Cindia Lancelotti

Preparação e caracterização de hidrogéis neutros de colágeno aniônico:gelatina:extrato de semente de uva.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em ciências.

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à todos que me fazem transbordar de amor todos os dias, dando-me a sensação única do quanto a vida vale à pena:

✓ *À Deus, Santo Antônio, São Francisco de Assis e Nossa Senhora, por me guiarem até aqui, me abençoando e livrando do mal;*

✓ *Ao meu marido, Marsiel, companheiro, amante e luz da minha vida. Um anjo que Deus mandou para fazer de meus dias mais felizes. Amor eterno, amor puro;*

✓ *À minha mãe, Fatima, razão da minha vida e meu porto seguro. A mãe mais incrível, compreensível e dedicada. Amor único, amor incondicional;*

✓ *Aos meus filhos, Mandy e Tufão, que mudaram a minha vida. Obrigada por me fazerem companhia nos estudos, sempre deitados em meus pés, a qualquer hora. Obrigada pelas gargalhadas proporcionadas e lambidas de conforto. Obrigada simplesmente pela existência de vocês. Amor indescritível;*

✓ *À minha família, em especial, ao Valmi, meus irmãos, cunhada e sobrinhos, por todo apoio e carinho recebidos;*

✓ *Aos meus amigos, por tornarem a vida mais saborosa.*

AGRADECIMENTOS

✓ À Profa Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela dedicação, orientação, oportunidade e aprendizado.

✓ À Dra. Virginia da Conceição Amaro Martins, pela amizade, apoio, dedicação e ajuda no desenvolvimento do trabalho.

✓ À Profa Dra. Fernanda Canduri pelas longas conversas, amizade, apoio e compreensão.

✓ Ao pessoal do CAQI pelas análises realizadas.

✓ Ao Prof. Dr. Éder Tadeu Gomes Cavaleiro e à Dra. Ana Paula Garcia Ferreira pelas análises termogravimétricas.

✓ À Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi e à Dra. Claudia Bernal pelos ensaios de citotoxicidade.

✓ Aos amigos do laboratório de Bioquímica e Biomateriais, em especial à Carla, pela amizade, apoio e companheirismo.

✓ Aos amigos do laboratório de Bioquímica Molecular e Estrutural, em especial à Cintia e à Juliana, pela amizade e carinho que sempre dedicaram a mim.

✓ Aos amigos da ONG Cachorro Ajuda, principalmente à Bianca e à Flávia que me compreenderam, apoiaram e assumiram minhas funções no momento em que mais precisei.

✓ Ao pessoal do serviço de pós-graduação do IQSC.

✓ Ao CNPq pela bolsa concedida.

EPÍGRAFE

“Chegará o dia em que todo homem conhecerá o íntimo dos animais. Nesse dia, um crime contra o animal será considerado um crime contra a própria humanidade”.

Leonardo da Vinci

RESUMO

LANCELOTTI, Cindia. **Preparação e caracterização de hidrogéis neutros de colágeno aniônico:gelatina:extrato de semente de uva**. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

O desenvolvimento de uma matriz de colágeno associado à gelatina tem potencial como biomaterial devido sua alta biocompatibilidade, capacidade de alterar suas propriedades físico-químicas e estruturais por modificações químicas e a habilidade de formar géis estáveis. Porém, um ponto negativo de sua aplicação está na biodegradabilidade. Desta forma, para reduzir esta degradação, agentes de reticulação, como a proantocianidina (PA), que age formando ligações de hidrogênio as quais estabilizam o complexo proteína-PA, podem ser empregados. Este trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrogéis neutros de colágeno aniônico:gelatina:extrato de semente de uva. Para tanto, foram utilizadas duas proporções de extrato, 0,25 e 0,50% e três diferentes tempos de hidrólise alcalina do colágeno, 24, 72 e 120 horas, gerando nove diferentes biomateriais. O colágeno foi extraído de tendão bovino e o agente reticulante foi o extrato de semente de uva cujo componente majoritário é a proantocianidina. A caracterização foi feita por termogravimetria (TG), calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), cinética de absorção de água e ensaios de citotoxicidade *in vitro*, pelos métodos de difusão em ágar e difusão de extrato em solução (MTT). Estudos de TG mostraram a perda de água em um processo único, representando em média 95% do hidrogel. As curvas DSC mostraram que quanto maior a concentração de extrato, maior é a temperatura de desnaturação, aumentando em média 6,8°C com a adição de 0,50% de extrato, o que indica a eficácia da proantocianidina na reticulação do colágeno. Além disso, notaram-se temperaturas menores para maiores tempos de hidrólise alcalina do colágeno, sendo de 58,4°C, 49,7°C e 46,5°C para hidrogéis preparados com colágeno 24, 72 e 120 horas, respectivamente. A presença do extrato não causou alterações significativas nos espectros FTIR, apenas surgimento das bandas em 1118 e 1288 cm⁻¹ referentes ao anel aromático da proantocianidina, mas gerou mudanças nas estruturas internas dos hidrogéis, visualizadas por MEV, como aumento do número de poros e interconectividade entre eles. A cinética de absorção de água mostrou que o equilíbrio é atingido em aproximadamente 10 minutos, indicando vantagem para a aplicação do hidrogel, já que é obtido rapidamente a partir de sua forma liofilizada, adequada para o armazenamento. Também foi observado que quanto menor é o tempo de hidrólise, maiores são as absorções, variando de 540 até 1360%. Com os ensaios de citotoxicidade foi possível concluir que o hidrogel C₂₄GE₅₀ mostrou-se mais adequado para uma aplicação como biomaterial, com um índice de 92,7% de sobrevivência celular.

Palavras-chave: Colágeno, gelatina, proantocianidina, hidrogel.

ABSTRACT

LANCELOTTI, Cindia. **Preparation and characterization of anionic collagen:gelatin:grape seed extract neutral hydrogels.** 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

The development of a collagen matrix associated with gelatin has potential as biomaterial due to its high compatibility, ability to change its physical-chemical and structural properties by chemical modifications and also the ability to form stable gels. However, a negative point of its application is the biodegradability. Thus, to reduce this degradation, crosslinking agents, such as proanthocyanidin (PA), which acts forming hydrogen bonds which stabilize the PA protein complex may be employed. This project aimed to obtain neutral hydrogels prepared by mixture of anionic collagen: gelatin: grape seed extract. It was used two extract proportions (0.25 and 0.50%) and three different periods of time for collagen alkaline hydrolysis (24, 72 , 120 hours), giving nine different biomaterials. The collagen was extracted from bovine tendon and the crosslinking agent was grape seed extract whose major component is the proanthocyanidin. The characterization was done by thermogravimetry (TG), differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), water absorption kinetics and in vitro cytotoxicity assays, by agar diffusion method and diffusion of extract in solution (MTT). TG results showed loss of water in a single process, representing about 95% of the hydrogel. DSC curves showed that the higher the concentration of the extract, the higher the melting temperature, increasing on average 6.8 °C with the addition of 0.50% extract, which indicates the effectiveness of the proanthocyanidin crosslinking of the collagen. Moreover, lower temperatures were observed for longer periods of alkaline hydrolysis of collagen, being 58.4°C, 49.7°C and 46.5°C for preparations with 24, 72 and 120 hours, respectively. The presence of the extract did not cause significant changes in the FTIR spectra, only appearance of bands at 1118 and 1288 cm⁻¹ related to the aromatic ring of proanthocyanidin but led to changes in internal structures of the hydrogels viewed by SEM, showing increased number of pores and interconnectivity between them. The water absorption kinetics showed that the equilibrium is achieved in approximately 10 minutes, indicating advantages in using this hydrogel, which is quickly obtained from its lyophilized form, a suitable form for storage. It was also observed that the shorter the time of hydrolysis, the greater the absorptions, ranging from 540 to 1360%. It was possible to conclude from the cytotoxicity analysis that the C₂₄GE₅₀ is more suitable for application as a biomaterial, with an index of 92.7% cell survival.

Keywords: Collagen, gelatin, proanthocyanidin, hydrogel.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – ESQUEMA REPRESENTATIVO DE ALGUMAS APLICAÇÕES DOS BIOMATERIAIS.	18
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA TRIDIMENSIONAL DE UM HIDROGEL.	20
FIGURA 3 - INTERAÇÃO ENTRE A ENGENHARIA DE TECIDOS E OS BIOMATERIAIS.	23
FIGURA 4 - ESTRUTURA DO COLÁGENO: (A) FORMA DE TRIPLETE PRESENTE NAS MATRIZES COLAGÊNICAS; (B) TROPOCOLÁGENO; (C) HÉLICE TRIPLA.	25
FIGURA 5 - FORMAÇÃO DA FIBRILA DE COLÁGENO.	26
FIGURA 6 - HIDRÓLISE ALCALINA DOS GRUPOS CARBOXIAMIDAS DOS RESÍDUOS DE ASN E GLN.	27
FIGURA 7 - OBTENÇÃO DA GELATINA A PARTIR DE COLÁGENO.	29
FIGURA 8 - ESTRUTURA DA PROANTOCIANIDINA. (A) FLAVAN-3-OL. (B) FORMA DE DÍMERO.	31
FIGURA 9 - INTERAÇÕES ENTRE O COLÁGENO E A PROANTOCIANIDINAS.	33
FIGURA 10 – EXTRATO DE SEMENTE DE UVA.	35
FIGURA 11 – CURVA DSC DEMONSTRANDO A DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO.	37
FIGURA 12 - PLACAS DE PETRI COM CÉLULAS, MEIO DE CULTURA COM CORANTE AMOSTRAS. (A) C ₂₄ GE ₅₀ . (B) C ₂₄ GE ₂₅ . (C) C ₂₄ G. (D) CONTROLE NEGATIVO. (E) CONTROLE POSITIVO.	40
FIGURA 13 - OBTENÇÃO DOS EXTRATOS A PARTIR DAS AMOSTRAS. (A) CONTROLE POSITIVO. (B) CONTROLE NEGATIVO. (C) C ₂₄ G. (D) C ₂₄ GE ₂₅ . (E) C ₂₄ GE ₅₀	41
FIGURA 14 – FLUXOGRAMA DO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.	42
FIGURA 15 - FOTOS DIGITAIS DOS HIDROGÉIS. (A) C ₂₄ G. (B) C ₂₄ GE ₂₅ . (C) C ₂₄ GE ₅₀ . (D) C ₇₂ G. (E) C ₇₂ GE ₂₅ . (F) C ₇₂ GE ₅₀ . (G) C ₁₂₀ G. (H) C ₁₂₀ GE ₂₅ . (I) C ₁₂₀ GE ₅₀	43
FIGURA 16 – CURVAS TG DOS HIDROGÉIS (—) C ₂₄ G, (—) C ₇₂ G E (—) C ₁₂₀ G EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).	46
FIGURA 17 – CURVAS TG DOS HIDROGÉIS (—) C ₂₄ G, (—) C ₂₄ GE ₂₅ E (—) C ₂₄ GE ₅₀ EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).	47
FIGURA 18 - CURVAS TG DAS ESPONJAS (—) C ₂₄ G, (—) C ₂₄ GE ₂₅ E (—) C ₂₄ GE ₅₀ EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).	48
FIGURA 19 – CURVAS TG DOS HIDROGÉIS REIDRATADOS (—) C ₂₄ G, (—) C ₂₄ GE ₂₅ E (—) C ₂₄ GE ₅₀ EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).	49
FIGURA 20 – CURVAS TG DOS HIDROGÉIS REIDRATADOS (—) C ₂₄ GE ₅₀ , (—) C ₇₂ GE ₅₀ E (—) C ₁₂₀ GE ₅₀ EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).	50

FIGURA 21 – CURVAS TG DOS HIDROGÉIS ANTES E APÓS LIOFILIZAÇÃO (—) C ₇₂ G HIDROGEL E (—) C ₇₂ G HIDROGEL REIDRATADO EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).....	51
FIGURA 22 – CURVAS TG DOS HIDROGÉIS ANTES E APÓS LIOFILIZAÇÃO (—) C ₁₂₀ GE ₅₀ HIDROGEL E (—) C ₁₂₀ GE ₅₀ HIDROGEL REIDRATADO EM AR SINTÉTICO (10°C MIN ⁻¹).....	52
FIGURA 23 – CURVAS DSC DOS HIDROGÉIS (—) C ₂₄ G, (—) C ₂₄ GE ₂₅ E (—) C ₂₄ GE ₅₀	53
FIGURA 24 – CURVAS DSC DOS HIDROGÉIS (—) C ₇₂ G, (—) C ₇₂ GE ₂₅ E (—) C ₇₂ GE ₅₀	53
FIGURA 25 – CURVAS DSC DOS HIDROGÉIS (—) C ₁₂₀ G, (—) C ₁₂₀ GE ₂₅ E (—) C ₁₂₀ GE ₅₀	54
FIGURA 26 - ESPECTRO DE FT-IR DOS COLÁGENOS ANIÔNICOS: (—) C ₂₄ , (—) C ₇₂ E (—) C ₁₂₀	57
FIGURA 27 – ESPECTRO DE FT-IR DA GELATINA.	58
FIGURA 28 – ESPECTRO DE FT-IR DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA PURIFICADO.	59
FIGURA 29 - ESPECTRO DE FT-IR PARA AS AMOSTRAS: (—) C ₂₄ G, (—) C ₂₄ GE ₂₅ E (—) C ₂₄ GE ₅₀ . SETAS: PRESENÇA DA PROANTOCIANIDINA NAS AMOSTRAS.	61
FIGURA 30 - ESPECTRO DE FT-IR PARA AS AMOSTRAS: (—) C ₇₂ G, (—) C ₇₂ GE ₂₅ E (—) C ₇₂ GE ₅₀ . SETAS: PRESENÇA DA PROANTOCIANIDINA NAS AMOSTRAS.	62
FIGURA 31 - ESPECTRO DE FT-IR PARA AS AMOSTRAS: (—) C ₁₂₀ G, (—) C ₁₂₀ GE ₂₅ E (—) C ₁₂₀ GE ₅₀ . SETAS: PRESENÇA DA PROANTOCIANIDINA NAS AMOSTRAS.	63
FIGURA 32 – FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS COM C ₂₄ . (A) C ₂₄ G NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (B) C ₂₄ G NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (C) C ₂₄ G NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (D) C ₂₄ G NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X. (E) C ₂₄ GE ₂₅ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (F) C ₂₄ GE ₂₅ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (G) C ₂₄ GE ₂₅ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (H) C ₂₄ GE ₂₅ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X. (I) C ₂₄ GE ₅₀ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (J) C ₂₄ GE ₅₀ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (K) C ₂₄ GE ₅₀ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (L) C ₂₄ GE ₅₀ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X.....	66
FIGURA 33 – FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS COM C ₇₂ . (A) C ₇₂ G NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (B) C ₇₂ G NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (C) C ₇₂ G NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (D) C ₇₂ G NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X. (E) C ₇₂ GE ₂₅ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (F) C ₇₂ GE ₂₅ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (G) C ₇₂ GE ₂₅ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (H) C ₇₂ GE ₂₅ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X. (I) C ₇₂ GE ₅₀ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (J) C ₇₂ GE ₅₀ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (K) C ₇₂ GE ₅₀ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (L) C ₇₂ GE ₅₀ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X.....	67

FIGURA 34 – FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS COM C_{120} . (A) $C_{120}G$ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (B) $C_{120}G$ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (C) $C_{120}G$ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (D) $C_{120}G$ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X. (E) $C_{120}GE_{25}$ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (F) $C_{120}GE_{25}$ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (G) $C_{120}GE_{25}$ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (H) $C_{120}GE_{25}$ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X. (I) $C_{120}GE_{50}$ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 200X. (J) $C_{120}GE_{50}$ NO CORTE SUPERFICIAL COM AUMENTO DE 500X. (K) $C_{120}GE_{50}$ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 200X. (L) $C_{120}GE_{50}$ NO CORTE TRANSVERSAL COM AUMENTO DE 500X.	68
FIGURA 35 – CURVAS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA PARA AS AMOSTRAS (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ E (—) $C_{24}GE_{50}$	70
FIGURA 36 – CURVAS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA PARA AS AMOSTRAS (—) $C_{72}G$, (—) $C_{72}GE_{25}$ E (—) $C_{72}GE_{50}$	71
FIGURA 37 – CURVAS DE ABSORÇÃO DE ÁGUA PARA AS AMOSTRAS (—) $C_{120}G$, (—) $C_{120}GE_{25}$ E (—) $C_{120}GE_{50}$	71
FIGURA 38 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CITOTOXICIDADE DO CONTROLE POSITIVO.	73
FIGURA 39 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CITOTOXICIDADE DO CONTROLE NEGATIVO.	74
FIGURA 40 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CITOTOXICIDADE PARA A AMOSTRA $C_{24}G$	74
FIGURA 41 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CITOTOXICIDADE PARA A AMOSTRA $C_{24}GE_{25}$	74
FIGURA 42 – AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CITOTOXICIDADE PARA A AMOSTRA $C_{24}GE_{50}$	75
FIGURA 43 - PLACA DE 96 POÇOS APÓS 3 HORAS DE INCUBAÇÃO COM MTT. (A) CONTROLE DE CÉLULAS. (B) CONTROLE NEGATIVO. (C) CONTROLE POSITIVO. (D) $C_{24}G$. (E) $C_{24}GE_{25}$. (F) $C_{24}GE_{50}$	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS PROANTOCIANIDINAS DE ACORDO COM O PADRÃO DA UNIDADE MONOMÉRICA FLAVAN-3-OL.	32
TABELA 2 - VALORES DA QUANTIDADE DE ÁGUA CONTIDA NOS HIDROGÉIS SEM RETICULAÇÃO, POR TERMOGRAVIMETRIA.	45
TABELA 3 - VALORES DA QUANTIDADE DE ÁGUA CONTIDA NOS HIDROGÉIS COM C ₂₄ , POR TERMOGRAVIMETRIA.	46
TABELA 4 - VALORES DE PERDA DE MASSA DAS ESPONJAS COM C ₂₄ , POR TERMOGRAVIMETRIA.	48
TABELA 5 - VALORES DA QUANTIDADE DE ÁGUA CONTIDA NOS HIDROGÉIS REIDRATADOS, COM C ₂₄ G, POR TERMOGRAVIMETRIA.	50
TABELA 6 - VALORES DA QUANTIDADE DE ÁGUA CONTIDA NOS HIDROGÉIS REIDRATADOS RETICULADOS, POR TERMOGRAVIMETRIA.	51
TABELA 7 - TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (°C) PARA CADA HIDROGEL.	55
TABELA 8 - RELAÇÃO ENTRE ABSORBÂNCIAS PARA CADA COLÁGENO.	56
TABELA 9 – VALORES DO NÚMERO DE ONDA PARA OS PRINCIPAIS ESTIRAMENTOS OBSERVADOS.....	60
TABELA 10 – VALORES DO TAMANHO MÉDIO DOS POROS DAS ESPONJAS.	65
TABELA 11 - ÍNDICE DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR PARA CADA AMOSTRA.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

C₁₂₀ – Colágeno preparado com 120 horas de hidrólise alcalina.

C₁₂₀G – Hidrogéis de colágeno 120 horas e gelatina.

C₁₂₀GE₂₅ – Hidrogéis de colágeno 120 horas, gelatina e 0,25% de extrato de semente de uva.

C₁₂₀GE₅₀ – Hidrogéis de colágeno 120 horas, gelatina e 0,50% de extrato de semente de uva.

C₂₄ – Colágeno preparado com 24 horas de hidrólise alcalina.

C₂₄G – Hidrogéis de colágeno 24 horas e gelatina.

C₂₄GE₂₅ – Hidrogéis de colágeno 24 horas, gelatina e 0,25% de extrato de semente de uva.

C₂₄GE₅₀ – Hidrogéis de colágeno 24 horas, gelatina e 0,50% de extrato de semente de uva.

C₇₂ – Colágeno preparado com 72 horas de hidrólise alcalina.

C₇₂G – Hidrogéis de colágeno 72 horas e gelatina.

C₇₂GE₂₅ – Hidrogéis de colágeno 72 horas, gelatina e 0,25% de extrato de semente de uva.

C₇₂GE₅₀ – Hidrogéis de colágeno 72 horas, gelatina e 0,50% de extrato de semente de uva.

Colágeno 120 horas - Colágeno preparado com 120 horas de hidrólise alcalina.

Colágeno 24 horas - Colágeno preparado com 24 horas de hidrólise alcalina.

Colágeno 72 horas - Colágeno preparado com 72 horas de hidrólise alcalina.

DSC – Calorimetria exploratória diferencial.

FT-IR– Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

PA – Proantocianidina.

Td – Temperatura de desnaturação.

TG – Termogravimetria.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	3
EPÍGRAFE.....	4
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS	11
SUMÁRIO	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS.....	15
3 CONTRIBUIÇÃO E ORIGINALIDADE DO TRABALHO.....	16
3.1 Contribuições do trabalho	16
3.2 Originalidade do trabalho	16
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
4.1 Biomateriais	17
4.2 Engenharia de tecidos.....	22
4.3 Colágeno	24
4.4 Gelatina.....	28
4.5 Proantocianidina.....	30
5 MATERIAIS E MÉTODOS	34
5.1 Obtenção do gel de colágeno	34
5.2 Gelatina.....	34
5.3 Extrato de semente de uva.....	34

5.4 Preparação dos hidrogéis	35
5.4.1 Sem reticulação	35
5.4.2 Reticulados com extrato de semente de uva	36
5.5 Caracterização dos hidrogéis	36
5.5.1 Análise térmica	36
5.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho	37
5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura	38
5.5.4 Cinética de absorção de água	38
5.5.5 Citotoxicidade	39
5.5.5.1 Cultura celular.....	39
5.5.5.2 Método de difusão em ágar	40
5.5.5.3 Método de difusão do extrato em solução	40
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
6.1 Análise térmica	44
6.1.1 Termogravimetria (TG)	44
6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial	52
6.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR).....	55
6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	63
6.4 Cinética de absorção de água	69
6.5 Citotoxicidade	72
6.5.1 Cultura celular.....	73
6.5.2 Método de difusão em ágar	73
6.5.3 Método de difusão de extrato em solução	75
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de matrizes a base de colágeno vem se mostrando interessante na área dos biomateriais devido à alta biocompatibilidade do colágeno e à capacidade de alterar suas propriedades físico-químicas e estruturais por meio de modificações químicas. Estas matrizes podem ser aplicadas em reconstrução de tecidos moles, revestimento de queimaduras e outras lesões, suporte para crescimento de novas células (SIONKOWSKA, 2000), estudos de liberação de fármacos, entre outros (KIM et al., 2009).

Como o colágeno apresenta a característica da biodegradabilidade, esta, apesar de ser positiva, para aplicações em que se deseja um tempo maior de permanência da função de um biomaterial no organismo torna-se necessário a utilização de agentes de reticulação, os quais são usados para diminuir a taxa de degradação *in vivo* destas matrizes (HAN et al., 2003).

Alguns compostos com biocompatibilidade, não citotoxicidade e capacidade de aumentar a resistência à degradação enzimática após a implantação, têm sido explorados como agentes de reticulação de proteínas, tais como a proantocianidina (HAN et al., 2003). Esta é metabólito natural de plantas, encontrado em várias frutas, legumes, nozes, sementes, flores e cascas (LIU et al., 2008).

No presente estudo propõe-se a preparação e caracterização de matrizes formadas por colágeno aniônico e gelatina, reticuladas com proantocianidina em diferentes concentrações. O colágeno utilizado, derivado de tendão bovino, foi modificado através de um processo de hidrólise alcalina, realizado em três tempos diferentes, tornando-se aniônico com alterações no número de cargas negativas presentes (BATISTA et al., 2009). O agente de reticulação usado foi o extrato de semente de uva, cujo componente majoritário é a proantocianidina.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo a obtenção de hidrogéis neutros de colágeno aniônico e gelatina, reticulados com extrato de semente de uva, com a finalidade de obter matrizes que possam ser aplicadas como biomateriais.

Objetivos secundários:

- Preparação de gel de colágeno aniônico, com três diferentes tempos de hidrólise alcalina, 24, 72 e 120 horas;
- Avaliação da reticulação a partir de duas concentrações de extrato de semente de uva, 0,25 e 0,50% em relação à massa de gel;
- Obtenção de esponjas a partir dos hidrogéis, para avaliar se estão adequadas como forma de armazenamento do biomaterial obtido;
- Caracterização das matrizes obtidas por TG, DSC, FT-IR, MEV e cinética de absorção de água;
- Ensaios de citotoxicidade *in vitro*.

3 CONTRIBUIÇÃO E ORIGINALIDADE DO TRABALHO

3.1 Contribuições do trabalho

Colaborar com o desenvolvimento e estudo das propriedades de hidrogéis à base de biopolímeros (colágeno e gelatina) e de um metabólito natural de plantas contido no extrato de semente de uva (proantocianidina).

Gerar informações sobre as propriedades térmicas, estruturais, de absorção de água e citotóxicas dos biomateriais obtidos.

Mostrar a capacidade reticulante da proantocianidina no colágeno aniônico.

Mostrar como mudanças no tempo de hidrólise do colágeno aniônico e diferenças concentrações de extrato influenciam as propriedades dos hidrogéis e esponjas.

3.2 Originalidade do trabalho

Apesar de hidrogéis preparados com colágeno serem amplamente discutidos na literatura, não foram encontrados estudos que fornecessem informações sobre as propriedades destes quando adicionados gelatina e extrato de semente de uva.

Outro diferencial deste trabalho é o uso de colágeno aniônico na preparação dessas matrizes.

Desta forma, a originalidade deste trabalho se baseia no poder reticulante da proantocianidina sobre o colágeno aniônico e o estudo das propriedades das matrizes geradas, possibilitando o desenvolvimento de novos biomateriais com propriedades adequadas para aplicação biológica.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Biomateriais

Um biomaterial é, por definição, qualquer material usado para substituir uma parte ou uma função do corpo de uma maneira segura, confiável, econômica e fisiologicamente aceitável (PARK e LAKES, 2007). Pode ser de natureza sintética ou natural, utilizado permanente ou temporariamente para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou inteiramente tecidos ou órgãos. Como exemplo tem-se os materiais que induzem o crescimento de tecido ósseo, cartilagens, peles, vasos, válvulas cardíacas e outros tecidos (ORÉFICE et al., 2012). Entre os sintéticos estão os polímeros, cerâmicas, metais ou compósitos e os naturais incluem os biopolímeros tais como o colágeno, a gelatina e os polissacarídeos (GIL et al., 2006).

O uso dos biomateriais tem implicado em uma melhora na qualidade de milhões de vidas e aumenta a cada ano, já que tem a finalidade de melhorar ou substituir de forma completa ou parcial as funções biológicas (PARK e LAKES, 2007). Além disso, como nenhum biomaterial abrange todas as aplicações e novas delas surgem com os avanços da medicina, o campo continua a ser rico na área da pesquisa e desenvolvimento (KUHN, 2012). A figura 1 traz um esquema representativo de algumas aplicações dos biomateriais.

Um biomaterial ideal deve apresentar as características de biocompatibilidade, não ser citotóxico, não ser carcinogênico, não provocar reações alérgicas, ter estabilidade mecânica, peso e densidade adequados, ser reprodutível e de fácil fabricação e desempenhar sua função no organismo, ou seja, serem biofuncionais. Dentre estas características, a biocompatibilidade é a mais importante do ponto de vista biológico. Quando um material estranho entra em contato com o tecido ou com os fluidos biológicos, respostas imunológicas são desencadeadas e manifestam-se primeiramente como processos inflamatórios para a eliminação do implante. Se não for biocompatível haverá rejeição do organismo a este material. Sendo assim, o desempenho adequado de um biomaterial pós-implante está

associado a um equilíbrio entre a biocompatibilidade e a biofuncionalidade (PARK e LAKES, 2007).

Figura 1 – Esquema representativo de algumas aplicações dos biomateriais.

Fonte: Adaptado de CINESIOLOGIA, 2010.

Durante o desenvolvimento das pesquisas surgiram alterações no entendimento da interação de biomateriais com o sistema biológico. As expectativas

para a função do biomaterial avançaram: se anteriormente resumiam-se apenas a um papel inerte no corpo, atualmente são desenvolvidos também para serem bioativos. Materiais bioativos têm a capacidade de iniciar uma resposta biológica após a implantação, tais como a adesão, proliferação e diferenciação celular, possibilitando a regeneração de um tecido danificado ou órgão inteiro (KUHN, 2012). Desta forma, para o desenvolvimento dos biomateriais é necessário o conhecimento detalhado de suas propriedades físico-químicas, estruturais e das interações da interface do biomaterial com o tecido (BET, 2000).

Sendo assim, devido à complexidade das células e dos tecidos, surgiu uma abordagem para a obtenção, seleção, síntese ou fabricação dos biomateriais, chamada de biomimética. A biomimética envolve aspectos imitando os materiais naturais e tecidos. Estes estudos nem sempre levam ao resultado desejado já que muitas das funcionalidades dos tecidos naturais ainda são desconhecidas. Além disso, as propriedades desejáveis de um biomaterial podem variar muito dependendo da aplicação biomédica (PARK e LAKES, 2007).

Polímeros naturais, como proteínas e polissacarídeos, tem sido bastante empregados como biomateriais. Este fato deve-se a estes compostos apresentarem na sua estrutura grupos funcionais, como hidroxilas primárias e secundárias, aminas e ácidos carboxílicos, possibilitando que a molécula natural seja modificada, alterando suas características químicas e físicas, e conseqüentemente, melhorando sua aplicabilidade específica. Além disso, apresentam uma grande variedade, biocompatibilidade, menor incidência de toxicidade e inflamação quando comparados com materiais sintéticos. Suas aplicações destacam-se no desenvolvimento de agentes de contraste para aplicação em imagem médica, sistemas de liberação controlada de fármacos, hidrogéis e bioadesivos (KUHN, 2012).

O uso dos hidrogéis na pesquisa tem se mantido ativo há muitos anos. Iniciou-se em 1960, destacou-se nos anos 80 com os trabalhos bem sucedidos da ação de microcápsulas de alginato de cálcio na proliferação celular (LIM et al., 1980) e uso de polímeros naturais tais como o colágeno e cartilagem de tubarão em emplastos para queimaduras (YANNAS et al., 1989), mas têm continuado a ser de interesse para o crescimento celular, e mais recentemente, para a aplicação na

engenharia de tecidos, como matrizes que agem na reparação e regeneração de uma ampla variedade de tecidos e órgãos (HOFFMAN, 2002).

Hidrogéis são estruturas poliméricas tridimensionais (figura 2), hidrofílicas, capazes de absorver grandes quantidades de água ou fluidos biológicos. Estas matrizes são insolúveis em água devido à presença de pontos de reticulação químicos ou físicos (GIL et al., 2006). Podem apresentar um comportamento de intumescimento devido à absorção de água ou fluidos biológicos através de sua superfície porosa, retendo-os dentro de sua estrutura, dependente do meio externo, sendo afetado por fatores como força iônica, pH, radiação, temperatura, força eletromagnética e proporção de ligações cruzadas. Quanto maior a proporção de reticulação, mais fechada é a estrutura do hidrogel, que inchará menos em comparação com os de menor índice de ligações cruzadas (PEPPAS et al., 2000). Essas redes poliméricas podem absorver de dez até centenas de vezes o seu peso quando seco e podem ser de origem sintética ou natural (RATNER et al., 2013).

Figura 2 – Representação da estrutura tridimensional de um hidrogel.

Fonte: GIL et al., 2006, p. 73.

O caráter hidrofílico dos hidrogéis é devido à presença de grupos funcionais em sua estrutura que possuem grande afinidade em água, como por exemplo, os grupamentos OH^- e COOH^- (SPERLING, 2006). Suas ligações cruzadas podem ser do tipo covalente, eletrostática, dipolo-dipolo ou Van der Waals.

Os hidrogéis podem ser estáveis ou concebidos para se degradar, desintegrando-se no meio. Esta característica é dependente do tipo de ligação cruzada presente na estrutura do hidrogel. Os permanentes possuem ligações cruzadas do tipo covalente, ou seja, ligações químicas mais estáveis. Os hidrogéis que se interconectam por interações eletrostáticas, de hidrogênio, Van der Waals ou por emaranhamento de cadeias se formam por ligações mais fracas e por isso serão de fácil degradabilidade. A formação das ligações cruzadas podem dar-se através de radiação do tipo raios gama, raios-x ou ultravioleta, ou por reações químicas. Neste último caso é necessário o uso de pelo menos um elemento que se liga aos grupos funcionais da cadeia dos hidrogéis, formando uma estrutura de rede. Outra forma de se obter estas ligações é por meio da reação de copolimerização, feita entre um ou mais monômeros (RATNER et al., 2013).

Geralmente, os hidrogéis não apresentam estrutura homogênea devido à diferença da densidade de ligações cruzadas por toda a sua estrutura. Em alguns pontos pode haver uma aglomeração maior de ligações cruzadas que em outro, alterando algumas propriedades como a sua capacidade de absorção de água ou fluidos (SILVA, 2007). Além disso, podem ser classificados como aniônicos, catiônicos, anfônicos ou neutros dependendo da natureza dos grupos laterais (PEPPAS et al., 2000).

Hidrogéis assemelham ao tecido natural mais do que qualquer outra classe de biomateriais sintéticos. Isto é devido aos seus elevados teores de água, contribuindo para a biocompatibilidade e serem de consistência macia, indicando a semelhança com o tecido natural (PEPPAS et al., 2000). Podem conter poros para que células vivas possam penetrar e proliferar. Alguns têm a vantagem de incorporar na membrana celular, estimulando a adesão, disseminação e crescimento de células no interior da matriz do hidrogel, porém apresenta baixa resistência mecânica, dificultando o manuseio e problemas de esterilização (HOFFMAN, 2002). São usados na engenharia de tecidos, como lentes de contato, membranas de biossensores, revestimento para corações artificiais, materiais para a pele artificial e dispositivos de liberação de fármacos (PEPPAS et al., 2000).

4.2 Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos integra a biologia com a engenharia com o intuito de promover a regeneração por meio de um novo órgão ou tecido viável. Esta ciência requer a compreensão de diversas áreas biológicas, incluindo a celular e a biologia molecular, a fisiologia e integração de sistemas, a proliferação e diferenciação celular, a endocrinologia e os conhecimentos sobre compostos químicos e matrizes extracelulares, além de muitos campos da engenharia, como a bioquímica e mecânica, a ciências de polímeros, os biorreatores e os biomateriais (MCCLELLAND et al., 2012).

Nos estudos em que se utilizam células, a engenharia de tecidos requer um tecido doador de células as quais podem ser adultas ou embrionárias. Se forem adultas, estas podem ser células diferenciadas ou células-tronco. Estas células podem ser diretamente implantadas ou cultivadas em um substrato que age como suporte, guiando sua proliferação de forma organizada na cultura do tecido fora do organismo, para posteriormente ser implantado. Sendo assim, a engenharia de tecidos promove estudos da interação de tecidos com os substratos, ou seja, com os biomateriais (PARK e LAKES, 2007). A figura 3 mostra esta interação.

Uma das classes de biomateriais para área de engenharia de tecido é a criação de matrizes extracelulares sintéticas (MECs) que atuam como sítios de ancoragem e servem como suporte tridimensional para crescimento de um novo tecido. As MECs apresentam um papel importante na engenharia de tecidos já que facilitam a localização e a liberação de células para sítios específicos do organismo, definem e mantêm um espaço tridimensional para a formação de novos tecidos com estrutura apropriada e guiam o desenvolvimento de novos tecidos (BET, 2000 e KUHN, 2012).

Quanto à sua natureza química podem sintéticas ou derivadas de materiais naturais desde que possuam as características de biocompatibilidade, capacidade de sustentar o crescimento celular, propriedade mecânicas adequadas com o tecido a ser reconstruído, velocidade de degradação compatível com o crescimento do tecido e indução de respostas celulares rápidas e específicas (BET, 2000 e KUHN, 2012).

Apesar da grande variedade de polímeros utilizados na área de biomateriais, poucos têm função e aplicabilidade na engenharia de tecido por não possuírem as características citadas (BET, 2000). Dentre os mais empregados, tem-se os de origem sintética como os poliésteres do tipo ácido poliglicólico (MARQUES et al., 2013) e entre os de origem natural tem-se o colágeno (AHN et al., 2013), a gelatina (LIU e WANG, 2013) e a quitosana (AZEVEDO et al., 2013).

Figura 3 -Interação entre a engenharia de tecidos e os biomateriais.

Fonte: Adaptado de PARK e LAKES, 2007, p. 487.

4.3 Colágeno

O colágeno é amplamente utilizado como biomaterial nas formas de hidrogéis, membranas, esponja, pó, como agente hemostático, materiais para o revestimento de queimaduras e outras lesões, ou ainda como suporte para crescimento de terminais nervosos periféricos danificados (SADER, et al., 2013). Não apresenta citotoxicidade e antigenicidade, além de ser biodegradável, biorreabsorbível e biocompatível (NAIR et al., 2010). Pode ser utilizado na sua forma nativa ou reconstituída, associado principalmente à reações de reticulação, com a finalidade de alterar sua biodegradabilidade e propriedades mecânicas. Em alguns casos são quimicamente modificados resultando matrizes colagênicas carregadas, aplicadas como suporte para crescimento celular, géis de colágeno viscoelástico para reposição do humor vítreo, géis de colágeno para liberação de fármacos e para o estudo da fibrilogênese do colágeno (GOES et al., 2007). A matriz de colágeno oferece uma estrutura de suporte que atua como guia e estimula a formação dos tecidos (WATANABE et al., 2013).

O colágeno é a proteína do tecido conjuntivo mais abundante dos animais, representando cerca de 30% da proteína total do corpo dos vertebrados. Está presente em vários tecidos, como pele, tendão, cartilagem, ossos e córnea (YANG et al., 2013). 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. Além disso, forma fibras insolúveis com alta força elástica, ocasionando a função de orientar tecidos em desenvolvimento (CEN et al., 2008). Um aspecto muito prático da utilização de colágeno é a sua facilidade de preparação e a sua ocorrência disseminada na natureza.

Atualmente, existem 29 tipos de colágeno conhecidos sendo os mais comuns do tipo I, II, III e IV (PARENTEAU-BAREIL et al., 2010). O colágeno do tipo I, o mais abundante, tem como unidade básica o tropocolágeno que é uma molécula linear, semiflexível e com cerca de 300 nm de comprimento e 1,5 nm de diâmetro. Este é formado por duas cadeias idênticas ($\alpha 1$), com cerca de 1.055 resíduos de aminoácidos e uma cadeia diferente ($\alpha 2$), com cerca de 1.029 resíduos. A estrutura primária destas unidades é constituída pela repetição do triplete Glicina (Gly),

representando 33%, Prolina (Pro), com 12% e Hidroxiprolina (Hypro), com 11%. Estas cadeias formam uma hélice tripla (figura 4) estabilizada por ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas (SIONKOWSKA, 2006).

Figura 4 - Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.

Fonte: SIONKOWSKA, 2006.

A cadeia lateral de cada resíduo de glicina, composta por um átomo de hidrogênio, é direcionada para o centro da espiral da hélice. Devido ao tamanho reduzido do átomo de hidrogênio em comparação a outros aminoácidos, a glicina é o único aminoácido cuja cadeia é levemente torcida em relação à outra, permitindo uma ponte de hidrogênio entre a amida polipeptídica do hidrogênio de um resíduo de glicina com o oxigênio carbonila do resíduo X adjacente, em outra cadeia. A presença de prolina e de hidroxiprolina em intervalos frequentes ao longo da sequência causa limitações nos ângulos, impedindo que a cadeia tenha a forma clássica de α -hélice (PRESTES, 2013).

Nos tecidos biológicos o colágeno organiza-se em estruturas fibrilares que são estabilizadas por ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. A formação destas fibras insolúveis inicia-se através das interações entre cinco moléculas de tropocolágeno, originando as microfibrilas, que são a menor unidade estrutural do tecido conjuntivo. Estas agregam-se, por um processo de fibrilogênese, formando as fibrilas insolúveis, as quais são mantidas também por ligações cruzadas intramoleculares, entre a mesma unidade de tropocolágeno, e intermoleculares, entre as unidades de tropocolágeno, (NIMNI, 1988). Esta organização pode ser visualizada na figura 5.

Figura 5 - Formação da fibrila de colágeno.

Fonte: HORN, 2008.

Para o colágeno do tipo I, a formação das fibras ocorre em pH 7,0, o que infere que a resultante das cargas na molécula seja zero, correspondente ao colágeno nativo. Esta resultante pode ser alterada, por meio de processos químicos (BATISTA et al., 2009), físico-químicos (ZHANG et al., 2005) ou enzimáticos, gerando uma matriz colagênica carregada positiva ou negativamente, dependendo da aplicação que se deseja.

Matrizes catiônicas, obtidas por reação de esterificação, são mais apropriadas como suporte para o crescimento celular, enquanto as aniônicas são empregadas no crescimento de tecidos e sistemas de liberação de fármacos. Esta pode ser obtida por meio da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos Asparagina (Asn) e Glutamina (Gln) presentes na cadeia α do tropocolágeno (BATISTA et al., 2009), representada na figura 6.

A reação de hidrólise seletiva promove de acordo com o tempo de reação um aumento total de até 125 cargas por unidade de tropocolágeno (GOES et al., 2007), gerando alterações no padrão da organização da estrutura microfibrilar da matriz colagênica, que estão relacionadas com o rompimento das ligações cruzadas do tecido e também com o novo padrão de interações eletrostáticas, que ocorre em função do aumento de cargas negativas da matriz (BET et al., 2000).

Figura 6 - Hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas dos resíduos de Asn e Gln.

Fonte: BATISTA, 2008.

O colágeno pode ser solubilizado em meio aquoso ácido se ligando à uma grande quantidade de água. Dessa forma, hidrogéis podem ser produzidos de forma estável, por introdução de ligações cruzadas aleatórias entre moléculas de colágeno, em solução ácida, com raios gama ou irradiação ultravioleta (SIONKOWSKA, 2000). Este colágeno solúvel em ácido é o material usado na maioria dos estudos relativos à estrutura de colágeno.

O colágeno isolado a partir de pele ou tendão, geralmente tem baixa estabilidade térmica e resistência mecânica, devido à destruição das ligações cruzadas naturais que ocorrem em sua estrutura, pela ação de sais, ácidos, bases, ou proteases durante o processo de extração. Assim, surge a necessidade de serem modificados para usos práticos por vários métodos, tais como a irradiação da luz ultravioleta (UV), íons metálicos multivalentes e síntese das ligações cruzadas baseadas em aldeídos. No entanto, o tratamento por UV só modifica a superfície em vez de o colágeno como um todo, e a natureza citotóxica de compostos de aldeído exigem um maior controle em sua utilização nos alimentos e biomateriais (HE et al., 2011). Dessa forma, alguns compostos com biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e capacidade de aumentar a resistência à degradação enzimática após a implantação, têm sido explorados como agentes de reticulação de proteínas, tais como a proantocianidina (HAN et al., 2003).

4.4 Gelatina

A gelatina é um produto heterogêneo que tem uma mistura de peptídeos derivados do colágeno. Trata-se de um biopolímero biocompatível, biodegradável e solúvel em pH próximo a 7,0 em temperatura ambiente, o que a torna ideal para aplicações farmacêuticas. Possuem excelentes propriedades como a plasticidade, a adesividade, capacidade de adesão celular e promoção de crescimento (HUANG et al., 2012). É obtida a partir do colágeno, o qual quando submetido a processamento térmico em atmosfera úmida, hidrolisa parcialmente, transformando-se em gelatina. Neste processo as fibras de colágeno, altamente organizadas, quase cristalinas, são transformadas em uma substância solúvel em água, constituídas moléculas menores bastante independentes e com grau de organização interna muito menor (GÓMEZ-

GUILLÉN et al., 2011). A reação pode ser realizada em meio ácido, originando gelatina do tipo A, ou em meio básico, originando gelatina do tipo B (ROKHADE et al., 2006).

Essa desnaturação do colágeno com o controle da temperatura rompe as ligações de hidrogênio de sua estrutura e as hélices triplas são separadas umas das outras (figura 7), assumindo uma configuração espiral aleatória (VLIERBERGHE et al., 2011).

Figura 7 - Obtenção da gelatina a partir de colágeno.

Fonte: Adaptado de NITTA GELATIN INC., 2010.

A gelatina é amplamente utilizada na indústria de alimentos, cosmética, farmacêutica e de biomateriais, sendo produzida em grande escala e a preços relativamente baixos, o que justifica o interesse em seu uso. Além disso, possui propriedades multifuncionais, como a habilidade de formar géis estáveis e reversíveis (ROMAN et al., 2009). Todos os tipos de gelatina possuem composição

similar, contendo água, pequena quantidade de sais minerais e proteína de tecido conectivo pura, contendo um elevado teor de glicina, prolina e hidroxiprolina (HUANG et al., 2012). Porém, dependendo da matéria prima utilizada, do processo de pré-tratamento empregado e da intensidade da hidrólise, vários tipos de gelatina com propriedades diferentes podem ser obtidas (SCHOTT, 2001).

Estudos mostraram que hidrogéis que contêm gelatina podem ser promissores para o tratamento de feridas e para gerar matrizes de aplicações na engenharia de tecido, já que toleraram a fixação e crescimento de uma grande variedade de células humanas, incluindo fibroblastos, células endoteliais, células gliais, osteoblastos e células epiteliais (VLIERBERGHE et al., 2011). Microesferas de gelatina podem ser usadas para liberação de fármacos via nasal, bucal, vaginal e oftalmológica, já que possuem propriedade de mucoadesividade (UGWOKE et al., 1998).

Para a maior parte das aplicações em sistemas biológicos, devido às propriedades hidrofílicas da gelatina e sua dissolução na temperatura do corpo humano, a utilização de agentes de reticulação se torna uma estratégia para controlar as propriedades desses sistemas, como prevenir toxicidade e gerar materiais estáveis para suas aplicações biomédicas. A reticulação da gelatina pode ser de natureza química, formada por ligações covalentes irreversíveis, ou física, formada por várias ligações reversíveis (BERGER et al., 2004). Por exemplo, pode-se usar uma radiação ionizante para reticular as cadeias poliméricas e preparar muito facilmente um hidrogel (CATALDO et al., 2008) e também a proantocianidina, que promove a interação entre os grupos hidroxila com o grupos carboxila de gelatina (HUANG et al., 2012).

4.5 Proantocianidina

Proantocianidinas (PAs) são metabólitos naturais de plantas, encontrados em várias frutas, legumes, nozes, sementes, flores e cascas. São adotadas como antioxidantes naturais, seqüestradoras de radicais livres protetoras cardiovasculares e estimulam a proliferação de fibroblastos em uma matriz extracelular (HUANG et al., 2012).

PAs pertencem a uma categoria conhecida como taninos condensados, uma das duas principais categorias de taninos vegetais, as quais compreendem grupos hidroxilados que podem formar complexos insolúveis com carboidratos e proteínas. São produtos polifenólicos naturais compostas de unidades monoméricas de flavan-3-ol (figura 8). A estrutura das proantocianidinas é variada dependendo núcleo flavan-3-ol, do grau de polimerização, do tipo de radical substituído e da posição em que essa substituição acontece. A hidroxilação ou substituição da molécula de flavan-3-ol difere as proantocianidinas classificando-as em uma ampla classe, por exemplo: procianidinas, prodelfinidinas, propelargonidinas, profisentinidinas e prorobinetidinas (tabela 1). Proantocianidinas variam em tamanho desde dímeros através de polímeros muito grandes (BREECHER, 2004).

Recentemente, têm recebido atenção considerável nas áreas de saúde, nutrição e medicina devido às suas atividades fisiológicas, tais como a capacidade antioxidante, antimicrobianas, bactericida, propriedades antiinflamatórias, antitumoral, atividade antialérgica e atividade inibitória contra algumas enzimas (KU et al., 2007). PAs podem ser utilizadas na proliferação de fibroblastos e aumento da síntese de matriz extracelular e estabilizar biomateriais sem citotoxicidade (HUANG et al., 2012).

Figura 8 - Estrutura da proantocianidina. (A) Flavan-3-ol. (B) Forma de dímero.

Fonte: adaptado de BREECHER, 2004, p. 3.

Tabela 1 - Classificação das proantocianidinas de acordo com o padrão da unidade monomérica flavan-3-ol.

Classe de Proantocianidina	Unidade monomérica constitutiva	Padrão de substituição					
		3	5	7	3'	4'	5'
Procianidina	Catequina, Epicatequina.	OH	OH	OH	OH	OH	H
Prodelfinidina	Galocatequina, Epigalocatequina.	OH	OH	OH	OH	OH	OH
Propelargonidina	Afizelequina	OH	OH	OH	H	OH	H
Profisentidina	Fisetinidol	OH	H	OH	OH	OH	H
Prorobinetidina	Robinetinidol	OH	H	OH	OH	OH	OH

Fonte: SUN e SPRANGER, 2005, p. 63.

Outra propriedade bastante importante da proantocianidina é sua capacidade de atuar como agente de reticulante do colágeno. As PAs aumentam a síntese de colágeno e aceleraram sua conversão de solúvel para insolúvel durante seu desenvolvimento. Atuam formando ligações de hidrogênio, covalentes, iônicas e hidrofóbicas que estabilizam o complexo proteína-PA, consequentemente gerando matrizes de colágeno com reduzida taxa de degradação *in vivo* (HAN et al., 2003). As ligações de hidrogênio ocorrem entre as hidroxilas das proantocianidinas, com os grupamentos amida do aminoácido prolina (figura 9), presente na constituição da hélice tripla do colágeno, formando uma estrutura estável (HE et al., 2011). Além disso, PAs modulam as características mecânico-químicas da gelatina para evitar a toxicidade e gerar materiais estáveis para aplicações biomédicas (LIU et al., 2008).

O extrato de semente de uva é conhecido como uma importante fonte de PA. Trata-se de um constituinte natural da planta e contém lipídios, proteínas, hidratos de carbono e os polifenóis, sendo a PA o composto mais abundante. Tem a capacidade de eliminação de radicais livres superior a outros antioxidantes como vitamina C, a vitamina E e o ácido gálico (CHO et al., 2009).

O uso de proantocianidinas apresenta vantagens quando comparado com outros agentes reticulantes como, o glutaraldeído. Apesar de produzirem um aumento próximo na temperatura de desnaturação do colágeno, os resultados de citotoxicidade, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno apontam que o uso

da proantocianidina promoveu melhoria expressiva em todos estes, mostrando interessante para a obtenção de biomateriais composto por colágeno (HAN et al., 2003) .

Figura 9 -Interações entre o colágeno e a proantocianidinas.

Fonte: CARVALHO, 2007, p. 35.

Como o uso do colágeno em aplicações biomédicas está cada vez maior, a compreensão do papel da proantocianidina na modificação de sua estrutura e de suas propriedades é útil para o desenvolvimento de novos agentes de reticulação biológicos e fabricação de novos biomateriais funcionalizados (HE et al., 2011).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Obtenção do gel de colágeno (BATISTA et al., 2009)

O colágeno foi extraído de tendão bovino. Para tanto, este foi lavado com solução de NaCl 0,9%, para remoção de sangue e contaminantes, desfiado e tratado com uma solução alcalina contendo hidróxidos de K^+ e Na^+ e sais (cloretos e sulfatos) de Na^+ , K^+ , Ca^{++} , por tempos determinados de hidrólise (24, 72 e 120 horas). Posteriormente, esta solução alcalina foi removida e uma solução aquosa dos mesmos cloretos e sulfatos de Na^+ , K^+ , Ca^{++} foi adicionada. Os sais foram removidos por lavagens com H_3BO_3 3%, água desionizada e EDTA 0,3%. O colágeno foi extraído utilizando uma solução de ácido acético pH 3,5, homogeneizando e retirando todo o ar do gel formado. A concentração obtida foi determinada por liofilização e a partir desta foi utilizada, para a preparação dos hidrogéis, a concentração de 0,9% em ácido acético pH 3,5. Os colágenos obtidos foram nomeados como: C_x , onde x é igual ao tempo (em horas) de hidrólise alcalina, ou seja, C_{24} , C_{72} ou C_{120} .

5.2 Gelatina

A gelatina comercial (SIGMA®) foi utilizada sem purificação prévia. Na preparação dos hidrogéis foi usada uma solução de gelatina 0,9% preparada por geleificação em água desionizada a 60°C, por 30 minutos. O pH foi ajustado para 3,5 com ácido acético glacial e a solução armazenada em geladeira.

5.3 Extrato de semente de uva

Como agente reticulante foi utilizado o extrato de semente de uva comercial Procianin® (Empresa Galena – Química e Farmacêutica Ltda.), (figura10). Para purificação o pó foi diluído em ácido acético 0,5%, filtrado e liofilizado (LOCILENTO, 2012).

Figura 10 – Extrato de semente de uva.

Fonte: NUTRITIONAL OUTLOOK UBM CANON, 2012.

5.4 Preparação dos hidrogéis

5.4.1 Sem reticulação

Os hidrogéis foram preparados, primeiramente, misturando as soluções de colágeno e gelatina na proporção 1:1, porém como se apresentaram frágeis, com dificuldade de manuseio, foram testadas outras proporções até chegar à 2:1, a qual foi utilizada neste trabalho. Para tanto, a mistura foi submetida à agitação magnética constante em temperatura ambiente. Retirou-se o ar e o gel foi pesado em formas de Teflon[®] com diâmetro de 2,0 cm e profundidade de 3,0 mm, com massas aproximadamente iguais a 1,00 g, sendo congelado para posteriormente neutralizá-lo.

Os hidrogéis foram retirados das formas ainda congelados e mergulhados em solução de Na_2HCO_3 1 mol L⁻¹ gelada por 12 horas, trocando-a e permanecendo nesta por mais 12 horas, para neutralização. Para retirar o sal formado os hidrogéis foram lavados com água desionizada, ao menos cinco vezes ao dia, por uma semana, permanecendo sempre em geladeira. Posteriormente, para prosseguir com as análises, os hidrogéis foram separados em duas formas: parte permaneceu em geladeira e parte foi liofilizado, formando esponjas. Parte das esponjas foi reidratada, mergulhado-a em 25 mL de água desionizada, por 20 minutos.

Esta combinação deu origem às amostras C_xG , onde x é igual ao tempo de hidrólise alcalina em que o tendão bovino foi submetido, ou seja, $C_{24}G$, $C_{72}G$ ou $C_{120}G$.

5.4.2 Reticulados com extrato de semente de uva

Os hidrogéis foram preparados misturando as soluções de colágeno e gelatina na proporção 2:1, sob agitação magnética constante à temperatura ambiente. O extrato de semente de uva foi solubilizado em uma pequena quantidade de ácido acético glacial e etanol e adicionado à mistura, gota a gota, vagarosamente, sob agitação mecânica, nas proporções 0,25 e 0,50% em relação à massa de gel. Retirou-se o ar e seguiu-se o mesmo procedimento anterior, no qual o gel foi pesado em formas de Teflon[®], congelado, neutralizado, lavado e destinado às análises nas três formas, hidrogel, esponja e reidratado.

Esta combinação, com presença da proantocianidina, deu origem às amostras C_xGE_y , onde x é igual ao tempo de hidrólise alcalina em que o tendão bovino foi submetido e y é a proporção de extrato de semente de uva adicionado em relação à massa, ou seja, $C_{24}GE_{25}$, $C_{24}GE_{50}$, $C_{72}GE_{25}$, $C_{72}GE_{50}$, $C_{120}GE_{25}$ e $C_{120}GE_{50}$.

5.5 Caracterização dos hidrogéis

A caracterização dos hidrogéis foi feita usando-se as técnicas de análise térmica (termogravimetria (TG) e calorimetria exploratória diferencial (DSC)), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR), cinética de absorção de água e ensaios *in vitro* de citotoxicidade (método de difusão em ágar e método de difusão de extrato em solução).

5.5.1 Análise térmica

Para as medidas termogravimétricas, nas quais a massa da amostra é monitorada com o aumento constante da temperatura (de 25 a 800°C), foi utilizada

uma massa aproximada de 20 mg dos hidrogéis, das esponjas e dos materiais reidratados. A razão de aquecimento utilizada foi de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ em atmosfera de ar sintético com fluxo de gás de 80 mL min^{-1} . Para as análises referentes ao biomateriais compostos de colágeno com 24 horas de hidrólise alcalina, foi utilizado o equipamento da TA – Instruments, modelo TGA 2050. Para as demais amostras, as análises foram feitas no Laboratório de Análise Térmica, Eletroanalítica e Química de Soluções, do IQSC/USP, pela técnica Dra. Ana Paula Garcia Ferreira, utilizando o equipamento da TA – Instruments, modelo SDT 600.

Para as medidas por DSC, nas quais, devido ao fluxo de calor, avaliam-se as modificações na temperatura de desnaturação do colágeno a partir do ponto médio da inflexão da curva (figura 11), esponjas com aproximadamente 20 mg foram colocadas em suporte hermético de alumínio. A medida foi iniciada em 25°C , com razão de $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$, até 120°C . Foi utilizado ar sintético como gás de arraste, com fluxo de 80 mLmin^{-1} . Utilizou-se o equipamento da TA – Instruments, modelo DSC 2010.

Figura 11–Curva DSC demonstrando a determinação da temperatura de desnaturação.

Fonte: Adaptação a partir de LOCILENTO, D. A., 2012, p. 53.

5.5.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

Para a caracterização dos materiais por espectroscopia no infravermelho o material foi gotejado em placas de silício. Estas foram colocadas em dessecador,

com hidróxido de sódio, por 48 horas, para completa secagem formando uma película.

Os espectros foram obtidos em um intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 *scans*. Utilizou-se o equipamento Bomem de modelo MB-102.

5.5.3 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias foram obtidas a partir de dois cortes das esponjas, superficial e lateral. As amostras foram cortadas com estilete, colocadas em *stubs* por fita condutora de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s, possibilitando a análise de suas estruturas. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20kV. Para medir o tamanho dos poros das esponjas foi utilizado o *software* UTHSCSA Image Tool versão 3.0. Foram feitas 25 determinações para cada esponja com a imagem ampliada 200 vezes.

5.5.4 Cinética de absorção de água

Para avaliar a absorção de água dos hidrogéis liofilizados, foram feitas pesagens em um período de tempo até estabilização e curvas foram plotadas possibilitando comparações do comportamento entre os biomateriais estudados. Para este procedimento, o qual foi realizado em triplicata para cada hidrogel, os materiais liofilizados foram previamente pesados e em seguida mergulhados em béquer com 25 mL de água desionizada. Em tempos que variam de 0 a 90 minutos, os hidrogéis em processo de intumescimento foram pesados, retirando-se o excesso de água com auxílio de papel de filtro de tamanho padronizado, 5,0 x 3,0 cm, à temperatura ambiente. A absorção de água foi calculada pela equação 1.

$$\text{Absorção de água} = \frac{(\text{massa do hidrogel reidratado}) - (\text{massa do hidrogel liofilizado})}{(\text{massa do hidrogel liofilizado})} \times 100 \quad (1)$$

5.5.5 Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Cultura Celular e Fotossensibilizadores – IQSC/USP, pela técnica responsável, Dra. Cláudia Bernal, sob orientação da Profa. Dra. Janice Rodrigues Perussi.

Para estes testes os biomateriais liofilizados foram cortados com cerca de 0,25 cm² de área superficial e esterilizados com óxido de etileno pela Acecil Central de Esterilização Comércio e Indústria Ltda, Campinas - SP.

5.5.5.1 Cultura celular

Foi utilizada a linhagem VERO (ATCC CCL-81) constituída de células epiteliais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cultivada no meio ISCOVE'S suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e com os antibióticos penicilina e estreptomicina, mantida em garrafa armazenadora na estufa a 37 °C, 95% de ar e 5% de CO₂ (FRESHNEY, 2010).

Para a determinação da viabilidade e concentração celular foi utilizado o método da contagem em câmara de Neubauer e o teste da exclusão do corante (CARVALHO, 2001). Para tanto, o meio de cultura foi substituído pela solução Tripsina-EDTA 0,02%, que remove as células da garrafa armazenadora. Após 5 minutos, transferiu-se o conteúdo para um tubo cônico e centrifugou-se a 1000 rpm por 1 minuto. Descartou-se o sobrenadante e as células foram resuspendidas no meio de cultura. Coletou-se uma alíquota de 100 µL desta suspensão e adicionou-se 600 µL de PBS e 300 µL de corante vermelho neutro, agitou-se e colocou-se na placa de Neubauer. As células vivas e mortas foram contadas com auxílio de um microscópio óptico.

5.5.5.2 Método de difusão em ágar (ROGERO et al., 2003)

Neste método as células foram semeadas em cinco placas de Petri (15 x 90 mm), no volume de 5 mL em cada e incubadas durante 48 horas na estufa de cultura a 37°C e atmosfera úmida com 5% de CO₂. Após este período, com as células já aderidas em monocamada na placa, adicionou-se 5 mL de meio de cultura com ágar a 1,8% e 0,01% do corante vermelho neutro. Antes da solidificação completa, foram adicionados três fragmentos da mesma amostra com aproximadamente 0,25 cm² de área em cada placa, usando látex como controle positivo e papel de filtro como controle negativo, totalizando cinco placas (figura 12). Estas foram novamente levadas para a estufa, ficando incubadas nas mesmas condições por 24 horas e, em seguida, analisadas macroscopicamente quanto à presença do halo.

Figura 12 -Placas de petri com células, meio de cultura com corante amostras. (A) C₂₄GE₅₀. (B) C₂₄GE₂₅. (C) C₂₄G. (D) Controle negativo. (E) Controle positivo.

5.5.5.3 Método de difusão do extrato em solução (ROGERO et al., 2003)

As três amostras selecionadas foram analisadas juntamente com o controle positivo (látex), controle negativo (papel de filtro) e o controle de células. Para tal a preparação dos extratos, nove fragmentos de cada amostra, com exceção do controle de células, foram mergulhados em 2 mL de meio ISCOVE'S, em um tubo com tampa (figura 13) e deixados em temperatura ambiente por 144 horas.

As células foram aderidas em placa de 96 poços. Para tanto, adicionou-se 9,5 mL de meio ISCOVE'S em 552 μ L de suspensão de células e colocou-se 200 μ L desta mistura de modo que ficassem 7 poços para cada amostra, inclusive para o controle de células, totalizando 42 poços. Incubou-se por 24 horas em estufa, a 37°C e 5% de CO₂. Após este tempo, removeu-se o meio por aspiração e adicionou-se 200 μ L dos extratos em cada poço respectivo. Para o controle de células foi adicionado meio ISCOVE'S. Incubou-se nas mesmas condições por mais 24 horas.

Figura 13 - Obtenção dos extratos a partir das amostras. (A) Controle Positivo. (B) Controle Negativo. (C) C₂₄G. (D) C₂₄GE₂₅. (E) C₂₄GE₅₀.

Posteriormente, as células foram tratadas com o reagente 3-(4,5-dimetil)tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazolio (MTT), o qual reage com a mitocôndria de células vivas, reduzindo-se. A quantificação da redução de MTT constitui um método colorimétrico simples para avaliar a viabilidade celular. Após redução, o MTT forma cristais de formazan, de cor roxa, que ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo desta forma ser quantificados por espectrofotometria (Mosman, 1983).

Após 3 horas de incubação, o MTT foi retirado por aspiração e adicionou-se 50 μ L de etanol puro, para diluição de cristais formados. Após diluição completa, adicionou-se 150 μ L de álcool isopropílico com PBS na proporção 1:1, leu-se a placa em leitor Turnable Microplate Reader (VERSA MAX) em 570 nm, sendo sete medidas para cada amostra, e calculou-se o índice de sobrevivência pela equação 2.

$$\text{Índice de sobrevivência (\%)} = \frac{(\text{média das absorbâncias da amostra}) \times 100}{(\text{média das absorbâncias do controle de células})} \quad (2)$$

O procedimento experimental pode ser resumido no fluxograma da figura 14.

Figura 14 – Fluxograma do procedimento experimental.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens digitais dos nove hidrogéis obtidos neste trabalho encontram-se na figura 15. O extrato de semente de uva produz um escurecimento intenso nos biomateriais.

Figura 15 - Fotos digitais dos hidrogéis. (A) $C_{24}G$. (B) $C_{24}GE_{25}$. (C) $C_{24}GE_{50}$. (D) $C_{72}G$. (E) $C_{72}GE_{25}$. (F) $C_{72}GE_{50}$. (G) $C_{120}G$. (H) $C_{120}GE_{25}$. (I) $C_{120}GE_{50}$.

Diferenças macroscópicas significativas foram notadas conforme se alterou o tempo de hidrólise alcalina ao qual o colágeno foi submetido. Os hidrogéis preparados com colágeno 24 horas apresentaram um aspecto mais consistente, ficando mais espessos, com as bordas e superfícies regulares, sem fendas e rugosidade. O $C_{24}G$ apresentou-se mais esbranquiçado que o $C_{72}G$ e $C_{120}G$.

Os hidrogéis preparados com colágeno 72 horas tiveram semelhança com os descritos anteriormente, porém apresentaram-se menos consistentes, com bordas e superfícies levemente irregulares e pouca rugosidade. Já os constituídos com colágeno 120 horas ficaram pouco consistentes, com bordas bastante irregulares apresentando algumas fendas laterais e uma superfície rugosa. Além disso, notou-se um difícil manuseio destes hidrogéis, apresentando-se bastante frágeis.

De acordo com Bet (2000, p. 47-55) a hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas mostra um aumento progressivo no número de grupos tituláveis nas matrizes colagênicas em função do tempo de hidrólise alcalina em que o colágeno é submetido. Para o colágeno nativo, a quantidade de grupos carboxilas presentes na molécula correspondem a 239 ± 8 por mol de tropocolágeno em matrizes de pericárdio bovino nativo, e após 24, 72 e 120 horas de tratamento alcalino, foi obtida uma quantidade de 277 ± 4 , 345 ± 9 e 369 ± 4 , respectivamente.

Este aumento do número de cargas negativas decorrentes do processo de hidrólise das carboxiamidas origina um novo padrão de interações eletrostáticas, no qual começa a ocorrer uma repulsão das moléculas de tropocolágeno, gerando mudanças estruturais do agregado macromolecular do tropocolágeno com relação à formação da microfibrila (BET, 2000). Esta resultante desorganização nas fibras de colágeno explica a fragilidade observada nos hidrogéis preparados com colágeno de maior tempo de hidrólise alcalina.

6.1 Análise térmica

6.1.1 Termogravimetria (TG)

A termogravimetria é o ramo da análise térmica que analisa a variação de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo. Os experimentos são executados por meio de uma termobalança de elevada sensibilidade, reprodutibilidade e resposta rápida às variações de massa. As curvas obtidas fornecem informações relativas à composição e estabilidade térmica da amostra, dos produtos intermediários e do resíduo formado (MENCZEL e PRIME, 2009).

A DTG é a derivada da curva TG em função do tempo ou da temperatura. Os eventos de perda de massa são registrados na forma de picos. No entanto, em caso de reações de decomposição térmica que ocorrem lenta e gradativamente a curva DTG não mostrará um pico, mas se aproximará de um patamar uma vez que a derivada de uma constante é nula (MATOS e MACHADO, 2004).

Primeiramente foram feitas as análises termogravimétricas para todos os hidrogéis sem reticulação. Posteriormente, as curvas TG e DTG foram feitas para os biomateriais obtidos com colágeno 24 horas em suas três formas: hidrogel, esponja e hidrogel reidratado. Por último, foram feitas algumas comparações destas curvas com as obtidas para os outros tempos de hidrólise de modo a se evitar o uso desnecessário do equipamento com dados repetitivos que não contribuem para a relevância do trabalho.

A figura 16 mostra a comparação das curvas TG dos hidrogéis C₂₄G, C₇₂G e C₁₂₀G. Nota-se o mesmo perfil de curva para os três tempos de hidrólise diferentes, porém uma pequena variação no intervalo de perda de água e também na quantidade foram observadas. Para o hidrogel C₂₄G foi alcançada uma temperatura final do processo de perda de água de 120°C, já para os hidrogéis C₇₂G e C₁₂₀G, estas temperaturas foram de 105 e 130 °C, respectivamente. As quantidades de água contida nos hidrogéis encontram-se na tabela 2. Pequenas alterações são notadas, com uma maior quantidade de água no hidrogel com maior tempo de hidrólise, ou seja, que possui maior número de cargas negativas. Resultado justificável devido ao maior número de interações eletrostáticas entre o colágeno e as moléculas de água.

Tabela 2 - Valores da quantidade de água contida nos hidrogéis sem reticulação, por termogravimetria.

Hidrogel	Quantidade de Água (%)
C ₂₄ G	97,3
C ₇₂ G	97,5
C ₁₂₀ G	99,2

Figura 16 – Curvas TG dos hidrogéis (—) $C_{24}G$, (—) $C_{72}G$ e (—) $C_{120}G$ em ar sintético ($10^{\circ}C\ min^{-1}$).

As curvas termogravimétricas dos hidrogéis pertencentes ao tempo de 24 horas de hidrólise alcalina do colágeno estão dispostas na figura 17. Uma primeira etapa referente à perda de água do hidrogel ocorre entre 25 e 120°C. Sequencialmente ocorrem a degradação e a carbonização. Não foram observadas grandes alterações com a presença extrato de semente de uva. Nota-se o mesmo perfil da curva e uma tendência a diminuir a quantidade de água quando se aumenta a concentração de extrato (Tabela 3), a qual pode ser explicada pela hidrofbicidade da proantocianidina (HE et al., 2011).

Tabela 3 - Valores da quantidade de água contida nos hidrogéis com C_{24} , por termogravimetria.

Hidrogel	Quantidade de Água (%)
$C_{24}G$	97,3
$C_{24}GE_{25}$	95,5
$C_{24}GE_{50}$	93,6

Figura 17 – Curvas TG dos hidrogéis (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ e (—) $C_{24}GE_{50}$ em ar sintético ($10^{\circ}Cmin^{-1}$).

Também não foram observados resíduos formados, confirmando a eficiência nas lavagens para retirar o sal, carbonato de sódio, formado durante a neutralização, conforme a reação 1.

As curvas termogravimétricas obtidas para os hidrogéis liofilizados (esponjas) encontram-se na figura 18. Nota-se uma perda de massa em três estágios: perda da água estrutural, degradação térmica das cadeias poliméricas do colágeno e carbonização do polímero, respectivamente. As perdas de massa para cada faixa de temperatura encontram-se na tabela 4. Nota-se que houve algumas alterações com a presença da proantocianidina. O primeiro estágio ocorre na mesma faixa de temperatura para as três amostras, de 25 a $120^{\circ}C$, porém quando há extrato, a quantidade de água é reduzida em 4,6%. No segundo estágio ocorre uma diminuição de 1,4% de massa, quando tem-se a proantocianidina. Para o terceiro estágio observou um aumento na quantidade de massa devido a presença da proantocianidina, referente à 6%, para as esponjas $C_{24}GE_{25}$ e $C_{24}GE_{50}$.

Figura 18 - Curvas TG das esponjas (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ e (—) $C_{24}GE_{50}$ em ar sintético ($10^{\circ}Cmin^{-1}$).

Tabela 4 - Valores de perda de massa das esponjas com C_{24} , por termogravimetria.

Hidrogel	Faixa de Temperatura ($^{\circ}C$)	Perda de Massa (%)
$C_{24}G$	25 - 120	19,6
	120 - 430	36,4
	430 - 680	44,0
$C_{24}GE_{25}$	25 - 120	15,0
	120 - 430	35,0
	430 - 680	50,0
$C_{24}GE_{50}$	25 - 120	15,0
	120 - 430	35,0
	430 - 680	50,0

As curvas TG para os hidrogéis que foram liofilizados e posteriormente reidratados encontram-se na figura 19. Esta análise é importante afim de comparação com os hidrogéis antes do processo de liofilização. É possível observar o mesmo perfil obtido anteriormente para todas as curvas, porém um aumento da temperatura final do estágio de perda de água quando há proantocianidina, passando de 120 para 140°C.

A quantidade de água em cada hidrogel reidratado (Tabela 5) não apresentou alterações significativas em relação aos valores iniciais, sugerindo que o processo de liofilização está adequado para o armazenamento destes hidrogéis, evitando problemas com contaminação e proliferação de fungos.

Figura 19 – Curvas TG dos hidrogéis reidratados (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ e (—) $C_{24}GE_{50}$ em ar sintético ($10^{\circ}C\ min^{-1}$).

A fim de se obter uma comparação dos perfis das curvas para os diferentes tempos de hidrólise alcalina do colágeno, selecionaram-se algumas curvas termogravimétricas de diferentes amostras para discutir conforme os padrões obtidos e apresentados anteriormente.

Tabela 5 - Valores da quantidade de água contida nos hidrogéis reidratados, com $C_{24}G$, por termogravimetria.

Hidrogel	Quantidade de Água (%)
$C_{24}G$	95,8
$C_{24}GE_{25}$	95,0
$C_{24}GE_{50}$	94,3

Para o processo de reidratação comparou-se a curva obtida para o hidrogel $C_{24}GE_{50}$ com os hidrogéis $C_{72}GE_{50}$ e $C_{120}GE_{50}$ (figura 20). O mesmo perfil e faixa de temperatura do processo de perda de água são observados, porém nota-se uma pequena alteração da quantidade de água presente nos hidrogéis reidratados, quando comparado com os hidrogéis da figura 16. Nota-se agora que, quando maior é o tempo de hidrólise, menor é a quantidade de água presente do hidrogel reidratado (tabela 6).

Figura 20 – Curvas TG dos hidrogéis reidratados (—) $C_{24}GE_{50}$, (—) $C_{72}GE_{50}$ e (—) $C_{120}GE_{50}$ em ar sintético ($10^{\circ}C\ min^{-1}$).

Para comparar os hidrogéis com colágeno 72 e 120 horas antes de liofilizar e após reidratar tem-se as figuras 21 e 22, respectivamente. Assim como para o tempo 24 horas, o perfil da curva não se altera, mas há uma leve diminuição da quantidade de água presente nos hidrogéis reidratados. Para o colágeno 72 horas, a quantidade de água passou de 95,8 para 93,3% com a reidratação. Já para o colágeno 120 horas, esta diferença foi de 97,5 para 92,5, apresentando-se um pouco maior.

Tabela 6 - Valores da quantidade de água contida nos hidrogéis reidratados reticulados, por termogravimetria.

Hidrogel	Quantidade de Água (%)
C ₂₄ GE ₅₀	94,3
C ₇₂ GE ₅₀	93,2
C ₁₂₀ GE ₅₀	92,5

Figura 21 – Curvas TG dos hidrogéis antes e após liofilização (—) C₇₂G hidrogel e (---) C₇₂G hidrogel reidratado em ar sintético (10°C min⁻¹).

Figura 22 – Curvas TG dos hidrogéis antes e após liofilização (—) C₁₂₀GE₅₀hidrogel e (—) C₁₂₀GE₅₀ hidrogel reidratado em ar sintético (10°C min⁻¹).

6.1.3 Calorimetria exploratória diferencial

A DSC é a técnica de análise térmica na qual se mede a diferença de energia fornecida à substância e a um material de referência termicamente estável ou ar, enquanto são submetidos a uma programação controlada de temperatura. São divididas em duas configurações: DSC com compensação de potência e DSC com fluxo de calor, que diferem no modo em que amostra e referência são aquecidas, separadas ou juntas. Nesta última, a qual foi utilizada neste trabalho, amostra e referência são colocadas no mesmo compartimento e aquecidas por uma única fonte de calor. É então registrado, o fluxo de calor diferencial necessário para manter a amostra e o material de referência à mesma temperatura, seja por fenômenos químicos ou físicos (MACHADO et al., 2004).

Devido à transição endotérmica, na qual ocorre a mudança estrutural da hélice tripla do colágeno (SIONKOWSKA, 2000), é possível obter por medidas de DSC, as temperaturas de desnaturação (Td).

Na figura 23 constam as curvas DSC para as três amostras preparadas com colágeno 24 horas de hidrólise alcalina. É possível notar a atuação da proantocianidina como agente reticulante do colágeno, a qual promoveu o aumento da temperatura de desnaturação conforme aumentou-se a concentração de extrato de semente de uva no hidrogel.

Figura 23 – Curvas DSC dos hidrogéis (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ e (—) $C_{24}GE_{50}$.

O mesmo foi observado para os dois outros tempos de hidrólise, 72 e 120 horas, figuras 24 e 25 respectivamente. Com o aumento da concentração de extrato, as transições foram deslocadas para a direita, significando o aumento da Td.

Figura 24 – Curvas DSC dos hidrogéis (—) $C_{72}G$, (—) $C_{72}GE_{25}$ e (—) $C_{72}GE_{50}$.

Estes resultados estão condizentes com os apresentados em estudos com matrizes de colágeno não aniônico e proantocianidina. Conforme mostrado por Han

et al. (2003), a proantocianidina também atuou como agente reticulante do colágeno derivado de tendão bovino fresco e tiras de pericárdio bovino, aumentando a temperatura de desnaturação a qual passou de 66 para 86°C.

Figura 25 – Curvas DSC dos hidrogéis (—) $C_{120}G$, (—) $C_{120}GE_{25}$ e (—) $C_{120}GE_{50}$.

A tabela 7 mostra os valores das temperaturas de desnaturação para todos os hidrogéis analisados. As maiores Td foram atingidas pelos hidrogéis com colágeno 24 horas, os quais apresentaram uma variação de temperatura, com o aumento da concentração da proantocianidina, menor do que para os demais tempos de hidrólise.

As menores temperaturas obtidas para os maiores tempos de hidrólise podem ser explicadas pelo novo padrão de interações eletrostáticas, que ocorrem em função do aumento de cargas negativas da matriz. Quanto maior é o tempo de hidrólise, maior será o rompimento das ligações cruzadas naturais presentes na estrutura microfibrilar da matriz colagênica, devido à ação de sais, ácidos e bases durante o processo de extração (LACERDA et al., 1998). Esta mudança estrutural, a qual é mais pronunciada com a extensão do tempo de hidrólise, gera matrizes mais susceptíveis a degradação em temperaturas mais baixas, justificando as transições ocorridas nos hidrogéis preparados com colágeno 120 horas.

Para as matrizes preparadas com o colágeno 24 horas, as maiores temperaturas obtidas, implicam em uma redução da taxa de degradação *in vivo* satisfatória para aplicações que necessitem de um tempo de permanência maior do biomaterial no sistema biológico.

Tabela 7 - Temperatura de desnaturação (°C) para cada hidrogel.

Hidrogel	Temperatura de Desnaturação (°C)
C ₂₄ G	58,4
C ₂₄ GE ₂₅	61,6
C ₂₄ GE ₅₀	63,4
C ₇₂ G	49,7
C ₇₂ GE ₂₅	54,9
C ₇₂ GE ₅₀	57,2
C ₁₂₀ G	46,5
C ₁₂₀ GE ₂₅	49,9
C ₁₂₀ GE ₅₀	54,4

6.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade para a análise de grupos funcionais de estruturas orgânicas está situada entre 4000 e 400 cm^{-1} . As ligações covalentes que constituem as moléculas orgânicas estão em constante movimentos axiais e angulares. A radiação emitida no infravermelho faz com que átomos e grupos de átomos de compostos orgânicos vibrem com amplitude aumentada ao redor das ligações covalentes que os ligam. A cada mudança de nível de energia vibracional corresponde uma série de mudanças de níveis de energia rotacional, desta forma, as linhas sobrepõem-se dando origem a uma série de bandas observadas no espectro vibracional (PRABAVATHI et al., 2013).

A banda visualizada em 600 cm^{-1} em todos os espectros refere-se à pastilha de silício utilizada nas análises.

Os espectros apresentados para os três colágenos aniônicos estudados estão apresentados na figura 26. Não houve alterações significativas nos valores das bandas teóricas características. Em 1658 cm^{-1} , tem-se a presença de amida I,

proveniente ao estiramento da carbonila, em 1556 cm^{-1} , amida II, devido às vibrações da ligação N-H e ao estiramento C-N, em 1240 cm^{-1} correspondente às vibrações da amida III, e em 1454 cm^{-1} , natural da estereoquímica dos anéis pirrolidínicos e ao redor de 3.350 cm^{-1} , devido ao estiramento O-H e grupo N-H (SIONKOWSKA et al., 2004).

A relação entre as absorvâncias das bandas referentes aos estiramentos de amida III e da estereoquímica dos anéis pirrolidínicos é capaz de verificar a integridade da hélice tripla do colágeno. Um valor próximo de 1,0 indica a integridade de hélice tripla e próximo a 0,5, a desnaturação da proteína. (SILVESTER et al., 1989). A tabela 8 trás esta relação para os três colágenos aniônicos estudados. Os valores de absorvância foram obtidos pela da equação 3.

$$\text{Absorvância} = -\log \text{Transmitância} \quad (3)$$

Os valores obtidos indicam a integridade da estrutura da hélice tripla, mesmo para uma alta duração de hidrólise alcalina, como 120 horas.

Tabela 8 - Relação entre absorvâncias para cada colágeno.

Colágeno	Absorvância da amida III	Absorvância dos anéis pirrolidínicos	Relação
C ₂₄	0,2431	0,2568	0,95
C ₇₂	0,1808	0,2009	0,90
C ₁₂₀	0,1876	0,2112	0,89

Figura 26 - Espectro de FT-IR dos colágenos aniônicos: (—) C₂₄, (—) C₇₂ e (—) C₁₂₀.

Como a gelatina é um produto heterogêneo que tem uma mistura de peptídeos derivados do colágeno, o espectro de IV obtido (Figura 27) possui as mesmas bandas características do colágeno, porém a relação entre as absorvâncias referentes aos estiramentos de amida III e da estereoquímica dos anéis pirrolidínicos foi de 0,72.

Figura 27 – Espectro de FT-IR da gelatina.

O espectro obtido para o extrato de semente de uva está presente na figura 28. Como comprovado em outro trabalho (LOCILENTO, 2012), o processo de purificação do extrato não causa aparecimento ou deslocamento de picos na região do espectro. É possível observar as bandas das vibrações encontradas na proantocianidina em 1633 e 1527 cm^{-1} , referentes ao estiramento do anel aromático C=C-C, em 1452 cm^{-1} devido ao estiramento dos grupos C=C do anel aromático, em 1288 cm^{-1} , correspondente ao estiramento C-O da estrutura do anel pirano, e em 1118 cm^{-1} devido à deformação dos grupos C-H do anel aromático.

Foram obtidos espectros para todos os hidrogéis estudados. Na figura 29 constam as amostras com colágeno 24 horas, e nas figuras 30 e 31, as amostras com 72 e 120 horas, respectivamente. As setas com os valores dos números de onda nas curvas apontam as bandas surgidas devido à presença da proantocianidina. Estas bandas apresentam mais intensas com o aumento da concentração de extrato na amostra.

Figura 28 – Espectro de FT-IR do extrato de semente de uva purificado.

Fonte: Adaptação a partir de LOCILENTO, D. A., 2012, p. 69.

A tabela 9 mostra os valores das principais bandas analisadas em todos os espectros. Não foram observadas grandes alterações com a adição do extrato, já que três das cinco bandas características da proantocianidina encontram-se em sobreposição com os estiramentos típicos do colágeno. Nota-se pequenos deslocamentos no número de onda e alargamento das bandas referentes às amidas I, II e III, o que comprova a preservação estrutural da hélice tripla do colágeno na presença da proantocianidina. Estas alterações podem ser explicadas devido às ligações de hidrogênio que surgem entre a proantocianidina e o colágeno. A ligação de hidrogênio tem um papel dominante na estabilização de colágeno por conta dos polifenóis em condições ácidas. Os grupos hidroxila, carboxila, amina e amida da cadeia lateral do colágeno proporcionam os sítios para a formação de ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila fenólicos de proantocianidina, interação a qual pode proporcionar deslocamentos e alargamentos de algumas bandas, dependente da concentração de extrato presente. Em outras palavras, as moléculas de

proantocianidina agem como agentes de ligação cruzada, mas sem destruir a estrutura da hélice tripla do colágeno (HE et al., 2011).

Tabela 9 – Valores do número de onda para os principais estiramentos observados.

Amostra	Amida I (cm⁻¹)	Amida II (cm⁻¹)	Amida III (cm⁻¹)	Anéis pirrolidínicos (cm⁻¹)	Anel aromático da proantocianida (cm⁻¹)	
C ₂₄	1658	1554	1454	1240	----	----
C ₇₂	1658	1556	1456	1240	----	----
C ₁₂₀	1658	1556	1454	1240	----	----
C ₂₄ G	1658	1554	1454	1240	----	----
C ₇₂ G	1658	1556	1456	1240	----	----
C ₁₂₀ G	1658	1556	1454	1240	----	----
C ₂₄ GE ₂₅	1654	1558	1452	1240	1288	1118
C ₇₂ GE ₂₅	1658	1552	1452	1240	1288	1118
C ₁₂₀ GE ₂₅	1658	1556	1452	1240	1288	1118
C ₂₄ GE ₅₀	1658	1556	1452	1240	1288	1118
C ₇₂ GE ₅₀	1658	1550	1452	1240	1288	1118
C ₁₂₀ GE ₅₀	1654	1550	1452	1240	1288	1118

Figura 29 - Espectro de FT-IR para as amostras: (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ e (—) $C_{24}GE_{50}$. Setas: presença da proantocianidina nas amostras.

Figura 30 - Espectro de FT-IR para as amostras: (—) $C_{72}G$, (—) $C_{72}GE_{25}$ e (—) $C_{72}GE_{50}$. Setas: presença da proantocianidina nas amostras.

Figura 31 - Espectro de FT-IR para as amostras: (—) $C_{120}G$, (—) $C_{120}GE_{25}$ e (—) $C_{120}GE_{50}$. Setas: presença da proantocianidina nas amostras.

6.3 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O MEV é um dos mais versáteis instrumentos disponíveis para a observação e análise de características microestruturais de objetos sólidos. A principal razão de sua utilidade, além da rapidez, é a capacidade de alta resolução e a aparência

tridimensional da imagem das amostras, resultado direto da grande profundidade de campo. Permite, também, o exame em pequenos aumentos e com grande profundidade de foco, o que é extremamente útil, pois a imagem eletrônica complementa a informação dada pela imagem óptica (DEDAVID et al., 2007).

As fotomicrografias obtidas para as esponjas estão dispostas a seguir em duas perspectivas de aumento, 200 e 500 vezes, para os cortes superficial e transversal. A disposição do tipo folha observada com presença de poros, é responsável pela retenção da água dentro da estrutura do hidrogel liofilizado. Além disso, a porosidade é um dos fatores que promove absorção de líquidos fisiológicos, crescimento celular, entre outros (DEDAVID et al., 2007).

A figura 32 trás as fotomicrografias das esponjas preparadas com colágeno 24 horas. É possível notar que conforme aumentou-se a concentração de extrato de semente de uva, a estrutura apresentou-se mais densa, com um maior número de poros e uma grande interconectividade entre estes. As imagens K e L mostram uma estrutura mais regular, disposta em linhas paralelas. Não foi possível visualizar a proantocianidina nas imagens.

As fotomicrografias das esponjas com C_{72} estão dispostas na figura 33. Pode-se observar nas imagens transversais que ao aumentar a concentração do extrato, ocorreu uma disposição da estrutura em linhas paralelas com efeito mais pronunciado do que para as esponjas com colágeno 24 horas. Além disso, comparando as imagens C, G e K observou-se uma organização da estrutura com a presença da proantocianidina. Pelas imagens de superfície também foi notado o aumento do número de poros assim como a interconectividade entre eles. Não foi possível visualizar a proantocianidina nas imagens.

Para as amostras com C_{120} foram obtidas as fotomicrografias apresentadas na figura 34. Também observou-se uma maior interconectividade dos poros conforme aumentou-se a concentração do extrato, porém não houveram mudanças significativas na quantidade de poros.

Ao comparar as fotomicrografias para as mesmas concentrações de extrato, porém colágenos hidrolisados por tempos diferentes, figuras 32 (C), 33 (C) e 34 (C), pode-se notar que quanto menor é o tempo de hidrólise mais densa é a estrutura interna da esponja, sem alterar seu tamanho, com maior interconectividade dos

poros. O mesmo é visualizado quando tem-se a presença do extrato, figuras 32 (K), 33 (K) e 34 (K).

O maior espaçamento observado na estrutura interna das esponjas preparadas com C₇₂ e C₁₂₀ pode ser explicado pelo aumento da densidade de carga negativa através da hidrólise das carboxiamidas ocorrendo uma repulsão das moléculas de tropocolágeno que causa uma desorganização nas fibras de colágeno (BET, 2000).

A fim de se demonstrar o aumento do espaçamento da estrutura interna das esponjas conforme aumentou-se o tempo de hidrólise alcalina do colágeno fez-se uma análise dos tamanhos dos poros. Os resultados encontram-se na tabela 10, porém não foi possível obter conclusões devido ao grande erro atribuído às medidas decorrente da variada disposição dos poros, apresentando-se irregulares e de tamanhos aleatórios, sem padrão de distribuição.

Tabela 10 –Valores do tamanho médio dos poros das esponjas.

Esponja	Tamanho médio dos poros (µm)
C ₂₄ G	208,42 ± 101,44
C ₂₄ GE ₂₅	205,65 ± 88,72
C ₂₄ GE ₅₀	158,21 ± 60,38
C ₇₂ G	314,20 ± 120,80
C ₇₂ GE ₂₅	274,90 ± 82,76
C ₇₂ GE ₅₀	255,85 ± 97,45
C ₁₂₀ G	543,35 ± 228,96
C ₁₂₀ GE ₂₅	514,56 ± 196,24
C ₁₂₀ GE ₅₀	502,56 ± 165,06

Figura 32 – Fotomicrografias das esponjas com C_{24} . (A) $C_{24}G$ no corte superficial com aumento de 200x. (B) $C_{24}G$ no corte superficial com aumento de 500x. (C) $C_{24}G$ no corte transversal com aumento de 200x. (D) $C_{24}G$ no corte transversal com aumento de 500x. (E) $C_{24}GE_{25}$ no corte superficial com aumento de 200x. (F) $C_{24}GE_{25}$ no corte superficial com aumento de 500x. (G) $C_{24}GE_{25}$ no corte transversal com aumento de 200x. (H) $C_{24}GE_{25}$ no corte transversal com aumento de 500x. (I) $C_{24}GE_{50}$ no corte superficial com aumento de 200x. (J) $C_{24}GE_{50}$ no corte superficial com aumento de 500x. (K) $C_{24}GE_{50}$ no corte transversal com aumento de 200x. (L) $C_{24}GE_{50}$ no corte transversal com aumento de 500x.

Figura 33 – Fotomicrografias das esponjas com C_{72} . (A) $C_{72}G$ no corte superficial com aumento de 200x. (B) $C_{72}G$ no corte superficial com aumento de 500x. (C) $C_{72}G$ no corte transversal com aumento de 200x. (D) $C_{72}G$ no corte transversal com aumento de 500x. (E) $C_{72}GE_{25}$ no corte superficial com aumento de 200x. (F) $C_{72}GE_{25}$ no corte superficial com aumento de 500x. (G) $C_{72}GE_{25}$ no corte transversal com aumento de 200x. (H) $C_{72}GE_{25}$ no corte transversal com aumento de 500x. (I) $C_{72}GE_{50}$ no corte superficial com aumento de 200x. (J) $C_{72}GE_{50}$ no corte superficial com aumento de 500x. (K) $C_{72}GE_{50}$ no corte transversal com aumento de 200x. (L) $C_{72}GE_{50}$ no corte transversal com aumento de 500x.

Figura 34 – Fotomicrografias das esponjas com C_{120} . (A) $C_{120}G$ no corte superficial com aumento de 200x. (B) $C_{120}G$ no corte superficial com aumento de 500x. (C) $C_{120}G$ no corte transversal com aumento de 200x. (D) $C_{120}G$ no corte transversal com aumento de 500x. (E) $C_{120}GE_{25}$ no corte superficial com aumento de 200x. (F) $C_{120}GE_{25}$ no corte superficial com aumento de 500x. (G) $C_{120}GE_{25}$ no corte transversal com aumento de 200x. (H) $C_{120}GE_{25}$ no corte transversal com aumento de 500x. (I) $C_{120}GE_{50}$ no corte superficial com aumento de 200x. (J) $C_{120}GE_{50}$ no corte superficial com aumento de 500x. (K) $C_{120}GE_{50}$ no corte transversal com aumento de 200x. (L) $C_{120}GE_{50}$ no corte transversal com aumento de 500x.

6.4 Cinética de absorção de água

O ensaio da cinética de absorção de água é fundamental para a utilização do biomaterial. Com esse, é possível conhecer o comportamento de um hidrogel liofilizado na sua reidratação, analisar se o hidrogel é recomposto neste processo, em qual tempo e o quanto de água é capaz de absorver cada biomaterial estudado.

O processo de absorção de água ocorre devido a várias interações. Quando as primeiras moléculas começam a entrar na matriz do hidrogel, estas hidratam os grupos hidrofílicos e polares, e assim o hidrogel começa a se expandir. Dessa forma, os grupos apolares ficam expostos interagindo também com outras moléculas de água que continuam a entrar na matriz. Após, outra parcela de água, que não participa de ligação, preenche o espaço entre as cadeias poliméricas e os poros do hidrogel que ainda estavam vazios, entrando na pelo efeito da força osmótica. Este é contraposto pela força das ligações cruzadas do material que tem um comportamento elástico. Assim, o hidrogel encontra o seu ponto de equilíbrio de absorção. Se a expansão prosseguir, as ligações tanto cruzadas como as da estrutura do colágeno poderão romper, e o hidrogel se degradar (HOFFMAN, 2002).

A figura 35 mostra as absorções obtidas para as amostras C₂₄G, C₂₄GE₂₅ e C₂₄GE₅₀. As curvas indicaram que no início a absorção é bastante rápida, atingindo o equilíbrio em aproximadamente 10 minutos. Este resultado mostra uma vantagem para a aplicação do hidrogel, já que é obtido rapidamente a partir de sua forma liofilizada, adequada para o armazenamento. Além disso, foi possível notar uma redução da quantidade de água absorvida conforme aumentou-se a concentração de extrato presente, passando de 1360% para 880%.

As mesmas observações foram feitas para os hidrogéis com colágeno submetido a 72 e 120 horas de hidrólise alcalina, figuras 36 e 37, respectivamente. A reidratação deu-se rapidamente atingindo equilíbrio em aproximadamente 10 minutos. As absorções foram maiores para hidrogéis com ausência de proantocianidina passando de 1200 para 680% e 1080 para 540%, para os hidrogéis preparados com colágeno 72 e 120 horas, respectivamente.

Esta redução da quantidade de água absorvida conforme aumenta-se a concentração de extrato no hidrogel pode ser explicada pela estrutura da

proantocianidina, que age formando ligações de hidrogênio as quais estabilizam o complexo proteína-PA. Estas ocorrem entre as hidroxilas presentes na proantocianidina com os grupamentos amida do aminoácido prolina, presente na constituição da hélice tripla do colágeno, promovendo a reticulação e a hidrofobicidade da estrutura (HE et al.,2011).

Comparando as curvas obtidas de cada figura, observou-se que quanto menor o tempo de hidrólise do colágeno, maiores são os valores de absorção obtidos para hidrogéis a mesma concentração de proantocianidina.

Figura 35 – Curvas de absorção de água para as amostras (—) $C_{24}G$, (—) $C_{24}GE_{25}$ e

Figura 36 – Curvas de absorção de água para as amostras (—) $C_{72}G$, (—) $C_{72}GE_{25}$ e (—) $C_{72}GE_{50}$.

Figura 37 – Curvas de absorção de água para as amostras (—) $C_{120}G$, (—) $C_{120}GE_{25}$ e (—) $C_{120}GE_{50}$.

A alteração da quantidade de água absorvida notada para uma que contenha a mesma quantidade de extrato, porém constituída de colágeno preparado com diferente tempo de hidrólise pode ser explicada pela estrutura interna observada nas fotomicrografias do MEV. Para o colágeno 24 horas, a estrutura apresentou-se mais densa, com maior interconectividade dos poros, o que proporciona uma maior área para as primeiras moléculas de água interagirem e, conseqüentemente, maior quantidade de grupos apolares para as próximas moléculas interagirem e posteriormente a entrada pelo efeito da força osmótica, ocupando a área livre e gerando uma maior retenção de água no hidrogel.

Para o colágeno 120 horas a estrutura interna observada no MEV mostrou-se mais espaçada, com uma menor área de contato para as primeiras moléculas de água interagirem e assim, conseqüentemente, houve uma menor retenção de água no hidrogel, quando comparado com estruturas mais compactas.

Fazendo uma comparação das absorções com os resultados obtidos por TG obteve-se coerência. Na figura 20, na qual tem-se as reidratações para as amostras com colágeno 24 horas, nota-se que quando maior a concentração de proantocianidina no hidrogel, menor é a quantidade de água em sua estrutura. Além disso, por meio da figura 20, observou-se que para a mesma concentração de extrato, quando maior é o tempo de hidrólise do colágeno, menor é a quantidade de água presente, confirmando os resultados obtidos na cinética de absorção de água.

6.5 Citotoxicidade

A citotoxicidade é o efeito nocivo ou prejudicial, não desejado, produzido por um biomaterial. O teste de citotoxicidade *in vitro* é usado como uma avaliação inicial com o objetivo de detectar o potencial efeito letal ou subletal do biomaterial no sistema biológico, por meio da utilização de cultura de células (FRESHNEY, 2010).

Como a aplicação do biomaterial estudado requer uma redução da taxa de degradação *in vivo*, acredita-se que a opção mais adequada a partir das comparações dos resultados de TG, DSC, MEV e absorção de água, são os hidrogéis de colágeno 24 horas. Assim, os testes de citotoxicidade foram realizados apenas com estas amostras.

6.5.1 Cultura celular

Contaram-se, em microscópio óptico, 145 células vivas e 28 mortas, resultando em uma viabilidade celular de 84% e concentração de $1,8 \times 10^6$ células/mL, resultado apropriado para prosseguir os testes (FRESHNEY, 2010).

6.5.2 Método de difusão em ágar

As placas foram analisadas macroscopicamente quanto à formação de um halo ao redor do material. O referencial de citotoxicidade foi dado pelo controle positivo (figura 38) no qual formou um halo claro de aproximadamente 2,5 cm ao redor do látex. Esta formação é característica de morte celular, na qual ocorre a liberação do corante vermelho que estava incorporado nas células vivas, dando este aspecto transparente ao local.

Figura 38 – Avaliação macroscópica da citotoxicidade do controle positivo.

As placas para o controle negativo e para os biomateriais, C₂₄G, C₂₄GE₂₅ e C₂₄GE₅₀ são mostradas nas figuras 39, 40, 41 e 42, respectivamente. Não foi observado formação de halos devido a citotoxicidade ao redor de nenhuma das amostras, mostrando o mesmo comportamento do controle negativo (papel de filtro atóxico). Este fato indica que os biomateriais estudados não provocaram alterações morfológicas nas células, mantendo-as íntegras e vitais.

Figura 39 – Avaliação macroscópica da citotoxicidade do controle negativo.

Figura 40 – Avaliação macroscópica da citotoxicidade para a amostra C₂₄G.

Figura 41 – Avaliação macroscópica da citotoxicidade para a amostra C₂₄GE₂₅.

Figura 42 – Avaliação macroscópica da citotoxicidade para a amostra C₂₄GE₅₀.

6.5.3 Método de difusão de extrato em solução

O objetivo deste teste é avaliar o índice de sobrevivência das células após contato com o extrato produzido a partir dos materiais estudados. O efeito de mudança de coloração do reagente MTT, de amarelo para roxo, pode ser visto na figura 43. Este efeito é devido à redução feita pelas desidrogenases mitocondriais, presente somente em células vivas (TAYLOR et al., 1994). Nota-se que somente o controle positivo permaneceu na coloração amarelada, indicando a presença de células vivas em todos os outros controles e biomateriais.

O índice de sobrevivência celular, calculado a partir das medidas de absorbâncias que foram lidas para cada poço no leitor de placas, pode ser visualizado na tabela 11. Dos três biomateriais estudados pode-se notar que quando há menor concentração de proantocianidina presente, o índice de sobrevivência é muito próximo do hidrogel com a ausência desta. Para uma concentração maior, 0,50%, notou-se um aumento significativo deste índice.

Figura 43 - Placa de 96 poços após 3 horas de incubação com MTT. (A) Controle de células. (B) Controle negativo. (C) Controle positivo. (D) C₂₄G. (E) C₂₄GE₂₅. (F) C₂₄GE₅₀.

Tabela 11 - Índice de sobrevivência celular para cada amostra.

Amostra	Média das Absorbâncias	Desvio Padrão	Índice de Sobrevivência (%)
Controle de Células	1,169	± 0,047	100,00
Controle Negativo	1,184	± 0,080	100,00
Controle Positivo	0,060	± 0,006	5,13
C ₂₄ G	0,922	± 0,083	78,87
C ₂₄ GE ₂₅	0,913	± 0,061	78,10
C ₂₄ GE ₅₀	1,084	± 0,124	92,73

A partir destes resultados, é possível concluir que para aplicação biológica o biomaterial C₂₄GE₅₀ torna-se mais adequado, já que possui um alto índice de sobrevivência celular referente 92,7%.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi possível obter hidrogéis neutros de colágeno, gelatina e extrato de semente de uva, preparados com três diferentes tempos de hidrólise alcalina e duas concentrações de proantocianidina.

O extrato de semente de uva foi eficaz na reticulação do colágeno, aumentando a Td conforme aumentou-se sua concentração, em todos os hidrogéis. Além disso, a presença da proantocianidina promoveu uma redução na quantidade de água presente nos hidrogéis, inclusive para os reidratados. Não causou alterações significativas nos espectros de infravermelho, apenas surgimento das bandas em 1118 e 1288 cm^{-1} referentes ao anel aromático da proantocianidina. Também observou-se alterações nas estruturas internas dos hidrogéis, visualizadas por MEV, como aumento do número de poros e grande interconectividade entre eles.

Para os mesmos hidrogéis, porém preparados com colágeno hidrolisados por tempos diferentes, foi possível notar diferenças macroscópicas, como redução da consistência, presença de bordas irregulares, superfície rugosa e maior dificuldade de manuseio conforme aumentou-se o número de cargas negativas do colágeno. Além disso, observou-se que as maiores Td são obtidas para os menores tempos de hidrólise, assim como as maiores absorções de água. Por MEV, notou-se que as estruturas que possuem maior número de cargas negativas são mais espaçadas.

A cinética de absorção de água mostrou que o equilíbrio é atingido em aproximadamente 10 minutos. Este resultado mostra uma vantagem para a aplicação do hidrogel, já que é obtido rapidamente a partir de sua forma liofilizada, adequada para o armazenamento.

Com os ensaios de citotoxicidade foi possível concluir que o hidrogel C₂₄GE₅₀ mostrou-se mais adequado para uma aplicação como biomaterial, já que apresentou um índice de 92,7% de sobrevivência celular.

REFERÊNCIAS

AHN, J.; KUFFOVA, L.; MERRETT, K.; MITRA, D.; FORRESTER, J. V.; LI, F.; GRIFFITH, M. Crosslinked collagen hydrogels as corneal implants: Effects of sterically bulky vs. non-bulky carbodiimides as crosslinkers. **Acta Biomaterialia**, v. 9, p. 7796–7805, 2013.

AZEVEDO, A. S.; SÁ, M. J. C.; FOOK, M. V. L.; NOBREGA NETO, P. I.; SOUSA, O. B.; AZEVEDO, S. S. Hidroxiapatita e quitosana isoladas e associadas à medula óssea no reparo do tecido ósseo em coelhos. Estudo histológico e morfométrico. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1265-1270, 2013.

BATISTA, Thelma Matuura. **Mineralização *in vitro* de matrizes de colágeno aniônico derivadas de tecidos biológicos**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

BATISTA, T.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v.95, n. 3, p. 945-949, 2009.

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

BET, Marcos Roberto. **Colágeno aniônico: propriedades físico químicas, estruturais e comportamento biológico**. 2000. 107 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BREECHER, G. R. Proanthocyanidins: biological activities associated with human health. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, p. 2-20, 2004.

CARVALHO, Elisabete Barros de. **Estudos da interacção entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos**. 2007. 183 f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade do Porto, Lisboa, 2007.

- CARVALHO, Valéria Cardoso de Melo. **Estudo dos efeitos de duas porfirinas hidrofílicas em células tumorais HEp-2 visando aplicação em terapia fotodinâmica do câncer**. 2001. 100f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.
- CATALDO, F.; URSINI, O.; LILLA, A.; ANGELINI, G. Radiation-induced crosslinking of collagen gelatin into a stable hydrogel. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 275, p. 125-131, 2008.
- CEN, L.; LIU, W.; CUI, L.; ZHANG, W.; CAO, Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatric Research**, v. 63, p. 492-496, 2008.
- CHO, M.L.; HEO, Y.J.; PARK, M.K.; OH, H.J.; PARK, J.S.; WOO, Y.J.; JU, J.H. Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis. **Immunology Letters**, v. 124, p. 102-110, 2009.
- CINESIOLOGIA. **Osteologia**, 2010. Disponível em <http://cleamacieli.blogspot.com.br/p/osteologia_01.html> Acesso em: 02 mar 2014.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura**: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EdIPUCRS, 2007. v. 1, p. 9-10.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells**: a manual of basic technique and specialized applications. 6th ed. New York: Wiley BlackWell, 2010. v. 1.
- GIL, M. H.; FERREIRA, P. Polissacarídeos como Biomateriais. **Química**, v. 100, p. 72-73, 2006.
- GOES, J. C.; FIGUEIRO, S. D.; OLIVEIRA A. M.; MACEDO, A. A. M.; SILVA, C. C. Apatite coating on anionic and native collagen films by an alternate soaking process. **Acta Biomaterialia**, v. 3, p. 773–778, 2007.
- GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M. P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternativesources: a review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1813-1827, 2011.

- HAN, B.; JAUREQUI, J.; TANG, B. W.; NIMNI, M. E. Proanthocyanidin: a natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 65, p. 118-24, 2003.
- HE, L.; MU, C.; SHI, J.; ZHANG, Q.; SHI, B.; LIN, W. Modification of collagen with a natural cross-linker: procyanidin. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 48, p. 354–359, 2011.
- HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. **Advances Drug Delivery Reviews**, v. 43, p. 3 – 12, 2002.
- HORN, Marília Marta. **Obtenção e caracterização de hidrogéis de quitosana, xantana e colágeno aniônico**. 2008. 73 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos 2008.
- HUANG, C. H.; CHI, C. Y.; CHEN, Y. S.; CHEN, K. Y.; CHEN, P. L.; YAO, C. H. Evaluation of proanthocyanidin-crosslinked electrospun gelatin nanofibers for drug delivering system. **Materials Science and Engineering**, v. 32, p. 2476–2483, 2012.
- KIM, S.; KIM, J.H.; JEON, O.; KWON, I.C.; PARK, K. Engineered polymers for advanced drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, p. 420-430, 2009.
- KU, C. S.; SATHISHKUMAR, M.; MUN, S. P. Binding affinity of proanthocyanidin from waste Pinus radiata bark onto proline-rich bovine achilles tendon collagen type I. **Chemosphere**, v. 67, p. 1618–1627, 2007.
- KUHN, L. T. Biomaterials. In: ENDERLE, J. D.; BRONZINO, J. D.; BLANCHARD, S. M. (Ed.). **Introduction to biomedical engineering**. Burlington: Elsevier, 2012. p. 220-269.
- 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.
- LIM, F.; SUN, A. M. Microencapsulated islets as bioartificial pancreas. **Science**, p. 908–910, 1980.

LIU, B. S. Fabrication and evaluation of a biodegradable proanthocyanidin-crosslinked gelatin conduit in peripheral nerve repair. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 87, p. 1092-1102, 2008.

LIU, Y. L.; WANG, Y. Crosslinked collagen–gelatin–hyaluronic acid biomimetic film for cornea tissue engineering applications. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 196–201, 2013.

LOCILENTO, Danilo André. **Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva**. 2012. 94 f. Dissertação(Mestrado) - Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

MACHADO, L.D.B.; MATOS, J.R. Análise térmica diferencial e calorimetria exploratória diferencial. In: CANEVAROLO JUNIOR, S.V. (Ed.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. p. 229-261.

MARQUES, B. V.; PEREIRA, F. P.; FACO, E. F. S.; VALIATI, M. A.; RUFINO, R. P. S. Análise histológica do copolímero de ácido polilático e poliglicólico no subcutâneo e em defeitos de calvária. **Arquivos of Health Investigation**, v. 2, 2013.

MATOS, J.R.; MACHADO, L.D.B. Análise térmica – termogravimetria. In: CANEVAROLO JUNIOR, S.V. (Ed.). **Técnicas de caracterização de polímeros**. São Paulo: Artliber, 2004. p. 209-228.

MCCLELLAND, R. E.; DENNIS, R.; REID, L. M.; STEGEMANN, J. P.; PALSSON, B.; MACDONALD, J. M. Tissue engineering. In: ENDERLE, J. D.; BRONZINO, J. D.; BLANCHARD, S. M. (Ed.). **Introduction to biomedical engineering**. Burlington: Elsevier, 2012. p. 273-355.

MENCZEL, J.D.; PRIME, R.B. **Thermal analysis of polymers: fundamentals and applications**. New York: John Wiley , 2009. 688 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NAIR, R.; SEVUKARAJAN, M.; BADIVADDIN, T.M.; KUMAR, C.K.A. Collagen based drug delivery systems: a review. **Journal of Trends Pharmaceutical Science**, v. 1, p. 288-304, 2010.

NIMNI, M. E. **Collagen**. Boca Raton: CRC, 1988. v.1, p. 1-86.

NITTA GELATIN. **Collagen Material Business**, 2010. Disponível em: <<http://www.nitta-gelatin.co.jp/english/company/business.html>> Acesso em: 03 ago 2012.

NUTRITIONAL OUTLOOK UBM CANON. Polyphenolics. **SuppySide West Sneak Peek: Grape Seed Extractor for Cardiovascular Health**, 2012. Disponível em: <<http://www.nutritionaloutlook.com/news/supplieside-west-sneak-peek-grape-seed-extract-cardiovascular-health#>> Acesso em: 10 fev 2014.

ORÉFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais**: fundamentos e aplicações. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2012. 538 p.

PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. Collagen-based biomaterials for tissue engineering applications. **Materials**, v. 3, p. 1863-1887, 2010.

PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials**: an introduction. New York: Springer, 2007. 564 p.

PEPPAS, N. A.; BURES, P.; LEOBANDUNG, W.; ICHIWACA, H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 50, p. 27-38, 2000.

PRABAVATHI, N.; NILUFER, A.; KRISHNAKUMAR, V. Spectroscopic (FT-IR, FT-Raman, UV and NMR) investigation, conformational stability, NLO properties, HOMO–LUMO and NBO analysis of hydroxyquinoline derivatives by density functional theory calculations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 114. p. 449-474, 2013.

PRESTES, R. C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 15, p. 65-74, 2013.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science**: an introduction to materials in medicine. Waltham: Elsevier, 2013. 1520 p.

- ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudos Comparativo entre duas Metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 314-320, 2003.
- ROKHADE, A. P.; AGNIHOTRI, S. A.; PATIL, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; KULKARNI, P. V.; AMINABHAVI, T. M. Semi-interpenetrating polymer network microspheres of gelatin and sodium carboxymethyl cellulose for controlled release of ketorolac tromethamine. **Carbohydrate Polymers**, v. 65, p. 243-252, 2006.
- ROMAN, J. A.; MENDONÇA, S. N. T. G.; SGARBIERI, V. C. Avaliação Físico-química, microbiológica, sensorial e atitude do consumidor de gelatina de elevado valor nutricional. **Alimentose Nutrição**, v. 20, p. 41-51, 2009.
- SADER, M. S.; MARTINS, V. C. A.; GOMEZ, S.; LEGEROS, R. Z.; SOARES, G. A. Production and in vitro characterization of 3D porous scaffolds made of magnesium carbonate apatite (MCA)/anionic collagen using a biomimetic approach. **Materials Science and Engineering**, v. 33, p. 4188–4196, 2013.
- SCHOTT, A. Functions of gelatine in food applications. **American Association of Cereal Chemists**, v. 46, p. 414-416, 2001.
- SILVA, Lívio Bruno Jacques. **Novo hidrogel eletro, pH e termoresponsivo para aplicações em músculos artificiais e atuadores**. 2007. 148 f. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Engenharia Metalúrgica e de Minas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- 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. The influence of UV light on collagen/poly(ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, p. 305-312, 2006.
- SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C.; WESS, T. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 795-801, 2004.

SPERLING, L.H. **Introduction to physical polymers science**. New Jersey: John Wiley, 2006. 845 p.

SUN, B.; SPRANGER, I. Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 2, p. 59-89, 2005.

TAYLOR, L. R.; PAPP, R. B.; POLLARD, B. D. **Instrumental methods for determining elements**. New York: VCH, 1995. 541 p.

UGWOKE, M. I.; KINGET, R. Influence of processing variables on the properties of gelatin microspheres prepared by the emulsification solvent extraction technique. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, p. 273-281, 1998.

VLIERBERGHE, S. V.; DUBRUEL, P.; SCHACHT, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. **Biomacromolecules**, v. 12, p. 1387–1408, 2011.

WATANABE, K.; NISHIO, Y.; MAKIURA, R.; NAKAHIRA, A.; KOJIMA, C. Paclitaxel-loaded hydroxyapatite/collagen hybrid gels as drug delivery systems for metastatic cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, p. 81–86, 2013.

YANG, X.; GUO, L.; FAN, Y.; ZHANG, X. Preparation and characterization of macromolecule cross-linked collagen hydrogels for chondrocyte delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.07.021>> Acesso em: 27 ago 2013.

YANNAS, I. V.; LEE, E.; ORGILL, D. P. Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86 p. 933–937, 1989.

ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine limed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, p. 23-28, 2005.