UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ARTES, CIÊNCIAS E HUMANIDADES

GIOVANNA RODRIGUES MELIN

**Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de
carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica**

São Paulo

2013

GIOVANNA RODRIGUES MELIN

**Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de
carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica**

Dissertação apresentada à Escola de Artes,
Ciências e Humanidades da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Materiais e Processos
Têxteis

Orientadora: Profa. Dra. Silgia Aparecida da
Costa

São Paulo

2013

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Melin, Giovanna Rodrigues

Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica / Giovanna Rodrigues

Melin; orientadora Silgia Aparecida da Costa. – São Paulo, 2013.

126 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Têxtil e Moda, Escola de Artes, Ciências e Humanidades da Universidade de São Paulo.

1. Biomateriais. 2. Polímeros. 3. Bandagens. 4. Carboximetilcelulose. 5. Quitosana.

Nome: MELIN, Giovanna Rodrigues

Título: Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica

Dissertação apresentada à Escola de Artes,
Ciências e Humanidades da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de Mestre.
Área de Concentração: Materiais e Processos
Têxteis

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

A Deus, por todas as bênçãos.

À minha mãe, pelo exemplo de vida e caráter.

Ao meu pai, por manter-se sempre prestativo e alegre.

À minha querida irmã, por todo carinho recebido.

Ao amor da minha vida, meu esposo, pela dedicação, paciência,
ideias e contribuições durante a execução desta pesquisa.

Agradecimentos

À Fapesp, pelo apoio financeiro e institucional.

A todos os atendentes do setor de informações da Fapesp, pela disposição e atenção.

À Profa. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza, do Departamento de Química da Escola de Engenharia de Lorena da USP, pela atenção e disponibilidade na realização das análises de FTIR.

Ao Prof. Dr. Luiz Antonio Gioielli, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, por abrir as portas de seu laboratório para a realização das análises de DSC. Agradeço também à sua orientanda, doutoranda Fabiana Andrea Schäfer de Martini Soares, pela recepção e por acompanhar as análises com tanta simpatia.

À Dra. Sizue Ota Rogero, do Centro de Química e Meio Ambiente do Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares (Ipen), pela realização dos ensaios de citotoxicidade. Ainda agradeço por ter prestigiado a apresentação desta pesquisa no Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência de Materiais (CBecimat 2012), em Joinville.

Ao Diretor do Centro de Têxteis Técnicos e Manufaturados do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT), Richad Pahl, por colocar as análises à nossa disposição. Especialmente ao Fernando Soares Lima pela realização do ensaio de tração.

À M.Sc. Liz Zanchetta D'Agostino, do Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT) do Departamento de Engenharia de Minas e de Petróleo da Escola Politécnica da USP, pelo acolhimento e zelo nas análises das amostras.

À Profa. Dra. Julia Baruque, primeira coordenadora do programa de mestrado em Têxtil da Each - USP, por toda atenção dedicada aos estudantes e por estar sempre disposta a ajudá-los.

À Profa. Dra. Regina Sanches, atual coordenadora do programa de mestrado, pelas aulas de qualidade durante a graduação e por dedicar-se ao desenvolvimento, tanto da graduação quanto da pós-graduação, do Curso de Têxtil, da Each - USP.

A toda equipe da secretaria de pós-graduação da Each - USP, em especial as profissionais Jussara Barbosa, Alessandra Lima e Cristiane Pereira da Silva, pela atenção dispensada aos estudantes, pelo esclarecimento das dúvidas, pelos atendimentos pessoais, telefônicos e e-mails.

À Equipe de Pedro Reiz Centro de Treinamento e Formação, pela análise crítica desta dissertação e pelas sugestões.

Ao Ervin Sriubas Jr. e ao Kellinton Francisco, do Conjunto Multidisciplinar de Pesquisa da Each - USP pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa e pela companhia.

À Profa. Dra. Sirlene Maria da Costa, por ter dedicado seu tempo no envolvimento deste trabalho, tanto no âmbito de laboratório como de sugestões bibliográficas. Agradeço ainda, pelo acompanhamento das análises realizadas no IPT, Ipen e LCT.

Ao Prof. Dr. Maurício de Campos Araújo, pelos estímulos durante a realização da iniciação científica e pelo carinho com os estudantes.

Aos técnicos do laboratório didático, Silvio e Kelly, pela simpatia e otimismo.

As colegas de mestrado, Agatha Cristine Carretero, Kátia Crystina Hipólito Bezerra, Mariana Brites, Paula Rindeika, pelo tempo que passamos juntas, nas salas de aula, laboratórios, bibliotecas, cantinas, congressos. Vocês são partes de todos esses anos, desde a graduação.

E por último, contudo, não menos importante, às queridas estudantes de iniciação científica, Caroline Alves dos Santos Lima e Daniela Furuya, pelo exemplo de dedicação, em especial, à Caroline, pelas horas e horas de companhia nos laboratórios, pela meiguice, pelo carinho.

Agradecimento especial

À Profa. Dra. Silgia Aparecida da Costa, pela orientação desta pesquisa, notadamente pela energia empregada na docência. O otimismo, latente na professora Silgia, contagia a todos que estão a sua volta. Parabéns por dedicar-se aos estudantes e pesquisadores com simpatia, empenho, entusiasmo, carinho e torná-los parte da sua família.

*“A única coisa que importa é colocar em prática, com
sinceridade e seriedade, aquilo em que se acredita.”*

Dalai Lama

RESUMO

MELIN, G.R. **Desenvolvimento de membranas à base de quitosana e de carboximetilcelulose para aplicação na área biomédica**. 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A quitosana é um polissacarídeo produzido pela desacetilação da quitina e tem sido estudada para aplicação como biomaterial por apresentar características, tais como: biocompatibilidade, atoxidade e ação antimicrobiana. O objetivo deste estudo foi o desenvolvimento e caracterização química, física e biológica de membranas à base de quitosana (QUI) e carboximetilcelulose (CMC) para aplicação na área biomédica. Foram realizados ensaios de resistência, capacidade de absorção de água e perda de massa em solução salina de tampão fosfato (PBS) e saliva artificial, infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), calorimetria exploratória diferencial (DSC), bioatividade, citotoxicidade e degradação. Nos ensaios de citotoxicidade, observou-se que as membranas desenvolvidas são atóxicas e nos ensaios de absorção de água que a carboximetilcelulose aumentou significativamente a capacidade de absorção da membrana. As características naturais dos polímeros não foram alteradas, como observado no ensaio térmico (DSC) e no FTIR. Referente à liberação da lisozima as membranas de QUI e QUI/CMC/QUI obtiveram melhores resultados, tanto na liberação quanto na atividade da enzima. As principais aplicações das membranas estudadas na área biomédica são como bandagens.

Descritores: Biomateriais, Polímeros, Bandagens, Carboximetilcelulose, Quitosana.

ABSTRACT

MELIN, G.R. **Development of membranes based on chitosan and carboxymethylcellulose for use in biomedical area.** 2013. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Artes, Ciências e Humanidades, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Chitosan is a polysaccharide produced from chitin by deacetylation and has been studied for application as biomaterial for presenting characteristics, such as biocompatibility and antimicrobial atoxidade. The objective of this study was the development and characterization chemical, physical and biological of membranes based on chitosan and carboxymethylcellulose (CMC) for application in the biomedical area. Tests of resistance, water absorption capacity and mass loss in phosphate buffered saline (PBS) and artificial saliva, Fourier transform infrared (FTIR), differential scanning calorimetry (DSC), bioactivity and cytotoxicity. The tests of cytotoxicity revealed that the membranes developed are non toxic and water absorption test the CMC increased significantly absorption capacity of membrane. The natural characteristics of the polymers were not changed, as observed on DSC and FTIR. With regard to the release of lysozyme membranes CHI and CHI/CMC/CHI obtained better results in both the release and in the activity of the enzyme. The main applications of the membranes studied in the biomedical field are like bandages.

Descriptors: Biomaterials, Polymers, Bandages, Chitosan, Carboxymethylcellulose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escopo da engenharia de materiais flexíveis, proposto por Byrne	34
Figura 2 - Materiais não implantáveis a) curativo e (b) bandagem, materiais implantáveis (c) ligamentos e (d) prótese vascular	36
Figura 3 - Classificação dos substitutos cutâneos proposta pela disciplina de cirurgia plástica, da FMUSP	38
Figura 4 - Processo de desacetilação da quitina	43
Figura 5 - Processo completo de obtenção da quitosana	45
Figura 6 - Classificação dos polímeros enzimaticamente degradáveis, de acordo com a origem.....	50
Figura 7 - Polímeros utilizados (a) quitosana e (b) carboximetilcelulose.....	57
Figura 8 - Gel de quitosana	58
Figura 9 - Gel de carboximetilcelulose	59
Figura 10 - Esquema representativo do método utilizado no preparo das membranas híbridas.....	60
Figura 11 - Esquema representativo dos ensaios de absorção de água e perda de massa.....	63
Figura 12 - Fotografia das membranas de (a) QUI, (b) QUI_GL, (c) QUI/CMC/QUI e (d) QUI/CMC/QUI_GL	74
Figura 13 - MEV das membranas controle de (a) QUI, (b) QUI_GL, (d) QUI/CMC/QUI, (e) QUI/CMC/QUI_GL, EDS das membranas controle de (c) QUI e (f) QUI/CMC/QUI	88
Figura 14 - MEV das membranas (a) QUI, após três dias e (b) QUI, após 21 dias em solução SBF	90
Figura 15 - MEV (a) e EDS (b) da membrana de QUI, após 3 dias em solução SBF	89
Figura 16 - Mapeamento da membrana de QUI/CMC/QUI_GL, após 3 dias em solução SBF	90

Figura 17 - MEV e EDS das membranas de QUI (a) e (b), QUI_GL (c) e (d), QUI/CMC/QUI (e) e (f), QUI/CMC/QUI_GL (g) e (h), após 7 dias em solução SBF	91
Figura 18 - Mapeamento da membrana de QUI, após 7 dias em solução SBF	92
Figura 19 - Comparação dos cristais de cálcio encontrados nas amostras de 3 dias (a) e cálcio e fósforo encontrados nas amostras de 7 dias (b) ..	92
Figura 20 - MEV e EDS das membranas de QUI (a) e (b), QUI_GL (c) e (d), QUI/CMC/QUI (e) e (f), QUI/CMC/QUI_GL (g) e (h), após 21 dias em solução SBF	94

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores.....	69
Gráfico 2 - Curva padrão de BSA para determinação da proteína total.....	71
Gráfico 3 - Espectro no infravermelho dos polímeros quitosana e carboximetilcelulose.....	78
Gráfico 4 - Espectro no infravermelho das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	79
Gráfico 5 - Comparação das curvas obtidas por DSC das amostras analisadas (1) polímero quitosana (flocos), (2) membrana de QUI, (3) membrana de QUI_GL, (4) polímero carboximetilcelulose (pó), (5) membrana de CMC, (6) membrana de QUI/CMC/QUI e (7) membrana de QUI/CMC/QUI_GL.....	82
Gráfico 6 - Absorção de água das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução PBS	83
Gráfico 7 - Absorção de água das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução de saliva artificial	84
Gráfico 8 - Perda de massa das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução PBS	85
Gráfico 9 - Perda de massa das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução de saliva artificial	86
Gráfico 10 - Ensaio de citotoxicidade das membranas sem glicerol.....	95
Gráfico 11 - Ensaio de citotoxicidade das membranas com glicerol	95
Gráfico 12 - Evolução do pH em solução PBS com lisozima no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI e QUI_GL	97
Gráfico 13 - Concentração de açúcares redutores em solução PBS com lisozima no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI e QUI_GL...	98

Gráfico 14 - Perda de massa em solução PBS com lisozima no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI e QUI_GL	98
Gráfico 15 - Concentração de proteína na solução PBS no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	100
Gráfico 16 - Concentração de proteínas na solução de saliva artificial no período de 3 dias a 37 °C das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	100
Gráfico 17 - Atividade da lisozima em solução PBS no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	101
Gráfico 18 - Atividade da lisozima em solução de saliva artificial no período de 3 dias a 37 °C das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	102
Gráfico 19 - Concentração de açúcares redutores em solução PBS no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	103
Gráfico 20 - Concentração de açúcares redutores em solução de saliva artificial no período de 3 dias a 37 °C das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	104

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Aplicações médicas de materiais poliméricos degradáveis49

Quadro 2 - Polímeros e materiais biológicos utilizados em filmes
automontados.....54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição das membranas desenvolvidas	58
Tabela 2 - Massas das amostras de membranas e polímeros analisadas por DSC	62
Tabela 3 - Composição da solução PBS.....	64
Tabela 4 - Composição da solução de saliva artificial	65
Tabela 5 - Composição da solução SBF	66
Tabela 6 - Resultados do ensaio de espessura das membranas	75
Tabela 7 - Carga máxima, alongamento à carga máxima e módulo de Young das membranas QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL	77
Tabela 8 - Temperatura onset, temperatura do pico e entalpia dos eventos endotérmicos e exotérmicos	81

LISTA DE SIGLAS

Cetim	Centro de Têxteis Técnicos e Manufaturados
CMC	Carboximetilcelulose
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
Each	Escola de Artes, Ciências e Humanidades
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
Ipen	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
LCT	Laboratório de Caracterização Tecnológica
LPTT	Laboratório de Pesquisa de Têxteis Técnicos
MEM	Meio mínimo de Eagle
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PBS	Solução salina de tampão fosfato
QUI	Quitosana
QUI/CMC/QUI	Quitosana e carboximetilcelulose
QUI/CMC/QUI_GL	Quitosana e carboximetilcelulose com glicerol
QUI_GL	Quitosana com glicerol
SBF	Solução simulada de fluídos corporais
SFB	Soro fetal bovino

LISTA DE SÍMBOLOS

mL	mililitros
mm	milímetro
cm	centímetros
g	grama
μL	microlitro
Nm	nanômetro
kgf	quilograma força
j	joule
kGy	quilogray
°C	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico
Ca	cálcio
P	fósforo
Cl	cloro
K	potássio
O	oxigênio
H	hidrogênio

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE QUADROS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS

LISTA DE SÍMBOLOS

1 INTRODUÇÃO	27
2 OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos	31
3 REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1 Têxteis técnicos: conceitos e classificação.....	33
3.1.1 Têxteis aplicados à área biomédica.....	35
3.2 Aplicações de biomateriais	37
3.2.1 Polímeros naturais utilizados como biomateriais	39
3.2.1.1 Carboximetilcelulose	40
3.2.1.2 Quitosana.....	42
3.2.1.2.1 Obtenção da quitosana	43
3.2.1.2.2 Contribuições da quitosana como biomaterial	46
3.2.2 Polímeros biorreabsorvíveis, biodegradáveis e degradáveis como biomaterial.....	47
3.2.3 Membranas e filmes como biomaterial.....	51
4 MATERIAIS e MÉTODOS	56
4.1 Produção das membranas	56
4.1.1 Produção dos géis	57

4.1.1.1 Produção do gel de quitosana	58
4.1.1.2 Produção do gel de carboximetilcelulose.....	58
4.1.2 Produção das membranas	59
4.2 Caracterização das membranas	61
4.2.1 Ensaio de espessura	61
4.2.2 Ensaio de tração	61
4.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	61
4.2.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	62
4.2.5 Ensaios de absorção de água e de perda de massa	63
4.2.5.1 Absorção de água e de perda de massa em solução salina de tampão fosfato (PBS)	63
4.2.5.2 Absorção de água e de perda de massa em solução de saliva artificial.....	65
4.2.6 Ensaio de bioatividade	66
4.2.7 Citotoxicidade.....	67
4.2.8 Estudo de degradação da quitosana em solução PBS com lisozima ..	68
4.2.8.1 Determinação dos açúcares redutores pelo método DNS	68
4.2.9 Estudo de liberação de lisozima	70
4.2.9.1 Determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford	70
4.2.9.2 Determinação de atividade enzimática	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	74
5.1 Aspectos macroscópicos das membranas produzidas	74
5.2 Caracterização das membranas produzidas	75
5.2.1 Espessura das membranas	75
5.2.3 Propriedades de resistência à tração das membranas	76
5.2.3 Caracterização por FTIR dos polímeros e das membranas	77
5.2.4 Caracterização por DCS dos polímeros e das membranas	79

5.2.5 Propriedades de absorção de água e de perda de massa das membranas em solução salina de tampão fosfato (PBS) e saliva artificial .	83
5.2.5.1 Absorção de água	83
5.2.5.2 Perda de massa	85
5.3 Bioatividade das membranas	87
5.4 Citotoxicidade.....	94
5.5 Análise da degradação da quitosana por ação enzimática	96
5.6 Degradação das membranas produzidas e liberação da lisozima nas soluções PBS e saliva artificial	99
5.7 Propriedades das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL e possíveis aplicações na área biomédica.....	104
6 CONCLUSÃO	109
7 REFERÊNCIAS.....	111
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	125

Introdução

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novos biomateriais é contínuo e, diversas áreas contibuem para que novos materiais estejam disponíveis para atender às neecessidades de áreas, tais como: Medicina, Odontologia, Farmácia.

Os biomateriais são contituídos de materias cerâmicos, metálicos e poliméricos (COOKE et al., 1996). No entanto, desde a década de 1980, com o surgimento de novas tecnologias biomédicas, como a engenharia de tecidual, medicina regenerativa, terapia gênica, liberação controlada de fármacos e bionanotecnologia, materiais como polímeros bioreabissorvíveis têm atraído o interesse na pesquisa de biomateriais (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Na medicina regenerativa, os desafios dizem respeito às dificuldades de se encontrar meios para reparar lesões ou defeitos surgidos de acidentes ou doenças e também de acesso aos materiais com capacidade de desenvolver e remodelar tecidos. Muitos estudos têm sido desenvolvidos para detectar materiais que possam substituir, de forma apropriada, os tecidos danificados e que se ajustem aos critérios de biocompatibilidade e resistência necessária. Os materiais usados na substituição de tecidos se enquadram na classe de biomateriais, cujas propriedades físicas e biológicas devem estimular resposta adequada aos tecidos vivos (JAYAKUMAR et al., 2011; FRIEDMAN e JUNEJA, 2010; DUCEPPE e TABRIZIAN, 2010).

Os avanços na área de materiais têxteis e as aplicações na área biomédica mostram a importância do desenvolvimento de novas classes de biomateriais. Os polímeros naturais, como quitosana, colágeno, alginato, amido, celulose, hidrocelulose, policaprolactona (PCL), polihidroxibutirato (PHB), poli(ácido glicólico) (PGA), poli(L-ácido lático) (PLLA), poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA), dentre outros, possuem propriedades físico-biológicas interessantes para aplicações em produtos biotecnológicos e têm sido

amplamente aplicados e pesquisados (STAMATIALIS et al., 2008; CZAJA et al., 2006).

Os polissacarídeos são eficazes como biomateriais, por causa da crescente descoberta de suas funções biológicas únicas. Isso, combinado com novas rotas sintéticas disponíveis atualmente para modificar polissacarídeos, biodegradabilidade e a capacidade de produzir estruturas adequadas, tornam os polissacarídeos materiais naturais importantes e amplamente estudados (NAIR e LAURENCIN, 2007).

A quitosana e a carboximetilcelulose são polissacarídeos que têm atraído o interesse de áreas como a farmacêutica, alimentícia, médica, biomédica, e odontologia por causa de características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e atoxidade (JAYAKUMAR et al., 2007; KUMAR, 2000; KURITA et al., 2000).

Materiais constituídos de quitosana e da mistura com outros polímeros se mostram como perspectivas potenciais em diversas áreas. Desse modo, a literatura científica está bem documentada com publicações que empregaram a quitosana em diversas aplicações na engenharia tecidual, formação de géis, fibras, filmes, membranas, e ultimamente, na liberação controlada de fármacos e também como biossensores para diagnóstico clínico. Friedman e Juneja (2010) afirmam que em 2010 havia 17 mil citações sobre quitosana na base de dados Scopus.

Para Venkatesan e Kim (2010), nas últimas duas décadas, avanços significativos foram obtidos no transplante de órgãos, reconstrução cirúrgica e uso de próteses artificiais para tratar a perda ou falha de um órgão ou tecido ósseo, e a quitosana tem tido papel promissor como matéria-prima no desenvolvimento de biomateriais para tais finalidades. Outro desafio para profissionais da área médica é o tratamento de lesões e feridas, que requer adaptação dos materiais de acordo com o tipo de lesão, bem como o estágio do tratamento da lesão (BOATENG et al., 2008).

A área biomédica tem ampla e diversificada demanda por biomateriais. Atender essa demanda é desafio que envolve a atividade de profissionais e pesquisadores de diferentes áreas. Desse modo, com o propósito de contribuir na busca de soluções para essa necessidade, neste trabalho propõe-se um biomaterial versátil que possa ser adaptado e aplicado em vários segmentos da área da saúde.

A estrutura deste trabalho foi constituída da seguinte maneira: no primeiro capítulo, consta a introdução, seguida dos objetivos, geral e específicos (capítulo 2). No capítulo 3, a revisão da literatura, a qual conforme propõe Reiz (2013), contribui para os pesquisadores situarem o leitor na evolução do tema de pesquisa e deve ser desenvolvida com base no problema central do estudo. Ainda de acordo com Reiz (2013), a literatura científica é a matéria-prima do pesquisador. No capítulo 4, foram desenvolvidos os materiais e os métodos. No quinto, estão juntos os resultados e a discussão. O capítulo 6 diz respeito à conclusão e o 7 às referências.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi produzir e caracterizar membranas à base de quitosana e carboximetilcelulose com glicerol para aplicação na área biomédica.

2.2 Objetivos específicos

- Medir a espessura e a resistência à tração das membranas.
- Caracterizar as membranas por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).
- Analisar a capacidade de absorção de água e perda de massa em meio aquoso (solução salina de tampão fosfato - PBS e solução de saliva artificial).
- Verificar a bioatividade das membranas em solução simulada de fluídos corporais (SBF) por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia dispersiva (EDS).
- Verificar a citotoxicidade das membranas.
- Analisar a biodegradabilidade da quitosana em solução com presença de lisozima e a liberação da lisozima incorporada às membranas.

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Têxteis técnicos: conceitos e classificação

A literatura sobre têxteis técnicos é escassa. Por isso, baseou-se em Byrne (2000), autor que pondera nas dificuldades de definição e classificação dos têxteis técnicos.

As aplicações de têxteis técnicos não são novas. Há séculos os têxteis são usados em mais funções que apenas na produção de vestuário, pois as fibras naturais, como algodão, linho, juta e sisal foram utilizadas em tendas, lonas, cordas, sacarias. Existem evidências do uso de tecidos e malhas usados na construção de estradas no Império Romano, tecnologia conhecida atualmente como geotêxteis e geogrelhas (BYRNE, 2000).

Ainda de acordo com Byrne (2000), a importância industrial e econômica dos têxteis técnicos ultrapassa os limites da indústria têxtil e tem consequências em praticamente todas as esferas econômicas e sociais. Trata-se de segmento que se desenvolve em diversas direções, velocidades e níveis de sucesso. Para o autor, existem constantes alterações na maneira de classificar essa complexa indústria, bem como dificuldades de adaptar as definições tradicionais de "têxteis" e "engenharia de materiais flexíveis".

Produtos como membranas poliméricas, materiais compósitos, grades e redes extrudadas desafiam as noções tradicionais de têxteis técnicos e, muitas vezes, enquadram-se no mercado de engenharia de materiais flexíveis (Figura 1), com inovações nos produtos, materiais, tecnologias de processos e mercados.

Figura 1 - Escopo da engenharia de materiais flexíveis, proposto por Byrne

Fonte: Byrne (2000, p.5)

Na busca por classificação dos têxteis técnicos, foram definidas 12 áreas principais de aplicação pela *Techtextil*¹:

- *Buildtech*: construção civil.
- *Clothtech*: componentes técnicos de calçados e roupas.
- *Geotech*: geotêxteis e engenharia civil.
- *Homotech*: componentes técnicos de mobiliário, têxteis para o lar e pavimentos.
- *Indutech*: filtração, transporte, limpeza e outros usos industriais.
- *Mobiltech*: automobilístico, marítimo, ferroviário e aeroespacial.
- *Oekotech*: proteção do ambiente.
- *Packtech*: embalagens.
- *Protech*: segurança e proteção pessoal.
- *Sporttech*: esporte e lazer.
- *Medtech*: higiene e medicina (BYRNE, 2000).

¹ Evento realizado a cada dois anos desde o final de 1980, pela *Messe Frankfurt*, na Alemanha.

As definições e classificações na área têxtil estão longe de ter consenso, visto que os materiais têxteis podem ser utilizados em diversos seguimentos, como saúde, higiene, esporte, transporte, construção civil, agricultura, equipamentos industriais diversos (filtros, correias, isolamento acústico, entre outros) (BYRNE, 2000).

3.1.1 Têxteis aplicados à área biomédica

Os materiais têxteis com aplicações na área biomédica estão inseridos num mercado em constante crescimento. As causas mais frequentes desse crescimento são o aumento da expectativa de vida e os desafios da tecnologia e da medicina para atender as demandas (HÖFER e SWEREV, 2003).

De acordo com Rygby e Anand (2000), produtos e materiais têxteis são projetados para atender a necessidades específicas da área médica e cirúrgica. Resistência, flexibilidade, umidade, permeabilidade do ar, entre outras, podem ser requisitos indispensáveis. Os materiais usados incluem monofilamentos, multifilamentos, tecidos, não tecidos e estruturas compostas.

Quanto às aplicações, são diversificadas e podem variar de fio de sutura a complexas estruturas compostas para substituição óssea. Esses materiais podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com a área de aplicação:

- Materiais não implantáveis: curativos, bandagens, emplastros, gazes etc.
- Dispositivos extracorporais: rins, pulmão e fígados artificiais.
- Materiais implantáveis: tendões, cartilagem, pele e córnea artificiais, suturas, enxertos vasculares, ligamentos e articulações artificiais etc.
- Produtos de higiene e saúde: vestuário de proteção cirúrgica (aventais, máscaras, toucas, meias cirúrgicas), campos cirúrgicos,

roupas de cama, lenços, fraldas, absorventes, entre outros.
(Figura 2) (RYGBY e ANAND, 2000).

Figura 2 - Materiais não implantáveis: curativo (a) e bandagem (b); materiais implantáveis: ligamentos (c) e prótese vascular (d)

Fonte: Adaptado de Byrne (2000, p.413-420)

Materiais têxteis de aplicação na área biomédica variam de muito simples a extremamente complexos. No caso dos materiais implantáveis,

biocompatibilidade é essencial (RYGBY e ANAND, 2000) e existem quatro fatores-chave para o material têxtil ser biocompatível:

- 1) A porosidade determina a velocidade a que o tecido humano crescerá e encapsulará o implante.
- 2) Pequenas fibras circulares são melhor encapsuladas pelo tecido humano que fibras maiores com seções transversais irregulares.
- 3) Substâncias tóxicas não devem ser liberadas pelo polímero, o material também deve estar livre de contaminantes na superfície.
- 4) As propriedades do polímero irão influenciar o sucesso do implante em termos da biodegradabilidade (RYGBY e ANAND, 2000).

Nesse sentido, materiais destinados a interagir com sistemas biológicos enquadram-se na categoria de biomateriais, como será estudado a seguir.

3.2 Aplicações de biomateriais

Diversas definições são propostas para o termo biomaterial. De acordo com Ratner (1996), a definição mais aceita tem sido a proposta por David F. Williams, em 1987, que definiu biomaterial como material não vivo utilizado em dispositivos médicos destinados a interagir com sistemas biológicos.

A evolução dos biomateriais tem sido classificada em três diferentes gerações: a primeira com os materiais bioinertes, a segunda com os materiais bioativos e biodegradáveis e a terceira geração com os materiais destinados a estimular respostas específicas na superfície molecular (NAVARRO et al., 2008).

Os biomateriais são desenvolvidos para atender a necessidades específicas, que variam de acordo com a aplicação. Desse modo, no caso de biomateriais ortopédicos, eles são produzidos para serem implantados no corpo humano como constituintes de dispositivos projetados para executarem determinadas funções biológicas, substituírem ou repararem tecidos diferentes,

como osso, cartilagem, ligamentos, tendões e até mesmo para guiar reparação óssea, quando necessário (NAVARRO et al., 2008).

Ferreira et al. (2011) mencionaram os desafios no tratamento de feridas complexas (queimaduras, traumatismos, infecções, doenças autoimunes). De acordo com os autores, a exérese de pele autógena é a solução recomendada, entretanto, pode haver escassez de área doadora. Nesse sentido, materiais sintéticos ou biológicos podem ser alternativas para aplicação como substitutos cutâneos. A disciplina de cirurgia plástica, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), propõe classificação dos substitutos cutâneos segundo três critérios: camada da pele a ser substituída, durabilidade no leito da ferida e origem do material constituinte (Figura 3).

Figura 3 - Classificação dos substitutos cutâneos, proposta pela disciplina de cirurgia plástica, da FMUSP

Fonte: Ferreira et al. (2011)

No que diz respeito ao desenvolvimento de bandagens para tratamento de lesões, o desafio é a adequação do tipo de lesão (aguda, crônica, exsudativas ou secas) ao curativo. Dessa forma, não há apenas um curativo que seja apropriado ao tratamento de todos os tipos de lesões. Outra questão a ser considerada em relação ao tipo de curativo, é o processo de cura das lesões, uma vez que apresentam várias fases que podem exigir diferentes curativos (BOATENG et al., 2008).

Quanto aos materiais utilizados para construir estruturas de biomateriais, podem ser divididos em três classes: metais, cerâmicos (inclusive vidro) e polímeros (COOKE et al., 1996). No caso dos polímeros, observam-se características como: biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade de absorção de secreções (BORSCHIVER et al., 2008).

Dessa maneira, cabe mencionar que, para atender aos propósitos deste estudo, buscaram-se tratar, dentro da classe de biomateriais poliméricos, apenas os biopolímeros, denominação mais aceita na literatura relacionada à área da saúde, bem como da biodegradabilidade dos biomateriais.

3.2.1 Polímeros naturais utilizados como biomateriais

Polímeros naturais, ou biopolímeros, são polímeros sintetizados por organismos vivos. Atualmente, há tendência para o uso de biopolímeros em áreas de domínio de polímeros sintéticos por causa do interesse de materiais originários de fontes renováveis (CUNHA et al., 2004).

Eles são classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres ou poliamidas. São comumente obtidos de fontes de carbono renováveis, como carboidratos derivados de cana-de-açúcar, milho, batata ou óleos vegetais extraído de soja, girassol (PRADELLA, 2006). Também são consideradas fontes renováveis de obtenção de polímeros: a celulose e a quitina, esta presente no exoesqueleto de crustáceos. A celulose é o polímero mais abundante na

natureza, e a quitina, o segundo (DASH et al., 2011; PILLAI et al., 2009; DUTTA et al., 2002; KUMAR, 2000).

As áreas médica e farmacêutica têm sido os campos de mais interesse para a aplicação dos biopolímeros, uma vez que os estudos estão concentrados no desenvolvimento de dispositivos terapêuticos cardiovasculares, ortopédicos, oftalmológicos, odontológicos, substitutos de pele, sistemas para liberação de fármacos e sensores com propósitos de diagnósticos (CORTÉS et al., 2008).

Borschiver et al. (2008) realizaram trabalho de monitoramento tecnológico e mercadológico com base em artigos e patentes com biopolímeros em geral. Ao considerar os artigos científicos publicados entre 2002 e 2007, de acordo com os autores, 42% das instituições e centros de pesquisas, que publicaram artigos na área de biopolímeros estão nos Estados Unidos. A área médica tem sido considerada a que mais investe no estudo e desenvolvimento dos biopolímeros, com destaque para as seguintes aplicações: implantes, terapia genética, cápsulas para comprimidos e engenharia tecidual.

No estudo realizado por Borschiver et al. (2008), o Brasil não foi mencionado nem em número de publicações nem em patentes. Desse modo, parece que no Brasil o estudo de biopolímeros, em especial na área da saúde, tem amplo potencial de crescimento.

No presente trabalho, utilizou-se a quitosana como principal material para a produção das membranas, e a associação com a carboximetilcelulose teve como propósito aumentar a absorção de água.

3.2.1.1 Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose é um polissacarídeo versátil, utilizado em diferentes áreas, alimentícia, biomédica, farmacêutica, cosmética. Os polissacarídeos são polímeros naturais constituídos por um ou por diferentes monossacarídeos (CUNHA et al., 2009). A carboximetilcelulose é derivado

hidrossolúvel obtido pela reação em suspensão de celulose, hidróxido de sódio e ácido monocloroacético (CARASCHI e CAMPANA FILHO, 1999). Trata-se de produto industrial, mais comumente comercializado na forma sódica. Apresenta como principais vantagens: ser produzida à pressão atmosférica, o que não ocorre com alguns éteres de celulose; apresenta grupos carboxilatos que permite a solubilização em água quando o grau médio de substituição é superior a 0,5. Pode ser obtida com base no bagaço da cana-de-açúcar, biomassa abundante e barata, que é resíduo de usinas de açúcar e álcool (FUJIMOTO et al., 2002).

As propriedades da carboximetilcelulose dependem da viscosidade das soluções aquosas, do grau médio de substituição e da distribuição dos grupos carboximetila. O grau médio de substituição é o número médio de grupos hidroxila, substituído por unidades D-glicopiranosil da cadeia polimérica. A distribuição dos grupos carboximetila, ao longo das cadeias, influencia as propriedades, o comportamento reológico das soluções e a abrangência das aplicações (CARASCHI e CAMPANA FILHO, 1999).

A carboximetilcelulose, na indústria alimentícia, é empregada como espessante, estabilizante e agente de corpo. Contribui para melhorar a consistência dos alimentos e, em certos casos, melhora os aspectos nutricionais (CAMPOS et al., 2009; CALEGUER e BENASSI, 2007). Na conservação de vegetais e frutos, o processo é realizado com o recobrimento por carboximetilcelulose na forma de película, o que reduz a migração de vapor d'água e as trocas gasosas com o meio (AMARIZ et al., 2010).

Em aplicações farmacêuticas, a carboximetilcelulose sódica reticulada é utilizada em cápsulas, comprimidos e grânulos de desintegração rápida; também é empregada como mucoadesivo, utilizado em sistemas de liberação de fármacos. Polímeros bioadesivos aderem à camada mucosa (mucoadesivos) ou à membrana celular (citoadesivos). A bioadesão é uma propriedade que permite aumentar o tempo de permanência do medicamento no organismo, o

que melhora a biodisponibilidade dos fármacos e pode reduzir o número de doses diárias do medicamento (VILLANOVA et al., 2010).

3.2.1.2 Quitosana

A quitosana é polissacarídeo produzido pela desacetilação da quitina, que constitui componente importante do exoesqueleto de crustáceos. A produção é economicamente viável e reduz o impacto ambiental gerado pelo depósito dos resíduos nas regiões costeiras (DUTTA et al., 2002).

Os polímeros são constituídos por cadeias muito longas, com uma ou mais unidades de monômeros repetidas e podem apresentar variação na massa molar, viscosidade e propriedades de plasticidade que, em alguns casos, pode ser vantajoso. Outras variáveis, como, por exemplo, grau de reticulação pode influenciar as propriedades físico-químicas dos polímeros. O uso de materiais poliméricos em aplicações médicas torna-se mais vantajoso quando comparado aos metais, em especial por causa do fato de que, num certo momento, o polímero pode ser suscetível de sofrer degradação. O processo de degradação ocorre no polímero à medida que os tecidos vivos são regenerados e se evita, dessa maneira, segunda intervenção cirúrgica para remoção do implante (SASTRE et al., 2004).

Os polímeros têm despertado muito interesse da área da saúde por causa do baixo custo de produção, facilidade de acesso à matéria-prima, baixa reação de corpo estranho, propriedades de absorção, adaptação à geometria e a formas diversas, como também às estruturas porosas, biocompatibilidade, características antibacterianas, biodegradabilidade, natureza atóxica, entre outras (ABDOU et al., 2008; KUMAR, 2000). Desse modo, observa-se que, nos últimos anos, a quitosana tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas.

3.2.1.2.1 Obtenção da quitosana

A quitosana pode ser obtida por meio de reação de desacetilação da quitina (Figura 4). Consiste na remoção controlada dos grupos acetil (C_2H_3O) em meio alcalino de modo a tornar o produto final solúvel em soluções de ácidos diluídos. O processo é designado por N-desacetilação e, por causa da natureza cristalina da quitina, torna-se complexo (CANELLA e GARCIA, 2001; ARGUELLES et al., 2001).

Figura 4 - Processo de desacetilação da quitina

Fonte: Kumar (2000)

A quitina é um polímero natural e o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose (ALONSO et al., 2010; LI et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005; PANCHENCE e KOHN, 2000; KUBOTA et al., 2000). É de coloração branca, dura e inelástica, encontrada em abundância no exoesqueleto de muitos crustáceos, como caranguejos, camarões, lagostas (ALONSO et al., 2010; HOVEN et al., 2007; DUTTA et al., 2004; HIRANO, 1999) e cutículas de alguns insetos (REGE e BLOCK, 1999). As carapaças dos caranguejos, camarões etc., provenientes de restos do processamento de comida (rejeitos da indústria pesqueira), são, atualmente, a principal fonte de quitina

(KONG, 2010; HOVEN et al., 2007; HIRANO, 1999). Aproximadamente 100 bilhões de toneladas de quitina são produzidas no mundo por ano, produção equivalente a de celulose por plantas de porte avantajado (KONG, 2010; REGE e BLOCK, 1999).

Tal como a celulose, a quitina é uma fibra que por causa das características químicas e biológicas, é excelente material para aplicações biomédicas e industriais (CANELLA e GARCIA, 2001). A quitina é polímero não ramificado formado por unidades de N-acetil-D-glucosaminas, unidas por ligações β -(1 $\rightarrow$ 4) e forma cadeias de várias centenas de unidades (HOVEN et al., 2007; CANELLA e GARCIA, 2001). A estrutura química é semelhante a da celulose, na qual os grupos hidroxila (celulose) da posição C-2 são substituídos pelo grupo acetamida (PILLAI et al., 2009; KUMAR, 2000).

A quitina pode ser encontrada em duas possíveis organizações moleculares: a α -quitina (caranguejos, camarões, lagostas) de orientação anti-paralela e a β -quitina (polvos e lulas) de orientação paralela (TOLAIMATE et al., 2000; HIRANO, 1999). A conformação α tem sido a mais utilizada em aplicações médicas, apesar de recentemente a β -quitina ter sido considerada como potencial e importante fonte de quitina (KURITA et al., 2000; TOLAIMATE et al., 2000). Trata-se de polissacarídeo insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos, semelhante à celulose em relação à solubilidade e à baixa reatividade química (JAYAUMAR et al., 2011; KUMAR, 2000).

A obtenção de quitosana com base na carapaça de crustáceos é constituída de quatro etapas (Figura 5): 1ª desproteinização, 2ª desmineralização, 3ª descoloração e 4ª desacetilação (DUTTA et al., 2004).

Figura 5 - Processo completo de obtenção da quitosana

Fonte: Adaptado de Dutta et al. (2004)

A quitosana é solúvel em soluções aquosas de ácidos orgânicos (acético, fórmico, cítrico) e também inorgânicos (clorídrico). Na presença dessas soluções, a quitosana apresenta-se como polieletrólito catiônico e constitui copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetamino-2-deoxi-D-

glicopirranose, com composição que varia de acordo com o grau médio de acetilação. O grau de acetilação é a fração de unidades 2-acetamido-2glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose. A proporção entre essas unidades, nas cadeias macromoleculares da quitosana, interfere na solubilidade (SANTOS et al., 2003).

3.2.1.2.2 Contribuições da quitosana como biomaterial

A quitosana tem se mostrado como alternativa muito atraente para o desenvolvimento de novos materiais para aplicações biomédicas. As aplicações de quitosana são variadas, tais como sistemas de liberação de fármacos com base em matrizes de quitosana, engenharia tecidual, quitosana como analgésico e glicosamina no combate à artrite (LARANJEIRA e FÁVERE, 2009).

Ainda na área da saúde, de modo geral, há crescente necessidade de produtos que possam ser aplicados na assistência ao paciente. Em diversas áreas da medicina há pesquisas que visam oferecer melhor resposta terapêutica e os estudos com quitosana têm oferecido futuro promissor (PARK e KIM, 2010; SHI et al., 2006; MAJETI e KUMAR, 2000).

Em razão da biocompatibilidade e da biodegradabilidade da quitosana, têm sido realizados trabalhos como excipiente em formulações farmacêuticas (géis, hidrogéis, comprimidos, microesferas, lipossomas, micro e nanopartículas) (PARK e KIM, 2010; FURTH et al., 2007; SILVA et al., 2006).

Na ortopedia, a preocupação com a substituição de articulações, reparação e regeneração de defeitos ósseos, dor lombar, osteoporose, escoliose e outros problemas músculo-esqueléticos precisam ser resolvidos com o uso de modo permanente ou temporário de dispositivos, e a quitosana também tem sido objeto de estudo (NAVARRO et al., 2008).

As infecções que se desenvolvem em feridas traumáticas e cirúrgicas continuam a ser um problema, apesar de décadas de avanços em antibióticos e

antissépticos (BURKATOVSKAYA et al., 2006). Esses autores realizaram testes *in vitro* para analisar as propriedades antibacterianas de curativo em ratos com feridas muito contaminadas. Os pesquisadores verificaram que o acetato de quitosana eliminou rapidamente a bioluminescência na ferida, conforme a atividade bactericida *in vitro* ofereceu melhor resposta que o curativo de alginato e sulfadiazina de prata.

Jayakumar et al. (2011) consideram que o curativo é uma das aplicações médicas mais promissoras para o uso da quitosana. A natureza adesiva da quitosana, as ações antifúngica e bactericida e a permeabilidade ao oxigênio são propriedades importantes quando associadas ao tratamento de feridas e queimaduras.

Membranas de quitosana ou de quitosana com outros materiais são empregadas em áreas como engenharia tecidual e em dispositivos de liberação de fármacos (DASH et al., 2011; STAMATIALIS et al., 2008).

A quitosana pode ser considerada um curativo biológico semi-permeável que mantém o exsudato da ferida estéril sob uma crosta seca, o que evita a desidratação, contaminação da ferida e melhora as condições para a cura (Stone et al., 2000).

Shi et al. (2006) consideram que a medicina regenerativa é um campo de pesquisa promissor, notadamente pela possibilidade de restauração ou substituição de órgãos perdidos ou danificados, transplante de novo tecido com a combinação de suportes (matrizes) e biomoléculas.

3.2.2 Polímeros biorreabsorvíveis, biodegradáveis e degradáveis como biomaterial

Muitos dos dispositivos protéticos permanentes destinados às aplicações terapêuticas temporárias tendem a ser substituídos por dispositivos biodegradáveis, que podem ajudar o corpo a reparar e a regenerar os tecidos

danificados. Novos polímeros biodegradáveis sintéticos e naturais desenvolvidos para aplicações biomédicas resultam de pesquisa nas áreas de engenharia tecidual, medicina regenerativa, terapias genéticas, liberação de medicamentos controlados e bionanotecnologia (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Polímeros biorreabsorvíveis são concebidos para degradar no corpo e serem absorvidos naturalmente quando sua função tiver sido realizada. As características de degradação diferem de polímero para polímero e podem variar de intumescimento à dissolução por hidrólise, quando exposto a fluidos corporais (STAMATIALIS et al., 2008). Os subprodutos da degradação desses polímeros são eliminados totalmente do corpo por vias metabólicas, sem efeitos colaterais (SANTOS JR. e WADA, 2007).

Materiais biorreabsorvíveis têm sido utilizados experimental e clinicamente em procedimentos cirúrgicos ortopédicos, tais como, osteossíntese de fraturas, substituição óssea, cartilaginosa e meniscal, fixação de ligamentos. Implantes ortopédicos temporários são necessários apenas enquanto ocorre a regeneração óssea. Para tal função, o material deve apresentar biocompatibilidade, resistência mecânica às demandas de estabilização óssea e biorreabsorção (FERREIRA et al., 2008).

Alguns exemplos de polímeros degradáveis são poli(ácido láctico) (PLA), poliglicolide (PGA), policaprolactona (PCL), colágeno e quitosana (STAMATIALIS et al., 2008).

Implantes poliméricos degradáveis são considerados de curto prazo e utilizados em aplicações que requerem a presença temporária de um implante. Uma vez utilizado um implante polimérico degradável, não há necessidade de novo procedimento cirúrgico para ser removido. Alexander et al. (1996) classificam os implantes degradáveis em quatro tipos principais:

- Suportes temporários;
- Barreiras temporárias;
- Dispositivos de liberação de drogas;

- Dispositivos multifuncionais.

No Quadro 1, constam algumas aplicações de materiais poliméricos degradáveis.

Aplicação	Comentários
Suturas	Primeira aplicação com sucesso de polímeros biodegradáveis na medicina humana
Dispositivos de liberação de drogas	Aplicação largamente investigada para utilização de polímeros biodegradáveis
Dispositivos de fixação ortopédica	Requer polímeros com alta resistência mecânica e rigidez
Prevenção de aderência	Requer polímeros que possam formar filmes ou membranas
Enxertos vasculares e <i>stents</i>	A compatibilidade com o sangue é a maior preocupação

Quadro 1 - Aplicações médicas de materiais poliméricos degradáveis

Fonte: Alexander et al. (1996, p.64)

Barbanti et al. (2005), ao discutir os desafios da engenharia tecidual, reforçam a importância de novos estudos de polímeros biorreabsorvíveis para a melhor compreensão dos fatores que influenciam a biodegradação, biorreabsorção e a forma com que interagem com os elementos biológicos. Acrescentam que o sucesso da reconstrução de órgãos e tecidos depende da combinação de técnicas das ciências, Engenharia dos Materiais, Medicina, Biologia Celular e Molecular. Também ressaltam que a formação de centros e grupos multidisciplinares contribui para ampliação do conhecimento na área.

No que se refere à degradação de biomateriais poliméricos, eles podem ser classificados como polímeros hidroliticamente degradáveis e polímeros enzimaticamente degradáveis (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Os polímeros naturais foram os primeiros biomateriais biodegradáveis utilizados clinicamente. Entretanto, muitos fatores interferem na taxa de degradação de polímeros enzimaticamente degradáveis, em especial em

aplicação *in vivo*. A taxa de degradação varia significativamente de acordo com o local de implantação, da disponibilidade e da concentração de enzimas. A modificação química dos polímeros também pode interferir na taxa de degradação (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Polímeros biodegradáveis podem ter diversas aplicações biomédicas, entre elas implantes temporários, dispositivos de liberação controlada de fármacos e suportes de engenharia tecidual (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Nair e Laurencin (2007), em trabalho sobre biomateriais poliméricos biodegradáveis, apresentaram classificação para os polímeros enzimaticamente degradáveis, de acordo com a origem do polímero, conforme a Figura 6:

Figura 6 - Classificação dos polímeros enzimaticamente degradáveis, de acordo com a origem

Fonte: Adaptado de Nair e Laurencin (2007)

De acordo com Santos Jr. e Wada (2007), a degradação de polímeros biorreabsorvíveis ocorre predominantemente por hidrólise simples, e os produtos da decomposição são eliminados do corpo por vias metabólicas.

Entretanto, a presença e a concentração de certas enzimas podem contribuir para a degradação de polímeros (FRANCHETTI e MARCONATO, 2006).

A lisozima é secretada pelo sistema monocítico (monócito-macrófago) e tem a capacidade de degradar a parede de bactérias. Está presente em secreções como saliva, lágrimas, secreções traqueobrônquicas e suco gástrico (CECCON et al., 1997).

Trata-se de proteína de baixo peso molecular e com atividade catalítica, é amplamente distribuída nos fluidos corporais. Sua ação antimicrobiana está associada com a hidrólise dos polissacáridos da parede da célula bacteriana (TRIANA et al., 2012).

A hidrólise *in vivo* da quitosana e seus derivados pela lisozima origina oligômeros que ativam os macrófagos. A degradação leva à formação de N-acetilglucosamina, componente principal dos tecidos dérmicos essencial para a reparação de tecidos. As fortes cargas positivas sobre a quitosana podem interagir fortemente com a membrana mucosa carregada negativamente, o que a torna um mucoadesivo eficaz e que contribui como acelerador na cicatrização de feridas (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Dessa forma, nota-se o potencial de filmes e membranas compostos de quitosana para o tratamento de diferentes lesões.

3.2.3 Membranas e filmes como biomaterial

As principais aplicações de membranas na área médica são em sistemas de liberação de fármacos (*drug delivery*), hemodiálise, órgãos artificiais (oxigenadores, pâncreas etc.) e engenharia tecidual (STAMATIALIS et al., 2008).

A aplicação de membranas como biomaterial requer, sobretudo, biocompatibilidade e, em alguns casos, biodegradabilidade. As propriedades do biomaterial dependem das funcionalidades do dispositivo desenvolvido. Propriedades como compatibilidade com o sangue, tamanho, forma e

porosidade devem ser controladas. Implantes cardiovasculares, por exemplo, têm como requisitos tamanhos determinados a fim de evitar a coagulação, enquanto que, na liberação controlada de fármacos, os requisitos são a permeabilidade da droga e as propriedades de liberação (STAMATIALIS et al., 2008).

Filmes produzidos com base em proteínas (proteína de soja, colágeno, ovalbumina, proteínas do soro do leite etc.) ou polissacarídeos (derivados hidrossolúveis de celulose, amido, pectina, alginatos, entre outros) contribuem para a biocompatibilidade e apresentam boas propriedades mecânicas, resistência aos solventes de baixa polaridade, hidrofilicidade, atoxicidade, biodegradabilidade e baixo custo (SEBRÃO et al., 2007).

A quitosana possui propriedades para inúmeras aplicações médicas, como: biodegradabilidade, atoxicidade, versatilidade para formar filmes, géis, fibras, matrizes poliméricas para liberação controlada de fármacos, estruturas porosas para engenharia tecidual, o que a torna atrativa (DEV et al., 2009; JAYAKUMAR et al., 2007; WESKA et al., 2007; REGE et al., 2003; KURITA et al., 2000; TOLAIMATE et al., 2000; MADIHALLY e MATHEW, 1999).

Por ser biodegradável, não antigênica e atóxica, a quitosana oferece condições benéficas à saúde, como atividades antimicrobianas e antioxidantes nos alimentos. Friedman e Juneja (2010) desenvolveram estudo em que analisaram as atividades química e antimicrobiana da quitosana em solução, como pó, filmes comestíveis e revestimento contra patógenos de origem alimentar, vírus patogênicos e fungos em diversas categorias de alimentos. Apesar de os resultados não serem conclusivos, mostraram que a quitosana tem baixa massa molar e pH abaixo de 6.0. Portanto, a quitosana apresenta condições ideais para alcançar os resultados antimicrobianos, antioxidantes e conservantes desejáveis em alimentos líquidos e sólidos, ou seja, segurança alimentar.

A quitosana também tem propriedade de adsorção e por isso o emprego em sistemas de liberação de fármacos. Ela também é propensa às modificações químicas e físicas, muito sensível aos estímulos ambientais, como, temperatura e pH. Essas características tornam a quitosana um material versátil com amplo potencial para o desenvolvimento de sistemas nanocarreador multifuncional para oferecer muitas variedades de agentes terapêuticos administrados de diversas formas com efeitos colaterais reduzidos (DUCEPPE e TABRIZIAN, 2010).

No que diz respeito à produção de filmes e membranas, de acordo com Paterno et al. (2001), em certos materiais é necessário controlar a espessura e as propriedades em escala molecular. A categoria de filmes ultrafinos atende a essa necessidade e permite a produção de filmes com estruturas moleculares organizadas. Para os autores, os métodos de Langmuir-Blodgett e de automontagem permitem o planejamento em escala molecular das propriedades finais dos filmes. Destacam como exemplo a incorporação de determinados cromóforos, de grupos funcionais e o controle da espessura das camadas do filme.

Ampla gama de polímeros foi utilizada na fabricação de filmes automontados. No Quadro 2, constam esses materiais e dentre eles encontram-se a carboximetilcelulose, a quitosana e alguns polímeros muito utilizados na produção de têxteis, como PVA e a PAAm.

Polímeros
Carboximetilcelulose (CMC) Hidrocloreto de poli(dialil dimetilamônio) (PDDA) Hidrocloreto de polialilamina (PAH) Lignina sulfonada (LS) Poli(ácido acrílico) (PAA) Poli(ácido anilina-propanosulfônico) (PAPSA) Poli(estireno-sulfonato de sódio) (PSS) Poli(etileno imina) (PEI) Poli(L-lisina) (PL) Poli(o-etoxianilina) (POEA) Poli(o-metoxianilina) (POMA) Poli(óxido de etileno) (PEO) Poli(p-fenileno vinileno) (PPV) Poli(tiofeno-3-ácido acético) (PTAA) Poli(vinil álcool) (PVA) Poli(vinil imidazol) (PVI) Poli(vinil pirrolidona) (PVP) Poli(vinil-sulfonato de sódio) (PVS) Poli[(N-metil-piridíneo-2-il)acetileno] (PMPA) Poli{1-[4-(3-carboxil-4-hidroxifenilazo)benzenosulfonamida]-1,2-etanodiil} (PAZO) Poliacrilamida (PAAm) Polianilina (PAni) Polianilina sulfonada (SPAN) Polipirrol (PPy) Quitosana (CHI)

Quadro 2 - Polímeros utilizados em filmes automontados

Fonte: Adaptado de Paterno et al. (2001)

As técnicas empregadas para produção de membranas ou filmes são definidas de acordo com as características requeridas e podem ser obtidas ao se verter o polímero em superfície plana para posterior evaporação do solvente ou por técnicas mais aperfeiçoadas, como a automontagem. De acordo com Assis e Silva (2003), os filmes obtidos por automontagem são homogêneos e diferem dos filmes obtidos por escoamento, por serem extremamente finos e apresentarem superfície menos irregular.

Materiais e métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O planejamento da parte experimental deste estudo consistiu de duas etapas. A primeira foi dedicada à produção dos géis e das membranas. A segunda, à caracterização química, física e biológica dos polímeros e das membranas.

A membrana de carboximetilcelulose (CMC) foi incluída apenas em alguns ensaios (espessura, DSC e citotoxicidade). Por se tratar de um polímero hidrossolúvel, a membrana não permanece íntegra em meio aquoso, portanto, foi incluída a este estudo apenas para comparação das características com as outras membranas estudadas. Houve tentativa de produção da membrana de CMC_GL, no entanto, essa membrana mostrou-se muito frágil e não foi possível retirá-la íntegra da placa de Petri.

4.1 Produção das membranas

A quitosana empregada neste estudo foi o produto comercial da Sigma-Aldrich®, que procede de quitinas extraídas de cascas de caranguejos, e a carboximetilcelulose também foi o produto comercial da Sigma-Aldrich® (Figura 7). Os polímeros utilizados neste estudo foram obtidos na forma pura e os solventes foram de grau analítico.

Figura 7 - Polímeros utilizados quitosana (a) e carboximetilcelulose (b)

Foram produzidos os géis de quitosana e de carboximetilcelulose para posterior desenvolvimento das membranas. Os géis e as membranas foram produzidos no Laboratório de Pesquisa de Têxteis Técnicos (LPTT), da Escola de Artes, Ciências e Humanidades (Each-USP).

4.1.1 Produção dos géis

Foram produzidos quatro géis: quitosana sem glicerol, quitosana com glicerol (1% m/m), carboximetilcelulose sem glicerol e carboximetilcelulose com glicerol (1% m/m).

A adição do glicerol aos géis não interferiu nas características macroscópicas dos géis, ou seja, eles permaneceram com a mesma coloração e viscosidade. O glicerol foi adicionado aos géis com o propósito de melhorar a plasticidade do biomaterial em desenvolvimento.

4.1.1.1 Produção do gel de quitosana

A obtenção do gel de quitosana (Figura 8) foi realizada por meio da dissolução de 5% (m/v) de quitosana em solução de ácido acético 2% (v/v) e a mistura foi mantida em agitação por 24 horas.

Posteriormente, foi adicionado álcool metílico e a concentração final de quitosana no gel foi de 2,2% (m/v), que foi filtrado a vácuo. No gel de quitosana com glicerol, o plastificante foi adicionado ao gel após a filtração.

Os géis foram colocados em banho de ultrassom, mantido à temperatura de 30 °C por uma hora e armazenados a 4 °C, para posterior utilização.

Figura 8 - Gel de quitosana

4.1.1.2 Produção do gel de carboximetilcelulose

A obtenção do gel de carboximetilcelulose (Figura 9) foi realizada por meio da dissolução de 1,4% (m/v) de carboximetilcelulose em água destilada. A mistura foi mantida em agitação por 24 horas. No gel de carboximetilcelulose com glicerol, o plastificante foi adicionado ao gel após 24 horas. Posteriormente, os géis foram colocados em banho de ultrassom, com temperatura de 30 °C por uma hora e armazenados a 4 °C, também para posterior utilização.

Figura 9 - Gel de carboximetilcelulose

4.1.2 Produção das membranas

Foram selecionadas cinco condições de preparo das membranas, conforme a Tabela 1:

Tabela 1 - Composição das membranas desenvolvidas

Membrana	Composição
QUI	Camada única com 3 g do gel de quitosana
QUI_GL	Camada única com 3 g do gel de quitosana com glicerol
CMC	Camada única com 3 g do gel de carboximetilcelulose
QUI/CMC/QUI	1ª camada com 1,5 g do gel de quitosana 2ª camada com 1,5 g do gel de carboximetilcelulose 3ª camada com 1,5 g do gel de quitosana
QUI/CMC/QUI_GL	1ª camada com 1,5 g do gel de quitosana com glicerol 2ª camada com 1,5 g do gel de carboximetilcelulose com glicerol 3ª camada com 1,5 g do gel de quitosana com glicerol

As membranas foram produzidas em placa de Petri ($\approx 6,5$ cm ϕ). As massas dos géis (Tabela 1) foram pesadas em balança analítica, diretamente sobre as placas previamente taradas.

- **Método de preparo das membranas de QUI, QUI_GL e CMC**

Após a pesagem, os géis foram distribuídos na superfície das placas que foram colocadas em banho ultrassom durante 15 minutos para a remoção das bolhas de oxigênio. As placas preparadas foram colocadas em estufa a 30 °C durante 24 horas para a secagem e formação de membranas.

- **Método de preparo das membranas híbridas (QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL)**

As membranas híbridas foram preparadas em três etapas (Figura 10):

1ª) Pesagem da primeira camada de gel e secagem em estufa a temperatura de $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 45 minutos.

2ª) Pesagem da segunda camada de gel e secagem em estufa a temperatura de $35\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 45 minutos.

3ª) Pesagem da terceira camada de gel e secagem em estufa a temperatura de $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ por 24 horas.

Figura 10 - Esquema representativo do método utilizado no preparo das membranas híbridas

4.2 Caracterização das membranas

4.2.1 Ensaio de espessura

Foram tomadas 10 medidas em cada uma das membranas. A espessura das cinco membranas foi determinada pelo Espessômetro Mitutoyo, modelo IDc112cb, com precisão de $\pm 0,001$ mm, uso de uma sapata de 6,4 mm (área 32,1 mm²) e pressão de ensaio de 19,94 kPa.

Os ensaios de espessura foram realizados no Centro de Têxteis Técnicos e Manufaturados (Cetim), do Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT).

4.2.2 Ensaio de tração

A norma utilizada no ensaio de resistência à tração foi a ASTM D882-10 (*Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting*). As dimensões dos corpos de provas foram de 2 cm de largura por 4 cm de comprimento. Foi utilizada célula de carga de 10 N com velocidade de 12,5 mm/min. Os ensaios de tração foram realizados no Cetim do IPT.

4.2.3 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Os polímeros (quitosana e carboximetilcelulose) e as membranas foram analisados na região do infravermelho em espectrofotômetro Spectrum One Perkin Elmer. As amostras foram secas previamente em dessecador com P₂O₅ sob vácuo durante 4 dias.

Uma mistura de KBr (250 mg) e cerca de 1,5 a 2,0 mg de amostra dos polímeros foram maceradas em gral e pistilo de ágata. As pastilhas de 1 cm de diâmetro foram obtidas no pastilhador com pressão de 10 kgf.cm⁻² sob vácuo durante 5 min.

A faixa espectral varrida foi de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras. O ensaio foi realizado na Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP).

4.2.4 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas DSC foram obtidas com base em célula DSC 4000, da marca Perkin Elmer, no Laboratório de Instrumentação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF-USP), sob atmosfera dinâmica de He (20 mL/min), com razão de resfriamento de $-10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ e de aquecimento de $5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$. A faixa de temperatura estudada para cada amostra foi de 0 a $340\text{ }^{\circ}\text{C}$. A temperatura e o calor de fusão foram calibrados com índio (temperatura inicial de $156,6\text{ }^{\circ}\text{C}$). Antes dos ensaios foram obtidas curvas em branco para analisar a linha de base do equipamento. Foram empregadas cápsulas de alumínio com massas das amostras variáveis, conforme a Tabela 2.

Tabela 2 - Massas das amostras de membranas e polímeros analisadas por DSC

Amostra	Massa (mg)
Membrana de QUI	5,3
Membrana de QUI_GL	5,5
Membrana de CMC	5,0
Membrana de QUI/CMC/QUI	5,5
Membrana de QUI/CMC/QUI_GL	5,9
Quitosana (flocos)	5,0
Carboximetilcelulose (pó)	5,5

As curvas obtidas foram processadas no programa Pyris e foram analisadas quanto ao início e fim dos eventos endotérmicos e exotérmicos, temperatura máxima dos principais picos ($^{\circ}\text{C}$) e entalpia de fusão (J/g).

4.2.5 Ensaio de absorção de água e de perda de massa

Os ensaios de absorção de água e perda de massa (Figura 11) em solução salina de tampão fosfato (PBS) e em solução de saliva artificial foram realizados no LPTT da Each-USP.

Figura 11 - Esquema representativo dos ensaios de absorção de água e perda de massa.

4.2.5.1 Absorção de água e de perda de massa em solução salina de tampão fosfato (PBS)

A composição da solução PBS utilizada encontra-se na Tabela 3. A solução foi preparada em pH $7,4 \pm 0,02$ e foi autoclavada por 30 minutos a 121 °C.

Tabela 3 – Composição da solução PBS

Reagente	Massa/volume
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g
KCl	0,2 g
NaCl	8 g
Água deionizada	1000 mL

As amostras, previamente secas por 24 horas a 30 °C, foram pesadas e adicionadas individualmente em tubos de Falcon com 10 mL da solução PBS. O experimento foi realizado em triplicata e as amostras foram acondicionadas a 37 °C. Foram retiradas amostras em 1, 3, 5, 7, 9, 15, 21 e 30 dias.

A massa úmida das amostras foi tomada com o propósito de conhecer a capacidade de absorção de água em cada membrana e a quantidade de água absorvida foi calculada pela Equação 1.

$$\% \text{ água absorvida} = \left(\frac{m_w - m_i}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: m_i = massa inicial da amostra

m_w = massa da amostra úmida

Depois de pesadas, as amostras retiradas da solução permaneceram por 24 horas a 30 °C e novamente foram pesadas para determinação da massa final. A perda de massa foi calculada conforme a Equação 2.

$$\% \text{ perda de massa} = \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: m_f = massa final da amostra após a secagem

m_i = massa inicial da amostra

4.2.5.2 Absorção de água e de perda de massa em solução de saliva artificial

A solução de saliva artificial (Tabela 4) foi preparada, conforme Klimek et al. (1982).

Tabela 4 – Composição da solução de saliva artificial

Reagente	Massa (g)
Ácido ascórbico	0,001
Glicose	0,015
NaCl	0,29
CaCl ₂	0,085
NH ₄ Cl	0,08
NaSCN	0,08
KCl	0,635
KH ₂ PO ₄	0,165
Carbamida (uréia)	0,1
Mucina	1,35
NaHPO ₄	0,17

As amostras, previamente secas por 24 horas a 30 °C, foram pesadas e colocadas individualmente em tubos de Falcon e adicionados 10 mL da solução de saliva artificial. As amostras foram acondicionadas a 37 °C e três amostras de cada uma das membranas foram retiradas após 24, 48 e 72 horas. A quantidade de saliva artificial absorvida foi calculada pela Equação 1 (4.2.5.1).

Depois de pesadas, as amostras permaneceram por 24 horas a 30 °C e novamente pesadas para determinação da massa final. A perda de massa foi calculada segundo a Equação 2 (4.2.5.1).

4.2.6 Ensaio de bioatividade

Foi utilizada a solução de fluido corporal simulado (SBF), que simula a concentração de íons do plasma sanguíneo (Tabela 5) para análise da bioatividade das membranas. Ao longo dos anos, a solução SBF passou por vários ajustes e, neste estudo, utilizou-se a solução SBF corrigida (KOKUBO e TAKADAMA, 2006). A formação de hidroxiapatita está associada à capacidade de osseointegração de um material. A norma ISO 23.317 indica a solução SBF corrigida para a análise da capacidade de formação de hidroxiapatita *in vitro*, na superfície de materiais implantáveis (SIQUEIRA e ZANOTTO, 2011).

Tabela 5 - Composição da solução SBF

Reagente	Massa/volume
NaCl	16,072 g
NaHCO ₃	0,704 g
KCl	0,450 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,460 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,622 g
CaCl ₂	0,586 g
Na ₂ SO ₄	0,144 g
TRIS	12,236 g
1M - HCl	75 mL

O ensaio foi realizado em triplicata e as amostras, previamente secas por 24 horas a 30 °C, foram pesadas e colocadas individualmente em tubos de Falcon e adicionados 10 mL da solução SBF. As amostras foram acondicionadas a 37 °C e retiradas em 1, 3, 5, 7, 15, 21 e 30 dias. As amostras retiradas permaneceram por 24 horas a 30 °C.

Para verificação da formação de hidroxiapatita, foi realizada a análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de energia

dispersiva (EDS), no Laboratório de Caracterização Tecnológica (LCT), do Departamento de Minas e Petróleo (PMI), da Escola Politécnica da USP (EPUSP). Foram selecionadas amostras das membranas dos dias 3, 7 e 21 em solução SBF. Como controle, foram utilizadas membranas que não foram expostas à solução SBF.

As amostras foram aderidas ao suporte com fita de carbono e recobertas com platina. As imagens foram realizadas em microscópio eletrônico da marca FEI, modelo Quanta 600 FEG, em atmosfera de alto vácuo com aumento de 5.000 vezes.

4.2.7 Citotoxicidade

Para o ensaio de citotoxicidade, foram utilizadas células da linhagem NTCC clone 929, da *American Type Culture Collection* (ATCC), cultivadas em meio mínimo de Eagle (MEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1,0 mM de piruvato de sódio (MEM-uso). As células foram cultivadas e fornecidas pelo Instituto Adolfo Lutz. O ensaio de citotoxicidade foi realizado no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (Ipen).

Foram utilizadas amostras de 0,5 g de cada uma das membranas. As amostras foram cortadas (aproximadamente 0,5 cm), colocadas em frascos de 12 mL e irradiadas a 25 KGy.

Após a esterilização das amostras, foram adicionados 5 mL de MEM sem soro. Depois de 24 horas de imersão, em estufa a 37 °C, foram preparadas cinco diluições do extrato (100, 50, 25, 12,5 e 6,25%) em 1,5 mL de MEM-uso.

Foi utilizado como controle positivo uma solução de fenol 0,2% em solução PBS e como controle negativo 0,3 g de pellets de PVC (Darco) em 5 mL de MEM-uso.

O meio de cultura da microplaca foi substituído pelos extratos diluídos e pelos controles positivo e negativo, em triplicatas. As microplacas foram colocadas em estufa de CO₂ (5%) por 24 horas.

Os extratos e os controles foram substituídos por solução de vermelho neutro e permaneceram a 37 °C por três horas, para incorporação do corante vital. As microplacas foram lavadas duas vezes com solução PBS e uma vez com solução de lavagem (1% de CaCl₂ em formaldeído 0,5%). Foram colocados 200 µL da solução de extração (1% ácido acético em etanol 50%) em cada poço da microplaca. As microplacas foram colocadas em um leitor ELISA, modelo RC Sunrise da Tecan, com agitação por 10 minutos e leitura em 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

4.2.8 Estudo de degradação da quitosana em solução PBS com lisozima

Para investigar a influência da enzima lisozima nas propriedades físico-químicas das membranas de QUI sem e com glicerol, os filmes foram incubados em tampão PBS pH 7,4 ± 0,02 com a enzima lisozima (EC 3.1.2.17, *from chicken egg white*, ≥ 40000 U/mg, Sigma) a 37 °C, por diferentes períodos de tempo (1, 3, 5, 7 e 10 dias) sob condições estáticas.

A concentração da enzima lisozima utilizada neste estudo foi de 1560 mg/L, que correspondeu a 3330 U/mL. A concentração de açúcares redutores liberados na solução pela ação de degradação das membranas pela enzima lisozima foi medida pelo método de DNS (GHOSE, 1987). A perda de massa foi determinada conforme descrito no item 4.2.5.1.

4.2.8.1 Determinação dos açúcares redutores pelo método DNS

A solução de DNS foi preparada com 2,5 g de ácido 3,5-dinitrossalicílico, dissolvidos em 50 mL de NaOH 2N e 125 mL de água destilada. A solução

permaneceu em banho-maria a 80 °C para solubilização. Foram adicionados 75 g de tartarato duplo de sódio e potássio (sal de La Rochelle) e a solução permaneceu sob agitação até a completa dissolução do sal. A solução foi transferida para um balão de 250 mL e o volume foi completado com água. A solução foi armazenada em frasco escuro.

A curva padrão (Equação 3) foi obtida pela diluição de solução de glicose 500 mg/L nas concentrações de 50, 200, 300 e 500 mg/L.

$$C = \left(\frac{ABS - 0,0206}{0,0011} \right) \text{ mg/L} \quad (\text{Equação 3})$$

Gráfico 1 - Curva padrão para determinação da concentração de açúcares redutores

A análise das amostras foi realizada em triplicata, conforme segue:

- Branco: 450 µL de tampão PBS + 450 µL DNS. Banho-maria a 100 °C por 5 minutos e adição de 4 mL de água destilada.

- Amostra: 450 μ L da amostra e 450 μ L de DNS. Banho-maria a 100 °C por 5 minutos e adição de 4 mL de água destilada. As amostras foram lidas no espectrofotômetro (Beckman) a 540 nm.

4.2.9 Estudo de liberação de lisozima

A enzima lisozima foi incorporada ao gel antes do preparo das membranas. A concentração utilizada foi de 1,56 mg para cada 1 g de gel. O processo de obtenção das membranas foi realizado conforme descrito no item 4.1.

As membranas foram incubadas em solução PBS a 37 °C e as amostras foram retiradas nos períodos de 1, 3, 5, 7 e 10 dias. Esse ensaio também foi realizado em solução de saliva artificial. As membranas foram incubadas a 37 °C e as amostras retiradas nos períodos de 1, 2 e 3 dias.

Para análise da liberação da enzima na solução, foram consideradas a concentração de proteína na solução e a atividade enzimática. Também se analisou a concentração de açúcares redutores (item 5.6).

4.2.9.1 Determinação de concentração de proteínas pelo método de Bradford

A concentração de proteína foi medida pelo método de Bradford (1976). Baseia-se na mudança de cor da solução ácida do Coomassie Brilliant Blue G 250, que, ao se ligar à proteína, muda a absorbância máxima de 465 nm para 595 nm.

O reagente Coomassie Blue foi preparado com 100 mg de Coomassie, 50 mL de etanol (95%), 100 mL de ácido fosfórico (85%) e o volume ajustado para 1000 mL com água destilada. Em seguida, a solução foi filtrada.

A curva padrão foi obtida com soluções de BSA nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg/L e tampão fosfato pH 7,4 $\pm$ 0,1 como solvente.

Para a leitura das amostras (em triplicata), foram pipetados 100 µl de cada uma das concentrações em tubos de ensaios. Em cada tubo foi adicionado 5 mL do reagente Coomassie Blue. A mistura foi agitada em vortex e a solução mantida em repouso durante 5 min. Após 5 min, foi feita a leitura das amostras a 595 nm, com o uso de branco preparado com 100 µl de tampão e 5 mL do reagente Coomassie Blue.

A média dos valores obtidos para cada uma das amostras foi inserida numa curva padrão (Gráfico 2). A concentração de proteína foi calculada com a substituição da absorbância da amostra de lisozima na equação obtida (Equação 4).

$$C \text{ (mg/L)} = \left(\frac{ABS - 0,0073}{0,0002} \right) \quad (\text{Equação 4})$$

Gráfico 2 - Curva padrão de BSA para determinação da proteína total

4.2.9.2 Determinação de atividade enzimática

Atividade enzimática da lisozima foi determinada com solução de 24 mg de *Micrococcus lysodeikticus* em 80 mL de tampão de fosfato de sódio 0,1 M,

pH 7. Para determinação da atividade, foram utilizados 50 µl da amostra e 950 µl de solução de *Micrococcus lysodeikticus* em solução tampão de fosfato. A absorbância foi medida em 450 nm (JOHANSSON JONSSON, 2003). Uma unidade de atividade foi definida como o decréscimo da densidade óptica (ΔOD_{450}) por $0,001 \text{ min}^{-1}$ (CHANG e CHU, 2007).

A atividade de lisozima na fase líquida foi medida conforme a Equação 5.

$$\text{Lisozima (UI/mL)} = \left(\frac{\Delta OD_{450}}{0,001 \times V_s} \right) \times D_f \quad (\text{Equação 5})$$

Em que:

$0,001$ é a mudança de absorbância em ΔOD_{450} por unidade de lisozima;

V_s = volume usado de lisozima (mL);

D_f = fator de diluição.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Aspectos macroscópicos das membranas produzidas

As membranas de QUI e QUI_GL apresentaram boa uniformidade (Figura 12). As membranas híbridas QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL foram as mais opacas e eventualmente apresentaram pequenas bolhas, decorrente do método de produção. Conforme o esperado, as membranas com glicerol apresentam mais plasticidade.

Figura 12 - Fotografia das membranas de (a) QUI, (b) QUI_GL, (c) QUI/CMC/QUI e (d) QUI/CMC/QUI_GL

5.2 Caracterização das membranas produzidas

Os resultados da caracterização das membranas produzidas foram apresentados de acordo com o método deste estudo. Dessa forma, os itens que seguem apresentam os resultados e a análise dos ensaios de espessura, tração, DSC, FTIR, absorção de água e perda de massa, citotoxicidade e degradação.

5.2.1 Espessura das membranas

Os resultados do ensaio de espessura (Tabela 6) apresentaram divergências com exceção da membrana de CMC, visivelmente mais fina e uniforme. As membranas de QUI e QUI_GL deveriam apresentar espessuras mais próximas entre si, da mesma maneira que as membranas de QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL, por causa da similaridade do gel utilizado e pela técnica empregada na produção das membranas.

A membrana de QUI apresentou desvio padrão (DP) de 0,008, mais acentuado entre as membranas, o que evidenciou diferença mais acentuada de espessura na sua área.

Tabela 6 - Resultados do ensaio de espessura das membranas

Membranas	Espessura (mm)/DP
CMC	0,017±0,001
QUI	0,033±0,008
QUI_GL	0,020±0,002
QUI/CMC/QUI	0,029±0,004
QUI/CMC/QUI_GL	0,036±0,004

As diferenças de espessuras resultaram da forma de produção das membranas. O gel foi vertido sobre as placas e espalhado manualmente com o auxílio de uma espátula. Essas diferenças também podem estar associadas com

alguma irregularidade na superfície da placa de Petri ou com alguma inclinação no local em que as membranas foram secas.

Caso a uniformidade na espessura seja requisito necessário ao biomaterial, técnicas mais aperfeiçoadas podem ser utilizadas na produção das membranas. Técnicas para a produção de filmes ultrafinos estão bem documentadas na literatura e os pesquisadores utilizam o método de automontagem, que proporciona elevado controle de espessura, homogeneidade e reprodutibilidade (PATERNO et al., 2001).

5.2.3 Propriedades de resistência à tração das membranas

No ensaio de tração, a principal diferença entre as membranas ocorreu na presença ou não do plastificante glicerol. O alongamento à carga máxima foi 8 vezes maior nas membranas de QUI_GL em relação às membranas de QUI e 5 vezes maior nas membranas de QUI/CMC/QUI_GL em relação às membranas de QUI/CMC/QUI.

Costa Jr. e Mansour (2008) estudaram as propriedades mecânicas de filmes de diversas misturas de QUI e PVA e verificaram que quanto maior a concentração de QUI no filme, maior a tensão máxima de tração. Neste estudo não foi possível verificar a influência da quitosana. Entretanto, quando comparadas as membranas de QUI/CMC/QUI e QUI, observou-se que a presença de carboximetilcelulose proporcionou aumento de 20,6% na carga máxima e 25,5% no alongamento à carga máxima. Na Tabela 7, estão apresentados os resultados do ensaio de tração.

Tabela 7 - Carga máxima, alongamento à carga máxima e módulo de Young das membranas QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL

Membranas	Carga máxima (N)		Alongamento a carga máxima (%)		Módulo de Young (Mpa)	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP
QUI	18,34	3,96	4,65	1,25	2118,31	898,45
QUI_GL	14,82	3,55	36,32	10,10	654,65	238,27
QUI/CMC/QUI	23,09	6,00	6,24	5,74	2196,29	271,96
QUI/CMC/QUI_GL	12,92	2,58	33,82	5,00	208,03	113,13

De acordo com Cenevarolo e Vicente (2006), o módulo de Young está diretamente relacionado à rigidez do polímero, pois, quanto maior o módulo de Young, maior a rigidez do polímero. Essa afirmação corrobora com os resultados encontrados neste estudo, porque o módulo de Young foi maior nas membranas sem glicerol.

5.2.3 Caracterização por FTIR dos polímeros e das membranas

No espectro de infravermelho do polímero quitosana (Gráfico 3), as principais bandas encontradas foram: estiramento axial de -OH entre 3406 e 3426 cm^{-1} , sobreposta à banda de estiramento N-H; deformação axial de C=O de amida por volta de 1640 cm^{-1} ; deformação angular de N-H em aproximadamente 1590 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de amida por volta de 1420 cm^{-1} ; deformação angular simétrica de CH_3 em 1370 cm^{-1} ; deformação axial de -CN de grupos amino entre 1321 a 1380 cm^{-1} ; e bandas de estruturas polissacarídicas na região entre 800 a 1020 cm^{-1} .

Essas bandas foram semelhantes às apresentadas na literatura (SANTOS et al., 2003; BRUGNETTO et al., 2001).

Gráfico 3 - Espectro no infravermelho dos polímeros quitosana e carboximetilcelulose

Ainda, no Gráfico 3, foi apresentado o espectro infravermelho do polímero carboximetilcelulose comercial. Na síntese de carboximetilcelulose ocorre a inserção na estrutura da celulose do grupo $-\text{CH}_2\text{COONa}$. Esse grupamento possui carbonila (inserida no grupo carboxilato), que normalmente absorve na faixa de 1650 a 1550 cm^{-1} , por causa da formação axial assimétrica. A banda larga na região 3650 a 3000 cm^{-1} foi decorrente do estiramento da ligação OH.

No Gráfico 4, estão apresentados os espectros das membranas produzidas. Notou-se que as membranas de QUI e QUI_GL apresentaram as bandas características do polímero quitosana. Pode-se observar que houve redução da intensidade das bandas na membrana com glicerol.

Gráfico 4 - Espectro no infravermelho das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL

Costa Jr. e Mansur (2008), ao estudar filmes de quitosana pura e blendas de quitosana e poli(álcool vinílico), notaram que, com o aumento do teor de quitosana, houve aumento na banda de 1730 cm⁻¹, atribuída ao estiramento da amina (C=O). Também houve aumento na banda de 1250 cm⁻¹, atribuída à deformação do -NH₃⁺, estiramento do CO e deformação do OH, por causa da mistura dos polímeros.

Tonhi e Plepis (2002) submeteram blendas de colágeno e quitosana à espectroscopia no infravermelho e verificaram que não houve interação entre os polímeros, porém, notaram alteração na intensidade das bandas decorrente das diferentes proporções entre os polímeros.

5.2.4 Caracterização por DCS dos polímeros e das membranas

As amostras submetidas à análise de DSC apresentaram eventos endotérmicos e exotérmicos. Para Machado e Matos (2004), os eventos

endotérmicos e exotérmicos podem ocorrer em polímeros. Eventos exotérmicos podem estar relacionados à fusão, perda de massa (vaporização de água, aditivos ou produtos voláteis de reação ou decomposição), dessorção e reações de redução. Os eventos exotérmicos se referem à cristalização, reações de polimerização, cura, oxidação, degradação oxidativa, adsorção, entre outros.

Nas amostras de quitosana, foram verificados dois picos. O primeiro, endotérmico, relacionado ao processo de desidratação (perda de água) do polímero e pode variar de acordo com a secagem do material. O segundo, exotérmico, relacionado à decomposição.

As amostras de carboximetilcelulose também apresentaram um pico endotérmico e dois exotérmicos.

Na Tabela 8, constam os eventos endotérmicos e exotérmicos das amostras, com a temperatura de início do evento (*onset*), temperatura do pico e entalpia.

Tabela 8 - Temperatura *onset*, temperatura do pico e entalpia dos eventos endotérmicos e exotérmicos

Amostra	Evento	Temperatura onset (°C)	Temperatura pico (°C)	Entalpia (J/g)
Quitosana (flocos)	Endotérmico	134,47	136,35	102,24
	Exotérmico	268,74	295,28	-135,79
Carboximetilcelulose (pó)	Endotérmico	103,45	130,17	69,44
	Exotérmico 1	259,06	270,22	-84,92
	Exotérmico 2	299,58	306,85	-22,01
Membrana de QUI	Endotérmico	97,23	120,85	120,20
	Exotérmico	251,38	281,40	-129,40
Membrana de QUI_GL	Endotérmico	110,67	133,87	110,97
	Exotérmico	256,91	284,33	-142,23
Membrana de CMC	Endotérmico	77,74	113,09	186,45
	Exotérmico 1	263,46	270,60	-91,14
	Exotérmico 2	299,56	307,38	-12,87
Membrana de QUI/CMC/QUI	Endotérmico	149,13	151,74	198,22
	Exotérmico	247,30	279,65	-126,38
Membrana de QUI/CMC/QUI_GL	Endotérmico	132,40	133,45	154,43
	Exotérmico	251,39	274,65	-106,49

As análises DSC permitiram verificar que as membranas de QUI e de CMC mantiveram o perfil térmico dos polímeros, que foram utilizados na preparação (quitosana em flocos e carboximetilcelulose em pó). Tal informação foi relevante, pois os polímeros foram solubilizados para a formação do gel e posterior produção da membrana.

No Gráfico 5, consta a comparação das curvas obtidas por DSC das amostras analisadas.

Gráfico 5 - Comparação das curvas obtidas por DSC das amostras analisadas polímero quitosana (flocos) (1), membrana de QUI (2), membrana de QUI_GL (3), polímero carboximetilcelulose (pó) (4), membrana de CMC (5), membrana de QUI/CMC/QUI (6) e membrana de QUI/CMC/QUI_GL (7)

No caso das membranas híbridas, notou-se interação entre os polímeros. A carboximetilcelulose apresentou dois picos exotérmicos em 270,22 °C e 306,85 °C, enquanto que a quitosana apresentou apenas um em 295,28 °C. Nas membranas híbridas, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_G,L os picos exotérmicos ocorreram em 279,65 °C e 274,65 °C, respectivamente, com entalpia inferior as das amostras de quitosana e superior as amostras de carboximetilcelulose.

5.2.5 Propriedades de absorção de água e de perda de massa das membranas em solução salina de tampão fosfato (PBS) e saliva artificial

5.2.5.1 Absorção de água

O ensaio de absorção de água em solução PBS permitiu verificar como a presença de carboximetilcelulose interferiu na hidrofilicidade da membrana. A membrana de QUI_GL teve capacidade de absorção inferior às membranas de QUI, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL e a membrana de QUI se degradou completamente após 15 dias, em solução PBS (Gráfico 6). A absorção média de água da membrana de QUI_GL em solução PBS foi de aproximadamente 2 vezes sua massa inicial (213%). A membrana de QUI/CMC/QUI_GL apresentou absorção média de quase 10 vezes sua massa inicial (920,6%) e a membrana de QUI/CMC/QUI teve absorção média de 17 vezes sua massa inicial (1696,5%).

Gráfico 6 - Absorção de água das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução PBS

A capacidade de absorção de água das membranas em solução de saliva artificial foi diferente do ensaio em solução PBS. Em solução de saliva artificial, as membranas com carboximetilcelulose também apresentaram mais capacidade de absorção de água (Gráfico 7). A membrana de QUI/CMC/QUI_GL teve mais capacidade de absorção em saliva artificial, ao passo que em solução PBS a membrana de QUI/CMC/QUI foi a que obteve mais capacidade de absorção (Gráfico 6).

Gráfico 7 - Absorção de água das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução de saliva artificial

O glicerol é um plastificante com caráter hidrofílico, com capacidade para aumentar a hidrofilicidade e permeabilidade ao vapor d'água em filmes poliméricos (SHIMAZU et al., 2007). Contudo, observou-se que ocorreu mais absorção de água na membrana de QUI/CMC/QUI_GL em comparação com a membrana de QUI/CMC/QUI, apenas na solução de saliva artificial, uma vez que as demais membranas com glicerol apresentaram absorção de água inferior à mesma membrana sem glicerol, tanto na solução PBS como na solução de

saliva artificial. O principal motivo para o aumento da absorção de água foi a presença de carboximetilcelulose.

5.2.5.2 Perda de massa

Em solução PBS (Gráfico 8), a percentagem mais elevada de perda de massa ocorreu nas membranas com glicerol. A média de perda de massa das membranas de QUI/CMC/QUI, ao longo dos 30 dias, foi de $14,2\% \pm 7,67$, enquanto que nas membranas de QUI_GL e QUI/CMC/QUI_GL a média de perda de massa foi de $27,2\% \pm 1,74$ e $28,9\% \pm 3,35$, respectivamente.

Gráfico 8 - Perda de massa das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução PBS

No Gráfico 9, verificou-se que ao longo dos 3 dias houve baixa alteração na perda de massa das membranas, em solução de saliva artificial. A membrana de QUI foi a que apresentou as menores percentagens de perda de massa, enquanto que na solução PBS degradou-se completamente em 15 dias.

A perda de massa mais expressiva, observada na membrana de QUI/CMC/QUI (Gráfico 9), está relacionada ao decréscimo na capacidade de absorção de água (Gráfico 7) em solução de saliva artificial.

Gráfico 9 - Perda de massa das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL em solução de saliva artificial

De maneira geral, a perda de massa das membranas foi mais acentuada em solução PBS, com exceção da membrana de QUI/CMC/QUI.

A quantidade de grupos amino protonados ($-\text{NH}_3^+$) na quitosana está relacionada à solubilidade. Quanto maior a presença dos grupos amino, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água (SANTOS et al., 2003).

5.3 Bioatividade das membranas

As membranas controle apresentaram aspecto semelhante, uniforme e com ausência de porosidade, que são características da forma de obtenção das membranas por meio do gel (Figura 13).

As análises de EDS das membranas controle (Figura 13) permitiram verificar a predominância dos elementos carbono (C) e oxigênio (O), presentes na estrutura da quitosana e da carboximetilcelulose.

Também foi possível notar pequenos picos de platina (Pt), que foi utilizada no recobrimento das amostras e cloro (Cl), presente na água utilizada na solubilização dos polímeros.

(a)

-

(b)

(d)

(e)

(c)

(f)

Figura 13 - MEV das membranas controle de (a) QUI, (b) QUI_GL, (d) QUI/CMC/QUI, (e) QUI/CMC/QUI_GL, EDS das membranas controle de (c) QUI e (f) QUI/CMC/QUI

As amostras submetidas à solução SBF apresentaram picos de potássio (K) e cloro, conforme é possível verificar na Figura 14.

Figura 14 - MEV das membranas (a) QUI, após três dias e (b) QUI após 21 dias em solução SBF

Após 3 dias em solução SBF, a membrana de QUI apresentou cristais de cálcio (Ca) (Figura 15).

Figura 15 - MEV (a) e EDS (b) da membrana de QUI após 3 dias em solução SBF

A Figura 16 mostra o mapeamento da área com presença de cálcio da membrana de QUI/CMC/QUI_GL após 3 dias em solução SBF.

Figura 16 - Mapeamento da membrana de QUI/CMC/QUI_GL após 3 dias em solução SBF

As amostras das membranas QUI, QUI_GL e QUI/CMC/QUI, após 7 dias em solução SBF, apresentaram no EDS pontos de fósforo (P) e cálcio (Figura 17).

Continuação da Figura 17

Figura 17 - MEV e EDS das membranas de QUI (a) e (b), QUI_GL (c) e (d), QUI/CMC/QUI (e) e (f), QUI/CMC/QUI_GL (g) e (h) após 7 dias em solução SBF

Na Figura 18, consta o mapeamento de região com a presença de cálcio e fósforo.

Figura 18 - Mapeamento da membrana de QUI após 7 dias em solução SBF

Pelas imagens da MEV, foi possível verificar a diferença nos cristais que são apenas de cálcio após 3 dias, e os que apresentaram fósforo e cálcio após 7 dias (Figura 19).

Figura 19 - Comparação dos cristais de cálcio encontrados nas amostras de 3 dias (a) e cálcio e fósforo encontrados nas amostras de 7 dias (b)

O crescimento da hidroxiapatita ocorre em meio que contenha, além dos íons cálcio e fósforo, elementos-traços essenciais, como Mg^{2+} , HCO_3^- , K^+ e Na^+

(APARECIDA et al., 2005). Esses elementos foram vistos nas amostras de 21 dias (Figura 20).

Na análise das amostras de 21, dias foram encontrados pontos de cálcio e de fósforo nas membranas de QUI_GL e QUI/CMC/QUI_GL (Figura 20).

(a)

(b)

(c)

(d)

Continuação da Figura 20

Figura 20 - MEV e EDS das membranas de QUI (a) e (b), QUI_GL (c) e (d), QUI/CMC/QUI (e) e (f), QUI/CMC/QUI_GL (g) e (h) após 21 dias em solução SBF

5.4 Citotoxicidade

No Gráfico 10, pode ser observada a viabilidade celular em função da concentração do extrato das membranas sem glicerol, enquanto que no Gráfico 11 a das membranas com glicerol. Notou-se que não houve diferença entre as amostras com e sem glicerol; também foi possível verificar que as amostras apresentaram padrão muito próximo ao controle negativo.

Gráfico 10 - Ensaio de citotoxicidade das membranas sem glicerol

Quanto à presença de glicerol nas membranas, também não houve influência na viabilidade celular. De acordo com Shimazu et al. (2007), o glicerol é atóxico e amplamente utilizado em aplicações terapêuticas e farmacológicas.

Gráfico 11 - Ensaio de citotoxicidade das membranas com glicerol

Os resultados do ensaio de citotoxicidade demonstraram que nenhuma das membranas estudadas apresentou toxicidade, o que está em conformidade com a literatura (CROISIER e JÉRÔME, 2013, JAYAKUMAR et al., 2007; KUMAR, 2000).

5.5 Análise da degradação da quitosana por ação enzimática

Neste ensaio verificou-se que a presença do glicerol desacelerou o processo de degradação (Gráficos 12 e 13). Também foi possível notar que a degradação da quitosana diminui o pH do meio (Gráfico 12), isso pode ser atribuído à solubilização da quitosana em ácido acético (preparo do gel). O estudo foi realizado em solução tampão com pH $7,4 \pm 0,1$, todavia, pode-se notar a mudança para o pH 6.8 após 24 horas. A alteração do pH para um meio mais ácido, ocorreu porque o processo de solubilização do polímero quitosana foi realizado em ácido acético 2% (v/v).

Ainda foi possível observar que o glicerol agiu como estabilizante. Nesse caso, a alteração no pH foi 3 vezes menor que nas membranas sem glicerol, pois a estabilização do pH pode estar associada à estabilização na degradação da membrana de QUI_GL (Gráfico 13).

Gráfico 12 - Evolução do pH em solução PBS com lisozima no período de 10 dias a 37 °C das membranas de QUI (-■-) e QUI_GL (-●-)

Nos Gráfico 13 e 14, constam a degradação das membranas de QUI ao longo dos 10 dias, tanto pelo método de concentração de açúcares redutores quanto pela perda de massa dos filmes. Em ambos, as membranas de QUI apresentaram degradação constante durante o período estudado, enquanto que as membranas de QUI_GL apresentaram-se mais estáveis.

Gráfico 13 - Concentração de açúcares redutores em solução PBS com lisozima, no período de 10 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-) e QUI_GL (-●-)

Gráfico 14 - Perda de massa em solução PBS com lisozima, no período de 10 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-) e QUI_GL (-●-)

Verificou-se que a degradação da quitosana pura intensificou-se a partir do 3º dia (100mg/L) e atingiu a concentração de 500 mg/L no 10º dia (Gráfico 13).

A membrana de QUI_GL manteve a concentração de açúcares redutores entre 25 e 75 mg/L até o 7º dia. Apenas no 10º dia, a concentração de açúcares redutores variou entre 100 e 150 mg/L.

Notou-se que a lisozima presente na solução foi mais eficaz na degradação das membranas sem glicerol (Gráficos 13 e 14). Isso pode estar associado à redução do pH (Gráfico 12), pois a atividade da lisozima é mais elevada em pH mais baixo (WEI et al. 2011).

5.6 Degradação das membranas produzidas e liberação da lisozima nas soluções PBS e saliva artificial

A concentração de proteína (lisozima) liberada da membrana para a solução foi medida com propósito de verificar as diferenças no perfil de liberação das quatro membranas estudadas.

Foi possível verificar que a concentração de proteína na solução foi crescente ao longo do período analisado, tanto na solução PBS (Gráfico 15) como na de saliva artificial (Gráfico 16).

Gráfico 15 - Concentração de proteína na solução PBS, no período de 10 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-), QUI_GL (-●-), QUI/CMC/QUI (-▲-) e QUI/CMC/QUI_GL (-▼-)

Gráfico 16 - Concentração de proteínas na solução de saliva artificial, no período de 3 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-), QUI_GL (-●-), QUI/CMC/QUI (-▲-) e QUI/CMC/QUI_GL (-▼-)

Pode-se observar que as membranas de QUI e QUI/CMC/QUI tiveram melhor desempenho na liberação da enzima que as membranas com glicerol em solução PBS, com destaque para a membrana de QUI/CMC/QUI. A membrana de QUI_GL foi a que obteve o menor desempenho na liberação da enzima em ambas soluções.

No que se refere à atividade da enzima, observou-se que a maior concentração de enzima ativa foi encontrada nas soluções com as membranas sem glicerol (Gráficos 17 e 18), tanto para a solução PBS quanto para a de saliva artificial. Como mencionado anteriormente, a elevada liberação da enzima nas membranas sem glicerol pode estar associada à redução do pH das soluções. Pois a atividade da lisozima é aumentada em pH reduzido (WEI et al. 2011).

Gráfico 17 - Atividade da lisozima em solução PBS, no período de 10 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-), QUI_GL (-●-), QUI/CMC/QUI (-▲-) e QUI/CMC/QUI_GL (-▼-)

Gráfico 18 - Atividade da lisozima em solução de saliva artificial, no período de 3 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-), QUI_GL glicerol (-●-), QUI/CMC/QUI (-▲-) e QUI/CMC/QUI_GL (-▼-)

Ao comparar as soluções PBS (Gráfico 17) e de saliva artificial (Gráfico 18) notou-se que houve o mesmo comportamento da atividade enzimática no 1º dia em ambas as soluções; no 2º e 3º dias, as membranas de QUI e QUI/CMC/QUI ultrapassaram 0,10 UI/mL na solução de saliva artificial. Entretanto, a partir do 5º dia foi possível verificar que a solução PBS mostrou-se propícia para a atividade da enzima, uma vez que houve crescimento constante da atividade em todas as membranas até o término do experimento. No caso das membranas de QUI e QUI/CMC/QUI, a atividade enzimática no 10º dia foi 6 vezes maior que a encontrada no 3º dia. Enquanto que na solução de saliva artificial, três das quatro amostras indicaram queda na atividade no 3º dia do ensaio.

A indicação de queda na atividade enzimática na solução de saliva artificial, a partir do 3º dia, pode ser atribuída à degradação da solução,

mencionada por Klimek et al. (1982). De acordo com os autores, a solução não deve ser utilizada após esse período, por se tratar de solução biológica.

As membranas com lisozima também foram analisadas em relação à degradação. Com base na análise dos açúcares redutores, foi possível observar que nos 3 primeiros dias a concentração de açúcares redutores ficou abaixo de 30 mg/L na solução PBS para todas as membranas (Gráfico 19), enquanto que na solução de saliva artificial a concentração de açúcares redutores no 3º dia foi de 50 mg/L para a membrana de QUI, 90 mg/L para a membrana de QUI/CMC/QUI_GL e 110 mg/L para a membrana de QUI/CMC/QUI (Gráfico 20).

No Gráfico 19, é possível verificar que na solução PBS a membrana de QUI atingiu a concentração de 260 mg/L de açúcares redutores, ao passo que as membranas de QUI/CMC/QUI, QUI/CMC/QUI_GL e QUI_GL não ultrapassaram a concentração de 125 mg/L.

Gráfico 19 - Concentração de açúcares redutores em solução PBS, no período de 10 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-), QUI_GL glicerol (-●-), QUI/CMC/QUI (-▲-) e QUI/CMC/QUI_GL (-▼-)

Gráfico 20 - Concentração de açúcares redutores em solução de saliva artificial, no período de 3 dias, a 37 °C, das membranas de QUI (-■-), QUI_GL glicerol (-●-), QUI/CMC/QUI (-▲-) e QUI/CMC/QUI_GL (-▼-)

5.7 Propriedades das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL e possíveis aplicações na área biomédica

As propriedades das membranas de QUI, QUI_GL, QUI/CMC/QUI e QUI/CMC/QUI_GL foram variadas, como o esperado. A proposta de melhorar as propriedades de absorção de água das membranas com a adição de carboximetilcelulose foi cumprida. Em solução de saliva artificial, a presença de carboximetilcelulose esteve associada à degradação acelerada da membrana.

No que se refere às propriedades de atoxidade da quitosana, essenciais para aplicação das membranas como biomaterial (CROISIER e JÉRÔME, 2013; JAYAKUMAR et al., 2007; KUMAR, 2000), os ensaios de citotoxicidade

mostraram que o processo de produção das membranas, desde a solubilização dos polímeros até a secagem das membranas, não interferiu na toxicidade do material. Trata-se de evidência que confirma a aplicação das membranas como bandagem.

Outra evidência que favorece a aplicação das membranas como biomaterial é a ação antibacteriana da quitosana (LECETA et al., 2013; RUIZ-NAVAJAS et al., 2013). Burkatovskaya et al. (2006) relataram o potencial antimicrobiano de bandagens de quitosana no tratamento de feridas contaminadas em ratos.

No caso das membranas com adição de lisozima (item 5.7), a ação bactericida e cicatrizante pode ser potencializada. Isso porque a degradação *in vivo* da quitosana pela lisozima leva à formação de N-acetilglucosamina, essencial para a reparação de tecidos, o que confirma a proposta de Nair e Laurencin (2007) que a quitosana pode agir como acelerador de cura de feridas (NAIR e LAURENCIN, 2007).

Neste estudo, as membranas de QUI e QUI/CMC/QUI, apresentaram atividade enzimática superior às demais membranas. Acrescenta-se que a membrana de QUI degradou-se 2,5 vezes mais rápido que a membrana de QUI/CMC/QUI.

Estudos experimentais foram realizados com sucesso na aplicação de membranas à base de quitosana como biomaterial. Em trabalho conduzido por Brito e colaboradores (2009), a implantação de membranas de quitosana no subcutâneo de ratos mostrou ser alternativa para reparação tecidual. Costa et al. (2006) estudaram capacidade angiogênica e a viabilidade de aplicação de membranas de quitosana em cirurgias corneais. Verificaram que houve vascularização corneal induzida pela membrana, observada após 3 dias da cirurgia, e que persistiu até 30 dias após a cirurgia.

Em estudos clínicos, verificou-se aplicação bem-sucedida de curativos de quitosana. É o caso de Stone e colaboradores (2000) que avaliaram a cicatrização

de áreas doadoras de pele de 20 pacientes, com curativo de quitosana. Os autores verificaram que a quitosana facilita a rápida re-epitelização da ferida e a regeneração de nervos na derme. Também observaram retorno para a cor normal da pele mais rápido nas áreas tratadas com quitosana.

Kordestani et al. (2008) compararam curativo à base de quitosana com curativo convencional (gaze) no tratamento de pacientes com úlceras de pressão, úlceras do pé diabético e úlceras de perna. Verificaram que 29 das 34 feridas tratadas com curativos de quitosana cicatrizaram completamente e sem processo infeccioso, enquanto que no grupo controle de 26 feridas, apenas 4 foram curadas.

Entretanto, de acordo com Tavaría e colaboradores (2012), ainda há limitações no uso da quitosana para aplicações biomédicas, apesar das crescentes discussões sobre suas vantagens. A genotoxicidade tem sido contestada e investigada e a literatura a esse respeito é limitada.

Quanto à degradação, propriedade requerida em determinados biomateriais (NAVARRO et al., 2008; NAIR e LAURENCIN, 2007; FRANCHETTI e MARCONATO, 2006; SASTRE et al., 2004; PANCHENCE E KOHN, 2000), as membranas estudadas apresentaram perda de massa variada de acordo com a solução (PBS ou saliva artificial), presença de glicerol nas membranas e presença de lisozima (nas membranas ou na solução).

A variedade de comportamento de perda de massa talvez exija, em futuros trabalhos, a análise detalhada do local de aplicação do biomaterial, ação requerida e tempo esperado de degradação.

Nair e Laurencin (2007) comentam que, por causa da complexidade e da variedade de aplicações dos biomateriais poliméricos, não existe um sistema polimérico que possa ser considerado ideal. Reforçam a necessidade de desenvolvimento de ampla gama de materiais biodegradáveis que estejam disponíveis e que possam corresponder adequadamente às necessidades específicas e únicas de cada aplicação biomédica.

Dessa forma, espera-se que o presente estudo possa ter contribuído para novos materiais, bem como para o aperfeiçoamento de materiais disponíveis aos profissionais, em especial da área biomédica.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Nos ensaios de citotoxicidade, verificou-se que as membranas analisadas são atóxicas e a capacidade de absorção de água foi potencializada nas membranas com carboximetilcelulose. Os ensaios de bioatividade mostraram que as membranas induzem levemente a formação de hidroxiapatita apenas a partir do 7º dia.

As características naturais dos polímeros não foram alteradas, como observado no ensaio térmico (DSC) e no FTIR. Dessa forma, cabe mencionar que as propriedades inerentes à quitosana, como, por exemplo, a ação antimicrobiana, não foram comprometidas.

No que se refere à liberação da lisozima, as membranas de QUI e QUI/CMC/QUI obtiveram melhores resultados, tanto na liberação como na atividade da enzima.

As caracterizações química, física e biológica das membranas produzidas neste estudo indicaram que o material desenvolvido pode ter potencial para aplicação na área biomédica. Diante disso, ao analisar a literatura, notou-se que a aplicação como bandagem pode ser o campo de atuação mais promissor para o grupo de membranas estudadas.

Referências

7 REFERÊNCIAS²

ABDOU ES, NAGY KSA, ELSABEE MZ. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. *Biores Technol.* 2008;99:1359-67.

ALEXANDER H, BRUNSKI JB, COOPER SL, HENCH LL, HERGENROTHER RW, HOFFMAN AS et al. Classes of materials used in medicine. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press; 1996, p.37-130.

ALONSO D, GIMENO M, SÁNCHEZ SJD, SHIRAI K. Chitosan-based microcapsules containing grapefruit seed extract grafted onto cellulose fibers by a non-toxic procedure. *Carbohydr Res.* 2010;345:854-59.

AMARIZ A, LIMA MAC, TRINDADE DCG, SANTOS ACN, RIBEIRO TP. Recobrimentos à base de carboximetilcelulose e dextrina em mangas 'Tommy Atkins' armazenada sob refrigeração. *Cien Rural.* 2010;40(10):2199-205.

APARECIDA AH, FOOK MVL, SANTOS ML, GUASTALDI AC. Influência dos íons K⁺ e Mg²⁺ na obtenção de apatitas biomiméticas. *Ecl. Quím.* 2005;30(4):13-8.

ARGUELLES CPW, GALLARDO A, ELVIRA C, SAN ROMÁN J. Quitosan: un polissacárido natural biodegradable biocompatible con aplicaciones en biotecnología y biomedicine. *Rev Plast Mod.* 2001;585:81-91.

² As referências deste trabalho, bem como as etapas de formatação foram desenvolvidas conforme as Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso Parte I (ABNT) do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, 2 ed, 2009.

ASSIS OBG, SILVA VL. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção de água em filmes finos de quitosana processados em diversas concentrações. *Polímeros*. 2003;13(4):223-28.

BARBANTI SH, ZAVAGLIA CAC, DUEK EAR. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*. 2005;15(1):13-21.

BOATENG JS, MATTHEWS KH, STEVENS HNE, ECCLESTON GM. Wound healing dressings and drug delivery systems: a review. *J Pharm Sci*. 2008;97(8):2892-923.

BORSCHIVER S, ALMEIDA LFM, ROITMAN T. Monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros. *Polímeros*. 2008;18(3):256-61.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976;72:248-254.

BRITO MKM, SCHELLINI SA, PADOVANI CR, PELLIZON CH, TRINDADE NETO CG. Inclusões de quitosana no subcutâneo de rato: avaliação clínica, histológica e morfométrica. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2009;84(1):35-40.

BRUGNETTO J, LIZARDI J, GOYCOLEA FM, ARGUELLES-MONAL W, DESBRIÈRES J, RINAUDO M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. *Polymer*. 2001;42:3559-80.

BURKATOVSKAYA M, TEGOS GP, SWIETLIK E, DEMIDOVA TN, CASTANO AP, HAMBLIN MR. Use of chitosan bandage to prevent fatal infections

developing from highly contaminated wounds in mice. *Biomaterials*. 2006;27:4157-64.

BYRNE C. Technical textiles market – an overview. In: HORROCKS AR, ANAND SC. *Handbook of technical textiles*. Cambridge: Woodhead Publishing. 2000, p.1-23.

CALEGUER VF, BENASSI MT. Efeito da adição de polpa, carboximetilcelulose e goma arábica nas características sensoriais e aceitação de preparados em pó para refresco sabor laranja. *Cien Tecn Alim*. 2007;27(2):270-7.

CAMPOS DCP, ANTONIASSI R, DELIZA R, FREITAS SC, FELBERG I. Molho cremoso à base de extrato de soja: estabilidade, propriedades reológicas, valor nutricional e aceitabilidade do consumidor. *Cien Tecn Alim*. 2009;29(4):919-26.

CANELLA KMC, GARCIA RB. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. *Quim Nova*. 2001;24:13-7.

CANEVAROLO JR. SV. *Ciência dos polímeros*. São Paulo: Artliber, 2006 p.139-68.

CARASCHI JC, CAMPANA FILHO SP. Influência do grau de substituição e da distribuição de substituintes sobre as propriedades de equilíbrio de carboximetilcelulose em solução aquosa. *Polímeros*. 1999;9(2):70-7.

CECCON MEJ, DINIZ EMA, VAZ FAC, RAMOS JLA. Imunidade do feto e do recém-nascido. *Pediatria (São Paulo)*. 1997;19(1):15-23.

CHANG YK, CHU L. A simple method for cell disruption by immobilization of lysozyme on the extrudate-shaped NaY zeolite. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;35: 37-47.

COOKE FW, LEMONS JE, RATNER BD. Properties of materials. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. San Diego: Academic Press; 1996, p.11-35.

CORTÉS MGR, DÍAZ BMV, PERILLA JE. Los biopolímeros como materiales para el desarrollo de productos en aplicaciones farmacéuticas y de uso biomédico. *Rev Ingen Investig*. 2008;28(1):57-71.

COSTA JR ES, MANSUR HS. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. *Quim. Nova*. 2008;31(6):1460-66.

COSTA TAC, ANDRADE AL, BINOTTO TB, PLEPIS AMG, BEVILACQUA L, SOUZA WM. Avaliações clínica e morfométrica da capacidade angiogênica da membrana de quitosana em córneas de coelhos. *Arq. Bras. Oftalmol*. 2006;69(6):817-21.

CROISIER F, JÉRÔME C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. 2013;49(4):780-92.

CUNHA MAA, SANTOS JC, GÓMEZ RJH, SILVA SS. Goma curdlana: propriedades e aplicações. *Rev Biotec Cien Desenv*. 2004;33;55-61.

CUNHA PLR, PAULA RC, FEITOSA JPA. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Quim Nova*. 2009;32(3):649-60.

CZAJA W, KRYSTYNOWICZ A, BIELECKI S, BROWN RM. Microbial cellulose-the natural power to heal wounds. *Biomaterials*. 2006;27:145-51.

DASH M, CHIELLINI F, OTTENBRITE RM, CHIELLINI E. Chitosan - a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Prog Polym Sci*. 2011;36:981-1014.

DEV VRG, VENUGOPAL J, SUDHA S, DEEPIKA G, RAMAKRISHNA S. Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye. *Carbohydr Polym*. 2009;75:646-50.

DUCEPPE N, TABRIZIAN M. Advances in using chitosan-based nanoparticles for in vitro and in vivo drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7(10):1191-207.

DUTTA P K, DUTTA J, TRIPATHI VS. Chitin and chitosan: chemistry, properties and applications. *J Sci Ind Res*. 2004;63:20-31.

DUTTA P K, RAVIKUMAR M N V, DUTTA J. Chitin and chitosan for versatile applications, *JMS Polym Rev*, C42 (2002) 307. Disponível em: <http://pt.scribd.com/doc/70923194/Chitin-and-Chitosan-for-VersatileApplications>.

FERREIRA BMP, STEFFEN AM, CARDOSO TP, ALBERTO-RINCON MC, DUEK EAR. Haste intramedular polimérica bioreabsorvível (PLLA/PHBV) para uso na recuperação de fraturas ósseas. *Polímeros*. 2008;18(4):312-9.

FERREIRA, MC, PAGGIARO AO, ISAAC C, TEIXEIRA NETO N, SANTOS GB. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. Rev Bras Cir Plast. 2011;26(4):696-702.

FRANCHETTI SMM, MARCONATO JC. Polímeros biodegradáveis – uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. Quim. Nova. 2006;29(4):811-6.

FRIEDMAN M, JUNEJA VK. Review of antimicrobial and antioxidative activities of chitosans in food. J Food Prot. 2010;73(9):1737-61.

FUJIMOTO J, REIS EAO, PETRI DFS. Formação de multicamadas de polissacarídeos e proteína. Quim Nova. 2002;25(5):757-61.

FURTH ME, ATALA A, VAN DYKE ME. Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine. Biomaterials. 2007;28:5068-73.

GHOSE TK. Measurement of cellulase activities. Pure Appl Chem. 1987;59:257-268.

HIRANO S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. Polym Int. 1999;48:732-4.

HÖFER D, SWEREV M. Medical textile and skin equivalents. J Textile Apparel Tech Manag. 2003;3(2):1-4.

HOVEN VP, TANGPASUTHADOL V, ANGKITPAIBOON Y, VALLAPA N, KIATKAMJORNWONG S. Surface-charged chitosan: preparation and protein adsorption. Carbohydr Polym. 2007;68(1):44-53.

JAYAKUMAR R, NWE N, TOKURA S, TAMURA H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol*. 2007;40(3):175-81.

JAYAKUMAR R, PRABAHARAN M, SUDHEESH KUMAR PT, NAIR SV, TAMURA H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications. *Biotechnol Adv*. 2011;29(3):322-37.

JOHANSSON HO, JONSSON M. Protein partitioning in thermoseparating systems of a charged hydrophobically modified ethylene oxide polymer. *Journal of chromatography A*. 2003;983:133-44.

KLIMEK J, HELLWIG E, AHRENS G. Fluoride taken up by plaque, by the underlying enamel and by clean enamel from three fluoride compounds in vitro. *Caries Res*. 1982;16:156-61.

KOKUBO T, TAKADAMA H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*. 2006;27(15):2907-15.

KONG M, CHEN XG, XING K, PARK HJ. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. *Int J Food Microbiol*. 2010;144:51-63.

KORDESTANI S, SHAHREZAEI M, TAHMASEBI MN, HAJIMAHMODI H, HAJI GHASEMALI D, ABYANEH MS. A randomised controlled trial on the effectiveness of an advanced wound dressing used in Iran. *Journal of wound care*. 2008;17(7):323-27.

KUBOTA N, TATSUMOTO N, SANO T, TOYA K. A simple preparation of the half N-acetylated chitosan highly soluble in water and aqueous organic solvents. *Carbohydr Res.* 2000;234:268-74.

KUMAR MNV. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46(1):1-27.

KURITA K, KAJI Y, MORI T, NISHIYAMA Y. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. *Carbohydr Polym.* 2000;(42):19-21.

LECETA PG, IBARBURU MT, DUEÑAS KC. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *Journal of Food Engineering.* 2013;116(4):889-99.

LARANJEIRA MCM, FÁVERE VT. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Quim Nova.* 2009;32(3):672-8.

LI Z, RAMAY HR, HAUCH KD, XIAO D, ZHANG M. Chitosan - alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26(18):3919-28.

MACHADO LDB, MATOS JR. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVAROLO JUNIOR SV. (Ed.). *Técnicas de caracterização de polímeros.* São Paulo: Artliber; 2004. p.229-61.

MADIHALLY SV, MATHEW HWT. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 1999;20:1113-42.

MAJETI NV, KUMAR R. A review of chitin and chitosan applications. *React Funct Polym.* 2000;46:1-27.

NAIR LS, LAURENCIN CT. Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci.* 2007;32:762-98.

NAVARRO M, MICHIARDI A, CASTAÑO O, PLANELL JA. Biomaterials in orthopaedics. *J Roy Soc Interface.* 2008;5(27):1137-58.

PANCHENCE JM, KOHN J. Biodegradable polymer. In: LANZA RP, LANGER R, VACANTI J. (ed.). *Principle of tissue engineering.* San Diego: Academic Press, 2000; p.263-77.

PARK BQ, KIM MM. Applications of chitin and its derivatives in biological medicine. *Int J Mol Sci.* 2010;11:5152-64.

PATERNIO LG, MATTOSO GHC, OLIVEIRA JUNIOR ON. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. *Quim Nova.* 2001;24(2);228-35.

PILLAI CKS, PAUL W, SHARMA CP. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci.* 2009;34:641-78.

PRADELLA JGC. Biopolímeros e intermediários químicos. Relatório técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP (2006).

RATNER BD. Biomaterials science: an interdisciplinary endeavor. In: RATNER BD, HOFFMAN AS, SCHOEN FJ, LEMONS JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, San Diego: Academic Press; 1996, p.1-8.

REGE PR, BLOCK LH. Chitosan processing sequence on the resultant chitosans properties. Carbohydr Res. 1999;321:235-45.

REGE PR, GARMISE RJ, BLOCK LH. Spray-dried chitinosans: part I: preparation and characterization. Int J Pharm. 2003;252(1-2):41-51.

REIZ P. Redação científica moderna. São Paulo: Hyria, 2013.

RIGBY AJ, ANAND SC. Medical textiles. In: HORROCKS AR, ANAND SC. Handbook of technical textiles. Cambridge: Woodhead Publishing. 2000, p.407-23.

RUIZ-NAVAJAS Y, VIUDA-MARTOS M, SENDRA E, PEREZ-ALVAREZ JA, FERNÁNDEZ-LÓPEZ J. In vitro antibacterial and antioxidant properties of chitosan edible films incorporated with *Thymus moroderi* or *Thymus piperella* essential oils. Food Control, 2013;30(2):386-92.

SANTOS JE, SOARES JP, DOCKAL ER, CAMPANA FILHO SP, CAVALHEIRO ETG. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. Polímeros. 2003;13:242-49.

SANTOS JUNIOR AR, WADA MLF. Polímeros biorreabsorvíveis como substrato para cultura de células e engenharia tecidual. Polímeros. 2007;17(4):308-17.

SASTRE R, AZA S, ROMÁN JS. Biomateriales. Faenza: Faenza Editrice Ibérica; 2004, p.522.

SEBRÃO D, SILVA VD, NASCIMENTO MG, MOREIRA MA. Imobilização de lipases em filme de caseinato de sódio/glicerol. Quim Nova. 2007;30(5):1182-7.

SHI C, ZHU Y, RAN X, WANG M, SUY, CHENG T. Therapeutic potential of chitosan and Its derivatives in regenerative medicine. J Surg Res. 2006;133:185-92.

SHIMAZU AA, MALI S, GROSSMANN MVE. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. Semin-Cien Agrar. 2007;28(1):79-88.

SILVA HRSC, SANTOS KSCR, FERREIRA EI. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. Quim Nova. 2006;29(4):776-85.

SIQUEIRA RL, ZANOTTO ED. Biosilicato®: histórico de uma vitrocerâmica brasileira de elevada bioatividade. Quim Nova. 2011;34(7):1231-41.

STAMATIALIS DF, PAPENBURG BJ, GIRONÉS M, SAIFUL S, BETTAHALLI SNM, SCHMITMEIR S, WESSLING M. Medical applications of membranes: drug delivery, artificial organs and tissue engineering. J Membrane Sci. 2008;308:1-34.

STONE CA, WRIGHT H, CLARKE T, POWELL R, DEVARAJ VS. Healing at skin graft donor sites dressed with chitosan. Br J Plast Surg. 2000;53(7):601-6.

TAVARIA FK, COSTA EM, PINA-VAZ I, CARVALHO MF, PINTADO MM. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. *Rev Bras Eng Biom.* 2013;29(1):110-20.

TOLAIMATE DJ, RHAZI M, ALAGUÍ A, VICENDON M, VOTTERO P. On the influence of deacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. *Polymer.* 2000;41:2463-9.

TONHI E, PLEPIS AM. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. *Quimica nova.* 2002;25(6):943-48.

TRIANA BEG, SOTO OD, ESPINA AML, BERNABEU AS. Principales proteínas salivales: estructura, función y mecanismos de acción. *Rev haban cienc méd.* 2012;11(2):450-456.

WEI L, CAI C, LIN J, WANG L, ZHANG X. Degradation controllable biomaterials constructed from lysozyme-loaded Ca-alginate microparticle/chitosan composites. *Polymer.* 2011;52:5139-48.

VENKATESAN J, KIM SK. Chitosan composites for bone tissue engineering-an overview. *Mar Drugs.* 2010;8(8):2252-66.

VILLANOVA JCO, ORÉFICE RL, CUNHA AS. Aplicações farmacêuticas de polímeros. *Polímeros.* 2010;20(1):51-64.

WESKA RF, MOURA JM, BATISTA LM, RIZZI J, PINTO LAA. Optimization of deacetylation in the production of chitosan from shrimp wastes: use of response surface methodology. *J Food Eng.* 2007;80(3):749-53.

YAMAMOTO H, KUNO Y, SUGIMOTO S, TAKEUCHI H, KAWASHIMA Y.
Surface-modified PLGA nanosphere with chitosan improved pulmonary
delivery of calcitonin by mucoadhesion and opening of the intercellular tight
junctions. J Control Release. 2005;102(2):373-81.

Bibliografia consultada

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

AZEVEDO VVC, MELO COSTA ACF, CHAVES AZ, BEZERRA DC, FOOK MVL. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. Revista Eletrônica de Materiais e Processos. 2007;2(3):27-34.

BEATRIZ A, ARAÚJO YJK, LIMA DP. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. Quim. Nova. 2011;34(2):306-319.

CUNHA AC, FREDDI MJAL, MF CRESTANA, MS ARAGÃO, SC CARDOSO, V VILHENA. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - SBD/FMUSP, 2005.

ECO U. Como se faz uma tese. Tradução por Gilson César Cardoso de Souza. 24 ed. São Paulo: Perspectiva, 2012. Tradução de Come se fa una tesi di laurea. Le materie umanistiche.

FRADE MAC, COUTINHO-NETTO J, GOMES FG, MAZZUCATO EL, ANDRADE TAM, FOSS NT. Curativo de biomembrana vegetal e hipersensibilidade. An Bras Dermatol. 2011;86(5):885-91.

HANKIEWICZ J, SWIERCZEK E. Lisozyne in human body fluids. Clin Chim Acta. 1974;57:205-9.

MANRICH S. Processamento de termoplásticos: rosca única, extrusão e matrizes, injeção e moldes. São Paulo: Artliber Editora, 2005.

MONAGAS SAF. Hidrólisis enzimática de carboximetilquitina y carboximetilquitosana. Rev Cubana Farm. 1998;32(2):125-9.

MOTTA A.C, DUEK EAR. Estudo inicial da degradação “in vivo” de poli(L-co-D,L ácido láctico), sintetizado em laboratório, aplicado como prótese tibial em coelhos. *Revista Matéria*. 2009;14(3):1070-6.

PORSTMANN B, JUNG K, SCHMECHTA H, EVERS U, PERGANDE M, PORSTMANN T, et al. Measurement of lysozyme in human body fluids: comparison of various enzyme immunoassay techniques and their diagnostic Application. *Clin Biochem*. 1989;22:349-55.

REIZ P. Manual de técnicas de redação científica. 2 ed. São Paulo: Hyria, 2012.

REZENDE CA, LUCHESI C, BARBO MLP, DUEK EAR. Membranas de Poli (Ácido Láctico-Co-Ácido Glicólico) como Curativos para Pele: Degradação In Vitro e In Vivo. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2005;15(3):232-238.

SALVADOR AD. Métodos e técnicas de pesquisa bibliográfica. 5 ed. rev. e aum. Porto Alegre: Sulina, 1976.

SCHLEMMER D, SALES MJA, RESCK IS. Preparação, Caracterização e Degradação de Blendas PS/TPS Usando Glicerol e Óleo de Buriti como Plastificantes. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*. 2010;20(1):6-13.

TORRES MA, VIEIRA RS, BEPPU MM, SANTANA CC. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. *Polímeros*. 2005;15(4):306-12.