo ($\pm 10\mu\text{m}$).

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

4.3.1.2 COMPORTAMENTO MECÂNICO

O ensaio de tração foi realizado para avaliar o comportamento mecânico (tensão máxima de tração (σ), deformação específica (DE), módulo de elasticidade (E) e tenacidade (T) dos filmes obtidos e foi executado em equipamento EMIC DL 3000, utilizando uma célula de carga de 50N, velocidade de ensaio de 5mm/min e corpos de prova na forma de tira com razão mínima de 8 entre a largura e a espessura. Foram obtidos valores médios de seis amostras conforme ASTM D882/02, temperatura de ensaio de $(21\pm 2)^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $(52\pm 8)\%$. As amostras ensaiadas foram previamente inspecionadas e qualquer descontinuidade tal como bolha de ar, furos ou segregação com dimensão superior a 5% da área foram rejeitadas. Na análise estatística dos resultados obtidos no ensaio mecânico foi realizada através das médias e desvios padrões dos grupos de medidas, pela análise estatística ANOVA. As decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de 0,05 (95%) (ASTM D882/02).

4.3.1.3 GRAU DE INTUMESCIMENTO

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

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

Íon	PBS	SBF	Plasma Sanguíneo	Tampão TRIS
Na^+	347,0	142,0	142,0	0
K^+	11,0	5,0	5,0	0
Mg^{2+}	0	1,5	1,5	0
Ca^{2+}	36,0	2,5	2,5	0
Cl^-	231,0	147,8	103,0	45,0
HCO_3^-	0,0	4,2	27,0	0
HPO_4^{2-}	15,0	1,0	1,0	0
SO_4^{2-}	0	0,5	0,5	0

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

As amostras foram mantidas a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ em banho-maria. Após o período de tempo as amostras foram retiradas do recipiente e pesadas. A fim de retirar o excesso de fluido as amostras foram colocadas rapidamente ($< 20\text{s}$) sobre papel filtro e então pesadas em balança analítica. Após a pesagem as amostras foram secas novamente em estufa a 40°C até atingir a estabilização do peso. O GI foi obtido conforme a Equação 2.

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

onde M_i é a massa intumescida e M_s a massa da amostra após a secagem final. Cada experimento foi repetido três vezes e o valor médio foi usado para validar os resultados ($n=3$). Para avaliar a influência do agente reticulante no grau de intumescimento foi usado ANOVA de fator único com nível de significância de 95%.

4.3.1.4 ÂNGULO DE CONTATO

A avaliação da evolução do ângulo de contato com o teor de quitosana na blenda foi adaptada de Mansur (2007) e feita entre a superfície do filme e a água deionizada ($18\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$). A medição do ângulo foi realizada utilizando o software IMAGEJ® 2006, a partir do tratamento da imagem digitalizada da gota (volume= $50\mu\text{L}$) depositada sobre a superfície do hidrogel com microseringa. Todas as fotos foram realizadas dentro do tempo máximo de 1 minuto usando uma câmera digital Sony® Cyber-Shot. As medições foram conduzidas em condições constantes de $(54\pm 2)\%$ de umidade relativa e temperatura ambiente de $(24\pm 3)^{\circ}\text{C}$. Foi utilizado como resultado a média de seis tratamentos independentes ($n=6$).

A análise estatística de todos os resultados obtidos das propriedades mecânicas e físicas foi realizada usando o software Microcal Origin® 7.0. Cada resultado foi registrado como média e desvio padrão considerando o número de replicatas característico de cada

experimento. A análise estatística dos dados foi realizada pelo método ANOVA com nível de significância de 95%.

4.3.1.5 VIABILIDADE DE CÉLULAS VERO *IN VITRO* POR MTT

No caso de dispositivos que ficarão em contato com a pele, como é a membrana (filmes) em estudo, a norma ISO 10993 contém um guia para avaliação de testes iniciais de biocompatibilidade. Nesta norma, para a seleção apropriada dos testes iniciais de avaliação para cada material e seu tempo de contato, é apresentada uma tabela de orientação. A tabela de orientação recomenda o ensaio *in vitro* de citotoxicidade. A técnica utilizada neste trabalho com a finalidade de determinar a porcentagem da viabilidade celular é o MTT. Este teste realiza ensaios quantitativos para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica presente no ambiente biológico estudado. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial medindo-se a formação de cristais de formazana, produto formado pela redução de tetrazólio MTT, utilizando, neste estudo, as células VERO. A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial (ISO10993).

Este teste permite que seja mensurado o metabolismo celular perante a adição do MTT, uma vez que células viáveis absorvem o tetrazólio de metiltiazol e o metabolizam na mitocôndria utilizando enzimas ativas, onde se acumulam sob a forma de cristais de tetrazólio ou formazana; sendo assim quanto maior o valor da leitura no espectrofotômetro, maior é a taxa metabólica, podendo diferenciar células viáveis de não viáveis.

A leitura da absorbância dos cristais de formazana, são diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis e foram realizados em 595 nm.

A viabilidade celular foi então analisada através da redução do brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Cat.# M2128, Sigma), usando monocamadas de células VERO (ATCC CCL-81 - células fibroblásticas de rim de Macaco Verde Africano) crescidas em placas de poliestireno de 96 poços tratada para cultura de células (TPP, 92096). As células foram incubadas a $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ em atmosfera úmida

contendo 5% de CO₂. Após 24h de incubação o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se a cada poço MTT diluído em meio mínimo de Eagle (Minimum Eagle Medium - MEM), incubando-se as células a (37±1)°C por 4h. Posteriormente, foi adicionada solução Dodecil Sufato de Sódio (SDS) SDS10%/ HCl 0,04 N e as placas foram re-incubadas por mais 14 a 16h e, 200µL foi transferido para uma placa de 96 poços onde foi lida a absorbância em 595 nm usando um leitor de microplacas *Asys Expert Plus*. Para a análise todos os dados foram expressos como média ± desvio padrão de 4 replicatas (n=4). Os dados foram analisados no programa PRISM (version 4.00), sendo utilizado ANOVA seguido de pós-testes de comparação múltipla Dunnett e Neuman_Keuls com nível de significância de 95% (ASTM F813-01).

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

4.3.1.6 ADESÃO DE CÉLULAS VERO

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

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MATÉRIAS-PRIMAS: QUITOSANA E PVA

5.1.1 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

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

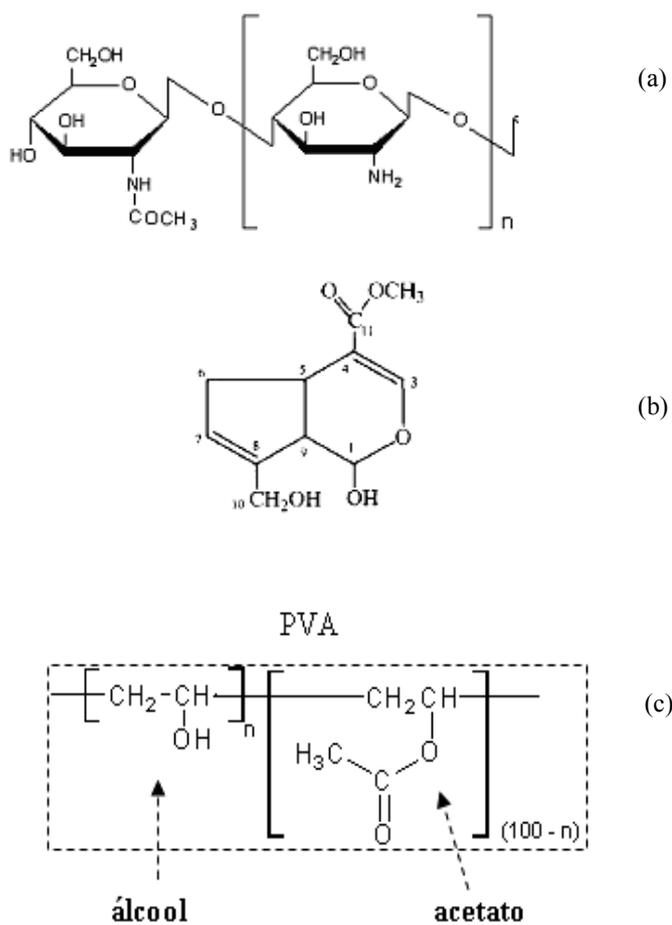


FIGURA 5.1 – Fórmulas estruturais de (a) quitosana, (b) genipin e (c) PVA.

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

A partir das intensidades das bandas de infravermelho da quitosana em pó, nas frequências 1655 e 3450 cm^{-1} , correspondem respectivamente a α_1 e α_2 na Equação (1), foi calculado o grau de desacetilação médio deste polímero sendo obtido o valor de $(80\pm 4)\%$, pelo método de espectroscopia de infravermelho proposto por Lima (2005). Este resultado apresenta-se relativamente similar ao fornecido pelo fabricante que é o grau de desacetilação de 76%. Existem várias técnicas recomendadas para verificar o grau de desacetilação. Entre essas técnicas são, por exemplo, titulometria, potenciometria, espectroscopia de infravermelho e ressonância magnética nuclear. Entretanto a espectroscopia de infravermelho tem sido a técnica mais aceita. É muito importante verificar o grau de desacetilação, pois ele exerce influência determinante no comportamento físico-químico, mecânico e até biológico do polímero. A relação existente entre o número de grupos glicosamina e N-acetilglicosamina presentes na quitosana controlam, entre outras coisas, o grau de reticulação. Independente da massa molar, quanto mais grupos aminos disponíveis maior será a possibilidade de formação de ligações cruzadas no material. O GD afeta as interações hidrofóbicas e hidrofílicas, pois dele dependem o número de grupos amino disponíveis para as reações de reticulação e interações inter e intra moleculares com água e outras substâncias (Gupta, 2007). A quitosana com alto GD (75%) é hidrofílica em comparação com quitosana de baixo GD (48%). Esta característica pode ser modulada também através de reações com agentes reticulantes nos grupamentos químicos referentes as aminas. Maiores graus de

desacetilação influenciam a interação com moléculas de água, aumentam assim a hidrofilicidade, e a solubilidade em soluções aquosas ácidas é facilitada. Maiores valores de GD também favorecem o maior índice de intumescimento e de difusão. O grau de desacetilação também afetam outras características. Com graus de desacetilação acima de 50% verifica-se propriedades bacteriostáticas contato-dependente, adesão, espalhamento e proliferação celular, principalmente em quantidades de massas molares superiores a $3,1 \times 10^5$ g/mol, embora a dependência sobre a massa molar seja menor (Sano, 2002; Hsu, 2004; Wenling, 2005; Sarasam, 2008).

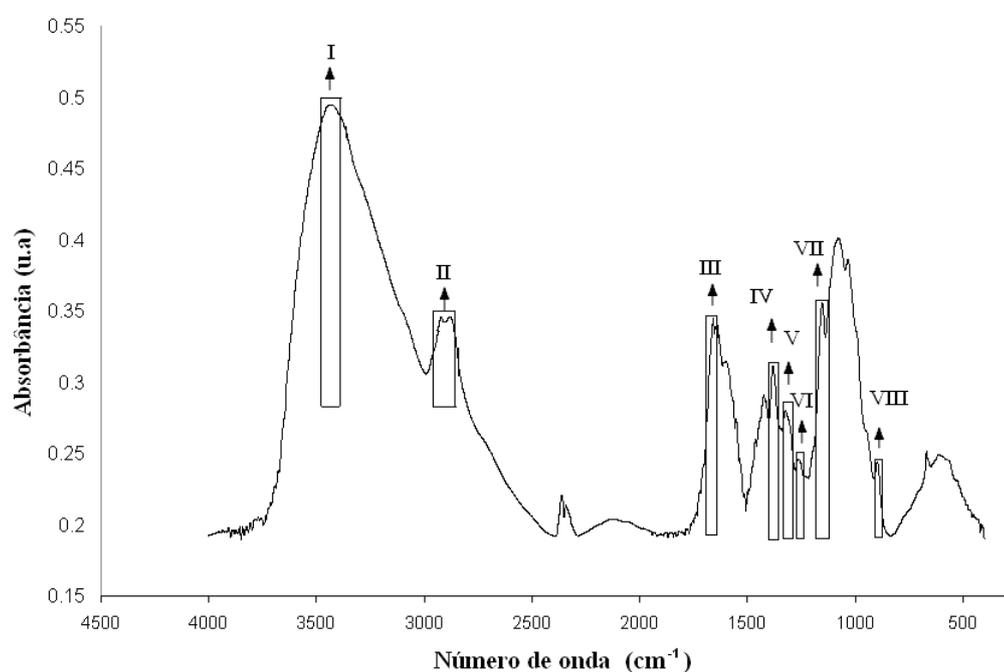


FIGURA 5.2 - Espectro de FTIR de quitosana em pó no modo absorvância com grau de desacetilação calculado em 80%.

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

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

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

moleculares dos grupos hidroxila vizinhos. Assim, podem ser produzidos materiais solúveis em meio aquoso controlando essas interações na molécula e isto é importante em várias aplicações biomédicas (Aranha, 2001).

O espectro de infravermelho do PVA e a tabela com as principais bandas estão apresentadas na Figura 5.3 e tabela 5.4.

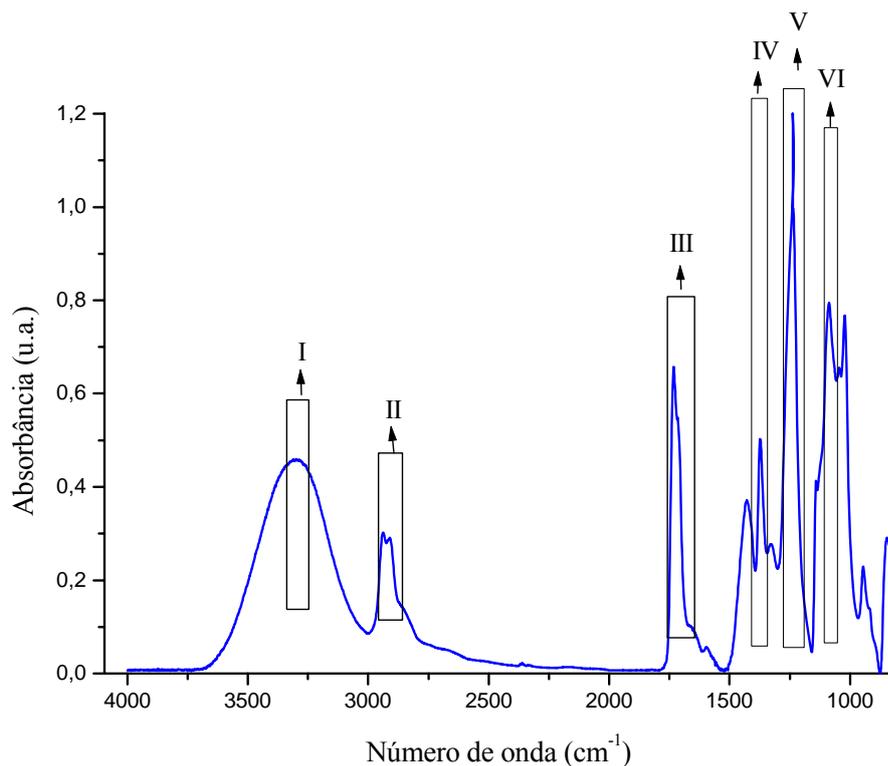


FIGURA 5.3 - Espectro de FTIR de PVA com grau de hidrólise de 80%.

TABELA 5.2. Com as principais grupos funcionais do PVA representados no espectro da Figura 5.3.

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

5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE HIDROGEL

5.2.1 AVALIAÇÃO QUALITATIVA

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

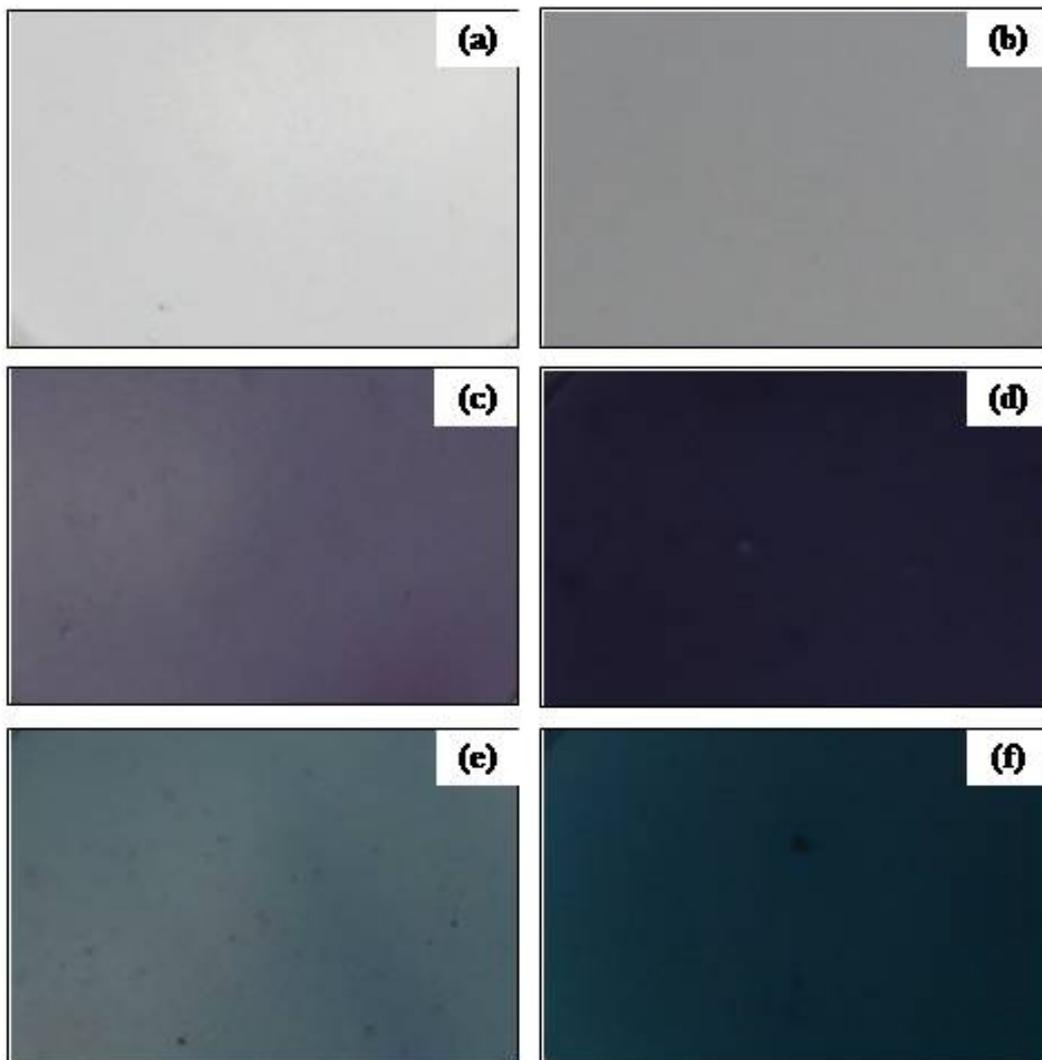


FIGURA 5.4 – Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (a) PVA (1:0:0); (b) quitosana (0:1:0); (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0,5); (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1); (e) PVA/Qui/Ge (1:1:0,5) e (f) PVA/qui/Ge (1:1:1) fundo branco.

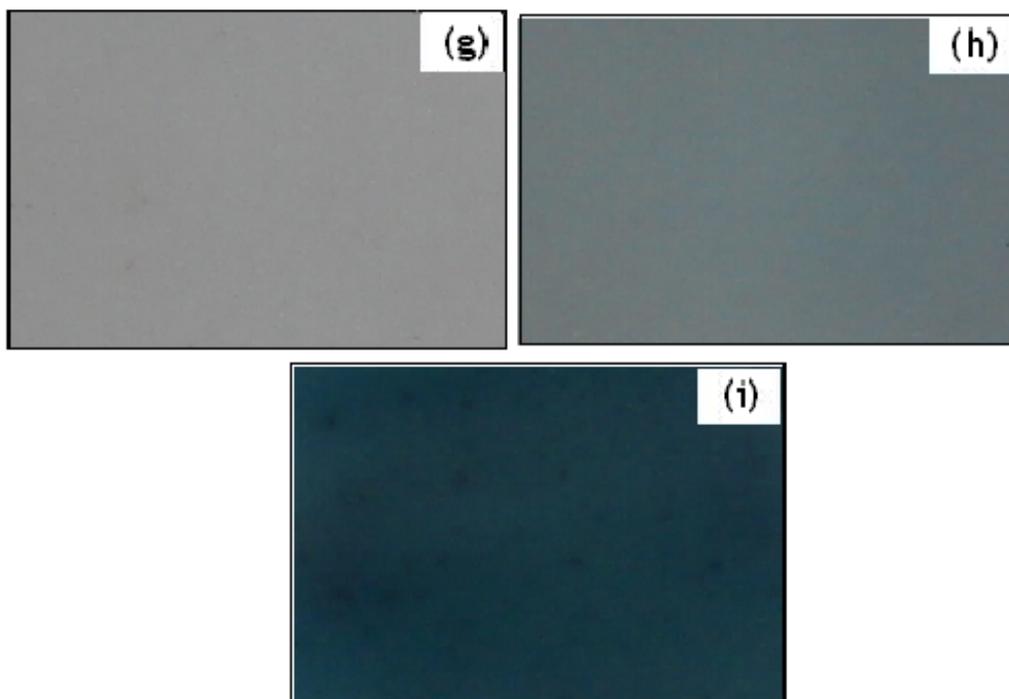


FIGURA 5.5 – Imagem de amostras de filmes polímeros e blendas. (g) PVA (3:1:0); (h) quiitosana (3:1:0,5); (i) PVA/Qui/Ge (3:1:1) fundo branco.

TABELA 5.6 – Avaliação visual das blendas

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

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

A absorção em comprimento de onda maior que 185 nm é limitado a um número de grupos funcionais chamados de cromóforos, que contém elétrons de valência com energia de excitação relativamente baixas. Ocorre que muitos compostos orgânicos ao reagirem com o fóton, tem como resultado a excitação eletrônica. Assim, os elétrons não compartilhados (não-ligante) ou elétrons compartilhados, entre dois átomos (ligantes), em um orbital π são

excitados para um orbital π^* (antiligante) de maior energia . Ambas as transições requerem a presença de um grupo funcional insaturado para fornecer os orbitais π . As energias necessárias para esses processos situam-se na região espectral de 200 a 700nm (Guaratini e Zandoni, 2000; Duff, 2001; Skoog, 2002).

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

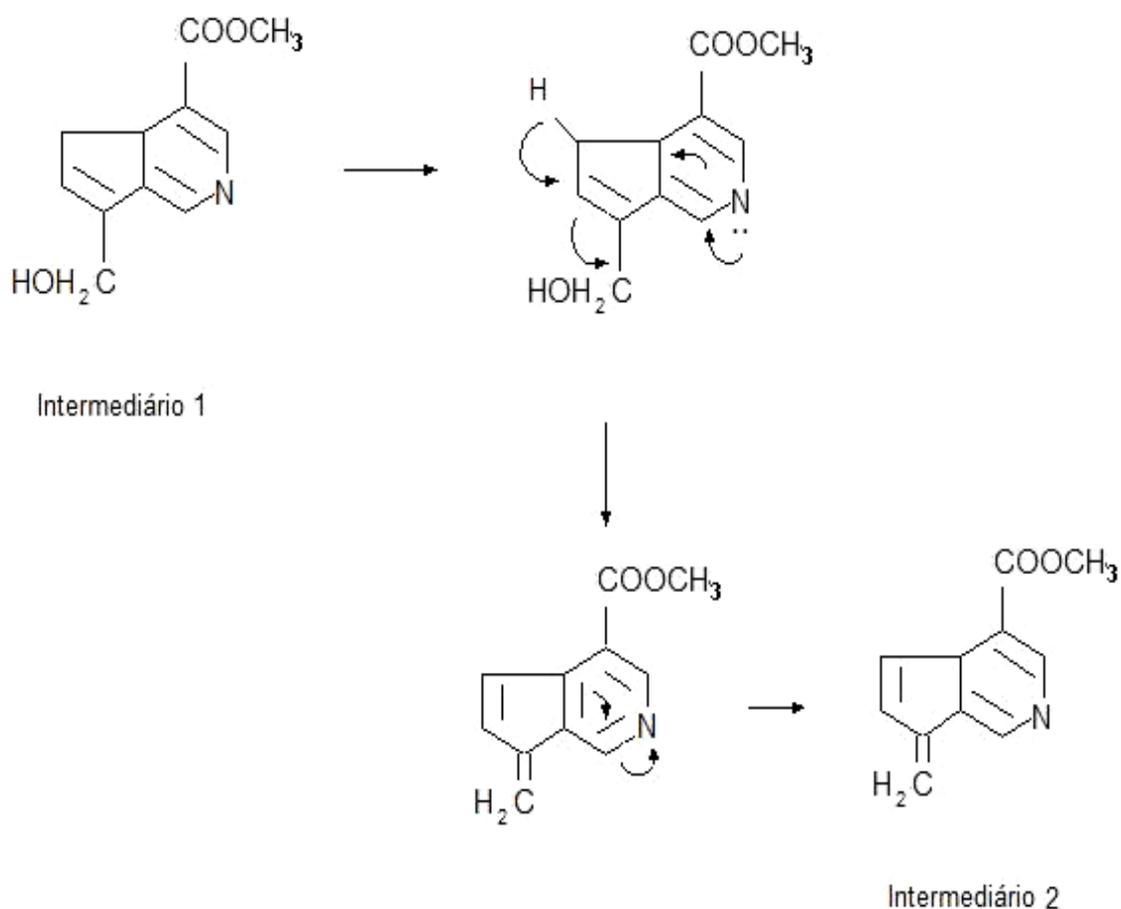


FIGURA 5. 6 – Intermediários formados na reação de genipin com grupamentos amina.

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

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

5.2.2 CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES POR ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Nos espectros apresentados na Figura 5.7, a absorção da banda em 1650 cm^{-1} associadas com o aumento do grupo amida da curva (a) a curva (c) ao aumentar o teor de ligações cruzadas. A banda em 1060 cm^{-1} é um resultado do estiramento de C-O e da banda em 1406 cm^{-1} resultado estiramento do anel da molécula de genipin (C = C). A vibração na faixa de 1540 cm^{-1} a 1560 cm^{-1} é devida aos grupos amina protonados e ao grupo ácido carboxílico da molécula de ácido acético. O estiramento do anel da amina heterocíclica aparece em 1340 cm^{-1} e ocorre com aumento de absorção, para maiores concentrações de genipin (Mi *et al.*, 2000; Liu, 2004; Lima, 2005; Elizondo, 2009) O perfil típico de polissacarídeo é mantido em 1150 cm^{-1} , característica de estiramento C-O-C. O estiramento do anel da amina heterocíclica aparece em 1340 cm^{-1} e ocorre com aumento de absorção, para maiores concentrações de genipin (Butler *et al.*, 2003; Costa *et al.*, 2008). O perfil típico de polissacarídeo é mantido em 1150 cm^{-1} , característica de estiramento C-O-C. A Figura 5.7 mostra que com o aumento de genipin dos espectros (a) para (c), ocorre mudanças na transmitância e conseqüentemente na absorbância das amostras.com aumento de genipin as reações ocorrem em maiores proporções , o que pode ser comprovado pelas Figuras 5.8 e 5.9 normalizadas pela banda 1450cm^{-1} do $\delta\text{ CH}_2$ de acordo com o trabalho de Beppu e colaboradores (Beppu *et al.*, 1999; Liu, 2004; Lima, 2005; Elizondo, 2009).

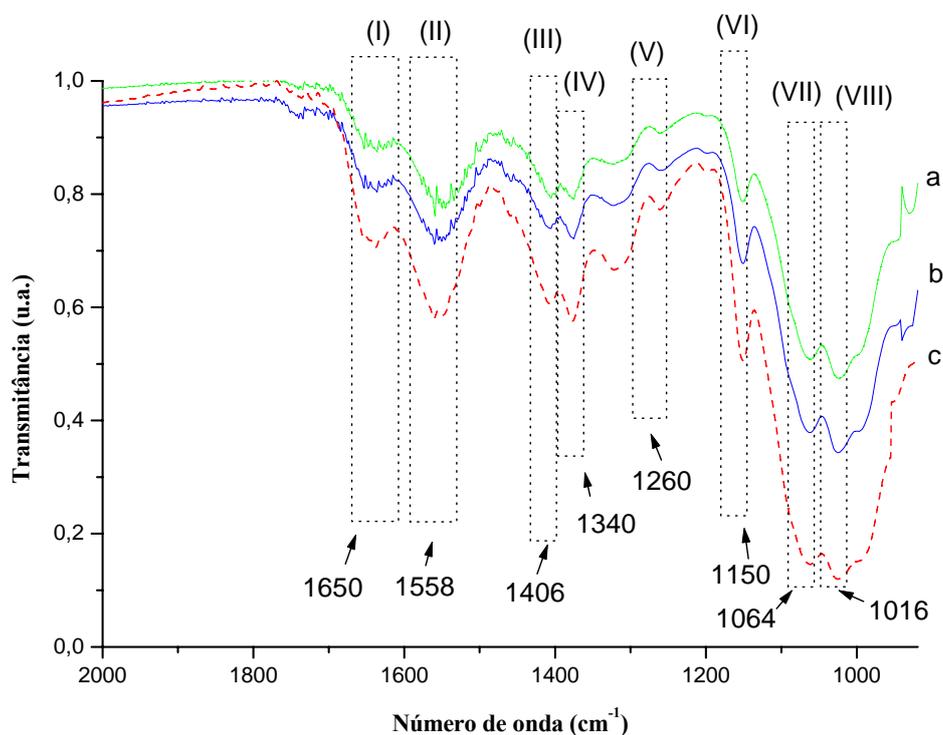


FIGURA 5. 7- Intensidade das bandas dos filmes de quitosana; (a) --- filme de quitosana sem reticulante, (b) — filme 0,5% de genipin com quitosana e (c)..... filme 1% de genipin com quitosana.

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

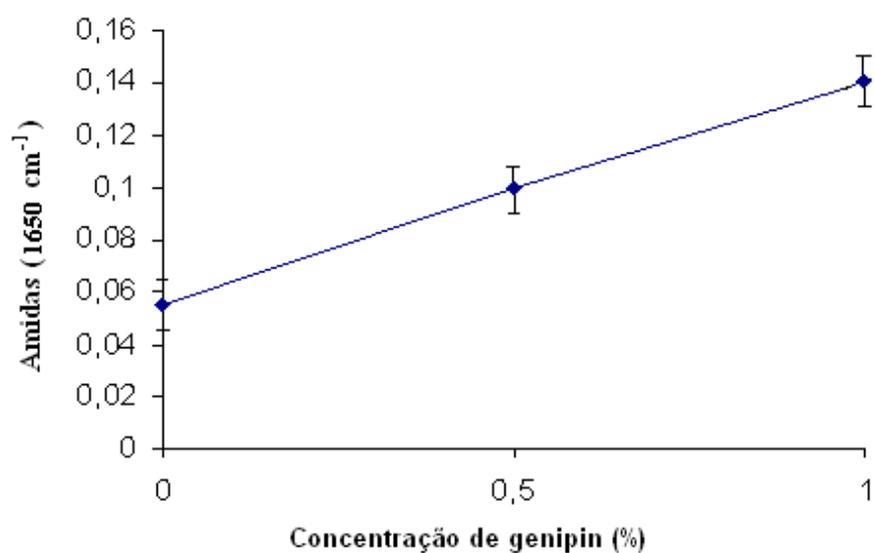


FIGURA 5.8- Intensidade da absorvância associada aos modos vibracionais das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes.

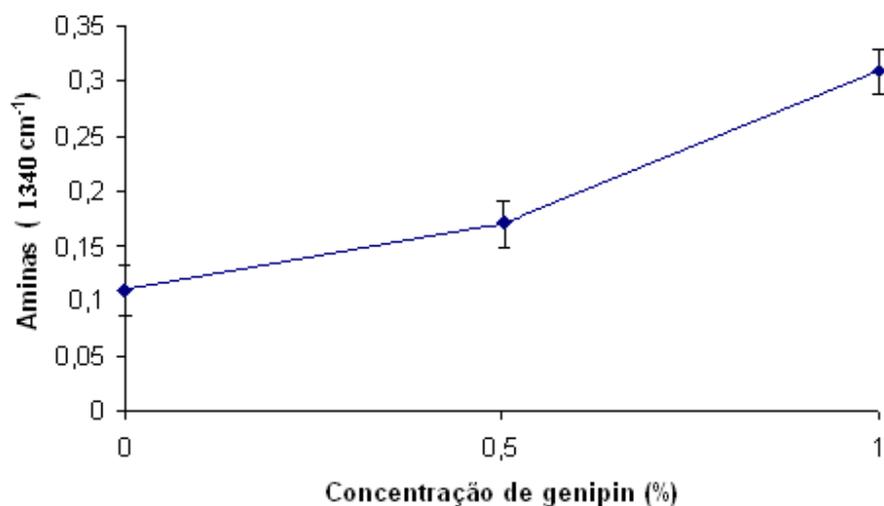


FIGURA 5.9 - Intensidade da absorvância associada aos modos vibracionais das aminas formadas pela reação de genipin com quitosana para diferentes concentrações de genipin nos filmes.

Levando em consideração estes resultados e a investigação dos mecanismos de reação em meio ácido feitas por Butler e colaboradores (2003) a síntese de quitosana reticulada

por genipin pode ser representada conforme mostrado na Figura 5.10 onde as bandas aminas do polímero reagem com o genipin formando amidas. Também é formado uma amina terciária no anel. Na Figura 5.10 a amida formada é indicada pelo número romano I e amina terciária formada é indicada pelo número .

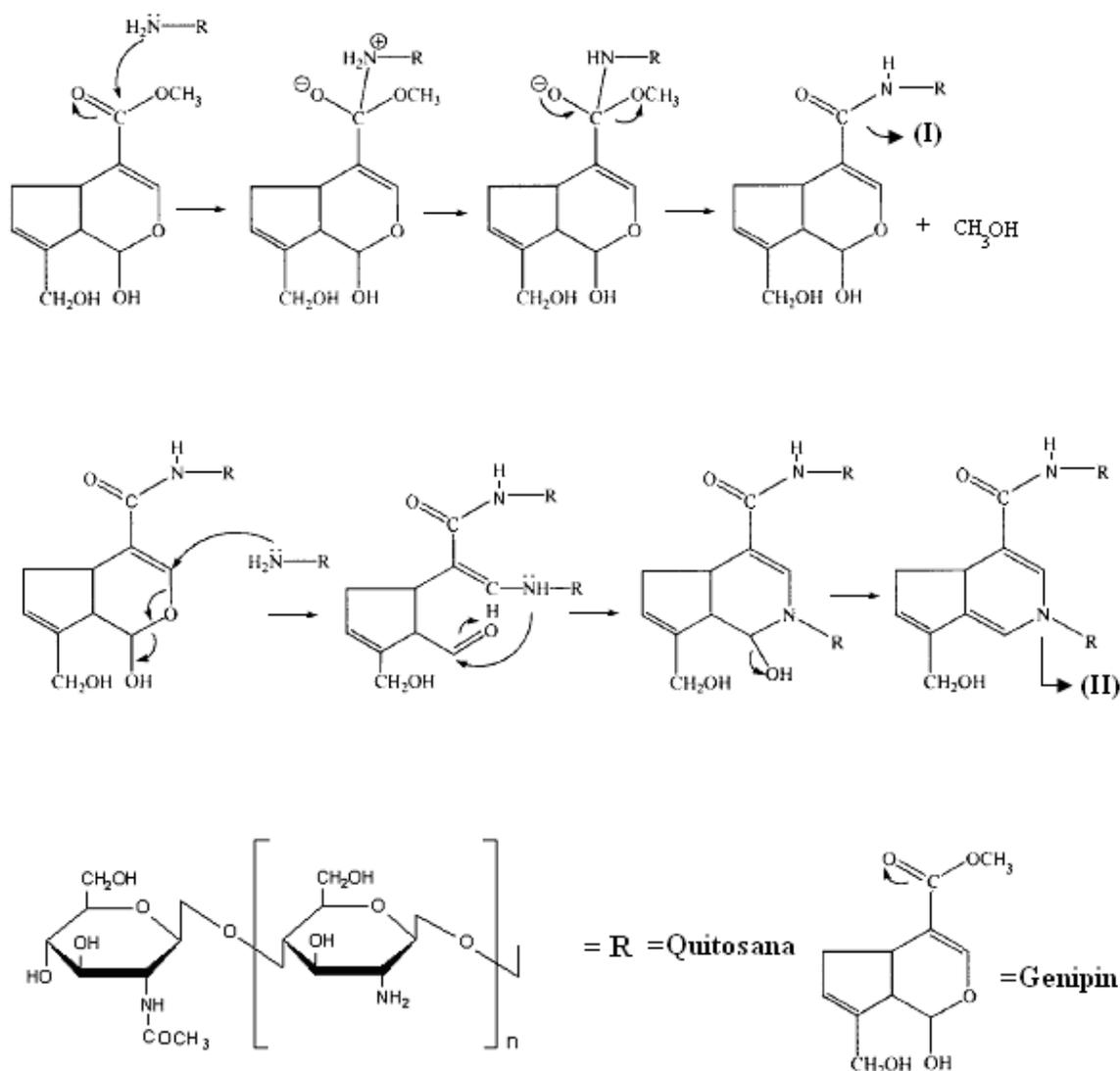


Figura 5.10 -Reações de grupos aminas de polímeros como quitosana com genipin.

Além do estudo dos filmes de quitosana reticulados e sem reticulação, foram realizados os estudos das blendas e também do PVA reagido com genipin. Na Figura 5.11 com a mistura

dos polímeros é possível observar a banda em 1250 cm^{-1} à deformação do NH_3^+ , estiramento do CO e deformação do OH ocorrida devido à mistura dos polímeros (Elizondo, 2009). Este pico em 1250 cm^{-1} é praticamente ausente na quitosana pura. O pico largo em 3290 cm^{-1} é devido à hidroxila. Esta banda é importante porque indica a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio nas amostras. As ligações de hidrogênio podem aumentar a resistência do material e diminuem a solubilidade em água (Elizondo, 2009).

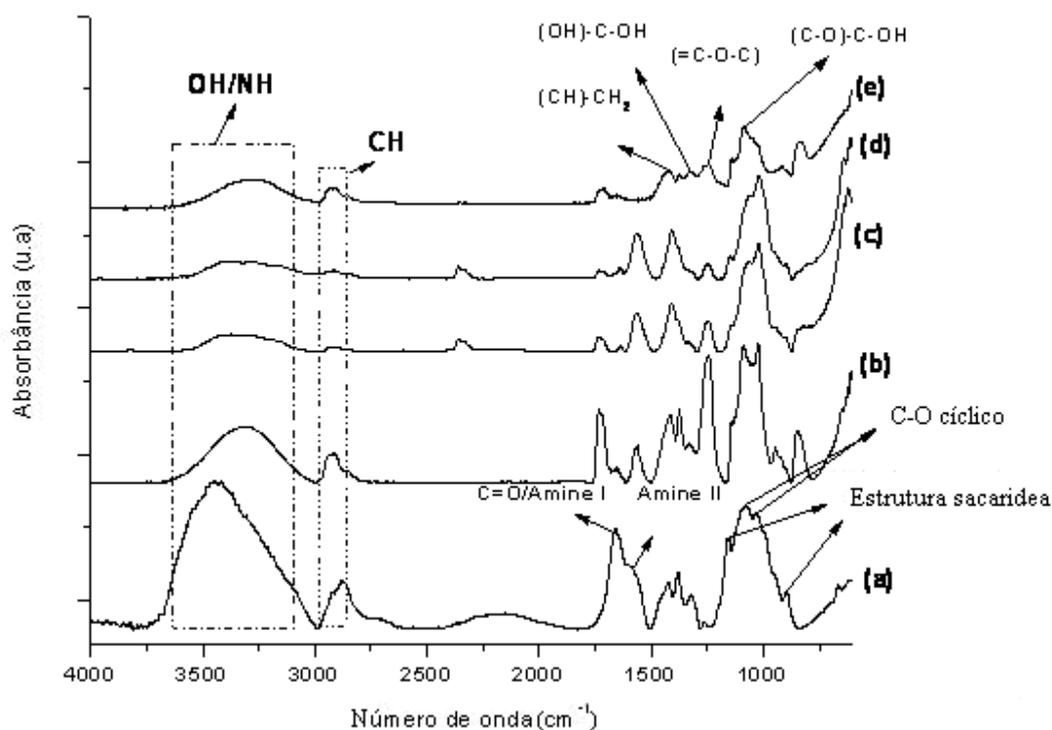


FIGURA 5.11. Blendas de quitosana e PVA sem reticulação PVA/Qui/Ge (a) PVA/Qui/Ge (0:1:0); (b) PVA/Qui/Ge (1:3:0); (c) PVA/Qui/Ge (1:1:0); (d) PVA/Qui/Ge (3:1:0) and (e) PVA (1:0:0).

Na figura 5.12 em 1720 cm^{-1} é possível verificar a diminuição considerável desta banda na blenda reticulada com 1% de genipin representada por (c) no espectro. Esta banda é referente ao acetato do PVA. A banda relacionada ao acetato em 1260 cm^{-1} diminui também na blenda com 1% de reticulação.

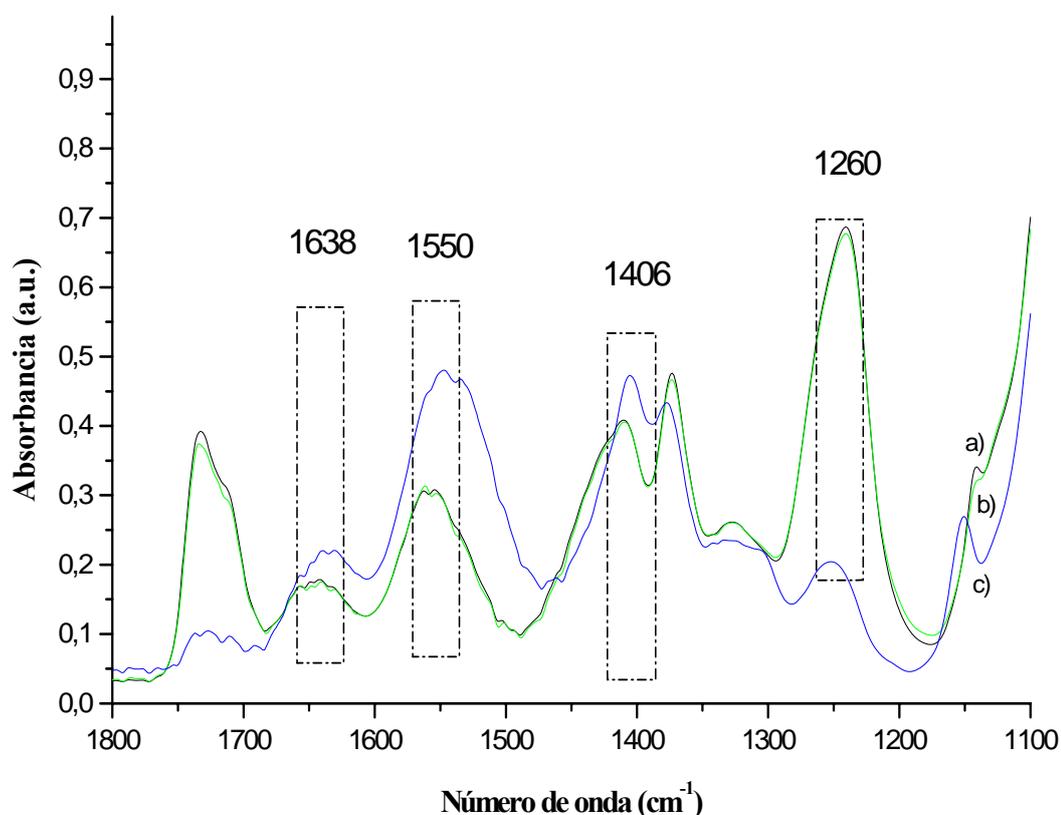


FIGURA 5.12. Blendas de quitosana e PVA com reticulação PVA/Qui/Ge.(a)75% PVA 25%QUI 0%genipin. (b) 75% PVA 25%QUI 0,5%genipin.(c) 75% PVA 25%QUI 1%genipin

As bandas relacionadas às amidas aumentam, indicando a formação de amidas entre genipin e quitosana, produzindo uma reação que resultaria no aumento das bandas em 1650 cm^{-1} como mostrado na Figura 5.13. Na figura 5.14 verifica-se a diminuição da intensidade das amins primárias relacionadas as amins da quitosana na blenda que foram consumidas na reação com genipin. As absorvâncias também foram normalizadas em relação à banda em 1450 cm^{-1} associada ao grupo C-H (Beppu *et al.*, 1999). Mas verifica-se grande redução da banda dos acetatos. Para a redução do acetato existe a possibilidade de diferentes reações estarem ocorrendo em proporções diversas. Entre as reações possíveis, pode ocorrer entre genipin e PVA a reação de transesterificação. As reações entre polímeros e agentes reticulante, dependem entre outros fatores da eficiência do agente reticulante e do tamanho da cadeia do polímero. Pode estar ocorrendo também a hidrólise ácida do PVA

com a conseqüente diminuição dos grupos acetatos no polímero, pois durante a preparação dos filmes o pH das soluções de polímero são ajustadas para 4. Além disso, pode estar ocorrendo entre o PVA e a quitosana a reação de formação de amida, à partir da carboxila do PVA e a amina primária da quitosana (Solomons, 2001; Gil *et al.*, 2005).

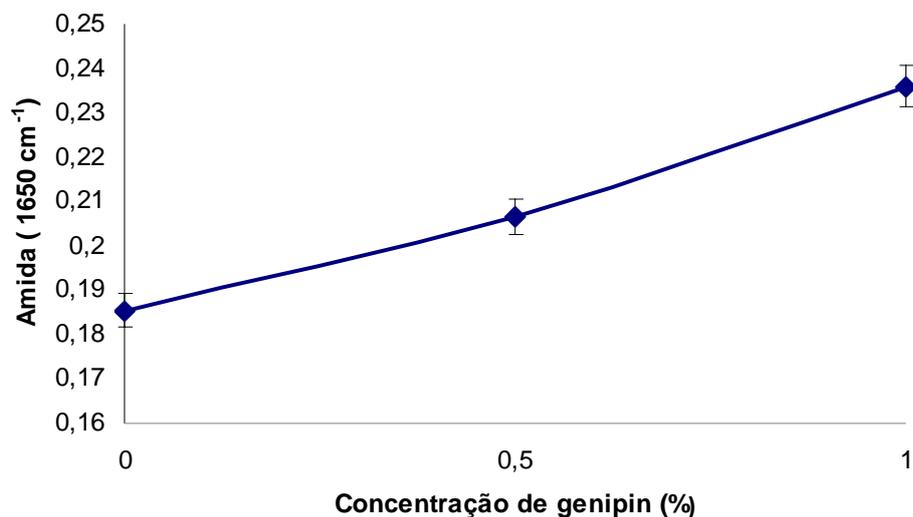


FIGURA 5.13 - - Intensidade da absorvância associada aos modos vibracionais das amidas formadas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm⁻¹ (δ CH₂).

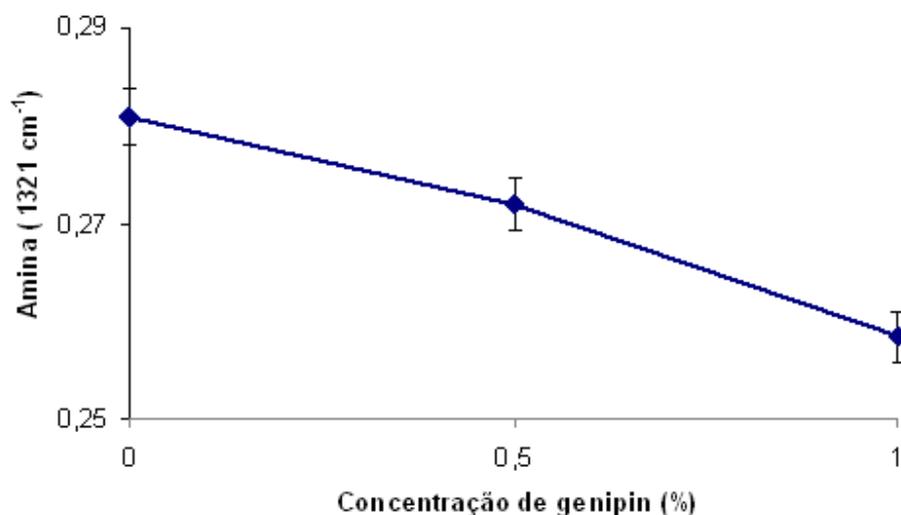


FIGURA 5.14 - Intensidade da absorção associada aos modos vibracionais das aminas consumidas pela reação de genipin com quitosana nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana.

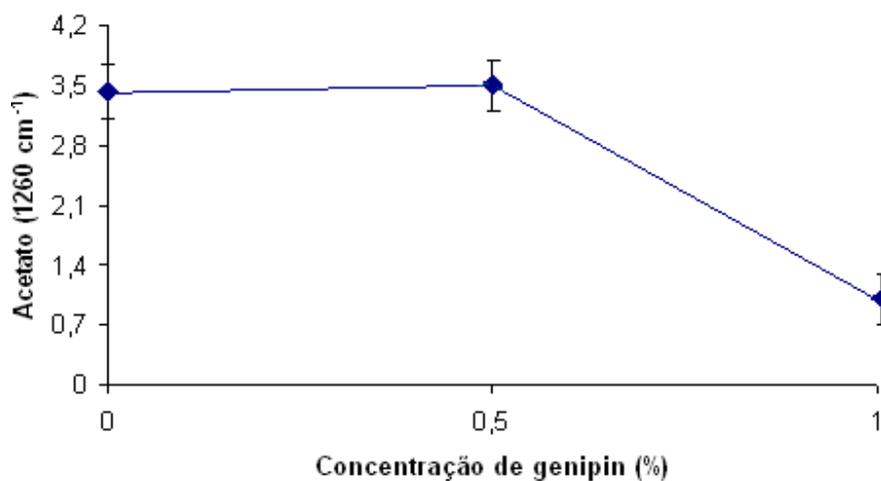


FIGURA 5.15 - Intensidade da absorção associada aos modos vibracionais de acetato nas blendas com 75% PVA 25 % quitosana, para diferentes concentrações de genipin nos filmes e normalizadas pela banda 1450 cm⁻¹ (δ CH₂).

O filme de PVA puro e os reticulados com 0,5% e 1% de genipin é mostrado na figura 5.16. Em 1300 a 1500 cm⁻¹ é referente a banda que pode ser associada ao anel heterocíclico

existente no genipin. Em 1750cm^{-1} o pico de estiramento C=O para PVA sem reticulação é semelhante ao que tem 0,5% de genipin e 1%. Os espectros dos filmes sem reticulação e reticulados com 0,5% e 1% de genipin encontram-se sem grandes alterações em suas bandas quando comparadas umas com as outras. (Oliveira, ; Butler *et al.*, 2003, Skoog *et al.*, 2002).

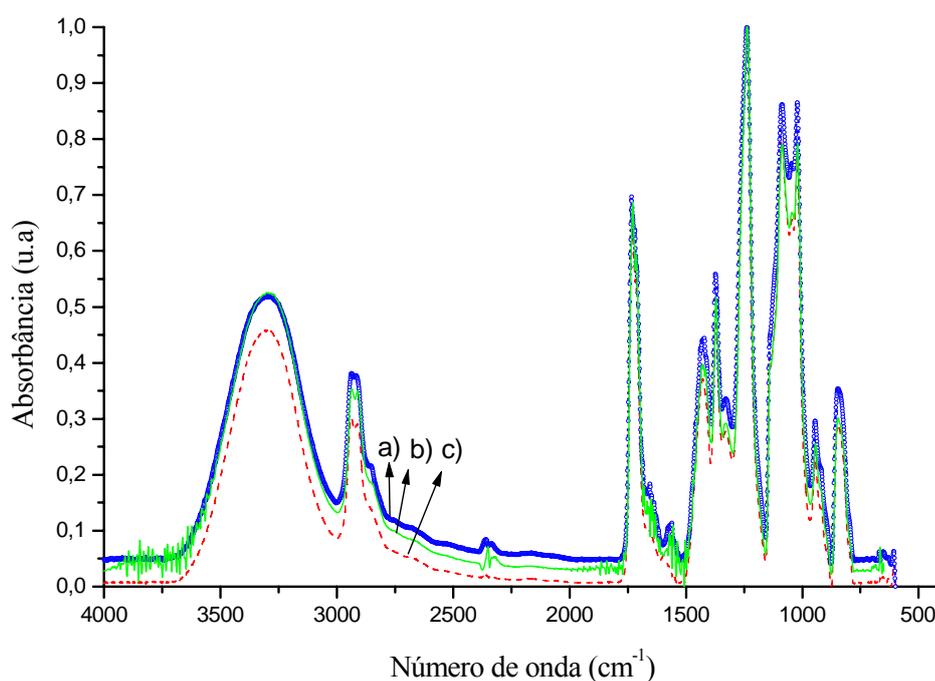


FIGURA 5.16. Blendas PVA / Qui / Ge a) 1:0:0 b) — 1:0:0.5 c) - - - 1:0:1 .

5.2.3 GRAU DE INTUMESCIMENTO

A Figura 5.17 mostra comportamento quanto ao grau de intumescimento para quitosana sem reticulação e reticulada com genipin em PBS (pH = 7,4). A transição do estado contraído para o estado expandido é marcada por mudanças nas propriedades dos filmes. Pode-se observar que os géis vão se expandindo (maior intumescimento) quando estão sem reticulante, ou seja não reagiram com o genipin ou possuem pouco reticulante em comparação com géis reticulados. O intumescimento depende do grau de reticulação. Assim, é importante observar que a redução no grau de intumescimento depende da

quantidade de agente reticulante. Porém esta redução na absorção de solvente não ocorre numa fórmula diretamente mensurável, por uma equação inversamente proporcional a quantidade de agente reticulante. Isto ocorre, pelo menos, utilizando a metodologia que é realizada pela maioria dos trabalhos em grau de intumescimento. Isto é observável na figura 5.17.

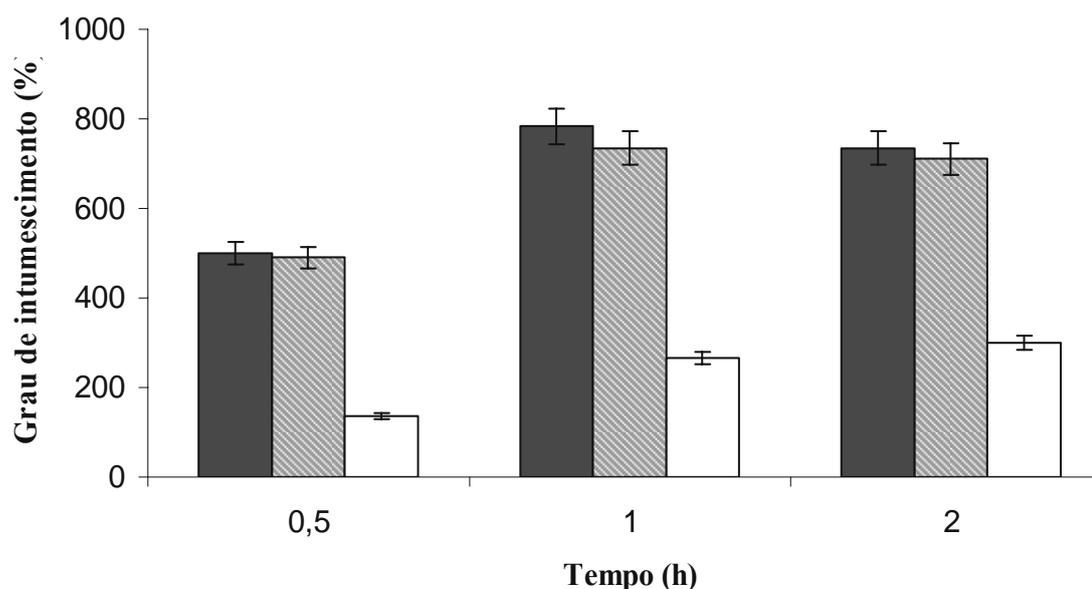


FIGURA 5.17. Grau de intumescimento de quitosana sem reticulante ■, com 0,5% de ■ genipin, □ com 1% de genipin.

Além disso, os valores de intumescimento, em 2 horas, para a quitosana pura chegaram a aproximadamente 780% e reticulados com 1% de genipin a 300%. O genipin reage com a quitosana nos grupos mais hidrofílicos, as aminas e isso também favorece a redução do intumescimento nos filmes de quitosana reticulados. As cadeias presas por ligações cruzadas também perdem a mobilidade. Isto dificulta a entrada de solvente ou expansão do filme. Além disso, sobram, após a reticulação, os grupos acetatos com a diminuição dos NH_3^+ na quitosana, reduzindo as ligações de hidrogênio com a água. Além disso, o grupo acetato tem um efeito estérico, reduzindo a interação da água com o polímero. Os graus de intumescimento no mesmo pH são semelhantes ao de Ginani e colaboradores (1999). É possível observar que existe pouca diferença no ensaio de intumescimento entre géis de quitosana pura e géis reticulados com 0,5% de genipin. Isto pode ocorrer, de acordo com a

literatura (Flory, 1953; Ginani *et al.*,1999; Bispo, 2004), porque para géis iônicos, a pressão osmótica irá levar ao intumescimento do gel, que ocorre com a diferença de concentração dos íons entre o gel e a solução. Assim quando se reticula com 0,5% de genipin alguns grupos NH_3^+ estavam reticulados mas estes grupos estando livres (sem reticulação) são grupos que irão interagir com os íons dissolvidos (presentes no PBS) e com a água que interage com os íons em PBS. Isto acaba levando ao intumescimento das membranas. Quando a membrana é menos reticulada com 0,5 % de genipin sobram mais grupos hidrofílicos, com NH_3^+ na membrana, para interagir com a água e os íons do que com 1% de genipin. Por isso, os grupos hidrofílicos estão em menores quantidades com 1% e além disso, com o maior número de reticulações as cadeias apresentam menos mobilidade para expandirem durante as interações. O tipo de reticulante também influencia. Dependendo do reticulante, pequenas quantidades do mesmo não modificam muito o intumescimento, porém o acréscimo de determinada quantidade, mesmo que não muito superior, irá reduzir bastante o intumescimento. Isto ocorre por causa das características do reticulante com hidrofílicidade e eficiência do agente reticulante e é verificado em trabalhos como o de Bispo (2004) e Ginani e colaboradores (Flory, 1953; Ginani *et al.*,1999; Bispo, 2004; Muzzarelli, 2009).

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

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

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

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

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

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

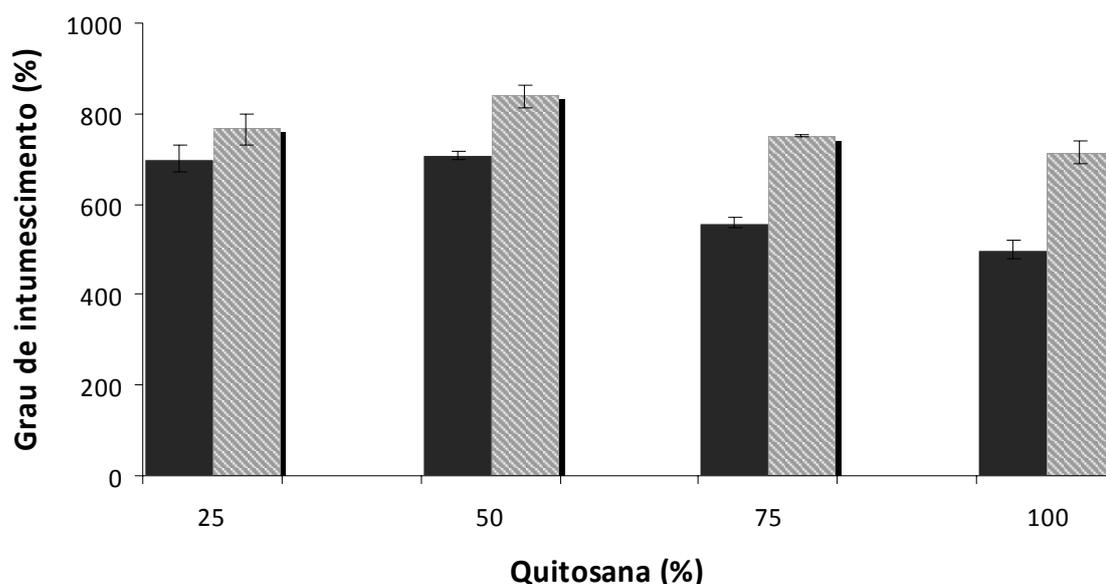


FIGURA 5.18. Efeito do teor de quitosana nas blendas sem reticulação em 0,5 hora e 2 horas.

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

água. Na mistura dos dois polímeros, quitosana e PVA podem alongar as suas cadeias, em grande extensão, em uma solução aquosa. Após a secagem das blendas, esses polímeros poderiam interagir entre si, formando assim um filme mais homogêneo. É possível verificar que o aumento na concentração de quitosana diminui o intumescimento, porque ela forma ligações de hidrogênio que estabilizam o filme e os acetatos reduzem a hidrofilicidade. Além disso a quitosana só se torna solúvel em pH 4, enquanto o PVA é solúvel em pH 7. O intumescimento da quitosana neste trabalho é parecido com o da literatura que chega vai de 650 a 800% com reticulação de 0.01% e 0.015% de genipin (Finch, 1973, Muzzarelli e Muzzarelli, 2002; Don *et al.*, 2006; Costa, 2008; Muzzarelli, 2009).

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

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

As medidas de intumescimento são importantes em géis, pois assim verifica o conteúdo de água nestes materiais. O conteúdo de água é um dos requisitos básicos para o material ser considerado biocompatível. Além disso, os hidrogéis são atrativos pela semelhança física

com os tecidos vivos que têm elevado conteúdo de água e consistência macia e elástica (Oliveira, 2002; Bispo, 2004).

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

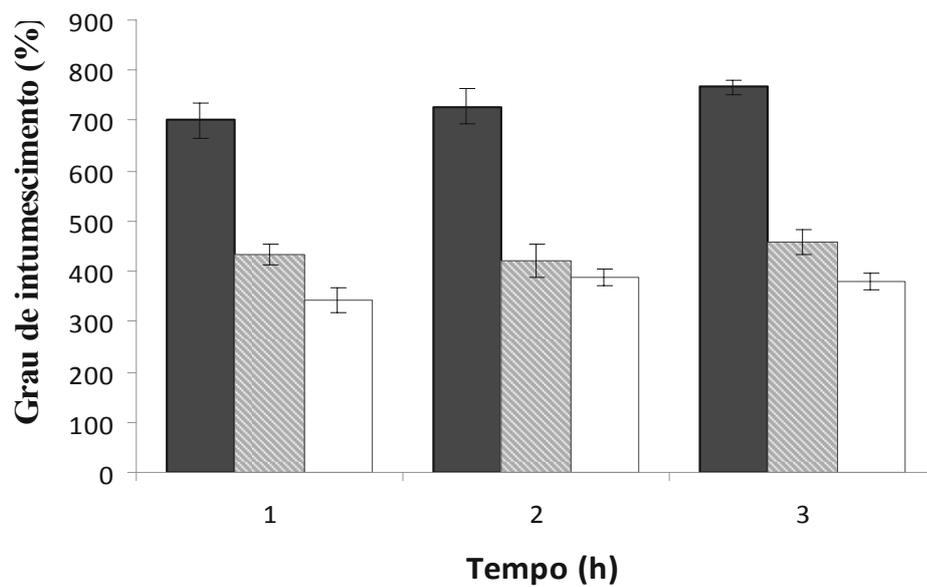


FIGURA 5.19 Efeito do grau de intumescimento de blendas de PVA /Qui (3:1) sem reticulante , com 0,5% de genipin  e com 1% de genipin .

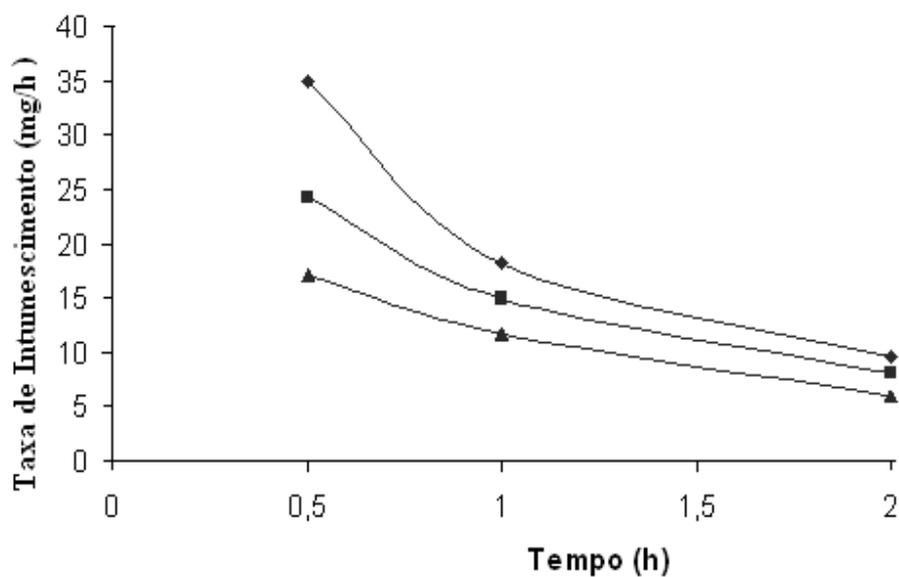


FIGURA 5.20. Efeito da taxa de intumescimento de blendas de PVA /Qui (3:1)  sem reticulante,  0,5% de genipin,  1% de genipin.

5.2.4. ENSAIO MECÂNICO

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

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

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

Relata-se que o grau de desacetilação da quitosana, o perfil de secagem do solvente, o uso de plastificantes e procedimentos de mistura podem influenciar conjuntamente todas as propriedades mecânicas dos materiais produzidos nestas condições. Isto é verificado na literatura para filmes de quitosana, que possuem valores de resistência à tração com uma

variação na faixa que vai de 1,4 a 50 MPa e valores de 3,5 a 115% para a deformação (Chielline *et al.*, 2001; Jin *et al.*, 2004; Costa, 2008).

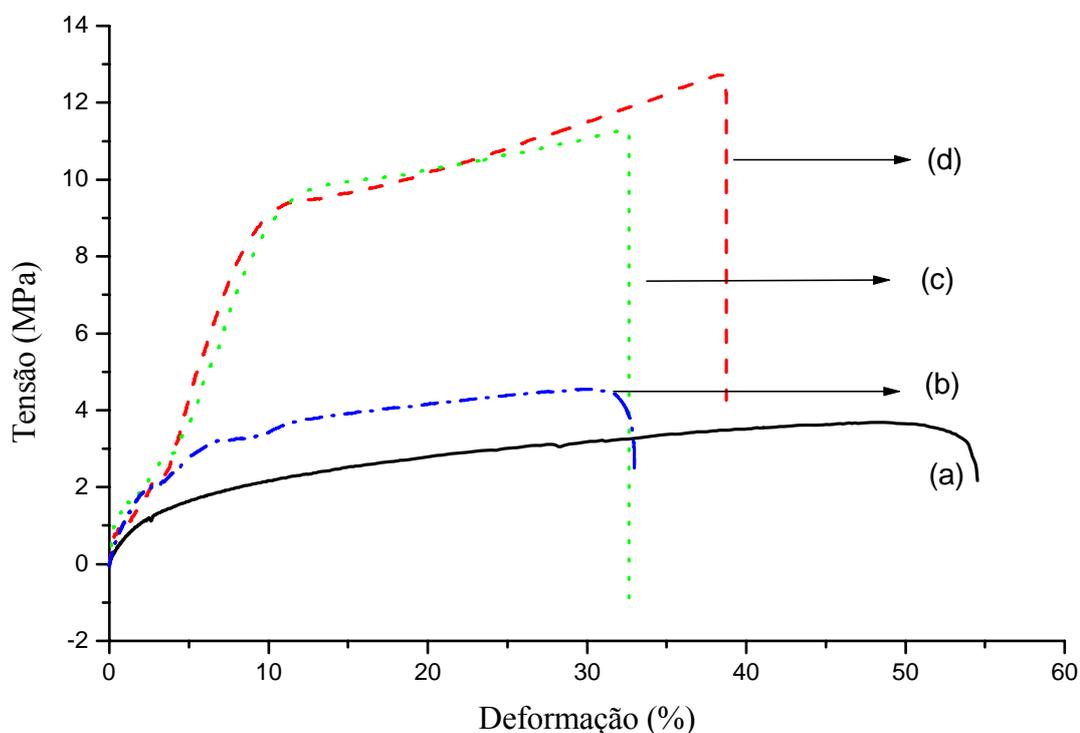


FIGURA 5.21. Tensão x deformação dos filmes (a) $\text{PVA/Qui/Ge}(1:0:0)$, (b) $\text{PVA/Qui/Ge}(3:1:0)$, (c) $\text{PVA/Qui/Ge}(1:3:0)$, (d) $\text{PVA/Qui/Ge}(0:1:0)$.

A Figura 5.22 apresenta valores de tensão máxima para os filmes $\text{PVA/Qui/Ge}(1:0:0)$, $\text{PVA/Qui/Ge}(3:1:0)$, $\text{PVA/Qui/Ge}(1:3:0)$, $\text{PVA/Qui/Ge}(0:1:0)$ produzidos sem agente reticulante e $\text{PVA/Qui/Ge}(1:0:1)$, $(3:1:1)$, $(1:3:1)$, $(0:1:1)$ com agente reticulante genipin. Os resultados indicam que tanto o aumento da porcentagem de quitosana nos filmes aumenta os valores de tensão máxima para qualquer concentração de reticulante nos filmes produzidos, quanto o agente reticulante genipin aumenta os valores de tensão máxima. Dessa forma, a tensão máxima pode ser modulada pela concentração de polímero quitosana e pelo agente de reticulação genipin. Assim, pode-se produzir materiais com propriedades

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

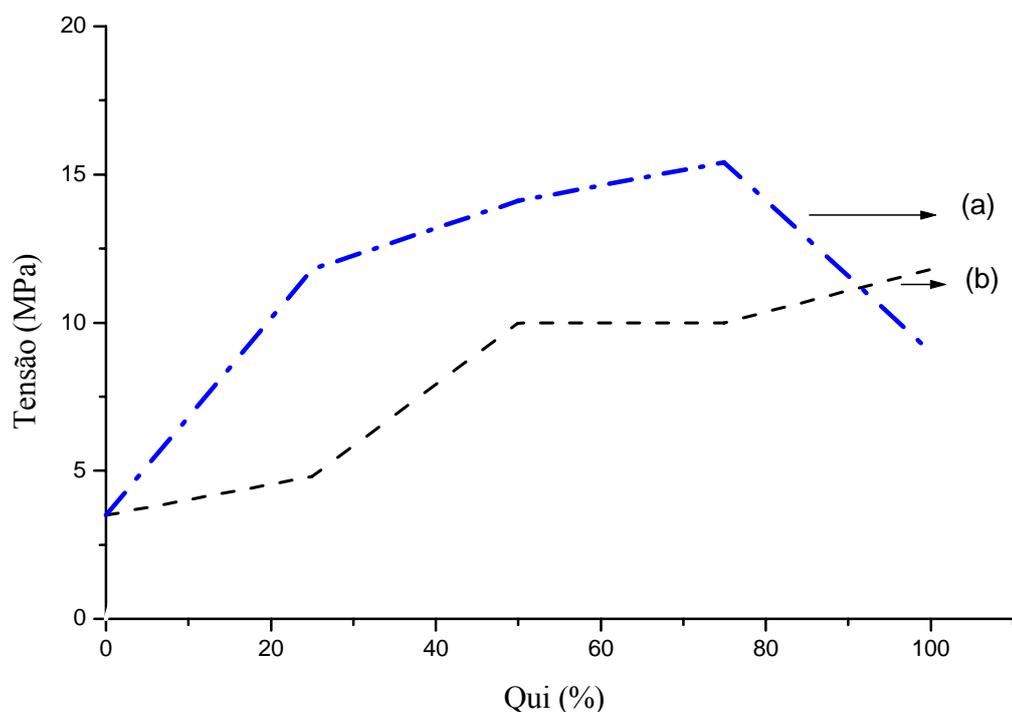


FIGURA 5.22 A influência da concentração de quitosana na tensão máxima dos filmes (a)reticulados-.-.-.-PVA/Qui/Ge(1:0:1), (3:1:1), (1:1:0), (1:3:1), (0:1:1). b) e sem reticulação - - - -PVA/Qui/Ge(1:0:0), (3:1:0), (1:1;0), (1:3:0), (0:1:0).

O comportamento do filme de PVA / Qui / Ge (0:1:1) é diferente dos outros filmes, apresentando descontinuidade no comportamento mecânico em relação a composição. Este fenômeno é apresentado também na Figura 5.23, mostrando que com um aumento do genipin o filme tornou-se mais frágil, reduzindo a tensão máxima. Isto ocorre pois as cadeias ficam imobilizadas numa proporção tão grande, que a força não consegue movimentar as cadeias sobre a outra, quando com menos reticulante, que acabam se rompendo. Este mesmo efeito de genipin é encontrado no trabalho de Jin e colaboradores (Jin *et al.*, 2004). Resultado semelhante é encontrado por Costa com quitosana e glutaraldeído (2008). Comportamento parecido também foi observado por Chiellini e colaboradores (2001), quando a concentração de glutaraldeído aumentou no filme de gelatina (Chiellini *et al.*, 2001; Costa, 2008; Monteiro, 2009).

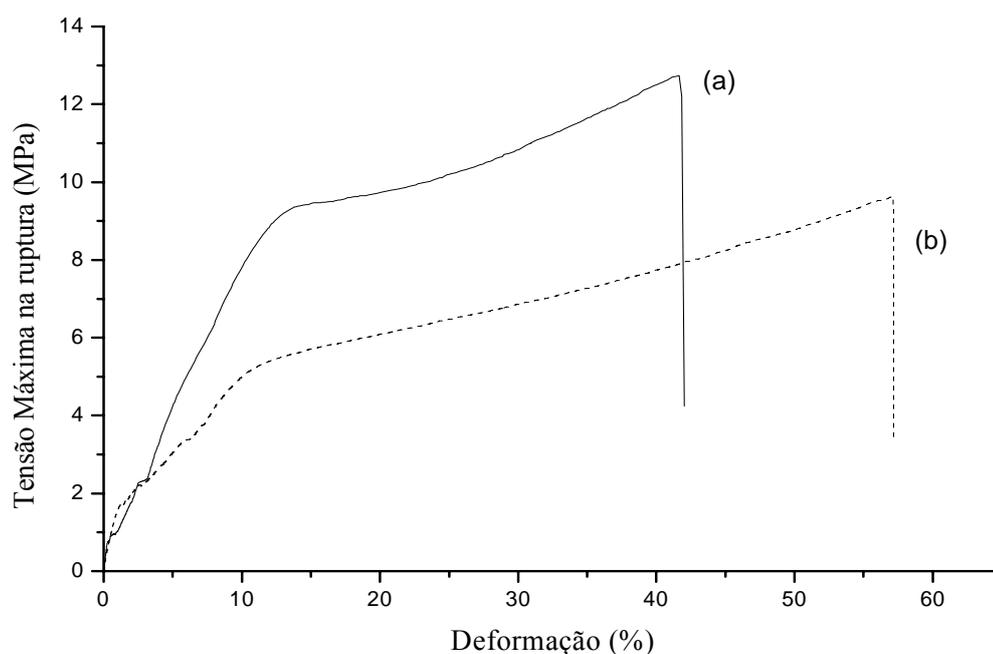


FIGURA 5.23 Gráfico da influência da concentração do reticulante na tensão máxima de tração dos filmes PVA/Qui/Ge (0:1:0) com 0% genipin (a) e PVA/Qui/Ge (0:1:1) com 1% de genipin (b).

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

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

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

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

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

Dessa forma a pele é considerada uma mistura de biopolímeros e outras substâncias (Harris, 2009). Dessa forma, as blendas de polímeros produzidas neste trabalho com diferentes características, assemelham às propriedades mecânicas da pele natural. A quitosana tem o efeito de aumentar a resistência do material e o PVA confere uma maior

maleabilidade aos filmes. A combinação destes polímeros nas blendas vêm modular as propriedades dos materiais e maior resistência pode ser conseguida com a adição do agente reticulante genipin.

Os valores do ensaio mecânico e os desvios padrão para as blendas são mostrados nas Tabelas 5.7, 5.8 e 5.9.

TABELA 5.7 Tensão máxima (MPa) e desvio padrão(dp) (médias para 6 amostras).

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

TABELA 5.8 Deformação total (elástica e plástica) (%) e desvio padrão(médias para 6 amostras).

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

TABELA 5.9 Módulo de elasticidade e desvio padrão (médias para 6 amostras).

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

É possível observar dos resultados que a blenda (1:1) e (1:3) tiveram valores que parecem desviar dos resultados dos outros filmes. Isto pode ocorrer porque as blendas com secagem rápida formam regiões com aglomerações de quitosana e PVA. Os acetatos tendem a se aglomerarem formando regiões mais hidrofóbicas e as hidroxilas e aminas por serem mais hidrofílicas formam outra região que tendem a interagir por ligações de hidrogênio. Isto pode fazer com que o filme apresente comportamento mecânico diverso do esperado por causa da separação de fases. O material apresenta-se heterogêneo e cada fase apresenta um comportamento mecânico predominante que afeta o comportamento total do material. Estas regiões são mostradas na Figura 5.23.

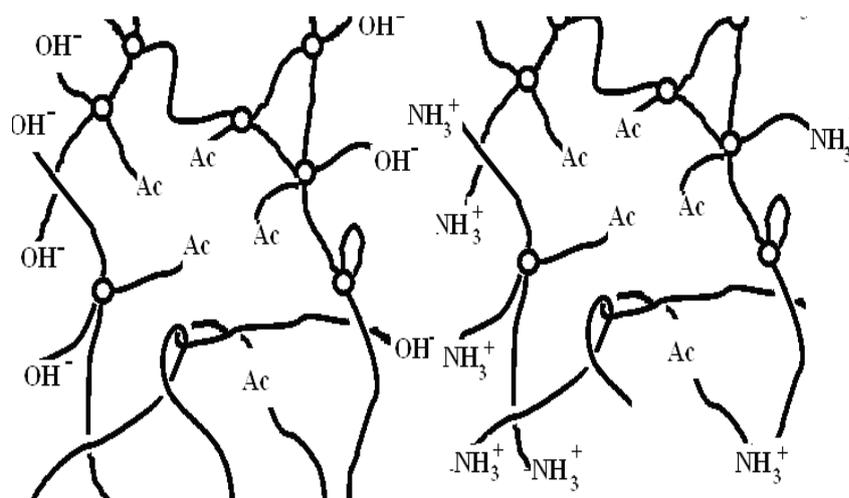


FIGURA 5.23 A formação de aglomerados nos filmes de quitosana e PVA.

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

5.2.5. DETERMINAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO NOS FILMES

O aumento do ângulo de contato com o aumento da concentração de quitosana é devido a maior hidrofobicidade do filme de quitosana e das blendas em relação ao filme de PVA. O aumento do ângulo de contato indica um aumento na hidrofobicidade da superfície (Souza, 2008). O ângulo de contato, para o filme de PVA é de $\theta = 65 \pm 3^\circ$ que é mostrado na Figura 5.24, é menor que o ângulo encontrado para a quitosana pura provavelmente devido ao balanço entre as quantidades de C-O e OH que o torna hidrofílico e solúvel em água. Os grupos polares na quitosana podem não ser capazes de se orientar na superfície e podem exibir forte ligação de hidrogênio intramolecular e intermolecular abaixo da superfície do filme. Por outro lado, o PVA é uma molécula linear e tem estrutura bidimensional. Hamilton (2006) apresenta para a quitosana com grau de desacetilação de 79% ângulos de contato de $(73 \pm 1,9)^\circ$. Neste trabalho foi obtido o valor próximo a 80% semelhante ao obtido por Costa, para a quitosana com GD de 76%, com valor de ângulo de contato de $78 \pm 4^\circ$ (Mansur, 2007; Ratner *et al.*, 2005; Hamilton, 2006).

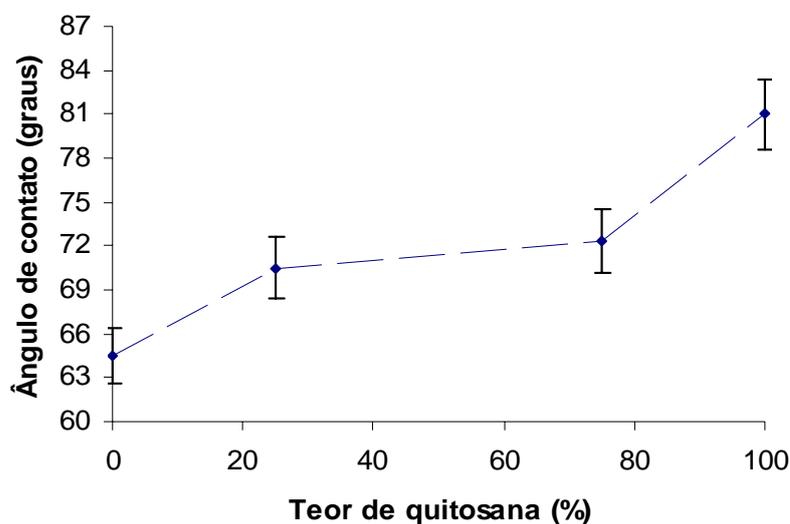


FIGURA 5.24 Ângulo de contato em relação ao teor de quitosana nos filmes.

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

A viabilidade celular foi medida por MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e representa a atividade das enzimas mitocondriais presentes na célula capazes de reduzir o MTT. Neste estudo, o teste de viabilidade foi medida no intervalo de 24h após a sementeira da célula. A capacidades matrizes de Qui / PVA para apoiar a viabilidade e proliferação mostrou que estas amostras avaliadas apresentaram biocompatibilidade comparáveis, para amostras não reticuladas por genipin e reticuladas, Fig.5.25 e Fig.5.26 respectivamente.

Foi possível observar na Fig.5.25 números variados de viabilidade celular em um intervalo relativamente amplo (em comparação com células VERO controle como 100%), utilizou-se para análise dos dados o método ANOVA ($p < 0,05$; $n \geq 4$). Pode-se inferir com os resultados que todas as matrizes produzidas mostram-se promissoras para serem testados em ensaios *in vivo*. Testes de citotoxicidade utilizando culturas de células foram aceitas como o primeiro passo na identificação de compostos ativos e para os testes de biossegurança. Verificou-se neste estudo que as células possuem viabilidade celular de aproximadamente 105% sem reticulação. Já para as amostras reticuladas com 1% de genipin observou-se que a viabilidade celular chegou a valores aproximados de 140%, e os valores mínimos para filmes reticulados foram de 80%.

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

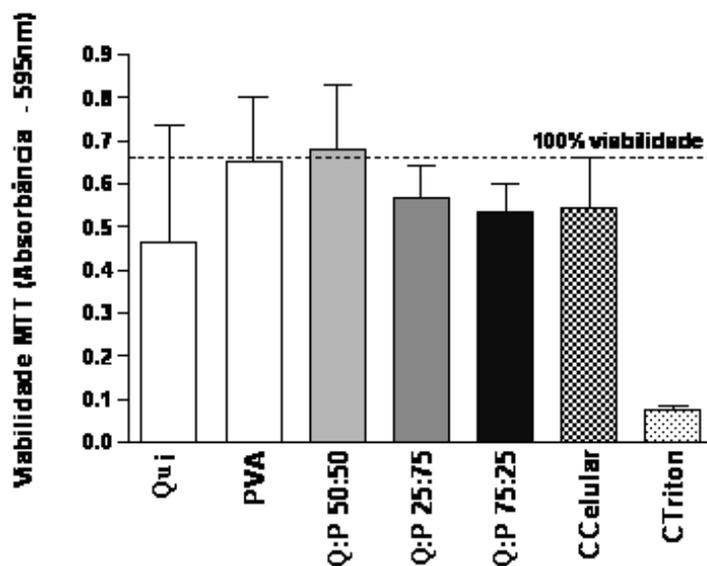


FIGURA 5.25. Compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) (0:1:0); (b) (1:0:0) (1:3:0,5); (c) (1:1:0), (d) (1:3:0), (e) (3:1:0)

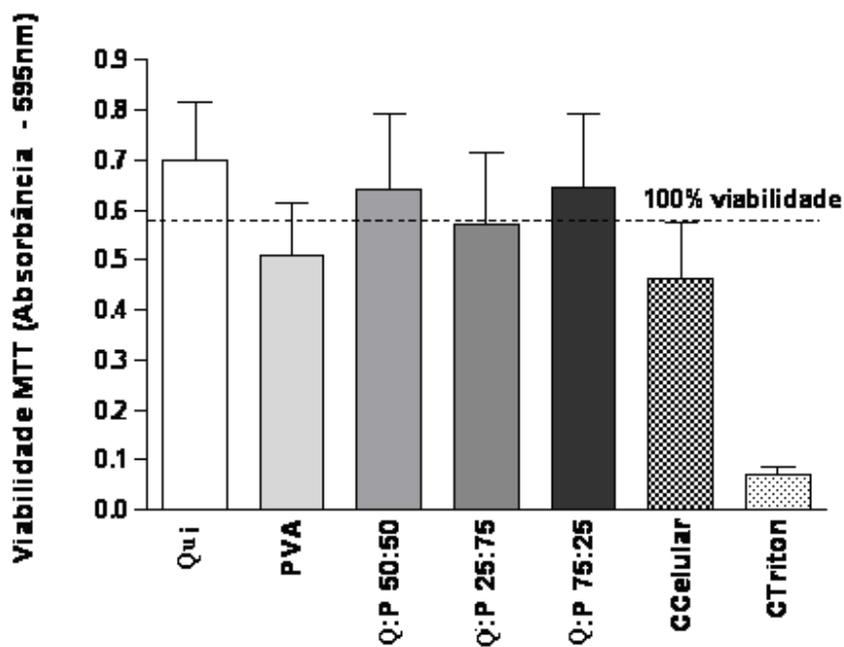


FIGURA 5.26. compatibilidade relativa de filmes PVA/Qui/Ge (a) Ge (a) (0:1:1); (b) (1:0:1) (1:3:1); (c) (1:1:1), (d) (1:3:1), (e) (3:1:1)

Nas Figuras 5.27, 5.28 e 5.29 observa-se manchas de coloração escura em vários pontos da microscopia óptica. Estas manchas referem-se aos cristais de tetrazólio e formazana produzidas por enzimas mitocondrias. Quanto maior a formação destes cristais maior a atividade mitocondrial e assim pode-se verificar a viabilidade celular. As regiões claras dentro destas manchas com forma arredondada é o núcleo das células. Observa-se uma diferença na quantidade destas manchas escuras, que são os cristais formados pela redução do MTT. A Figura 5.27 (b) possui um maior número destes cristais formados e ele representa o filme de quitosana pura reticulado com 1% de genipin, enquanto a Figura 5.27 (a) representa a quitosana pura sem reticulação. Mostrando a microscopia um aumento na viabilidade celular com o acréscimo de genipin. Assim materiais com genipin mostraram maior proliferação celular.

Na Figura 5.28 para PVA puro com e sem reticulação verificou-se por microscopia óptica um grande número de cristais formados. Tanto o filme com e sem genipin mostraram viabilidade celular. A viabilidade celular destes filmes mostrou-se semelhante por microscopia óptica.

Na Figura 5.29 (a) apresenta a microscopia óptica da blenda PVA/Qui/Ge (1:1:0) sem genipin e a Figura 5.29 (b) a blenda PVA/Qui/Ge (1:1:1) contendo genipin. A Figura 5.29 (b) contém um maior número de cristais, indicando um aumento na formação dos cristais e na viabilidade celular com a adição de genipin na blenda. O mesmo resultado pôde ser verificado nas Figuras 5.25 e 5.26 que mostram dados quantitativos de viabilidade celular para os diferentes filmes produzidos.

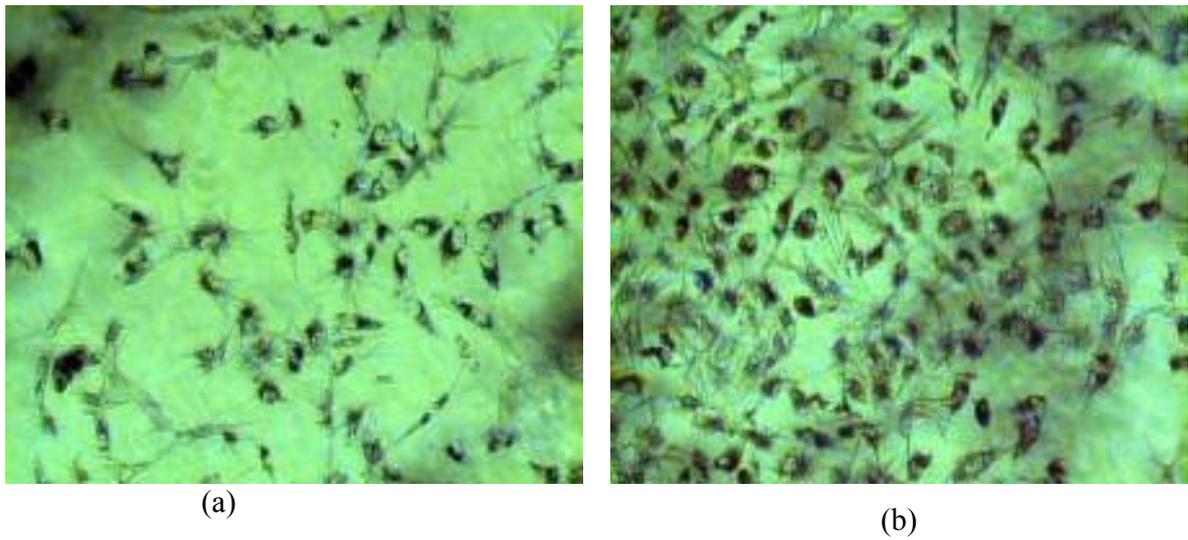


FIGURA 5.27. Registro por microscopia óptica de MTT do filme de quitosana (a) (0:1:0) sem genipin (b) (0:1:1) com genipin(100x).

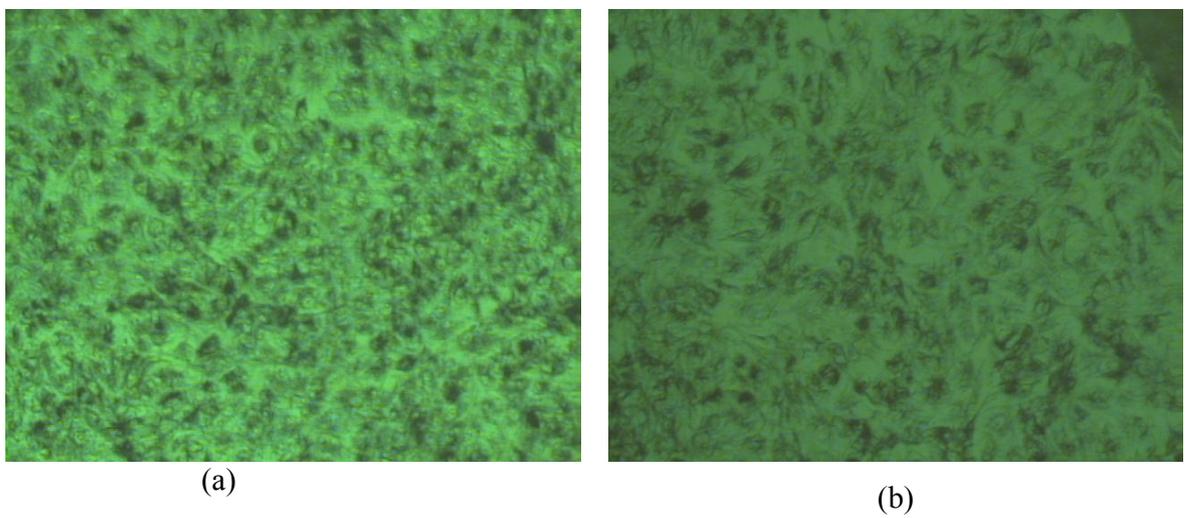


FIGURA 5.28. Registro por microscopia óptica de MTT do filme de PVA (a) (1:0:0) sem genipin (b) (1:0:1) com genipin 100x.

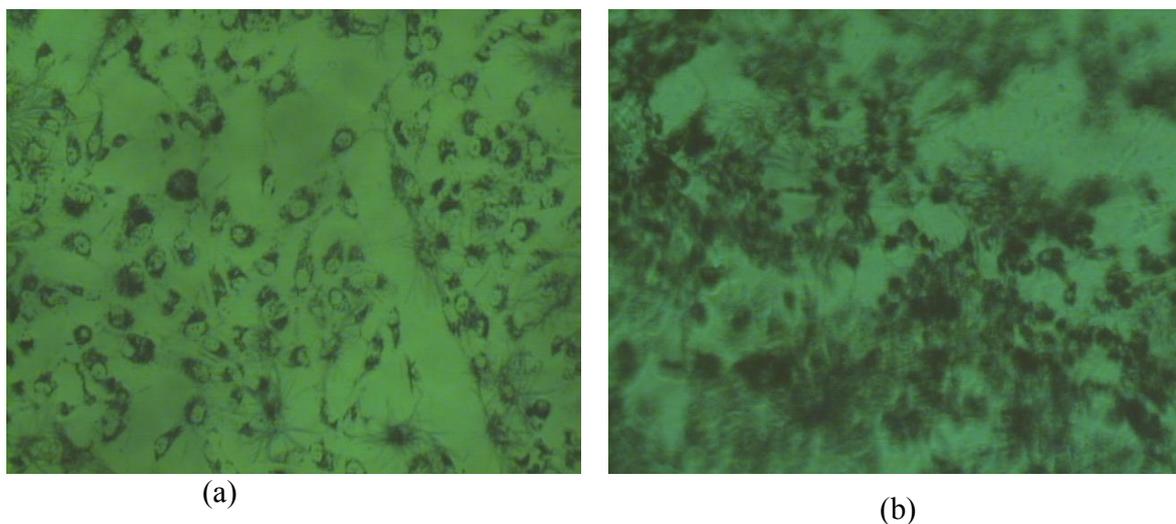


FIGURA 5.29. Registro por microscopia óptica de MTT do filme de PVA (a) (1:1:0) sem genipin (b) (1:1:1) com genipin 100x.

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

5.6 Biocompatibilidade através ensaio de adesão celular e espalhamento

A proliferação celular e o crescimento foram avaliados através de adesão e espalhamento, sendo a morfologia geral observada por imagens típicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), que são observadas nas Figura 5.30, 5.31, 5.32, 5.33, 5.34, 5.35. Pode-se notar que as células VERO semeadas na matriz apresentaram boa aderência e espalhamento. Observou-se nos materiais a morfologia das células, que apresentou-se regular para esta linhagem fibroblástica. Assim, ligação celular, adesão e espalhamento ocorreram nos materiais e estes fenômenos constituem a primeira fase da interação das células com o material. A qualidade desta fase irá influenciar a proliferação e diferenciação de células em superfícies de biomateriais.

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

Segundo a literatura, espalhamento de células é geralmente dividido em três níveis de interação principais: (a) não se espalhou: as células foram ainda esférico na aparência, saliências ou lamelipodio ainda não foram produzidos, (b) parcialmente distribuídos: nesta fase, as células começaram a espalhar-se lateralmente em um ou mais lados, mas as extensões da membrana plasmática foram não completamente confluentes e (c) totalmente propagado. O último modelo (c) representaria o melhor resultado para a pilha de material de hospedagem (Muzzarelli e Muzzarelli, 2002; Suh, 2000, Dunn, 1995; Yeo, 2004; Bose, 2002; Hannah, 2005; Costa , 2008).

A linhagem celular (VERO) usado como modelo nesta pesquisa foi escolhida porque desempenha um papel na produção de muitos dos componentes essenciais do tecido conjuntivo, por exemplo, componentes extracelulares, tais como glicosaminoglicanos e colágeno. Promover a inserção de células fibroblásticas ajudaria na integração do tecido conjuntivo e o implante, melhorando a vascularização na superfície do implante e diminuindo a chance de encapsulamento fibroso. Em resumo, a adesão celular e o espalhamento são de vital importância na vida biológica e estes processos estão envolvidos

em vários fenômenos naturais, tais como a manutenção da estrutura dos tecidos, cicatrização, resposta imune, e da integração tecidual dos biomateriais (Dunn, 1995; Yeo, 2004; Bose, 2002; Hannah, 2005; Costa 2008).

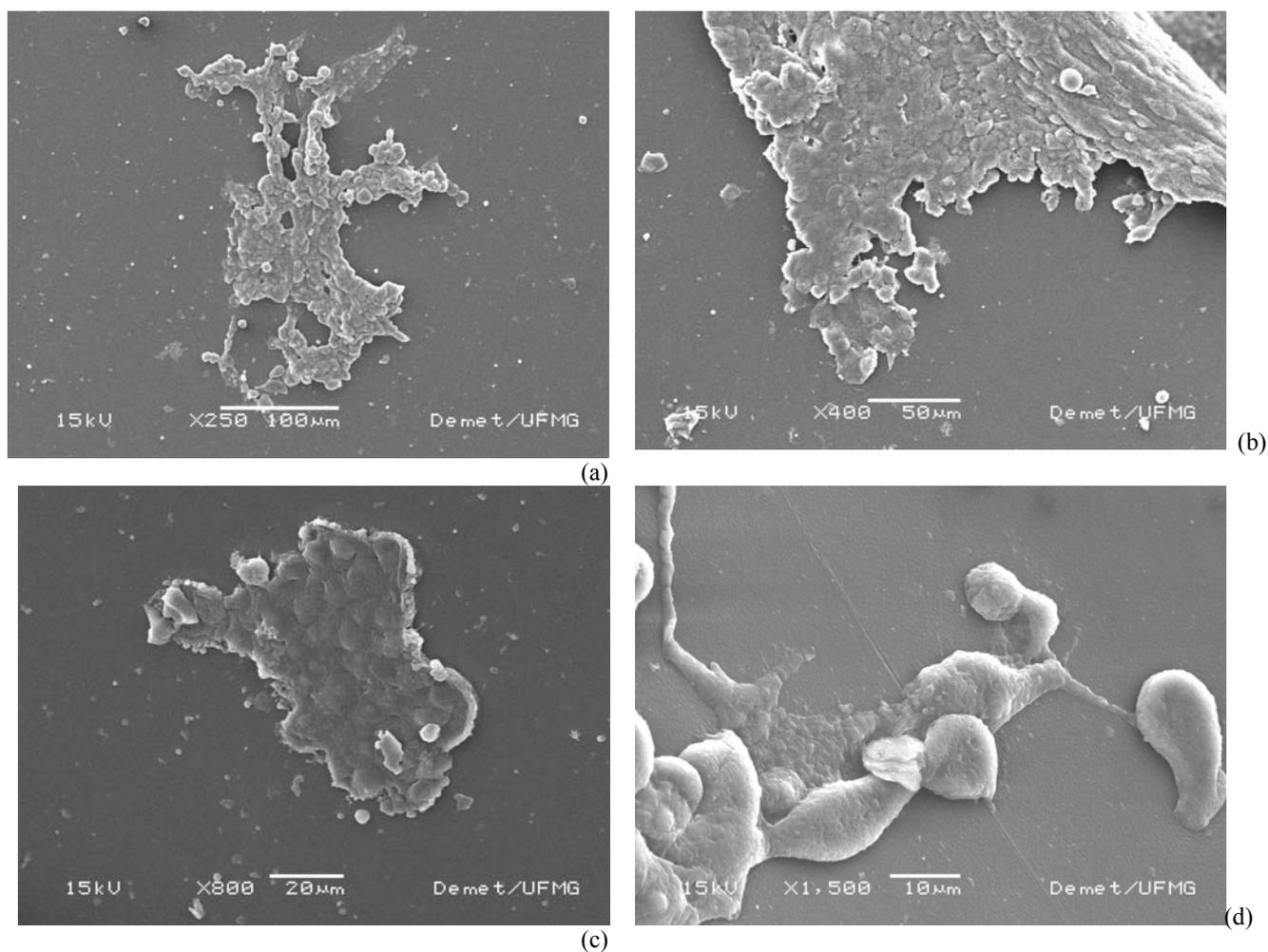


FIGURA 5.30 – Adesão de células VERO semeadas em matrizes de quitosana sem genipin (a) PVA/Qui/Ge (0:1:0) aumento de 250x; (b) PVA/Qui/Ge (0:1:0) ampliação de 400x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:0) ampliação de 800x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:0) ampliação de 1500x

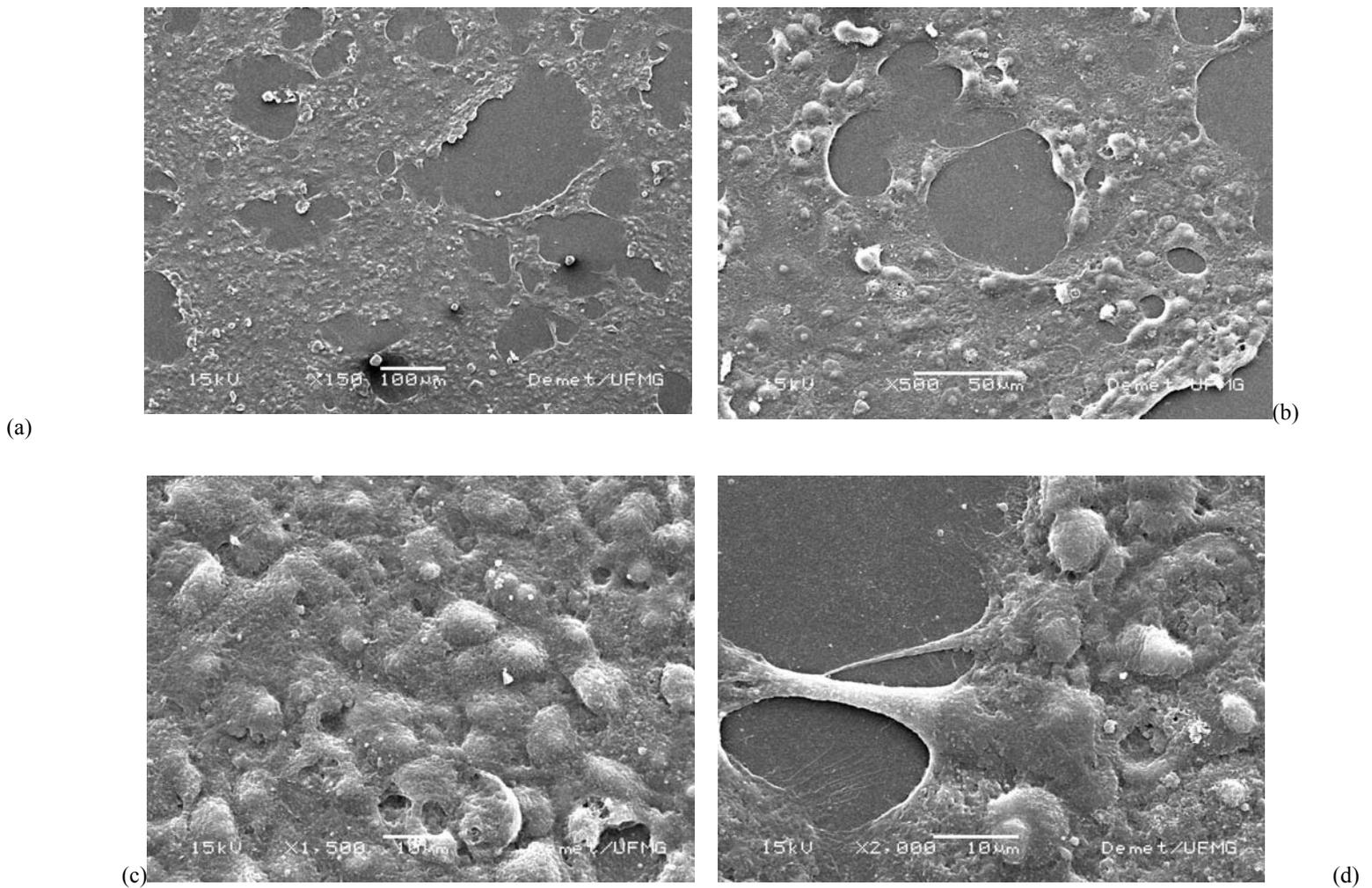


FIGURA 5.31 – Adesão de células VERO semeadas em matrizes de quitosana reticuladas com genipin (a) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 500x (c) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (0:1:1) ampliação de 2000x.

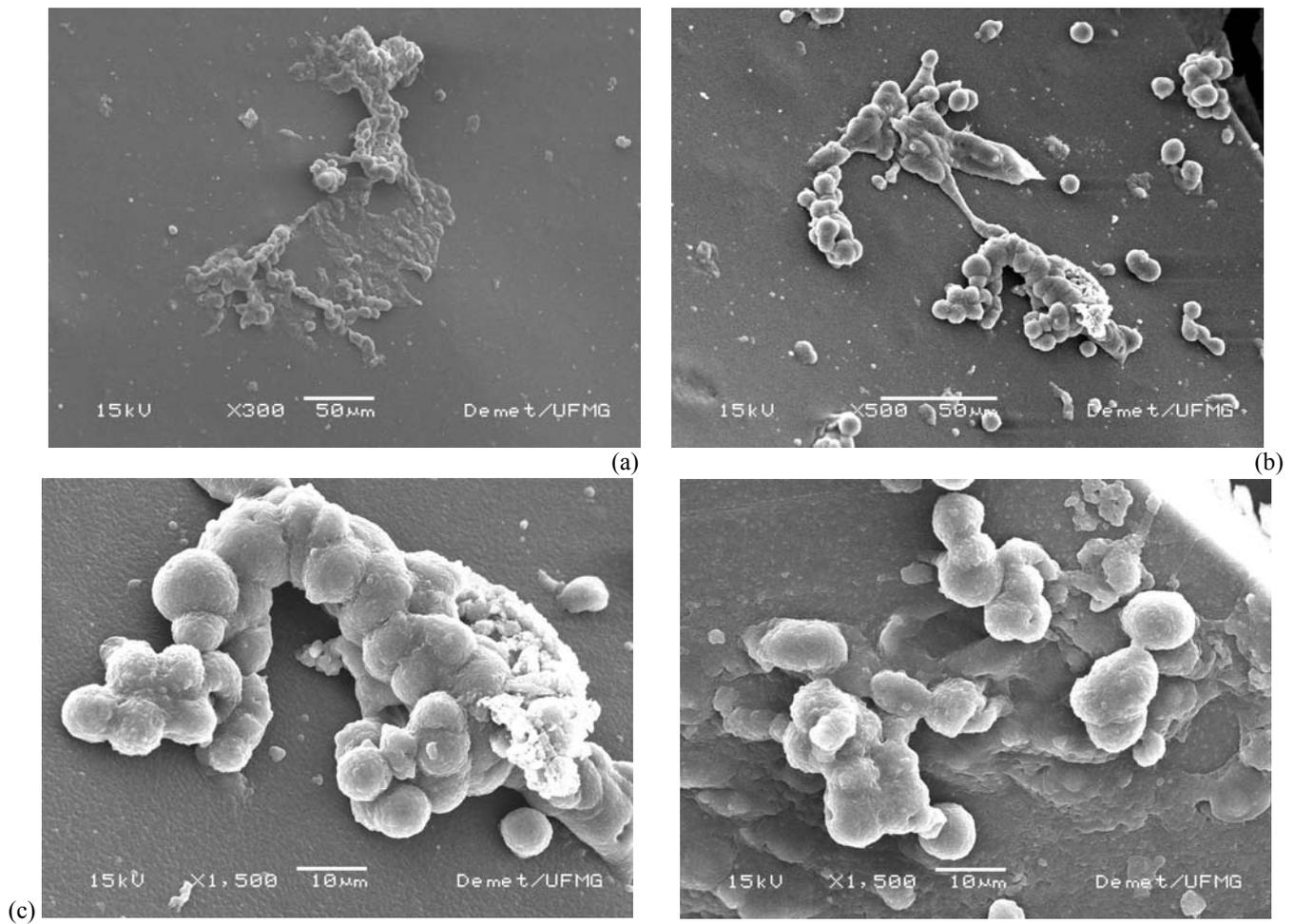


FIGURA 5.32 – Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana sem genipin (a) PVA/Qui/Ge (1:3:0) ampliação de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:0) ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (1:3:0) ampliação de 2000x.

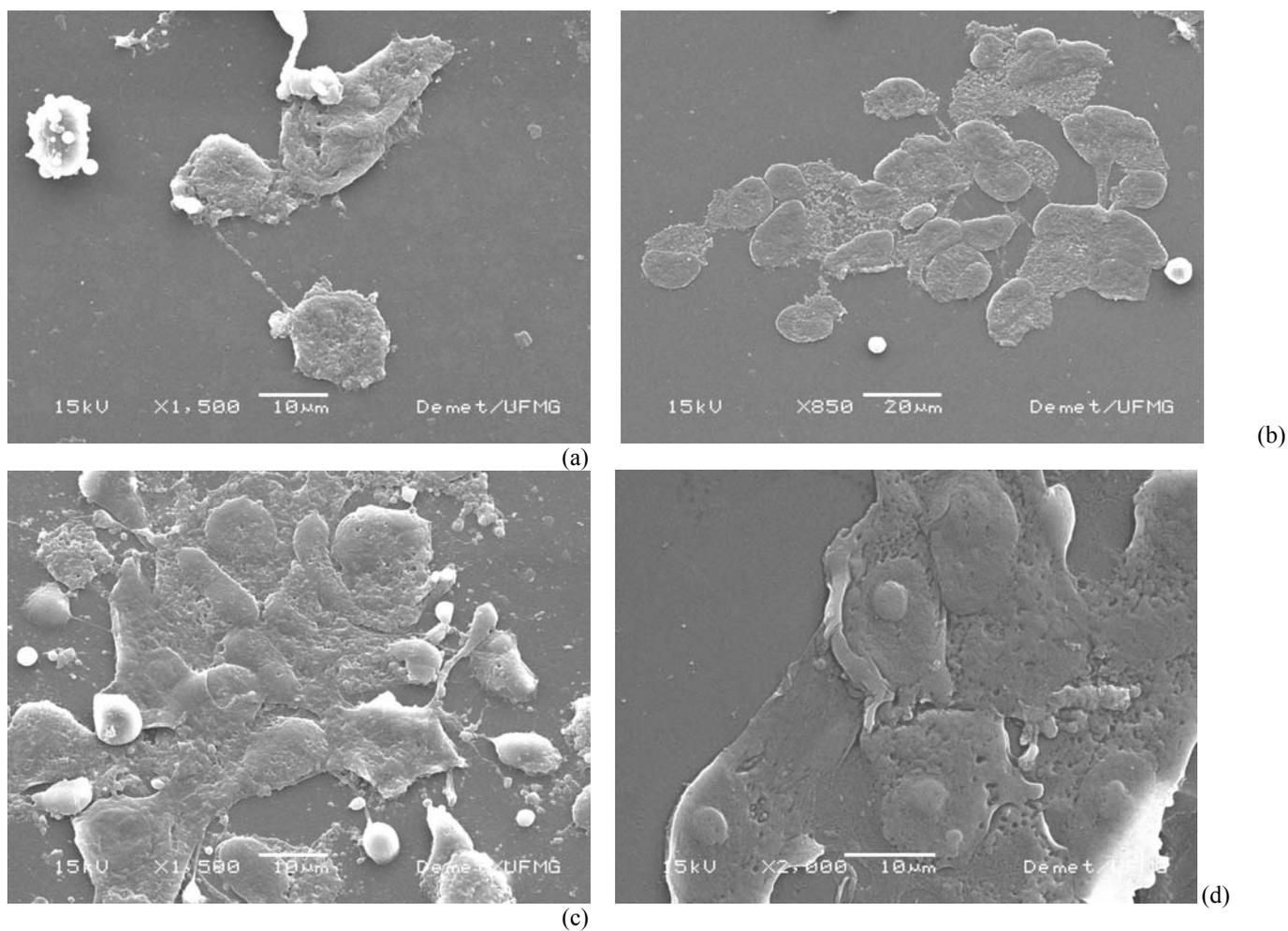


FIGURA 5.33– Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana com genipin (a) PVA/Qui/ (1:3:1) ampliação de 300x; (b) PVA/Qui/Ge (1:3:1) ampliação de 500x (c) PVA/Qui/Ge (1:3:1) ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (1:3:1) ampliação de 2000x.

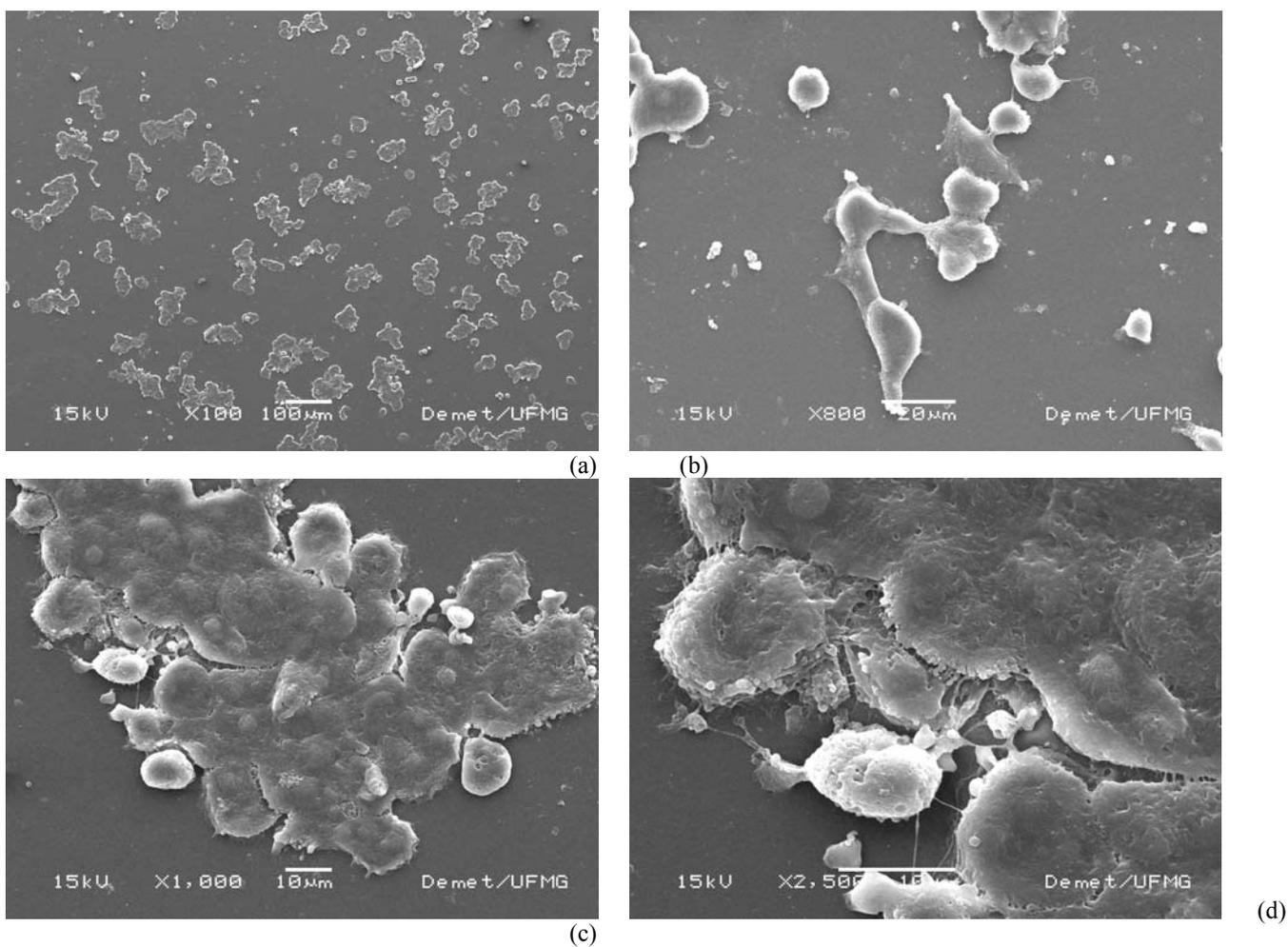


FIGURA 5.34 – Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana sem genipin (a) PVA/Qui/ (3:1:0) ampliação de 100x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:0) ampliação de 800x (c) PVA/Qui/Ge (3:1:0)ampliação de 1000x e (d) PVA/Qui/Ge (3:1:0)ampliação de 2500x.

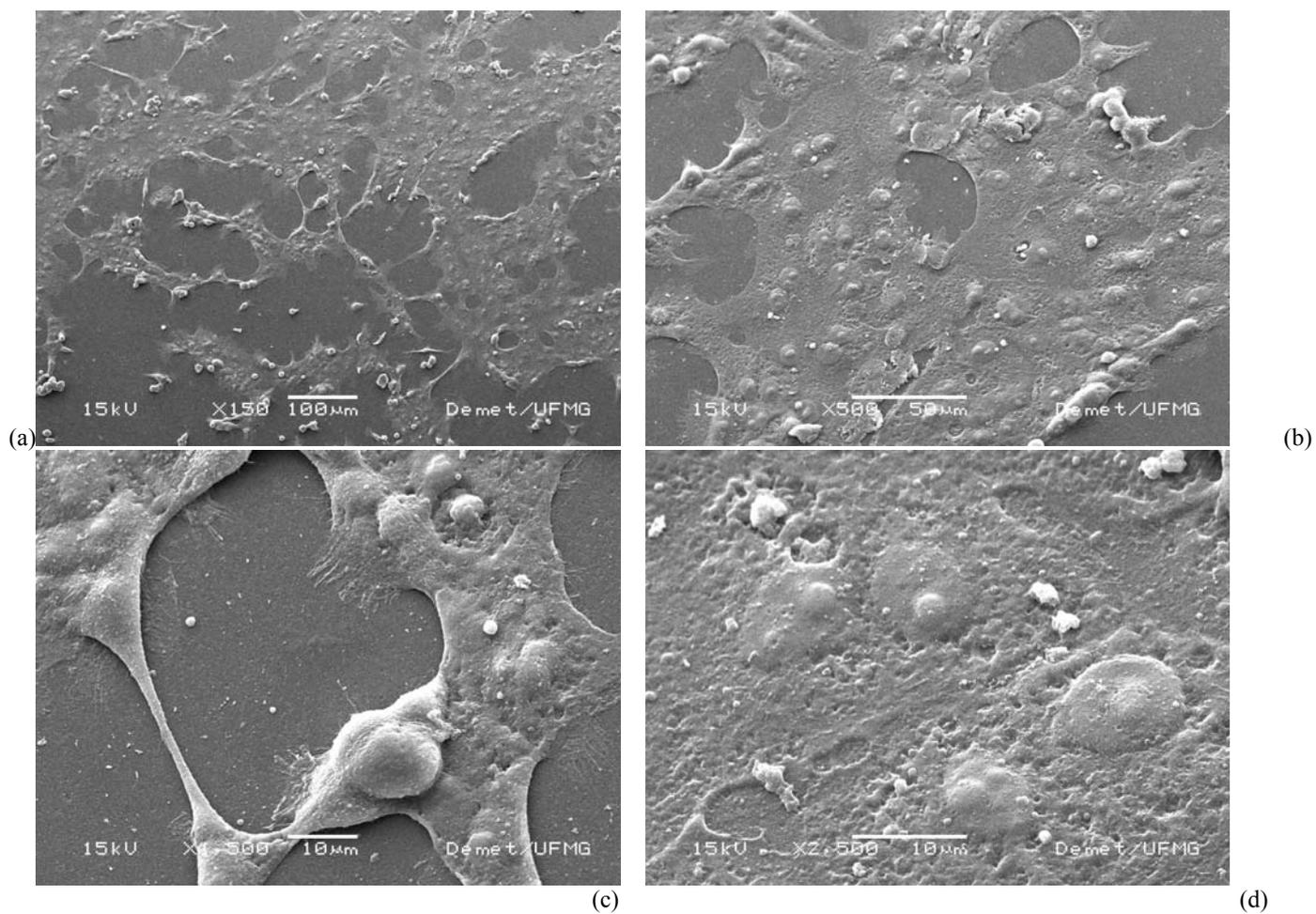


FIGURA 5.35 – Adesão de células VERO semeadas em matrizes de PVA e quitosana com genipin (a) PVA/Qui/ (3:1:1) ampliação de 150x; (b) PVA/Qui/Ge (3:1:1) ampliação de 500x (c) PVA/Qui/Ge (3:1:1)ampliação de 1500x e (d) PVA/Qui/Ge (3:1:1)ampliação de 2500x.

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

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

6. CONCLUSÃO

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

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

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

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

Os dados obtidos indicam que o genipin melhorou nos materiais a biocompatibilidade, a adesão e espalhamento das células. Além disso, os sistemas avaliados provaram ser

apropriados como potenciais biomateriais no reparo do tecido epitelial, com relação ao grau de intumescimento, às propriedades mecânicas e biocompatibilidade.

Observou-se que os melhores resultados gerais para intumescimento, mecânico, de viabilidade celular, adesão e espalhamento foram para os filmes PVA/Qui/ (0:1:1), PVA/Qui/ (1:3:1), PVA/Qui/ (1:1:1); PVA/Qui/ (3:1:1), PVA/Qui/Ge (3:1:0). Estes apresentaram propriedades que os assemelham ao tecido epitelial tanto na hidrofiliade, quanto características de tensão máxima na ruptura e viabilidade celular. Estes filmes podem ser considerados os mais promissores dentre os estudados para serem utilizados como tecido epitelial artificial.

7 CONTRIBUIÇÕES ORIGINAIS AO CONHECIMENTO

7.1 ARTIGOS SUBMETIDOS

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

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

7.2 TRABALHOS COMPLETOS EM CONGRESSOS NACIONAIS

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

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

Viviane Mota Bispo ; Mansur, A.A.P. ; Mansur, H. S. FTIR and Swelling of Chemically Crosslinked Chitosan Films. In: 11th International Conference on Advanced Materials (ICAM2009), 2009, Rio de Janeiro-RJ, 1, 91 (2009).

TRABALHOS FUTUROS

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

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

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

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

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

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

REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

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

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

Batyrbekov, E. O.; Iskakov, R. & Zhubanov, B. A. — Makromol. Symp., **127**, 251 (1998).

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

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

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

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

Beumer G. Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an in vivo evaluation. *J Biomed Mat Res*, **28** (5),545-52 (1994).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Burke JF, Yannas IV, Quinby WC, Bondoc CC, Jung WK. Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. *Ann Surg*, **1** (4), 194 (1981).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Edmunds, H. L; *The Sangreal*. Editorial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **90**, 1-6, (1985).

Fazio MJ, Zitelli JA, Goslen JB. Cicatrização de feridas. In: Coleman III WP, Hanke CW, Alt TH, Asken S. *Cirurgia Cosmética - Princípios e Técnicas*. 2.ed. Revinter, Rio de Janeiro, (2000).

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

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

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

Flory P. J.: Rubber Elasticity. 'Principles of Polymer Chemistry'. Cornell University Press, Ithaca, 432-493 (1953).

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

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

Gehrke S. H.: Synthesis and Properties of Hydrogels used for Drug Delivery. 'Fundamental Aspects of Polymers in Pharmaceutics'(eds.: Gordon L.A., Ping I. L., Elizabeth M.T.) Marcel Dekker, New York, 473-507 (2000).

Gehrke, S.H. Syntesis and Proprieties of Hydrogels for Drug Delivery." *Fundamental Aspects of Polymers in Pharmaceutics*. Marcel Dekker Press, New York, (2000).

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

Greenwood, N.N. Earnshaw, A.: *Chemie der Elemente*, VCH Verlagsgesellschaft, 1. Auflage, (1988).

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

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

Hamilton, V. Characterization of chitosan films and effects on fibroblast cell attachment and proliferation. *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, **17**,1373-1381 (2006).

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

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

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

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

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

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

Huang, Y. *et al.*. *In vitro* characterization of chitosana-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials*, **26**, 7616-7627, (2005).

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

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

ISO document 10 993-5. Biological evaluation of medical devices, Part 5, Tests for cytotoxicity: in vitro methods (1992).

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

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

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

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

Kong, Lijun; Ao, Qiang; Wang, Aijun; Gong, Kai;Wang, Xi; Lu,Guangyuan; Gong, Yandao; Zhao, Nanming e Zhang Xiufang.. Preparation and characterization of a multilayer biomimetic scaffold for bone tissue engineering. *J Biomater Appl.*, **22**(3), 1-18 (2007).

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

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

- Lane, N. *Oxygen - the molecule that made the world*. Oxford Univ. Press, Oxford, (2003).
- Langer, R. *Desinging materials for biology and medicine*. *Nature*, **428**, 487-492, (2004).
- Lee, J.S.; Woo, J.; Kim, Jung, H.; Pyun, D.; Park, M.H.; Yoon, Taek, R.; Lee, H.; Kuroyanagy, Y. Preparation of wound dressing using hydrogel polyurethane foam. *Trends biomater. Artif. Organs* **15**(1),4-6 (2001).
- Lee, W.K. Tchi, T., Ooya, T., Yamanoti, T. Katoh, M., Yui, N. Novel poly (ethylene glycol) scaffolds crosslinked by hydrolysable polyrotaxane for cartilage tissue engineering. *J.Biomed. Mater. Res. Part A*, **67**(40), 1087-1092 (2003).
- Lenza, R.F.S.; Jones, J.R.; Vasconcelos, W.L.; Hench, L. L. Surface-modified 3d scaffolds for tissue engineering. *Journal Mat. S.*, **13**, 837-842, (2002).
- Li Y., Du Y., Tang Y., Wang X.: pH sensitive chitosan/gelatin hybrid polymer network scaffold for tissue engineering. *Polymer International*, **58**, 1120-1125 (2009).
- Liang H. C., Chang W. H., Lin K. J., Sun H. W.: Genipin-crosslinked gelatin microspheres as a drug carrier for intramuscular administration: In vitro and in vivo studies. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, **65**, 271 – 282 (2003).
- Lima S. I.: 'Quitosanas e Quitosanas Química e Morfologicamente Modificadas com Anidrido Succínico-Propriedades, Adsorção e Termoquímica'. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, (2005).
- Liu, B. S.; Yao, C. H. e Hsu, S.H.. A Novel Use of Genipin-fixed Gelatin as extracellular Matrix for Peripheral Nerve Regeneration. *Journal of biomaterials Applications*, **19**(1), 21-34 (2004).
- Liu, H. *et al.*. Porous poly(DL-lactic acid) modified chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering. *Journal of Biomaterial Applications*, **19**, 303-322 (2005).

Liu, J. H.; Chung, Y. C. & Li, M. T. — Preparation of amphiphilic membranes using photosensitive polymers and their applications on the enzyme electrode. *J. Appl. Polym. Sci.*, **55**, 1441 (1995).

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

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

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

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

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

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

Mansur, H.S., Costa, H.S. Nanostructured Poly(Vinyl Alcohol)Bioactive Glass and Poly(Vinyl Alcohol)/Chitosan/Bioactive Glass Hybrid Scaffold for Biomedical Application, *Chemical Engineering Journal*, **137**, 72-83(2008).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Neren, R.M. Tissue Engineering in USA. *Medical and Biological Engineering and Computing*. **30**(4), CE8-CE12 (1992).

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

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

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

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

Okaya, T.; Suzuki, A. & Kikuchi, K. Coll. And Surf. A: Physicochem and Eng. Asp., **153**, 123 (1999).

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

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

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

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

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

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

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

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

Peirce, E.C.,II – Extracorporeal Circulation for Open-Heart Surgery. Charles C. Thomas, Springfield, 1969.

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

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

Puzari, J.B. Baruah / *Reactive & Functional Polymers* 46 101 –107 (Reação de polimerização), 2000.

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

Rinaudo, M.; Domard, A.; *In Chitin and Chitosan*; Brine, C. J.; Stanford, P.A.; Zikakis, J. P., Ed.; Elsevier Applied Sciences; London, 1989, p 71.

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

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

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

Sharma, C. P. Blood-Compatible Materials: A Perspective. *J Biomater Appl.*, vol. 15; p.359, 2001.

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

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

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

Shin, H.; Jo, S. e Mikos, A. G. Biomimetic materials for tissue engineering. *Biomaterials*, vol.24, p.4353, 2003.

Silva, M.H.P. Apostila de Biomateriais. [Http://mesonpi.catcbpf/e2006/posgraduacao/pdf](http://mesonpi.catcbpf/e2006/posgraduacao/pdf) >em junho de 2007.

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

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

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

Sohn, V.Y; Eckert, M.J.; Martin, M.J.; Arthurs, Z.M.; Perry, J.R.; Beekley, A.; Rubel, E.J.; Adams, R.P.; Bickett, G.L. Rush, R.M J. Efficacy of Three Topical Hemostatic Agents

Applied by Medics in a Lethal Groin Injury Model. *Journal of Surgical Research*, **154** (2), 258-261(2009).

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

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

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

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

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

Toyuama, R.; Takeda, Y.; Inoue, K.; Kawamura, I.;Yatsuzuka,M.; Ikumoto, T.; Shingu, T.;Yokoi, T.; Inouye, H. Studies on the blue Pigments Produced from Genipin and Methylamine. I. Structures of the Brownishe-Red, Pigments, Intermediates Leading to the blue Pigments. *Chem. Pharm. Bull.*, **42**(3),668-673 (1994).

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

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

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

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

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

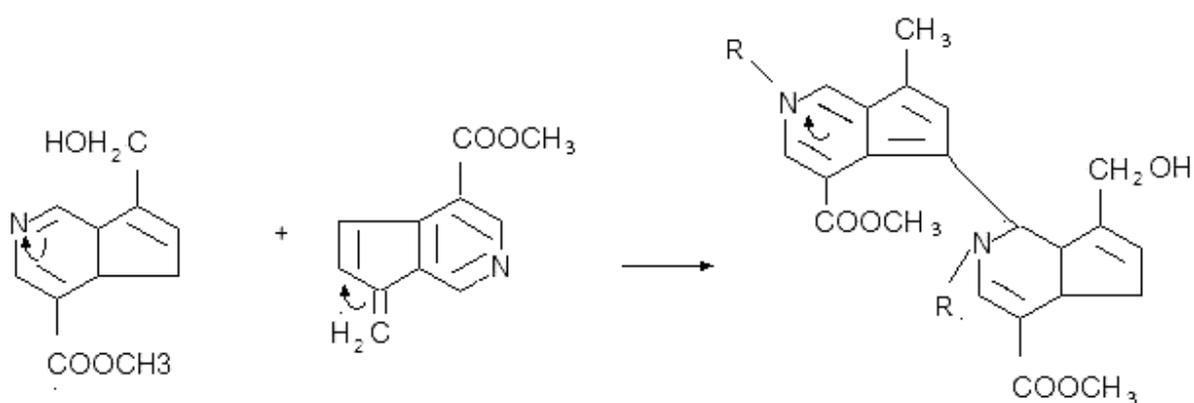
APÊNDICE :**REAÇÕES COM GENIPIN**

Figura 1 (Apêndice). Formação de dímero através de reações entre moléculas de genipin após ataque nucleófilo de composto contendo grupo amina.

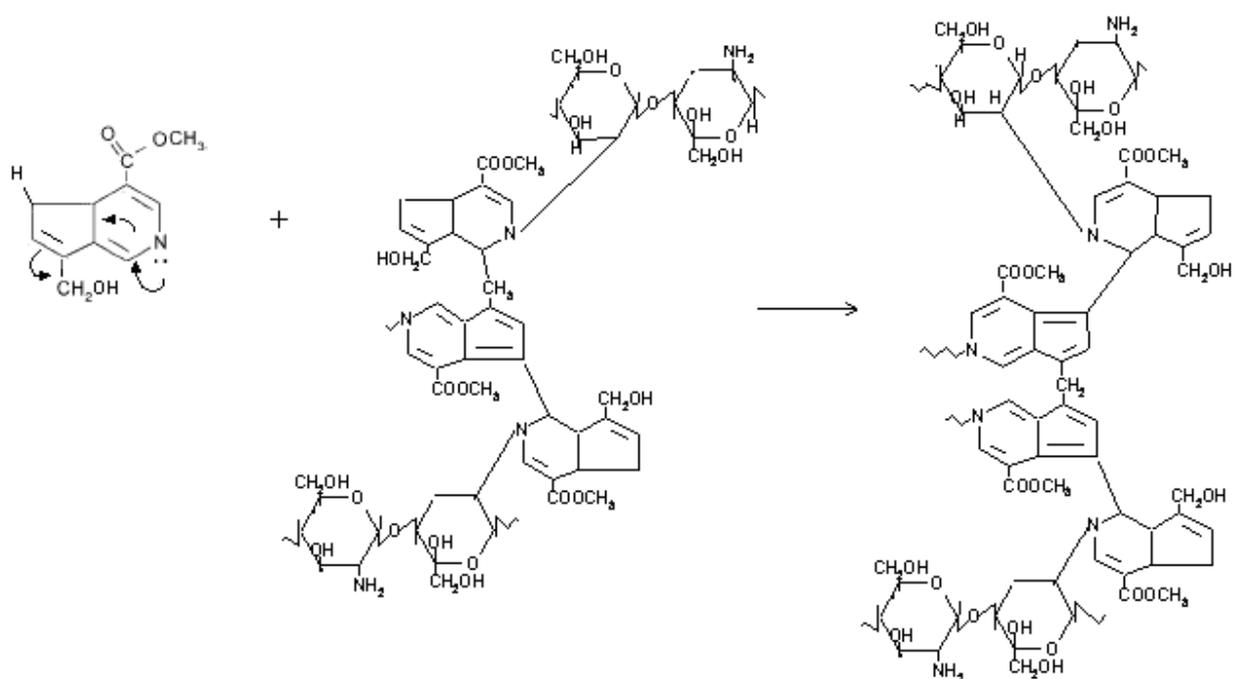


Figura 2 (Apêndice). Formação de tetrâmero de genipin por reação com compostos de ressonância do genipin após ataque por reagente nucleófilo.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)