UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

*OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE HIDROGÉIS DE
QUITOSANA, XANTANA E COLÁGENO ANIÔNICO*

MARILIA MARTA HORN

Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências (Química Analítica).

Orientadora: Prof^a. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos - 2008

"O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem sabe ver." - Gabriel G. Márquez

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr. Ana Maria de Guzzi Plepis pela orientação, dedicação e apoio.

À Virginia C. Amaro Martins pela ajuda, dedicação e amizade.

À Márcia Dib Zambon, do Grupo de Química Orgânica, pela realização das medidas de GPC.

À minha família pelo incentivo.

Ao Andrés pelo incentivo e companheirismo.

A todos do Laboratório de Bioquímica e Biomateriais pela amizade e pelo ótimo ambiente de trabalho. Ao Ézer Biazin e Glauco D. Broch pela amizade.

Aos técnicos da Central de Análises Químicas Instrumentais pela ajuda.

Ao Carlos Bento e Márcio de Paula pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

A todo o pessoal da Biblioteca.

À Andréia e Sílvia da Seção de Alunos.

Aos professores e funcionários do Instituto de Química de São Carlos que contribuíram para a minha formação.

As amigas Fabiana e Thelma pelo companheirismo, convivência, ajuda e amizade.

À Daniela, Fabiana e Juliana pela amizade sempre.

A todos, que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1. – <i>INTRODUÇÃO</i>	12
1.1 - Hidrogéis	13
1.2. - Polissacarídeos	16
1.2.1. - Quitosana.....	16
1.2.2. - Xantana	21
1.3. – Colágeno.....	24
1.4. – Complexo quitosana:xantana.....	26
2. - <i>OBJETIVOS</i>	29
3. - <i>PARTE EXPERIMENTAL</i>	30
3.1. – Obtenção da quitosana.....	30
3.1.1. – Determinação do Grau de Acetilação	32
3.1.1.1. - Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)	32
3.1.1.2. – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)	33
3.1.2. – Cromatografia de permeação em gel (GPC) para a determinação da massa molecular da quitosana	33
3.2. - Xantana.....	34
3.3. – Colágeno	34
3.4. - Preparação dos hidrogéis.....	35
3.5. - Caracterização dos hidrogéis.....	35
3.5.1. – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR).....	36
3.5.2. – Absorção de água.....	36
3.5.3. – Análise Térmica.....	37
3.5.4. – Microscopia Eletrônica de Varredura.....	38
4. <i>RESULTADOS E DISCUSSÃO</i>	39
4.1. - Quitosana.....	39
4.1.1. – Determinação do grau de acetilação	42
4.1.1.1. – Espectroscopia na região do ultravioleta (UV).....	42
4.1.1.2. - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR).....	44

4.1.2. – Cromatografia de permeação em gel (GPC) para a determinação da massa molecular da quitosana	44
4.2. - Xantana.....	47
4.3. – Colágeno.....	49
4.4. - Preparação dos Hidrogéis.....	53
4.5. - Caracterização dos Hidrogéis.....	56
4.5.1. – Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR).....	56
4.5.2. – Absorção de água.....	56
4.5.3. – Análise Térmica.....	57
4.5.4. – Microscopia Eletrônica de Varredura.....	63
5. – <i>CONCLUSÕES</i>	68
6. – <i>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</i>	69

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estruturas químicas da celulose e da quitina.	17
Figura 2. Representação da estrutura da quitosana em que x representa o grau de acetilação.	17
Figura 3. Representação esquemática das estruturas alfa e beta da quitina.	18
Figura 4. Desacetilação parcial da quitina ($n = p + q$).	20
Figura 5. Estrutura da goma xantana	22
Figura 6. Esquema de formação da hélice tripla da molécula de colágeno	25
Figura 7. Esquema da formação da fibrila de colágeno.	25
Figura 8. Estruturas da quitosana e xantana e seu modo de interação.	27
Figura 9. Estrutura e pH sensível de intumescimento de um complexo eletrólito contendo quitosana: - carga negativa de um polímero adicional; + carga positiva da quitosana; ○ interação iônica; — quitosana; — polímero adicional	28
Figura 10. Esquema da lula com destaque de suas principais partes.	30
Figura 11. Esquema geral de obtenção da quitosana.....	31
Figura 12. Quitosana obtida através do processo de desacetilação da β -quitina.....	40
Figura 13. Espectro de FT-IR da quitosana.....	40
Figura 14. Curva termogravimétrica da quitosana em atmosfera de ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).41	
Figura 15. Fotomicrografias da quitosana obtida: A, aumento de 100x e B, 200x.....	42
Figura 16. Espectro na região do ultravioleta para a solução de quitosana em $\text{HCl } 0,1\text{molL}^{-1}$	43
Figura 17. Curva de calibração dos padrões.....	45
Figura 18. Cromatograma da quitosana obtido por GPC.	46
Figura 19. Curva termogravimétrica da xantana comercial em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).....	47
Figura 20. Espectro de FT-IR da xantana.....	48
Figura 21. Fotomicrografias da xantana. Em A, aumento de 100x e em B, 200x.....	49
Figura 22. Espectro de FT-IR do colágeno.	50
Figura 23. Curva termogravimétrica do colágeno em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).	51
Figura 24. Curva DSC do colágeno de tendão.	52
Figura 25. Fotomicrografias do colágeno: A, aumento de 200x e B, 500x.....	52
Figura 26. Ilustração esquemática da formação da matriz: coacervação e formação do hidrogel	54

Figura 27. Fotografia dos hidrogéis: A) QX12, B) QXC12, C) QX11, D) QXC11, E) QX21 e F) QXC21.	55
Figura 28. Espectro de FT-IR dos hidrogéis: A, QX11 e B, QXC11.....	56
Figura 29. Curvas TG e DTG dos hidrogéis QX21 e QXC21 em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$)....	58
Figura 30. Curvas TG dos hidrogéis QX12 e QX12_r em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).	58
Figura 31. Curvas DSC dos hidrogéis QX12 e QXC12.	61
Figura 32. Aplicação do método de Flynn-Wall para os hidrogéis: A, QX12 e B, QXC12. ..	63
Figura 33. Fotomicrografias dos hidrogéis: A, QX11; B, QX12 e C, QX21. Aumento de 200x.	64
Figura 34. Fotomicrografias dos hidrogéis: A, QXC11; B, QXC12 e C, QXC21. Aumento de 200x.	66
Figura 35. Fotomicrografia do hidrogel QXC21, aumento de 500x.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aplicações da quitosana	20
Tabela 2. Valores de temperatura e de perda de massa para a quitosana preparada a partir de β -quitina.....	41
Tabela 3. Valores de massa e absorbância utilizados para a análise por UV	43
Tabela 4. Valores de absorbância (FT-IR) para a quitosana	44
Tabela 5: Características dos padrões utilizados na análise por GPC	45
Tabela 6. Valores médios de peso molecular da amostra de quitosana.....	45
Tabela 7. Valores de temperatura e de perda de massa para a xantana	48
Tabela 8. Valores de temperatura e de perda de massa para o colágeno.....	51
Tabela 9. Valores de porcentagem de água contida nos hidrogéis	57
Tabela 10. Quantidade de água total determinada por termogravimetria.....	59
Tabela 11. Valores da temperatura de fusão de água livre, determinadas por DSC.....	60

LISTA DE ABRAVIATURAS

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria Exploratória Diferencial

Ea – Energia de ativação

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FDA – Food and Drug Administration

FT-IR – Infravermelho com Transformada de Fourier

GAG – Glicosaminoglicanas

GlcN – Glicosamina

GlcNAc - N-acetilglicosamina

GPC - Cromatografia de Permeação em Gel

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

Mn – Massa molar numérica média

Mw – Massa molar mássica média

PDI – Índice de polidispersividade

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

TG – Termogravimetria

Tr – Tempo de retenção

UV – Ultravioleta

RESUMO

Uma variedade de hidrogéis, que correspondem a uma classe de materiais poliméricos altamente hidratados está sendo empregado como biomateriais. Biopolímeros como quitosana, xantana e colágeno apresentam excelente biocompatibilidade e podem ser utilizados na área de queimados e liberação controlada de fármacos. Neste trabalho foram preparados hidrogéis provenientes da mistura entre quitosana, derivada de β -quitina, xantana comercial e colágeno aniônico (derivado de tendão bovino) em proporções variadas. A caracterização das amostras foi realizada por análise térmica (termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial), espectroscopia no infravermelho, microscopia eletrônica de varredura e absorção de água. Pelas curvas termogravimétricas os resultados mostraram que todos os hidrogéis apresentam uma grande quantidade de água na sua estrutura e que pela reidratação são capazes de reter novamente essa quantidade de água. Por DSC observou-se que todos apresentaram o pico referente à fusão de água livre em temperaturas deslocadas acima de 0°C pelo aumento da interação água/polímero. Por FT-IR constatou-se a presença de bandas características dos biopolímeros com a ausência de novas bandas e pelo estudo por MEV os hidrogéis apresentaram uma estrutura na forma de folhas e a presença de colágeno é bastante visível participando desta estrutura.

ABSTRACT

Hydrogel are polymeric materials, which have the capacity to retain a great amount of water, and are often used as biomaterials. Chitosan, xanthan and collagen present biocompatibility and they can be used in tissue regeneration and drug delivery. In this work hydrogels were prepared by the mixture with chitosan (from β -quitina), commercial xanthan and anionic collagen (from bovine tendon) in different proportions. They were characterized by thermal analysis (thermogravimetry and differential scanning calorimetry), infrared spectroscopy (FT-IR), scanning electronic microscopy and water absorption. Thermogravimetric curves showed that all hydrogels present a great amount of water and after the rehydration were capable to keep the same amount of water. Melting point of water in DSC curves were shifted to higher values due the increase of water/polymer interaction. FT-IR showed characteristic bands of biopolymers with the absence of new bands and the morphology (MEV) showed that the hydrogels structures were in sheet form and the collagen fibers are visible in the hole structure.

1. – INTRODUÇÃO

Dispositivos médicos têm sido desenvolvidos para implantes no corpo com o intuito de facilitar o fluxo de fluidos corpóreos, para servir como enxertos vasculares ou para outros propósitos. Tipicamente, estes podem ser catéteres, materiais de reconstrução (como óssea), pele ou encapsulantes biológicos. Muitos desses implantes são preparados a partir de materiais duráveis e não-biodegradáveis como poliuretanas e poliacrilatos. Entretanto, os polímeros biodegradáveis são preferíveis, pois permanecem estáveis por um período de tempo no organismo e as suas pequenas moléculas biodegradadas são eliminadas naturalmente pelo corpo (RONAN; THOMPSON, 2002). Os polímeros bioabsorvíveis são manufaturados ou processados para se adequarem à sua utilização, pois entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos.

Um biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação de substâncias, farmacologicamente inertes, de origem natural ou sintética, idealizada para ser implantada ou incorporada por qualquer período de tempo, como parte ou o todo de um sistema que trata, aumenta ou substitui qualquer tecido, órgão ou função (WILLIANS, 1987). São exemplos, os materiais que substituem ou induzem o crescimento de tecido ósseo, cartilagens, peles, vasos, válvulas cardíacas e outros tecidos (SILVER; DOILLON, 1989).

A utilização de polímeros sintéticos é limitada por apresentarem problemas de biocompatibilidade e biodegradabilidade nos tecidos aplicados. Por isso, materiais de origem natural, como os biopolímeros têm sido bastante utilizados e estudados.

Entre os materiais utilizados para a aplicação regenerativa os hidrogéis estão recebendo uma atenção cada vez maior devido a sua capacidade de manter uma grande quantidade de água na sua estrutura, boa biocompatibilidade e propriedades superficiais como a permeabilidade seletiva. Além disso, alguns hidrogéis têm a propriedade de serem termosensíveis e fotopolimerizáveis podendo ser alocados no organismo através de uma

cirurgia mínima invasiva e serem transformados em géis em condições *in vivo* (BAROLI, 2007).

1.1 - Hidrogéis

Os hidrogéis são redes tridimensionais de polímeros que podem intumescer em meio aquoso ou fluido biológico e reter uma grande quantidade de água na sua estrutura sem se dissolver. Por causa da presença de certos grupos funcionais ao longo das cadeias do polímero, os hidrogéis são frequentemente sensíveis às condições do ambiente como temperatura, pH e composição do solvente (PEPAS, 1991).

Uma variedade de polímeros hidrofílicos está sendo utilizada para preparar hidrogéis para aplicação nos campos da farmácia, medicina e biotecnologia particularmente para o tratamento de feridas e suporte para liberação de fármacos (KHURMA; ROHINDRA; NAND, 2006). Essas aplicações são possíveis devido aos hidrogéis apresentarem características como grau de intumescimento, cinética de adsorção, permeabilidade do soluto e características de desempenho *in vivo* favoráveis.

Devido à grande quantidade de polímeros disponíveis para o desenvolvimento de um hidrogel com características desejadas para aplicação como biomaterial, é necessário correlacionar a estrutura macromolecular dos polímeros como o grau de intumescimento e as características mecânicas desejadas (PEPPAS, 2000).

A integridade estrutural dos hidrogéis depende das ligações formadas entre as cadeias poliméricas, que podem ser por ligações químicas ou interações físicas. Para a preparação de hidrogéis tanto materiais sintéticos quanto naturais podem ser utilizados. Alguns exemplos de materiais sintéticos incluem óxido de polietileno (PEO), álcool polivinílico (PVA) e hidroxietil metacrilato (HEMA). Já polímeros naturais incluem alginato, agarose, quitosana, colágeno, entre outros.

Hidrogéis tem a capacidade de intumescer na presença de água e na sua ausência, tendem a um encolhimento. Este volume de transição pode ser induzido por mudanças de temperatura, pH e força iônica do meio. A modulação das forças de intumescimento tem permitido o desenvolvimento para aplicações na agricultura, indústrias alimentícias, farmacêuticas e no desenvolvimento de biomateriais.

A indústria alimentícia utiliza hidrogéis para a proteção de sabores, retardando sua liberação e aumentando a sua duração. “Sabores encapsulados” têm sido adicionados, com sucesso, em gomas de mascar, misturas de massas, misturas de bolos e café instantâneo. Dependendo do sistema do hidrogel os sabores são liberados pela dissolução da parede capsular, por compressão ou por difusão. Outros aditivos alimentares como antioxidantes, colorantes e enzimas também foram testados (HIGUCHI, 2002).

Na área farmacêutica os hidrogéis têm sido utilizados para a liberação de fármacos. No campo biomédico, um dos primeiros usos foi para a preparação de lentes de contato e lentes intraoculares. O número de aplicações foi multiplicado desde então devido as suas propriedades favoráveis, como flexibilidade, durabilidade, permeabilidade a água e a materiais metabólicos (PEPPAS; LANGER, 1994).

A utilização de biopolímeros como a quitosana e o colágeno para a preparação de hidrogéis tem se mostrado bastante interessante, pois o colágeno é a proteína mais abundante dos tecidos dos mamíferos (LEE; SINGLA; LEE, 2001) e a quitosana por possui estrutura semelhante à GAG (glicosaminoglicanas) e é degradada pela lisozima presente no corpo humano (LEE; HA; PARK, 1995).

Estes materiais podem ser utilizados para o desenvolvimento de curativos visando o tratamento de ferimentos com crostas secas, pois retêm grande quantidade de água na sua estrutura. A forma de ação destes é que devido a serem insolúveis em água, absorvem a secreção da região lesada promovendo assim, a redução da viscosidade do gel e liberando

água na superfície do ferimento. Estes curativos retêm a secreção da região lesada ao mesmo tempo em que a mantém hidratada. A vantagem de sua utilização deve-se à hidratação que proporciona e à sensação refrescante que causa, uma vez que ocorre redução da dor inerente aos ferimentos secos (muito provavelmente pela prevenção da exposição dos terminais nervosos ao ambiente (CANDIDO, 2001)).

Dentre os polímeros naturais mais comumente estudados para serem utilizados na obtenção de biomateriais destinados à utilização em processos de regeneração de pele, destaca-se a quitosana. Este polissacarídeo apresenta diversas características de interesse, como ação antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e redutor do tempo de cicatrização de lesões provenientes de agressões físicas a tecidos animais, como por exemplo, ferimentos ou queimaduras (CRAVEIRO; CRAVEIRO, 2000). Além disso, a quitosana estimula a proliferação celular (YOSOF; LIM; KHOR, 2001; MUZZARELLI, 1988) e é biodegradável (LEE; HA; PARK, 1995), biocompatível (RAO; SHARMA, 1997) e confere excelente resistência mecânica aos biomateriais produzidos a partir de seu uso (MIMA, 1983).

Na literatura são encontrados trabalhos referentes à formação de hidrogéis através de ligações de reticulação de polímeros como gelatina, celulose, amido, quitosana e xantana (FUJIWARA et al., 2000; MANDALA; PALOGOU; KOSTAROPOULOS, 2002; ARGUILLES-MONAL et al., 1998; MUCHA, 1997). Devido à presença de dois grupos reativos, o grupo hidroxila e amino, a quitosana é um polímero susceptível a mudanças estruturais. Estudo de hidrogéis formados com β -quitina e poli(etilenoglicol)-co-poli(lactona), quitosana (derivada de β -quitina) e poli(etilenoglicol), quitosana:gelatina e quitosana:poliéster tem sido relatados (RAVI KUMAR, 2000).

1.2. - Polissacarídeos

Os polissacarídeos são constituintes normais de todas as células microbianas, incluindo as bactérias, leveduras e fungos. Estão divididos em três grupos, de acordo com sua localização morfológica: intracelular, localizado no interior da célula ou como parte da membrana citoplasmática; da parede celular, formada como parte estrutural das células; e polissacarídeos extracelulares, produzidos no interior da célula, sendo posteriormente, secretados para o exterior da mesma (SUTHERLAND, 1982).

1.2.1. - Quitosana

Um dos mais abundantes biopolímeros encontrados na natureza, a quitina é um polímero linear constituído por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas do tipo β -(1-4) (SAITO et al., 2000). É o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos, mas também ocorre em algumas espécies de fungos, participando da estrutura da parede celular (TOLAIMATE et al., 2000).

As estruturas da quitina e da celulose são muito semelhantes, possivelmente porque ambas desempenham a mesma função de sustentação nos organismos em que estão presentes. Na Figura 1 pode-se verificar essa característica, em que o grupo hidroxila do carbono C(2) da celulose é substituído pelo grupo acetamida na quitina.

Figura 1. Estruturas químicas da celulose e da quitina.

A quitosana é um heteropolissacarídeo composto por unidades de 2-acetamida-2-deoxi-D-glicopiranosose e de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose. É encontrada na natureza, particularmente como constituinte da parede celular de alguns fungos (BÉGIN; CALSTEREN, 1999). Entretanto, quitosana pode ser obtida pela desacetilação parcial da quitina, que é o maior componente do exoesqueleto dos insetos, na cutícula dos anelídeos e moluscos e na concha de crustáceos como camarão, lagosta e caranguejo (KURITA, 2006). Quitosana e quitina são diferenciadas apenas pela quantidade de grupos amino presentes na estrutura (Figura 2).

Figura 2. Representação da estrutura da quitosana em que x representa o grau de acetilação.

Existem três formas, α , β e γ nas quais as cadeias da quitina pode se organizar. A forma α é encontrada em crustáceos, insetos e fungos possuindo um arranjo de cadeias alternadas paralelas e antiparalelas (Figura 3) e é a forma mais comum e mais estável frente a processos químicos. A forma β , ocorre em organismos como lulas e algas microscópicas e possui um arranjo de cadeias paralelas (Figura 3).

Já a forma γ , ainda não foi totalmente caracterizada, mas sugeriu-se que o arranjo seja de duas cadeias paralelas e uma antiparalela.

Figura 3. Representação esquemática das estruturas alfa e beta da quitina.

Quitina obtida de gládios de lula, apresenta estrutura cristalográfica da forma β onde os arranjos estão de forma paralela, com forças intermoleculares relativamente fracas. Comparada com a α -quitina, a forma β possui solubilidade em um maior número de solventes, maior reatividade em reações químicas (incluindo o processo de desacetilação) e maior intumescimento (TOLAIMATE et al., 2000).

Como um polímero as propriedades físicas e químicas da quitosana são determinadas pelo grau de polimerização e da estrutura da cadeia. O grau de polimerização está relacionado com a distribuição do peso molecular e para a quitosana comercial este valor está entre 50.000 e 2.000.000 Daltons. A estrutura da cadeia é definida pela composição química e a sequência das unidades monoméricas. A estrutura da quitosana pode ser descrita pela fração molar de unidades acetiladas (ou desacetiladas), definida pelo grau de acetilação (ou desacetilação), que é a porcentagem de unidades monoméricas que estão acetiladas.

O grau de acetilação é um parâmetro estrutural que influencia as propriedades físico-químicas da quitosana (solubilidade, viscosidade, comportamento polieletrólítico e outros). Este, pode ser determinado por vários métodos, como a espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia de ultravioleta, dicroísmo circular, espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C , cromatografia de permeação em gel, titulação condutimétrica, análise elementar e cromatografia gasosa (SHIGEMASA et al., 1996).

A quitosana é insolúvel em soluções neutras e alcalinas, mas é solúvel em ácidos diluídos como ácido clorídrico, acético e perclórico onde os grupos amino são protonados. O resultado é uma carga positiva e a solubilidade da quitosana depende da quantidade de grupos *N*-acetil presentes na cadeia do polissacarídeo.

A obtenção da quitosana é baseada na desacetilação parcial da quitina (Figura 4) O isolamento da quitina ocorre em duas etapas: inicialmente, minerais como carbonato de cálcio e fosfato de cálcio são solubilizados usando ácido clorídrico. Após isso, proteínas são

removidas pelo tratamento com uma solução de hidróxido de sódio diluído que após a lavagem e secagem é obtido um material em forma de flocos. Finalmente, a quitosana é obtida após o aquecimento da quitina com uma solução de hidróxido de sódio concentrada que hidrolisa os grupos *N*-acetil. Em alguns casos deve ser realizado o processo de descoloração, com a utilização de solventes orgânicos, para a remoção de pigmentos. O rendimento, a qualidade e as propriedades da quitosana são fortemente dependentes do controle de cada etapa (HIGUCHI, 2002).

Figura 4. Desacetilação parcial da quitina ($n = p + q$).

A quitosana apresenta aplicações em diversas áreas. A Tabela 1 apresenta algumas utilizações deste biopolímero.

Tabela 1. Aplicações da quitosana (RAVI KUMAR, 2000)

Categoria	Aplicações
Tratamento de água	Remoção de íons metálicos, agente floculante;
Agricultura e alimentos	Liberação controlada de agrotóxicos, fertilizantes, recobrimento de sementes, aditivo em ração animal;
Polpa e papel	Aditivo para papel fotográfico e comum;
Cosméticos	Cremes para a face, mãos, hidratantes;
Biotecnologia	Agente de imobilização de enzimas e células, separação de proteínas;
Membranas	Membranas permeáveis, separação de solventes.

A utilização da quitosana como biomaterial é baseado em inúmeras propriedades, dentre elas destacam-se: biocompatibilidade e atoxicidade; biodegradabilidade; potencial para formação de complexos com polieletrólitos aniônicos tais como proteínas, polímeros e outros; é passível de modificações químicas e é também um material que pode ser trabalhado em diversas formas, como: gel, membranas, esponjas e solução.

1.2.2. - Xantana

Vários polissacarídeos têm sido produzidos e utilizados comercialmente, entre eles: dextrana, xantana, curculana, alginato bacteriano, gelana e welana. Até o momento, dextrana e xantana são praticamente os únicos polissacarídeos microbianos comercializados em larga escala. A xantana foi o segundo polissacarídeo microbiano usado na indústria de alimentos aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) em 1969 sendo que no Brasil, a adição de xantana em alimentos é permitida desde 1965 (LIMA et al., 2001).

A xantana é um polissacarídeo natural produzido pela bactéria *Xanthomonas campestris* com grande aplicação industrial. A cadeia (Figura 5) consiste em unidades β -D glicose em ligação (1 $\rightarrow$ 4), que faz com que seja idêntica à da celulose. Na cadeia principal, a posição O-3 do resíduo da glicose é ocupada por uma cadeia trissacarídica lateral que possui uma unidade ácido glicurônico entre duas unidades D-manose (Figura 5). Cerca de metade dos grupos terminais da D-manose contêm um resíduo de ácido pirúvico ligado, via grupo ceto, nas posições 4 e 6 do açúcar com uma distribuição não conhecida. A unidade D-manose ligada à cadeia principal contém um grupo acetil na posição O-6. A presença dos grupos acetato e piruvato conferem ao polissacarídeo a possibilidade de ter grupos aniônicos, dependendo do pH do meio. O peso molecular da xantana varia de 2 a 12 x 10⁶Da, dependendo do processo fermentativo e da linhagem utilizada.

Os aspectos toxicológicos e de segurança deste polímero para aplicações em produtos alimentícios e farmacêuticos foram amplamente estudados. A xantana é um produto atóxico, não promove sensibilização e não causa irritação na pele e nos olhos (GARCIA-OCHOA et al, 2000).

Figura 5. Estrutura da goma xantana (BECKER et al, 1998).

As condições de cultura das cepas fazem com que ocorram diferentes composições nos polissacarídeos encontrados na estrutura da xantana, variando de acordo com as bactérias do gênero *Xanthomonas*. Essa variação na estrutura ocorre principalmente por mudança nos graus de piruvato e acetato, mas também podem ocorrer variações na composição do carboidrato. Alterações nas condições de fermentação utilizadas podem influenciar o peso molecular da xantana, demonstrando a dificuldade de se manter uma uniformidade na produção deste polissacarídeo (GARCIA-OCHOA et al, 2000).

Na indústria de alimentos encontra-se um vasto campo de aplicação como agentes espessantes, estabilizantes e gelificantes e vêm substituindo gradativamente os polissacarídeos obtidos de fontes convencionais como plantas. A preferência por biopolímeros microbianos se

deve às suas propriedades funcionais, somadas às vantagens de sua produção ser independente de condições climáticas (GARCIA-OCHOA et al, 2000).

Sua aplicação ocorre em inúmeros segmentos industriais, entre eles alimentos, fármacos, químicos, petroquímico e deve-se principalmente as suas propriedades reológicas que permitem a formação de soluções viscosas a baixas taxas de concentração (0,05-1%) e ampla faixa de estabilidade a pH e temperatura, características conferidas devido a sua estrutura ramificada e seu alto peso molecular (SUTHERLAND, 2002). Devido à viscosidade alta de suas soluções e a solubilidade do polímero em água também possui aplicações importantes na indústria petrolífera onde é geralmente usado em processos de recuperação.

Vendruscolo e colaboradores (2005) descreveram a preparação de comprimidos utilizando-se somente xantana e também associada à galactomana extraída de sementes de *Mimosa scrabella* como matrizes para liberação controlada de teofilina. Os resultados mostraram que a xantana possui um efeito de sustentação maior na liberação de teofilina que as matrizes de galactomana isoladamente ou da mistura dos dois materiais. Andreopoulos e Tarantili (2001) descreveram o estudo de liberação utilizando-se matrizes preparadas com xantana e ácido salicílico em quantidades de 1, 2 e 5%. Os resultados mostraram que a liberação ocorre em um tempo menor (cerca de 450 min) nas matrizes contendo 5% do que nas que continham menor quantidade de ácido salicílico (1%) onde o tempo foi cerca de 630min.

A utilização de xantana como um substituto do ágar em meio de cultura também foi descrito (BABBAR; JAIN, 2006). Os resultados mostraram que a xantana sozinha ou misturada com o ágar não trinca por secagem, servindo para um maior prazo de manutenção das culturas, além de ter uma boa estabilidade em uma ampla faixa de pH.

A xantana foi utilizada também para o desenvolvimento de um líquido oftalmológico relacionada ao grau de interação com uma baixa (8% m/v) e alta (16% m/v) concentração de

dispersão de mucina, que é um grupo de mucoproteínas encontrado em várias secreções humanas, como por exemplo, fluídos lacrimais. O estudo demonstra que há uma significativa relação entre conforto e tolerância no líquido ocular preparado com xantana, especialmente quando a concentração de mucina é de 8% m/v (CEULEMANS; VINCKIER; LUDWIG, 2002).

1.3. – Colágeno

As fibras de colágeno começam a aparecer durante o desenvolvimento embrionário no processo inicial de diferenciação dos tecidos. Mais tarde, torna-se responsável pela integridade dos tecidos dos ossos, cartilagens, pele e estrutura de vasos sanguíneos e outros órgãos, correspondendo à cerca de 30% da proteína total e a 6% em peso do corpo humano. Com grande resistência à tração, a principal função do colágeno é acomodar e modular as forças mecânicas externas e internas que são exercidas no organismo.

O colágeno é um filamento de 300nm de comprimento e 1,5nm de diâmetro, formado fundamentalmente por uma unidade denominada tropocolágeno. Este, por sua vez, é constituído por três cadeias polipeptídicas denominadas α , que possuem forma helicoidal. Estas cadeias enrolam-se umas nas outras formando a hélice tripla (Figura 6), através da formação de ligações de hidrogênio, que estabilizam a estrutura (NIMNI, 1988).

Existem 28 tipos (VEIT et al., 2006) de colágeno conhecidos, mas os mais comuns são os do tipo I, II, III e IV. O colágeno do tipo I é o mais abundante e é formado por duas cadeias idênticas chamadas $\alpha 1$, possuindo cerca de 1.055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente $\alpha 2$, possuindo cerca de 1.029 resíduos.

O arranjo dos aminoácidos nas cadeias α consiste em triplete em que o terceiro resíduo é a glicina. A forma mais comum, correspondente a um terço das estruturas é o tipo – $(\text{Gly-X-Y})_n$, com X sendo prolina (Pro) e Y, hidroxiprolina (Hyp). No restante das cadeias, X

e Y correspondem a outros aminoácidos essenciais para a organização do colágeno em fibras (NIMNI, 1988).

Figura 6. Esquema de formação da hélice tripla da molécula de colágeno (ALBERTS, 1994).

As moléculas de tropocolágeno interagem entre si, formando as microfibrilas, menor unidade estrutural do tecido conjuntivo. Estas, também se agregam formando as fibrilas, que posteriormente também se unem para formar as fibras que compõem a matriz colagênica dos tecidos. Este processo, em que as moléculas de colágeno se organizam ordenadamente *in vitro* é chamado fibrilogênese (Figura 7) e é dependente da temperatura, pH e força iônica do meio.

Figura 7. Esquema da formação da fibrila de colágeno.

O colágeno possui características distintas como biomaterial quando comparado com um polímero sintético, sendo a mais importante o modo de interação com os tecidos do corpo. Isso está associado com propriedades naturais que incluem baixa resposta imunológica, baixa toxicidade, a habilidade de promover o crescimento celular e a reconstrução *in vitro* da estrutura microfibrilar encontrada em tecidos naturais (SIONKOWSKA, 2000).

1.4. – Complexo quitosana:xantana

Complexos poliméricos podem ser obtidos por reação entre dois ou mais polímeros e suas propriedades macromoleculares dependem dos polímeros utilizados e das condições de preparação. As ligações entre os diferentes polímeros são produzidas por interações intermoleculares como: forças de Coulomb (iônicas); ligação hidrogênio; transferência de carga e forças de Wan der Waals. Estas ligações produzem diferentes tipos de complexos, respectivamente, complexos polieletrólíticos; complexos por ligação hidrogênio; complexos por transferência de carga e estereocomplexos (DUMITRIU, CHORNET, 1998).

A quitosana pode ser utilizada para a preparação de complexos polieletrólíticos com poliânions naturais como a carboximetilcelulose, álcool polivinílico, dextrana sulfato, ácido hialurônico, carboximetildextrana, colágeno e xantana (MARTÍNES-RUVALCABA, 2007). O mais estudado é o complexo quitosana:alginato, que é formado pela interação entre os íons carboxílicos do alginato e os grupos amino da quitosana.

Além disso, a quitosana também pode interagir com materiais biológicos tais como a heparina e colágeno, produzindo complexos de grande interesse nas aplicações biomédicas. Dependendo das condições utilizadas o colágeno forma complexos com a quitosana por interações eletrostáticas ou por ligações hidrogênio.

A formação do complexo quitosana:xantana obedece às mesmas condições que a formação de outros complexos a base de quitosana. São dois polieletrólitos de cargas opostas

e quando a quitosana (policátion) e a xantana (poliânion) interagem formam um complexo insolúvel (Figura 8).

Figura 8. Estruturas da quitosana e xantana e seu modo de interação (CHELLAT et al., 2000).

A complexação ocorre pela ligação dos grupamentos amino da quitosana com os grupos carboxílicos da xantana, seguindo a reação:

O intumescimento é influenciado principalmente pelas interações iônicas que ocorrem na formação do complexo. Um aumento na densidade de interações entre as cadeias induz a uma diminuição no intumescimento do hidrogel e também do seu pH sensível, melhorando a estabilidade da rede tridimensional. Os hidrogéis formados por forças iônicas podem intumescer tanto em condições ácidas quanto básicas (Figura 9), que permite aplicações em diversas áreas biomédicas, como por exemplo, adesivos dentais e restaurações, dispositivos de liberação controlada e materiais biocompatíveis (PEPPAS et al., 2000).

Para o complexo quitosana:xantana o mecanismo de complexação foi sugerido como sendo melhor entre pH 5-6 que é onde ocorre a máxima interação entre as cadeias dos dois polímeros. Além disso, nesta faixa de pH a possibilidade de insolubilidade ou precipitação da quitosana é reduzida (HIGUCHI, 2002).

O complexo polieletrólito formado a partir dos biopolímeros quitosana e xantana tem sido relatado na literatura, com a sua utilização na imobilização de enzimas e liberação de fármacos (MAGNIN; DUMITRIU; CHORNET, 2003). O estudo da biocompatibilidade *in vitro* e *in vivo* do complexo quitosana:xantana mostrou que este não possui efeito citotóxico (CHELLAT et al, 2000).

Figura 9. Estrutura e pH sensível de intumescimento de um complexo eletrólito contendo quitosana: - carga negativa de um polímero adicional; + carga positiva da quitosana; ○ interação iônica; — quitosana; — polímero adicional (BERGER et al., 2004).

2. - OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi a obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno com potencialidade de uso como biomaterial e na liberação controlada de fármacos.

Para isso, os hidrogéis foram desenvolvidos por um método de preparação em que foi possível a obtenção deles em pH próximo ao da pele (pH ~ 5,5), utilizando-se soluções de quitosana (derivada de β -quitina), colágeno (derivado de tendão bovino) e xantana (comercial) em diferentes proporções.

3. - PARTE EXPERIMENTAL

3.1. – Obtenção da quitosana

Os moluscos são divididos em classes distintas: Cephalopoda (Lulas, Polvos e Chocos), Acephala (Conchas) e Gastropoda (Caracóis). Em relação à concha, de natureza calcária e rígida, no caso da lula esta está reduzida a uma lâmina fina e tornou-se interna e é chamada de gládio, pena ou siba (Figura 10).

Figura 10. Esquema da lula com destaque de suas principais partes.

A quitosana utilizada neste trabalho foi obtida a partir de β -quitina extraída do gládio de lula da espécie *Loligo*. Estes foram cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia – SP). Os gládios foram lavados com água corrente, um a um, para a eliminação de materiais residuais da pescagem (sais e matéria orgânica), secos em estufa a 30°C, triturados e separados com peneira obtendo-se partículas com diâmetro entre 0,149-0,250mm.

A figura 11 apresenta o esquema geral de obtenção da quitosana (KURITA et al., 1993) que consiste em três etapas: desmineralização, desproteinização e desacetilação.

Figura 11. Esquema geral de obtenção da quitosana.

Para o processo da desmineralização fez-se uma medida termogravimétrica do gládio de lula e o resíduo obtido foi considerado como sendo carbonato de cálcio. Este valor foi utilizado para o cálculo da quantidade de solução de HCl necessária para o processo, sendo que este deve estar em excesso para garantir a desmineralização do material.

Assim, realiza-se o processo utilizando-se 40,0g de gládio moído com $\text{HCl } 0,55 \text{ mol L}^{-1}$ na relação gládio de lula/solução (1g/15mL) à temperatura de 25°C por 2h com agitação mecânica constante. Após isso a solução foi lavada com água destilada com agitação mecânica constante, até a neutralidade (cerca de 10 dias). O sólido obtido foi seco em estufa à 40°C por cerca de 1 semana.

A desproteínização consiste no tratamento alcalino do sólido obtido na etapa anterior. Para este processo foi utilizada uma solução de $\text{NaOH } 0,3 \text{ mol L}^{-1}$ na razão gládio desmineralizado/solução (1g/10mL). Com agitação mecânica constante e temperatura controlada à 80°C , o sistema foi mantido nestas condições por 1h. O sólido obtido foi lavado como descrito anteriormente até a neutralidade, sendo necessário aproximadamente 4 dias. O material foi seco em estufa à 40°C por 1 semana.

Para se obter a quitosana a partir da β -quitina foi realizado um tratamento alcalino utilizando-se uma solução de $\text{NaOH } 40\%$ (m/m) na proporção β -quitina/solução (1g/20mL).

O sistema foi deixado à temperatura de 80°C com agitação mecânica constante por 3h e em atmosfera de N₂. Novamente, o material obtido foi lavado como nas etapas anteriores até a neutralidade e seco em estufa por cerca de 1 semana. Os três passos seguidos foram repetidos 1 vez para garantir maior eficiência dos processos.

A partir da quitosana obtida preparou-se uma solução com concentração 0,5% em ácido acético 1,0%. Esta foi agitada por cerca de 24h para a completa dissolução do sólido.

3.1.1. – Determinação do Grau de Acetilação

Na literatura são encontrados vários trabalhos utilizando diferentes métodos para a determinação do grau de acetilação. Para a determinação deste parâmetro, foram escolhidos dois métodos: a espectroscopia na região do infravermelho (FT-IR) e a espectroscopia na região do ultravioleta (UV).

3.1.1.1 .- Espectroscopia na região do ultravioleta (UV) (LIU et al., 2006)

A quitosana é composta por dois grupos cromóforos, N-acetilglicosamina (GlcNAc) e a glicosamina (GlcN). Não se têm evidências da interação entre os monômeros, podendo assim contribuir para a determinação simples do material em um comprimento de onda.

Uma amostra de 6,2mg de quitosana foi dissolvida em 50mL de ácido clorídrico 0,1molL⁻¹ e agitada até a dissolução total do material. Após isso, foi feita a leitura da absorbância da solução de quitosana em $\lambda_{\text{máx}} = 201\text{nm}$ e o grau de acetilação foi calculado pela equação:

$$\text{Grau de acetilação} = \frac{161,1 \times A \times V - 0,0218 \times m}{3,3615 \times m - 42,1 \times A \times V} \quad (2)$$

em que **A** é a absorbância; **V** é o volume da solução (L) e **m** é a massa (mg) de quitosana. O aparelho de UV utilizado foi um espectômetro HITACHI U-3000, num intervalo de 195-220nm, com cela de 1cm de largura e fenda de 0,5nm.

3.1.1.2. - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) (SHIGEMASA et al., 1996)

Para a determinação do grau de acetilação por infravermelho foi preparada uma pastilha, por prensagem, de KBr e quitosana na forma de pó.

Este parâmetro foi determinado pela relação dos grupos N-acetilglicosamina dados pela absorbância da amida I em 1655cm^{-1} e a banda do grupo hidroxila em 3450cm^{-1} , que são utilizados como referência interna. Para uma quitosana totalmente N-acetilada, a relação entre a absorbância em 1655cm^{-1} e 3450cm^{-1} é 1,33 e portanto, a porcentagem de N-acetil grupos na amostra é dada pela equação:

$$\text{Grau de desacetilação(\%)} = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \times \frac{100}{1.33} \quad (3)$$

O espectro de FT-IR foi obtido em um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON SERIES num intervalo de 400 a 4000cm^{-1} , com resolução de 4cm^{-1} , com 16 varreduras acumuladas.

3.1.2. – Cromatografia de permeação em gel (GPC) para a determinação da massa molecular da quitosana

Esta análise foi realizada por Márcia Dib Zambon do Grupo de Físico-Química Orgânica– DFQ – IQSC/USP. Uma amostra de 5,0mg de quitosana foi dissolvida em 2mL do eluente ($0,3\text{molL}^{-1}$ ácido acético/ $0,2\text{molL}^{-1}$ acetato sódio) sob agitação constante durante 24h.

Após esse período a solução foi filtrada em Filtro Acrodis de 1 μ m (fibra de vidro) – 25mm / Waters e injetada em um Cromatógrafo Líquido HP – SEC, marca Shimadzu. As colunas utilizadas foram uma pré-coluna Shodex OHpak SB-G + 2 colunas Shodex OHpak SB (805HQ + 803HQ), com um fluxo de 0,8mL/min, à 35°C. Os padrões Pullulan (padrões de polissacarídeos) utilizados para a curva de calibração estavam em concentração de 2mgmL⁻¹ de eluente.

3.2. - Xantana

A xantana utilizada foi produzida pela bactéria *Xanthomonas campestris* e comercializada pela Fluka – BioChemica. O material foi utilizado sem prévia purificação. A solução de xantana (concentração 0,5%) foi preparada pela dissolução desta em água desionizada a temperatura de 25°C.

3.3. – Colágeno (LACERDA, PLEPIS, GOISIS, 1998)

A matéria prima utilizada para a obtenção do gel de colágeno foi o tendão bovino, que após lavagem com solução de NaCl 0,9%, para remoção de sangue, foi tratado com uma solução alcalina contendo 6% de DMSO e sais (cloretos e sulfatos) de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺. Após 24h o material foi removido da solução alcalina e equilibrado em solução aquosa dos mesmos cloretos e sulfatos de Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺. Esses sais foram removidos por lavagens sucessivas com H₃BO₃ 3%, água destilada, EDTA 0,3% e água desionizada até condutividade constante. O colágeno foi então extraído com uma solução de ácido acético pH 3,5, homogeneizado e desaerado sendo que a concentração final obtida foi de aproximadamente 1%, determinada por liofilização. A partir da solução estoque foi preparada uma solução com concentração 0,5%, em ácido acético pH 3,5, utilizada na preparação dos hidrogéis.

3.4. - Preparação dos hidrogéis

Os hidrogéis foram preparados pela mistura à temperatura de 25°C das soluções preparadas concentração de 0,5%. À solução de quitosana foi adicionada a solução de xantana sob agitação. Foram obtidos hidrogéis da mistura entre quitosana/xantana nas proporções (m/m) 1:2 (QX12); 1:1 (QX11) e 2:1 (QX21), sendo que logo após a agitação estes imediatamente precipitaram.

Para a preparação dos hidrogéis contendo colágeno foram testadas diferentes proporções desta proteína na mistura com as soluções de quitosana e xantana, verificando que grandes quantidades de colágeno não permitiram a formação do hidrogel de maneira satisfatória. Assim, a quantidade foi fixada nas proporções (m/m/m) de quitosana/xantana/colágeno de 1:2:0,5 (QXC12); 1:1:0,5 (QXC11) e 2:1:0,5 (QXC21). Estes hidrogéis foram preparados pela mistura de quitosana com xantana, sob agitação e, após isso, o colágeno foi adicionado aos polissacarídeos também sob agitação. Estes demoraram um tempo maior para precipitar do que os hidrogéis contendo quitosana e xantana.

Após a mistura os hidrogéis foram dialisados com Tampão de McIlvaine (fosfato dissódico – ácido cítrico) pH 5,6 (MORITA; ASSUMPÇÃO, 1972) durante 4 dias sob agitação constante e temperatura de 25°C para promover um aumento do pH do sistema. Após isso, para evitar a presença de sais na amostra, foi realizada uma diálise com água desionizada também durante 4 dias. Os hidrogéis obtidos foram armazenados a aproximadamente 5°C até a sua utilização.

3.5. - Caracterização dos hidrogéis

A caracterização dos hidrogéis foi realizada através das técnicas de análise térmica (termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região do infravermelho e absorção de água.

3.5.1. – Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FT-IR)

Com a quitosana obtida e a xantana comercial foram preparadas pastilhas com KBr para a medida de absorção no infravermelho. Para a medida da amostra de colágeno foi preparada uma solução com concentração 0,1% e a membrana foi obtida pela secagem da solução por 24h em uma forma de Teflon® à temperatura ambiente, em capela de fluxo laminar.

Para os hidrogéis foram utilizadas membranas obtidas pela colocação destes em uma placa de silício e deixadas em capela de fluxo laminar por 24h para a secagem. Foi observada a formação de um filme fino sob a placa sendo possível a medida com este material. Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro BOMEM MICHELSON SERIES num intervalo de 400 a 4000cm⁻¹, com resolução de 4cm⁻¹, com 16 varreduras acumuladas.

3.5.2. – Absorção de água

A absorção de água dos hidrogéis foi determinada da seguinte maneira: cerca de 10mg dos hidrogéis liofilizados foram colocados com 2g de água desionizada em um tubo próprio e imediatamente, centrifugados (centrífuga FANEM modelo 205 N) durante 30 minutos a 3000rpm. As amostras foram removidas e o excesso de água retirado com papel de filtro e pesada. A absorção de água (α) foi calculada pela equação (4), sendo realizada uma média de 3 valores. O incremento no peso representa o peso de água absorvido pelo hidrogel.

$$\alpha = \frac{(massa\ do\ hidrogel\ hidratado) - (massa\ do\ hidrogel\ liofilizado)}{(massa\ do\ hidrogel\ liofilizado)} \times 100 \quad (4)$$

Após a pesagem dos hidrogéis reidratados estes foram utilizados para medidas termogravimétricas, descrita no item 3.5.3., para verificar a quantidade de água total contida na sua estrutura.

3.5.3. – Análise Térmica

Para o estudo da estabilidade térmica dos materiais, foram utilizadas duas técnicas: a calorimetria exploratória diferencial (DSC) e termogravimetria (TGA).

Na termogravimetria, a amostra é submetida a uma variação constante de temperatura enquanto a variação de massa é monitorada. No DSC, mede-se o fluxo de calor entre a amostra e um material termicamente inerte enquanto ambos são submetidos a uma variação de temperatura. Nesta técnica é possível avaliar modificações no estado físico da amostra (fusão, transição cristalina), pois ocorre liberação de calor.

Para as medidas termogravimétricas utilizou-se uma massa de cerca de 30mg dos hidrogéis, razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ em atmosfera de ar sintético com fluxo de gás de 80mLmin^{-1} . Os hidrogéis foram colocados no suporte de alumina do aparelho sendo submetidas a um aquecimento no intervalo de temperatura de 25 a 800°C .

Também foram obtidas curvas termogravimétricas utilizando-se hidrogéis reidratados, obtidos como descrito no item 3.5.2., para verificar se após a liofilização estes seriam capazes de novamente reter água na sua estrutura. As medidas foram realizadas utilizando-se os mesmos parâmetros.

Com dois hidrogéis, QX12 e QXC12 foram realizadas medidas termogravimétricas com diferentes razões de aquecimento: 5, 10, 15 e $20^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$, mantendo as outras variáveis como descrito anteriormente. Isso foi realizado com o objetivo de se calcular a energia de ativação referente ao estágio de perda de água nos hidrogéis.

Para as medidas por DSC as amostras com cerca de 20mg foram colocadas em suporte hermético de alumínio. Antes da análise, os hidrogéis foram colocados sobre papel de filtro para a retirada da água em excesso. A temperatura foi abaixada a -35°C utilizando-se nitrogênio líquido, sendo que logo após, o aquecimento foi acionado e a medida foi realizada

de -30 a 100°C com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$. O gás de arraste utilizado foi ar sintético, com fluxo de 80mLmin^{-1} .

Para o colágeno liofilizado foi utilizada uma amostra com 10mg deixada em solução tampão de fosfato $0,13\text{molL}^{-1}$ durante 24h . Antes da análise, o material foi deixado em papel de filtro por 2 min com um peso de aproximadamente 107g . A medida foi realizada entre 0°C à 120°C , com razão de aquecimento de $10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$ em atmosfera de ar sintético.

Um analisador da TA Instruments, acoplado aos módulos DSC-2010 e TGA-2050 foi utilizado nestas análises.

3.5.4. – Microscopia Eletrônica de Varredura

Para a obtenção das fotomicrografias os hidrogéis foram congelados, liofilizados e cortados com um bisturi para se obter a menor espessura possível. Para as amostras de quitosana, xantana e colágeno foram utilizadas as soluções preparadas, colocadas em molde de Teflon®, congeladas e liofilizadas.

As amostras foram colocadas nos suportes apropriados e recobertas com uma fina camada de liga ouro-paládio de 20nm de espessura. A metalização foi realizada em um metalizador Balsers modelo SDC 050 e as fotomicrografias, em um microscópio da marca ZEISS modelo LEO-440.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. - Quitosana

A quitosana foi obtida através dos processos de desmineralização, desproteínização e desacetilação conforme descrito anteriormente.

O processo de desmineralização tem por objetivo a retirada de materiais inorgânicos presentes na amostra. Após a realização do processo o material foi seco em estufa por 1 semana e a massa obtida foi de 29,7g.

A etapa de desproteínização faz com que ocorra a clivagem das cadeias protéicas contidas entre as cadeias poliméricas da quitina, quebrando-as em peptídeos e até mesmo em aminoácidos livres que são removidos neste tratamento. Após a realização do processo a β -quitina obtida apresentava um aspecto fibroso de coloração branca que foi seca em estufa e a massa pesada foi de 12,4g.

Segundo Kurita (2006) os gládios de lula são constituídos por quitina, estimada entre 20 a 40%, e o restante são proteínas. O valor encontrado neste trabalho foi de 31,0%, de acordo com o a literatura.

Na última parte do procedimento obtém-se a quitosana através da desacetilação parcial dos grupos acetamida. Esta se apresentou como flocos brancos duros (Figura 12) e após a secagem em estufa, a massa obtida foi de 9,2g, o que corresponde a um rendimento de 74,2% (em relação à massa de β -quitina). Este valor está de acordo com o encontrado na literatura. Segundo Kurita et al., 1993, a quantidade de quitosana obtida de duas desacetilações consecutivas, está em torno de 80,0% em relação à massa de β -quitina.

Figura 12. Quitosana obtida através do processo de desacetilação da β -quitina.

A quitosana obtida foi caracterizada por espectroscopia na região do infravermelho (Figura 13). Para o espectro da quitosana, as principais bandas encontradas foram: 1.650cm^{-1} , correspondente à amida I; 1.580cm^{-1} , relacionada à amida II; próximo a 3.420cm^{-1} , estiramento O-H, e 1.321cm^{-1} devido ao estiramento do grupo $-\text{CO}-\text{N}-$. A banda intensa entre 800 e 1.200cm^{-1} está relacionada com os anéis piranosídicos (BRUGNEROTTO et al., 2001).

Figura 13. Espectro FT-IR da quitosana.

A curva termogravimétrica da quitosana (Figura 14) apresenta perda de massa em três estágios. O primeiro, entre 25-200°C, corresponde a perda de água do material, o segundo, entre 200-400°C está relacionado à decomposição do biopolímero e o último estágio, à decomposição e carbonização do material (HONG et al., 2007). Os resultados estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores de temperatura e de perda de massa para a quitosana preparada a partir de β -quitina

Amostra	% Perda de Massa			
	25-200°C	200-400°C	400-750°C	Resíduo (750°C)
Quitosana	10,3	44,2	45,88	0

Figura 14. Curva termogravimétrica da quitosana em atmosfera de ar sintético (10°Cmin⁻¹).

As fotomicrografias da quitosana liofilizada mostram uma constituição de fibras, na sua maioria alinhada, mantendo uma organização na superfície do material.

Figura 15. Fotomicrografias da quitosana obtida: A, aumento de 100x e B, 200x.

4.1.1. – Determinação do grau de acetilação

4.1.1.1. – Espectroscopia na região do ultravioleta (UV)

A absorvância no ultravioleta (UV) de uma solução pura de quitosana é possível devido à presença dos resíduos de N-acetilglicosamina (GlcNAc) e glicosamina (GlcN). O valor de absorvância dividido pela concentração molar total dos resíduos (A/c_t) é linearmente relacionado com o grau de acetilação (LIU et al., 2006).

A Figura 16 mostra um gráfico representativo de uma das curvas obtidas por UV. Os dados obtidos para a leitura em $\lambda_{\text{máx}} = 201\text{nm}$ estão na Tabela 3.

Figura 16. Espectro na região do ultravioleta para a solução de quitosana em $\text{HCl } 0,1\text{molL}^{-1}$.

Tabela 3. Valores de massa e absorbância utilizados para a análise por UV

Medida	Massa (mg)	Absorbância (%)
1	6,2	0,2817
2	8,5	0,3848
3	8,5	0,3872

Substituindo estes valores na equação (2) e sabendo que o volume utilizado foi de 0,05L, obteve-se o valor de $10,53 \% \pm 0,03$.

A determinação do grau de acetilação da quitosana por UV utilizando padrões duplos (resíduos de GlcNAc e de GlcN) é um método simples para a determinação do grau de acetilação.

4.1.1.2. - Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) (SHIGEMASA et al., 1996)

O grau de acetilação da quitosana também foi determinado por espectroscopia na região do infravermelho. Através dos valores de absorbância das bandas em 1650 cm^{-1} e a banda do grupo hidroxila em 3420 cm^{-1} (Figura 13) foi possível calcular este parâmetro. Na tabela 4 estão dispostos os valores utilizados para o cálculo.

Tabela 4. Valores de absorbância (FT-IR) para a quitosana

Número de Onda (cm^{-1})	Absorbância
1650	0,0186
3420	0,0158

Substituindo os valores de absorbância na equação (3), o valor obtido para o grau de acetilação é de 11,50%. Este está próximo ao determinado por espectroscopia no ultravioleta, mostrando que os dois métodos utilizados são bastante satisfatórios para a determinação do grau de acetilação da quitosana.

4.1.2. – Cromatografia de permeação em gel (GPC) para a determinação da massa molecular da quitosana (HIGUCHI, 2002)

O sistema de cromatografia foi calibrado utilizando-se 6 padrões com pesos moleculares que variaram de 738 a 788.000 Daltons. Os padrões foram diluídos nas mesmas condições da quitosana ($0,3\text{ molL}^{-1}$ ácido acético/ $0,2\text{ molL}^{-1}$ acetato de sódio).

Os tempos de retenção estão de acordo com a teoria de cromatografia de permeação em gel em que quanto maior o peso molecular menor o tempo de retenção. Na Tabela 5 estão as características dos padrões utilizados.

Tabela 5: Características dos padrões utilizados na análise por GPC

Padrão	Tempo de retenção (min)	Mw ^a (Daltons)	Log Mw
Padrão 1	24,76	738	2,87
Padrão 2	22,64	5.900	3,77
Padrão 3	19,96	47.300	4,67
Padrão 4	17,78	212.000	5,33
Padrão 5	16,90	404.000	5,61
Padrão 6	16,08	788.000	5,89

^a Peso Molecular

Os valores da Tabela 5 foram utilizados para traçar a curva de calibração (log Mw vs Tr) mostrada na Figura 17, sendo que foi encontrado um bom valor de coeficiente de correlação ($r^2 = 0,9984$).

Figura 17. Curva de calibração dos padrões.

A solução de quitosana foi injetada na coluna para a análise e foi obtido o cromatograma mostrado na Figura 18. O valor médio do peso molecular, Mw e Mn e o Índice de Polidispersividade (PDI) foram estimados a partir do cromatograma usando a curva de calibração. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Valores médios de peso molecular da amostra de quitosana

Amostra	Mw	Mn	PDI
Quitosana	428.414	211.897	2,02

Figura 18. Cromatograma da quitosana obtido por GPC.

As condições experimentais durante a determinação do peso molecular pela cromatografia de permeação em gel são cruciais para se obter resultados reprodutíveis. Mudanças da força iônica do meio, o pH da fase móvel ou ainda a temperatura da coluna podem ser fatores que prejudiquem a reprodutibilidade da técnica, principalmente devido às interações entre a amostra e a coluna.

A concentração da amostra é um parâmetro importante, especialmente, para quitosanas de alto peso molecular que formam soluções viscosas. Quando a concentração é maior que 1mg/mL, bandas largas de eluição podem ser obtidas e, em alguns casos bandas sobrepostas podem ser observadas.

O peso molecular determinado por GPC foi de $4,28 \times 10^5$, um valor próximo ao encontrado na literatura nas mesmas condições experimentais utilizando-se quitosana derivada de β -quitina (METHACANON et al., 2003). O índice de polidispersividade igual a 1 corresponde a uma amostra monodispersa. Quanto maior o afastamento de 1, mais heterogênea é a mistura, no que diz respeito ao tamanho das cadeias presentes na quitosana.

4.2. - Xantana

A xantana comercial foi utilizada sem purificação prévia e analisada por termogravimetria e espectroscopia na região do infravermelho.

A curva obtida por termogravimetria para a xantana (Figura 19) apresentou perda de massa em três estágios: o primeiro, entre 25-150°C referente à água estrutural, o segundo, entre 150-400°C, que corresponde a degradação do polímero e, entre 400-550°C, a carbonização da xantana (VILLETTI et al., 2002). O resíduo, ou seja, material inorgânico presente na amostra, é observado em 750°C. O valor elevado de resíduo observado para a xantana é devido à presença de íons Na^+ na sua estrutura que podem formar diferentes compostos inorgânicos durante o processo de degradação (SOARES et al., 2005).

Na tabela 7, estão dispostas as temperaturas e as perdas de massa referentes a cada estágio.

Figura 19. Curva termogravimétrica da xantana comercial em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).

Tabela 7. Valores de temperatura e de perda de massa para a xantana

Amostra	% Perda de Massa			
	25-200°C	200-400°C	400-750°C	Resíduo (750°C)
Xantana	12,5	46,1	25,7	15,7

As bandas características encontradas para a xantana (Figura 20) são devido ao estiramento C=O do grupamento éster em 1730cm^{-1} , outro em 1630cm^{-1} correspondente a ligação hidrogênio ou dos grupos carboxílicos ionizados (DUMITRIU; CHORNET; VIDAL, 1997), o sinal largo em 3420cm^{-1} refere-se ao estiramento das ligações OH. Em 141-cm^{-1} , a banda de fraca intensidade corresponde também ao grupo carboxilato. O sinal intenso com a banda com máximo em 1060cm^{-1} corresponde aos estiramentos dos grupos C-O presentes nos açúcares (OSIRO, 2002).

Figura 20. Espectro de FT-IR da xantana.

As fotomicrografias obtidas para a xantana liofilizada (Figura 21) mostram uma estrutura compacta, com a presença de poucas fibras, diferentemente do que foi observado para a quitosana. A superfície também mostra a presença de poros.

Figura 21. Fotomicrografias da xantana. Em A, aumento de 100x e em B, 200x.

4.3. – Colágeno

O gel de colágeno obtido foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho, termogravimetria (TG/DTG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC).

O espectro no infravermelho (Figura 22) apresentou as principais bandas características em 1.656cm^{-1} , típica de amida I, devido ao estiramento da carbonila; em 1.556cm^{-1} , relacionado à amida II, devido às vibrações no plano da ligação N–H e ao estiramento C–N; em 1.240cm^{-1} , correspondem as vibrações no plano da amida III, devido ao

estiramento C–N e a deformação N–H; em 1.454cm^{-1} , correspondente a estereoquímica dos anéis pirrolidínicos e próximo a 3.350cm^{-1} , devido ao estiramento O–H (SIONKOWSKA et al., 2004).

Através da relação da absorbância das bandas em 1235cm^{-1} e 1450cm^{-1} que se referem à banda da amida III e estereoquímica dos anéis pirrolidínicos, pode-se verificar a integridade da hélice tripla do colágeno. O valor próximo ao unitário indica a integridade da hélice tripla, um valor próximo a 0,5 indica a desnaturação da proteína (SILVESTER; YANNAS; FORBES, 1989). O valor encontrado foi de 0,95 indicando a integridade da estrutura colagênica da hélice tripla.

Figura 22. Espectro de FT-IR do colágeno.

A curva termogravimétrica obtida para o colágeno está mostrada na Figura 23. A curva termogravimétrica mostra uma perda de massa em três estágios: o primeiro se refere à água estrutural ($25\text{-}130^{\circ}\text{C}$), o segundo, à degradação térmica das cadeias poliméricas do colágeno ($130\text{-}440^{\circ}\text{C}$) e o terceiro, ($440\text{-}750^{\circ}\text{C}$), à carbonização do polímero. Os valores de perda de massa referentes ao colágeno estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8. Valores de temperatura e de perda de massa para o colágeno

Amostra	% Perda de Massa			
	25-130°C	130-440°C	440-750°C	Resíduo (750°C)
Colágeno	13,1	50,1	34,9	2,0

Figura 23. Curva termogravimétrica do colágeno em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).

A curva DSC do colágeno (Figura 24) mostra a transição endotérmica referente à desnaturação da proteína que é a transição da hélice tripla para uma forma desordenada quando o colágeno é aquecido. Este aquecimento provoca a quebra de ligações intramoleculares fazendo com que a proteína passe de uma estrutura cristalina a uma forma desorganizada chamada gelatina. O valor encontrado para esta transição (Figura 24) está em torno de $42,9^{\circ}\text{C}$, determinada pela inflexão da curva, mostrando a integridade do colágeno, uma vez que materiais desnaturados não apresentam transição térmica nesta faixa de temperatura estudada.

Figura 24. Curva DSC do colágeno de tendão.

As fotomicrografias da superfície obtidas para o gel de colágeno liofilizado (Figura 25) mostram uma estrutura constituída de arranjos de fibras distribuídos randomicamente.

Figura 25. Fotomicrografias do colágeno: A, aumento de 200x e B, 500x.

4.4. - Preparação dos Hidrogéis

A reação de complexação entre os dois biopolímeros ocorre devido à interação entre as cargas estruturais existentes na quitosana e na xantana e o hidrogel formado retém uma quantidade significativa de água. (DUMITRIU; CHORNET; VIDAL, 1997).

A ilustração esquemática da formação da matriz do polieletrólito está mostrada na Figura 26.

A formação deste hidrogel ocorre em algumas etapas. A primeira é a mistura das soluções dos dois biopolímeros. O segundo passo é a modificação da concentração de cada polímero na solução final e na estrutura das macromoléculas (passa de enovelada para uma estrutura expandida), pois as soluções de quitosana e xantana não possuem o mesmo pH. No terceiro passo ocorre a formação poli-iônica entre o grupo NH_3^+ da quitosana e o grupamento COO^- da xantana. Esse processo de modificação estrutural e interações eletrostáticas é conhecido como coacervação em que ocorre a separação das soluções poliméricas aquosas em duas fases imiscíveis: uma fase coacervada (polímeros concentrados) e uma fase diluída. O coacervato é composto de quitosana, xantana e por moléculas de água orientada e não-orientada, sendo que estas se arranjam em camadas entre as macromoléculas. A primeira camada, na superfície das macromoléculas, as moléculas de água estão orientadas por ligação hidrogênio. A segunda camada corresponde à água livre, em que se encontram as moléculas não-orientadas. Finalmente, o último passo corresponde à mudança na conformação da macromolécula resultando na formação do hidrogel, com a eliminação da água não-orientada (MAGNIN et al, 2004).

Figura 26. Ilustração esquemática da formação da matriz: coacervação e formação do hidrogel (adaptado de MAGNIN et al. 2004).

As fotografias digitais (Figura 27) dos hidrogéis mostraram que estes possuem uma aparência similar a uma gelatina, sendo que os hidrogéis que contêm colágeno apresentaram

uma rigidez maior em relação aos sem colágeno. Além disso, foi possível perceber que o material com maior quantidade de xantana apresentou uma rigidez maior que nas demais proporções. Além disso, todos apresentaram uma coloração branca, mantinham a forma e eram bastante elásticos.

Figura 27. Fotografia dos hidrogéis: A) QX12, B) QXC12, C) QX11, D) QXC11, E) QX21 e F) QXC21.

4.5. - Caracterização dos Hidrogéis

4.5.1. – Espectroscopia de absorção na região do Infravermelho (FT-IR)

Os espectros FT-IR referente aos complexos quitosana:xantana mostram bandas características dos dois biopolímeros com a ausência de novos picos indicando que não há interação entre os dois polissacarídeos. Com a presença de colágeno não são observados deslocamentos nas bandas de FT-IR sugerindo novamente que o complexo formado não apresenta interações entre os materiais utilizados. A Figura 28 mostra o espectro no infravermelho dos hidrogéis QX11 e QXC11. As outras proporções apresentaram comportamento semelhante.

Figura 28. Espectro no infravermelho dos hidrogéis: A, QX11 e B, QXC11.

4.5.2. – Absorção de água

A absorção de água foi obtida através da equação 4, utilizando-se a massa do hidrogel liofilizado e reidratado. Os valores de porcentagem de água absorvida pelos hidrogéis (α) estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9. Valores de porcentagem de água contida nos hidrogéis

Hidrogel	Peso liofilizado (mg)	Peso hidratado (mg)	Água absorvida (α) (%)
QX11	10,00 $\pm$ 0,05	218,86 $\pm$ 4,49	2088,60 $\pm$ 0,02
QXC11	10,03 $\pm$ 0,06	229,16 $\pm$ 4,75	2184,75 $\pm$ 0,02
QX21	10,00 $\pm$ 0,05	270,90 $\pm$ 4,52	2609,00 $\pm$ 0,02
QXC21	10,06 $\pm$ 0,05	218,40 $\pm$ 4,91	2070,97 $\pm$ 0,02
QX12	10,03 $\pm$ 0,06	330,63 $\pm$ 0,92	3196,41 $\pm$ 0,01
QXC12	9,96 $\pm$ 0,06	223,03 $\pm$ 1,61	2139,26 $\pm$ 0,01

Os resultados mostraram que os hidrogéis possuem a capacidade de reter uma grande quantidade de água na sua estrutura após a liofilização. Os hidrogéis contendo colágeno apresentaram uma quantidade de água absorvida (α) semelhantes. Considerando os hidrogéis compostos somente de quitosana e xantana pode-se observar que o valor de quantidade de água no hidrogel QX11 foi próximo ao obtido para os hidrogéis contendo colágeno. Os hidrogéis QX12 e QX21 foram os que apresentaram os maiores valores de α . Com isso, pode-se perceber que a quantidade de água absorvida pelos hidrogéis é influenciada pela quantidade do polímero presente nas diferentes proporções.

4.5.3. – Análise Térmica

Para verificar os diferentes tipos de água presente nos hidrogéis, podem-se utilizar várias técnicas, como espectroscopia no infravermelho, espectroscopia de RMN, calorimetria exploratória diferencial (DSC) ou termogravimetria (TG/DTG). Três tipos de interações têm sido propostas: água não congelável ligada, que não apresenta transições de fase de primeira ordem, água congelável ligada, que é observada por DSC em temperatura menores que 0°C e a água livre. A água total presente no hidrogel pode ser obtida por termogravimetria (FRINGANT et. al., 1996).

As curvas termogravimétricas dos hidrogéis mostraram uma perda de massa em uma etapa, entre 25-200°C (Figura 29), referente à saída de água do hidrogel (Tabela 10). Devido a

pouca quantidade de biopolímero, a degradação e carbonização são bastante discretas não sendo possível verificar este evento térmico através das curvas.

Figura 29. Curvas TG e DTG dos hidrogéis QX21 e QXC21 em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).

Os hidrogéis liofilizados e reidratados foram submetidos à análise termogravimétrica a fim de se comparar com as análises efetuadas antes da liofilização. A Figura 30 apresenta uma curva termogravimétrica do hidrogel obtido inicialmente e sua respectiva reidratação.

Figura 30. Curvas TG dos hidrogéis QX12 e QX12_r em ar sintético ($10^{\circ}\text{Cmin}^{-1}$).

Na Tabela 10 estão dispostos os valores de quantidade de água para os hidrogéis e suas respectivas reidratações. A análise destes valores mostra que a quantidade de água contida nos hidrogéis preparados com quitosana derivada de β -quitina é maior que o encontrado na literatura para os hidrogéis compostos de quitosana derivada de α -quitina e xantana (65-95%) (DUMITRIU; CHORNET; VIDAL, 1997). Além disso, a presença de colágeno não induz em modificação no conteúdo de água retida no hidrogel e não altera também sua reidratação.

A reidratação não provoca alterações significativas na quantidade de água, sugerindo que a liofilização é uma boa opção para o armazenamento deles, evitando problemas de contaminação e surgimento de fungos nos hidrogéis.

Tabela 10. Quantidade de água total determinada por termogravimetria

Hidrogel	Quantidade de água (%)
QX12	98,5
QX12_r	98,7
QXC12	97,7
QXC12_r	98,1
QX11	99,0
QX11_r	97,7
QXC11	98,1
QXC11_r	93,8
QX21	98,1
QX21_r	97,7
QXC21	96,8
QXC21_r	96,5

r = reidratado

As curvas DSC mostram a transição referente à fusão da água livre presente nos hidrogéis, que segundo a literatura estão em torno de 0°C. Entretanto, os valores obtidos para esta transição mostram um pequeno deslocamento para temperaturas um pouco maiores provavelmente pelo aumento da interação água/polímero (Tabela 11).

Comprando-se os hidrogéis compostos por quitosana e xantana nas diferentes proporções, pode-se perceber que conforme o aumento da quantidade de quitosana na

amostra, maior é a temperatura de fusão da água. Isso possivelmente ocorre pelo fato de que com o aumento da quantidade deste biopolímero é maior a quantidade de grupos NH_3^+ capazes de interagir com os grupos COO^- , tanto da xantana quanto do colágeno. Isto implica em uma interação iônica e conseqüentemente, maior estabilidade e maior energia necessária para romper esta rede. A presença de colágeno nos hidrogéis não altera este tipo de comportamento.

Tabela 11. Valores da temperatura de fusão de água livre, determinadas por DSC

Hidrogel	Temperatura (°C)
QX12	4,14
QXC12	8,54
QX11	7,85
QXC11	7,36
QX21	8,79
QXC21	10,61

Comparando-se os hidrogéis com a mesma proporção de quitosana e xantana (QX11) e a respectiva amostra contendo colágeno (QXC11) percebe-se que não há uma mudança significativa na temperatura da transição referente à fusão da água livre da amostra, provavelmente por uma maior interação dos grupos iônicos NH_3^+ da quitosana e COO^- da xantana e do colágeno. Entretanto, nas outras amostras com proporções de quitosana e xantana diferentes, as amostras que contém colágeno apresentam a temperatura de saída de água um pouco mais elevada, entre 2 a 4°C provavelmente pela diferença na proporção de grupos iônicos.

A Figura 31 mostra uma curva representativa medida no processo de aquecimento. O pico endotérmico em torno de 0°C é devido à fusão da água (livre, congelada) do sistema. Nestas curvas é possível observar o pico referente à fusão de água e também um pico em torno de 30°C, somente nos hidrogéis de quitosana:xantana que corresponde a transição gel-

solução para a quitosana (RATTO et al., 1995). Este pico não é observado nos hidrogéis contendo colágeno, possivelmente por interferência desta proteína.

Figura 31. Curvas DSC dos hidrogéis QX12 e QXC12.

Os hidrogéis QX12 e QXC12 apresentaram o maior deslocamento na temperatura de fusão da água livre observada por DSC (Tabela 11). Por este motivo, estes foram submetidos a diferentes razões de aquecimento por termogravimetria com o intuito de calcular a energia de ativação correspondente ao evento de fusão da água. Com isso, foi possível determinar o quanto de energia é necessário para romper a rede polimérica.

O método utilizado para o cálculo foi o de Flynn e Wall (FLYNN; WALL, 1966), que se baseia em que a uma dada conversão o mecanismo de reação é o mesmo, independente da temperatura em que ocorra. Desta forma, é necessário determinar a temperatura em que se verifica uma dada conversão em condições experimentais de diferentes razões de aquecimento. Assim, o cálculo de energia de ativação a uma determinada conversão (perda de massa) pode ser feito a partir do coeficiente angular das retas obtidas em gráficos de $\ln\beta$ em função $1/T$, conforme a equação 5. Os valores de perda de massa para diversos valores de

porcentagem, entre 5% e 80% que foram utilizados para o cálculo correspondem à perda de água nos hidrogéis.

$$Ea = \frac{-R}{b} \left(\frac{d \log \beta}{d(1/T)} \right) \quad (5)$$

sendo Ea a energia de ativação (kJmol^{-1}); R , a constante dos gases ($8,314\text{Jmol}^{-1}\text{K}^{-1}$), b , constante igual a 1 e o termo derivado, a inclinação das curvas, com β sendo a razão de aquecimento e T a temperatura absoluta (K).

A figura 32 apresenta as curvas de $\ln\beta$ em função de $1/T$ para o hidrogel QX12 e QXC12.

Os resultados mostram que o valor de energia de ativação para o hidrogel QX12 foi de $3,44\text{kJmol}^{-1}$, enquanto que para o QXC12 foi de $14,84\text{kJmol}^{-1}$, sugerindo que a água presente no hidrogel contendo colágeno está mais fortemente ligada ao biopolímeros, mostrando que a energia necessária para a saída de água da rede do hidrogel contendo colágeno é cerca de 3 vezes maior que a necessária para o hidrogel QX12. Estes valores estão de acordo com o observado por DSC uma vez que o hidrogel QXC12 apresenta maior temperatura de fusão da água livre.

Figura 32. Aplicação do método de Flynn-Wall para os hidrogéis: A, QX12 e B, QXC12.

4.5.4. – Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias da vista lateral do complexo quitosana:xantana (Figura 33) revelam uma estrutura do tipo folha com presença de poros que é responsável pela retenção da água dentro da estrutura de rede (HIGUCHI, 2002).

Figura 33. Fotomicrografias dos hidrogéis: A, QX11; B, QX12 e C, QX21.

Aumento de 200x.

Comparando-se as fotomicrografias destes hidrogéis percebe-se que no que há maior quantidade de xantana (QX12) a estrutura é mais compacta assemelhando-se a fotomicrografia obtida para a xantana no mesmo aumento (Figura 21B). Para o hidrogel QX21, onde a quantidade de quitosana é maior pode-se verificar que a estrutura se apresenta em uma forma de fibras, como o observado para a fotomicrografia da quitosana (Figura 15B). Finalmente, o hidrogel com a mesma quantidade dos dois materiais (QX11) apresenta uma estrutura intermediária ao observado para os outros dois hidrogéis.

Para os hidrogéis contendo colágeno (Figura 34) e utilizando-se o mesmo aumento, as fotomicrografias mostram que como discutido acima o mesmo comportamento é mantido com relação à imposição de uma estrutura quando há uma quantidade maior de algum dos dois polissacarídeos. Entretanto, comparando-se as mesmas proporções com e sem colágeno pode-se verificar que a estrutura na presença desta proteína passa a ser mais porosa e os poros estão interconectados em todo o material em 3 dimensões, o que é extremamente importante na engenharia de regeneração tecidual.

Em um aumento maior para um dos hidrogéis contendo colágeno (QXC21) pode-se perceber claramente a presença de colágeno participando da estrutura do material (Figura 35).

Figura 34. Fotomicrografias dos hidrogéis: A, QXC11; B, QXC12 e C, QXC21.

Aumento de 200x.

Figura 35. Fotomicrografia do hidrogel QXC21, aumento de 500x.

5. – CONCLUSÕES

- Foi possível a preparação e obtenção de hidrogéis compostos de quitosana, xantana e colágeno, em diferentes proporções.
- Os espectros FT-IR mostraram que na mistura de quitosana:xantana não houve a formação de novos picos sugerindo que o complexo é formado somente pela interação entre os grupos NH_3^+ da quitosana e COO^- da xantana. Com a presença de colágeno não se percebe deslocamentos nos picos e o perfil do espectro é mantido.
- A termogravimetria mostrou que os hidrogéis contêm grande quantidade de água (acima de 96%) e que com a reidratação o material é capaz de novamente reter esta grande quantidade de água na sua estrutura. Isso sugere que a liofilização é uma boa opção para o armazenamento dos hidrogéis.
- O DSC mostrou que o pico referente à fusão da água livre foi deslocado para temperatura maior em decorrência do aumento da interação água/polímero.
- O cálculo de energia de ativação mostrou que a energia necessária para o rompimento da rede no hidrogel contendo colágeno é cerca de 3 vezes maior que a necessária para o hidrogel contendo somente quitosana:xantana.
- As fotomicrografias obtidas por MEV sugerem que as estruturas dos hidrogéis são fortemente influenciadas pelo polissacarídeo que está em maior quantidade e que o colágeno participa da estrutura do hidrogel.

6. – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B. **Molecular biology of the cell**. New York: Garland, 1994. p. 971-95.

ANDREOPOULOS, A. G.; TARANTILI, P. A. Xanthan gum as a carrier for controlled release of drugs. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 16, p. 34-46, 2001.

ARGUILLES-MONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M.; PENICHE, C.; HIGUERRA-CIAPARA, I. Rheological studies of the chitosan glutaraldehyde chemical gel system. **Polymer Gels and Networks**, v. 6, p. 429-440, 1998.

BABBAR, S. B.; JAIN, R. Xanthan Gum: An Economical Partial Substitute for Agar in Microbial Culture Media. **Current Microbiology**, v. 52, p. 287-292, 2006.

BAROLI, B. Hydrogels for Tissue Engineering and Delivery of Tissue-Inducing Substances. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 2197-2223, 2007.

BECKER, A.; KATZEN, F.; PÜHLER, A.; IELPI, L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical /genetic perspective. **Applied Microbiological Biotechnology**, v. 50, p. 145-152, 1998.

BÉGIN, A.; CALSTEREN, M. Antimicrobial films produced from chitosan. **Biological Macromolecules**, v. 26, p. 63-67, 1999.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications European. **Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, p. 35-52, 2004.

BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F. M.; ARGÜELLES-MONAL, W.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.

CANDIDO, L. C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. São Paulo: Editora Senac, 2001. 282p.

CEULEMANS, J.; VINCKIER, I.; LUDWIG, A. The use of xanthan gum in an ophthalmic liquid dosage form: Rheological characterization and of the interaction with mucin. **Journal of Pharmaceutics Science**, v. 91, p. 1117-1127, 2002.

CHELLAT F.; TABRIZIAN M.; DUMITRIU S.; CHORNET E.; MAGNY P.; RIVARD C.H.; YAHIA L. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of chitosan-xanthan polyionic complex. **Journal Biomedical Material Research**, v. 51, p. 107-116, 2000.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C. Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações. BR n. PI 9805480-5A. 12 set. 2000.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E. Inclusion and release of proteins from polysaccharide-based polyion complex. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 223-246, 1998.

DUMITRIU, S.; CHORNET, E.; VIDAL, P. **Polyionic insoluble hydrogels comprising xanthan and chitosan**. WO n. 5,620,706, 15 Apr. 1997.

FLYNN, J. H.; WALL, L. A. General Treatment of the Thermogravimetry of Polymers. **Journal of Research of the National Bureau of Standards —A. Physics and Chemistry**, v.70, n. 6, p. 487-523, 1966.

FRINGANT, C.; DESBRIÈRES, J.; MILAS, M.; RINAUDO, M.; JOLY, C.; ESCOUBES, M. Characterisation of sorbed water molecules on neutral and ionic polysaccharides. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 18, p. 281-286, 1996.

FUJIWARA, J.; IWANAMI, T.; TAKAHASHI, M.; TANAKA, R.; HATAKEYAMA, T.; HATAKEYAMA, H. Structural change of xanthan gum association in aqueous solutions. **Thermochimica acta**, v. 352-353, p. 241-246, 2000.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V.E.; CASAS, J.A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 549-579, 2000.

HIGUCHI, C. I. **Chitosan-Xanthan Hydrogel: a matrix of inclusion and the delivery of drugs**. 189 f. Tese (Doutorado) – Département de génie chimique, Université de Sherbrooke, Québec, 2002.

HONG, P. Z.; LI, S. D.; OU, C. Y.; LI, C. P.; YANG, L.; ZHANG, C. H. Thermogravimetric Analysis of Chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 105, p. 547–551, 2007.

KHURMA, J. R.; ROHINDRA, D. R.; NAND, A. V. Synthesis and Properties of Hydrogels Based on Chitosan and Poly(Vinyl Alcohol) Crosslinked by Genipin. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 43, p. 749–758, 2006.

KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers of marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, p. 203-226, 2006.

KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIMURA, S.; SHIMODA, K. Squid Chitin as a potencial Alternative Chitin source: Deacetylation Behavior and Characteristic Properties. **Journal of Polymer Science: Part A Polymer Chemistry**, v. 31, p. 485-491, 1993.

LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: Preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, p. 267-271, 1998.

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal Pharmaceutics**, v. 221, p. 1–22, 2001.

- LEE, K. Y.; HA, W. S.; PARK, W. H. Blood compatibility and biodegradability of partially N-acylated chitosan derivatives. **Biomaterials**, v. 16, p. 1211–1216, 1995.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. *Biotecnologia Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. V. 3, p. 125-154.
- LIU, D.; WEI, Y.; YAO, P.; JIANG, L. Determination of the degree of acetylation of chitosan by UV spectrophotometry using dual standards. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 782–785, 2006.
- MAGNIN, D.; DUMITRIU S.; CHORNET E. Immobilization of Enzymes into a Polyionic Hydrogel: ChitoXan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 18, p. 355–373, 2003.
- MAGNIN, D.; LEFEBVRE, L.; CHORNET, E.; DUMITRIU, S. Physicochemical and structural characterization of a polyionic matrix of interest in biotechnology, in the pharmaceutical and biomedical fields. **Carbohydrate Polymers**, v. 55, p. 437-453, 2004.
- MANDALA, I. G.; PALOGOU, E. D.; KOSTAROPOULOS, A. E. Influence of preparation and storage conditions on texture of xanthan-starch mixtures. **Journal of Food Engineering**, v. 53, p. 27-38, 2002.
- MARTÍNEZ-RUVALCABA, A.; CHORNET, E.; RODRIGUE, D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 586–595, 2007.
- METHACANON, P.; PRASITSLIP, M.; POTHSREE, T.; PATTARAARCHACHAI, J. Heterogeneous N-deacetylation of squid chitin in alkaline solution. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 119-123, 2003.
- MIMA, S.; MIYA, M.; IWAMOTO, R.; YOSHIKAWA, S. Highly deacetylated chitosan and its properties. **Journal Applied Polymers Science**, v. 28, p. 1909-1917, 1983.
- MORITA, T.; ASSUMPÇÃO, R.M.V. **Manual de Soluções, Reagentes e Solventes**. São Paulo: Edgard Blucher, 1972. p. 275.
- MUCHA, M. Rheological characteristics of semi-diluted chitosan solutions. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 198, p. 471-484, 1997.
- MUZZARELLI, R.; BALDASSARRE, V.; CONTI, F.; FERRARA, P.; BIAGINI, G. Biological activity of chitosan: ultrastructural study. **Biomaterials**, v. 9, p. 247-252, 1988.
- NIMNI, M. E. **Collagen**. Boca Raton: CRC, 1988. v.1, p. 1-86.
- OSIRO, Denise. **Caracterização da *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri* *Xylella fastigiosa* e seus processos metabólicos por RMN, FTIR e EPR**. 2002. 133 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

- PEPPAS, N. A. Physiologically responsive hydrogels. **Journal of bioactive and Compatible Polymers**, v. 6, p. 241-246, 1991.
- PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIKAWA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-46, 2000.
- PEPPAS, N.A.; LANGER, R. New challenges in biomaterials. **Science**, v. 263, p. 1715-1720, 1994.
- RAO, S. B.; SHARMA, C. P. Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 34, p. 21-28, 1997.
- RATTO, J.; HATAKEYAMA, T.; BLUMSTEIN, R. B. Differential scanning calorimetry investigation of phase transition of water/chitosan systems. **Polymer**, v. 36, p. 2915-1919, 1995.
- RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Funtional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.
- RONAN, J. M.; THOMPSON, S. A. Medical devices comprising ionically and non-ionically crosslinked polymer hydrogels having improved mechanical properties. WO n. 6,387,978, 14 May 2002.
- SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. Structural data on the infra-crystalline swelling of β -chitin. **Biological Macromolecules**, v.28, p.81-88, 2000.
- SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of desacetylation in chitin. **Biological Macromolecules**, v.18, p. 237-242, 1996.
- SILVER F.; DOILLON, C. **Biocompatibility**: interactions of biological and implantable materials. New York: VCH, 1989. v.1, p.1-76.
- SILVESTER, M. F.; YANNAS, I. V.; FORBES, M. J. Collagen banded fibril structure and the collagen platelet reaction. **Thrombosis Research**, v. 51, p. 135-148, 1989.
- SIONKOWSKA, A. Modification of collagen films by ultraviolet irradiation. **Polymer Degradation and Stability**, v. 68, p.147-151, 2000.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.; WESS, T. Molecular Interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v.25, p. 795-801, 2004.
- SOARES, R. M. D.; LIMA, A. M. F.; OLIVEIRA, R. V. B.; PIRES, A. T. N.; SOLDI, V. Thermal degradation of biodegradable edible films based on xanthan and starches from different sources. **Polymer Degradation and Stability**, v. 90, p. 449-454, 2005.

SUTHERLAND, I. A Sticky business. Microbial polysaccharides: current products and future trends. **Microbiology Today**, v. 29, p. 70-71, 2002.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. **Advances in Microbial Physiology**, v. 23, p.80-142, 1982.

TOLAIMATE, A.; DESBRIÈRES, J.; RHAZI, M.; ALAGUI, A.; VINCENDON, M.; VOTTERO, P. On the influence of desacetylation process on the physicochemical characteristics of chitosan from squid chitin. **Polymer**, v. 41, p. 2463-2469, 2000.

VEIT, G.; KOBBE, B.; KEENE, D. R.; PAULSSON, M.; KOCH, M.; WAGENER, R. Collagen XXVIII, a novel von willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 3494-3504, 2006.

VENDRUSCOLO, C. W.; ANDREAZZA, I. F.; GANTER, J. L. M. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M.B. Xanthan and galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p. 1–11, 2005.

VILLETTI, M.A.; CRESPO, J.S.; SOLDI, M.S.; PIRES, A.T.N.; BORSALI, R.; SOLDI, V. Thermal Degradation of natural polymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 67, p. 295-303, 2002.

WILLIAMS, D. F. **Definitions in Biomaterials**. New York: Elsevier, 1987. p.9-29.

YOSOF, N. L. B. M.; LIM, L.Y.; KHOR, E. Preparation and characterization of chitin beads as a wound dressing precursor. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 54, p. 59-68, 2001.