Murilo Álison Vigilato Rodrigues

**Biomateriais de quitosana/gelatina com resina de jatobá:
influência do grau de acetilação da quitosana e da inclusão
da resina**

Versão corrigida

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

Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Prof. Dr. Ana Maria de Guzzi
Plepis

São Carlos
2016

À minha família.

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o incentivo, torcida e luta que tornaram possível minha formação, em especial à minha mãe por todo seu apoio.

À Prof. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pelo conhecimento e tempo dedicados em minha orientação e pela oportunidade de aprendizagem oferecida.

À Dra. Virginia C. A. Martins, pelos ensinamentos, conselhos e ajuda oferecidos e à Dra. Marília M. Horn, pela ajuda nas muitas etapas da pesquisa, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Valcinir A. Scalla Vulcani, pela doação da resina de jatobá.

Aos professores Dr. Éder T. G. Cavalheiro e Dra. Agnieszka Joanna Pawlicka Maule, por ceder os equipamentos de análise térmica para os ensaios de termogravimetria, bem como à Dra. Ana Paula G. Ferreira e ao Dr. Rodrigo C. Sabadini, pela ajuda nas análises

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho, por ceder o equipamento utilizado na determinação das massas molares da quitosana e ao doutorando Danilo M. dos Santos, por sua ajuda nas medidas.

À Prof. Dra. Marcia Nitschke, por disponibilizar o laboratório para os ensaios de atividade antimicrobiana e à doutoranda Crisiane A. Marangon, por sua ajuda nas análises.

Aos companheiros do Grupo de Bioquímica e Biomateriais, pelos bons momentos de risadas e pelo ótimo ambiente de trabalho.

Aos técnicos da Central de Análises Químicas Instrumentais, professores, bibliotecárias, funcionários do serviço de pós-graduação e demais funcionários do Instituto de Química de São Carlos, por toda a assistência oferecida.

Aos amigos Tatiana, Luciano, Thiago, Luis Fernando, Nayana, Lecy, entre outros, pelo apoio e torcida na realização deste trabalho, com atenção especial ao Francisco, pelos conselhos, incentivos e torcida durante esta etapa.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

E a todos que torceram e contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

Há escolas que são gaiolas e há escolas que são asas.

Escolas que são gaiolas existem para que os pássaros desaprendam a arte do voo.

Pássaros engaiolados são pássaros sob controle. Engaiolados, o seu dono pode levá-los para onde quiser. Pássaros engaiolados sempre têm um dono. Deixaram de ser pássaros. Porque a essência dos pássaros é o voo.

Escolas que são asas não amam pássaros engaiolados. O que elas amam são pássaros em voo. Existem para dar aos pássaros coragem para voar. Ensinar o voo, isso elas não podem fazer, porque o voo já nasce dentro dos pássaros. O voo não pode ser ensinado. Só pode ser encorajado.

Rubem Alves

RESUMO

RODRIGUES, Murilo Álison Vigilato. **Biomateriais de quitosana/gelatina com resina de jatobá: influência do grau de acetilação da quitosana e da inclusão da resina.** 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

A blenda quitosana/gelatina, composta por polímeros atóxicos e biodegradáveis, é indicada para uso na área de biomateriais, inclusive por auxiliar na cicatrização. O grau médio de acetilação ($\overline{GA}$) da quitosana, definido como o número médio de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc), é um parâmetro que afeta suas interações inter e intramoleculares e, portanto, suas propriedades. É comum incorporar compostos a filmes de quitosana para melhora de suas propriedades, contudo, não há relatos da inclusão da resina de jatobá, composto natural com potencial atividade biológica. Esta pesquisa buscou estudar a influência do $\overline{GA}$ da quitosana e da inclusão da resina de jatobá sobre propriedades de filmes de quitosana/gelatina, visando aplicações em cicatrização de feridas cutâneas. Foram produzidas três amostras de quitosana a partir da N-desacetilação termoquímica de β -quitina extraída de gládios de lulas (*Loligo* spp.), as quais apresentaram diferentes $\overline{GA}$ ($7\% \leq \overline{GA} \leq 35\%$). As blendas foram preparadas pela mistura de uma solução 1% de quitosana (em ácido acético 1%) com uma solução de gelatina 2% (em água) na razão 9:1 sob agitação mecânica constante. As amostras com resina foram preparadas pela adição de uma solução etanólica da resina à blenda sob agitação mecânica constante. As blendas foram caracterizadas por ensaios reológicos e atividade antibacteriana. A concentração bactericida mínima (CBM) contra *Staphylococcus aureus* diminuiu com a redução no $\overline{GA}$ da quitosana, de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\overline{GA}$ 35%) para $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\overline{GA}$ 7%), efeito observado também na amostra de menor $\overline{GA}$ com adição da resina, para o qual a CBM foi de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apesar do provável efeito sinérgico da resina, isoladamente esta não apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações estudadas ($1,9$ a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Após inclusão da resina, a viscosidade dinâmica diminuiu para as soluções com maiores valores de $\overline{GA}$ e aumentou para a amostra com $\overline{GA}$ 7%. Para produzir os filmes, as blendas foram desaeradas, vertidas sobre moldes de Teflon e secas em fluxo de ar. Estes foram caracterizados por microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de absorção na região do infravermelho, termogravimetria, medidas de grau de intumescimento, espessura, solubilidade e permeação de vapor de água. Os filmes apresentaram uma superfície lisa para as blendas quitosana/gelatina e morfologia rugosa após adição da resina. A adição de resina também reduziu a estabilidade térmica dos filmes. Nos testes de absorção, o aumento no $\overline{GA}$ levou a valores de intumescimento cerca de duas vezes maiores para os filmes com $\overline{GA}$ 35%, comparado com as amostras de menor $\overline{GA}$. A adição de resina e o processo de neutralização reduziram o intumescimento dos filmes. A redução no $\overline{GA}$ e a inclusão da resina tanto aumentaram a permeação dos filmes ao vapor de água, quanto levaram a uma redução de sua solubilidade. Os biomateriais se mostraram bons candidatos a testes em aplicações cutâneas, apresentando atividade bactericida, baixa solubilidade e capacidade de intumescer e de realizar troca gasosa.

Palavras-chave: Quitosana; Gelatina. Resina de jatobá. Biomaterial.

ABSTRACT

RODRIGUES, Murilo Álison Vigilato. **Chitosan-gelatin biomaterials with jatoba resin: influence of the degree of acetylation of chitosan and inclusion of resin.** 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

Blending chitosan and gelatin, two biodegradable and non-toxic polymers, is a remarkable choice for use in biomaterials development, mainly in reason of their ability to contribute to the process of wound healing. The average degree of acetylation ($\overline{DA}$) of chitosan, defined as the average number of 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranose (GlcNAc) units in the polymer chain, is a parameter that affects the inter and intramolecular interactions of this polymer and, therefore, several of its properties. It is common the incorporation of other compounds to chitosan films to improve their properties. However, there are no reports of the incorporation of jatoba resin, a natural compound with potential biological activity to these films. This research aimed to study the influence of the $\overline{DA}$ of chitosan and the inclusion of the jatoba resin on the properties of chitosan/gelatin films, with potential applications in wound healing. Three samples of chitosan were produced from the thermochemical *N*-deacetylation of β -chitin extracted from squid pens (*Loligo* spp.), which presented different $\overline{DA}$ ($7\% \leq \overline{DA} \leq 35\%$). The chitosan-gelatin film-forming solutions were prepared by mixing a 1% chitosan solution (1% acetic acid) with a 2% gelatin solution (in water) at the ratio 9:1 under constant mechanical stirring. The samples with addition of resin were prepared adding an ethanolic solution of resin under constant mechanical stirring. Blends were characterized by rheological and antimicrobial activity assays. The minimum bactericidal concentration (MBC) against *Staphylococcus aureus* decreased with the reduction in chitosan $\overline{DA}$, from $62.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (35% $\overline{DA}$) to $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (7% $\overline{DA}$), effect also observed with the sample of smaller $\overline{DA}$ after resin addition, with a MBC of $15.6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Despite the probable synergistic effect of resin, singly it did not present antibacterial activity at the studied concentrations (1.9 to $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). Rheological tests showed that after resin inclusion the dynamic viscosity decreased for samples with higher values of $\overline{DA}$ while increased for the sample with 7% $\overline{DA}$. Films were produced by deaeration and dried in Teflon molds under airflow. Films were characterized by scanning electron microscope, infrared spectroscopy, thermogravimetry, solubility, permeation to water vapor and degree of swelling. The films presented a smooth surface and a rough morphology after addition of the resin. The addition of jatoba resin also led to the reduction in thermal stability of the films. The increase in $\overline{DA}$ of chitosan resulted in swelling values. The resin addition and the neutralization process considerably decreased the swelling degree of the films. Both the reduction in $\overline{DA}$ and the inclusion of resin increased the water vapor permeation, while led to a reduction in the solubility of these materials. The biomaterials showed to be good candidates to be tested in skin wound healing applications, presenting bactericidal activity, considerable swelling degree, ability to perform gas exchange and low solubility.

Keywords: Chitosan. Gelatin. Jatoba resin. Biomaterial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas da quitina e quitosana.....	15
Figura 2 – Estruturas da (a) α -quitina e (b) β -quitina.....	17
Figura 3 – Gládios de lulas do gênero <i>Loligo</i>	17
Figura 4 – Representação do processo de obtenção da gelatina a partir das fibras de colágeno e seu processo de gelificação.....	22
Figura 5 – Representação do complexo eletrolítico formado entre quitosana e gelatina. Em destaque estão os grupos NH_3^+ da quitosana e os grupos COO^- da gelatina.....	23
Figura 6 – Fotografia digital da resina de jatobá.....	26
Figura 7 – Representação da estrutura química do isopreno.....	27
Figura 8 – Representação da estrutura química do ácido copálico.....	27
Figura 9 – Ilustração da pele humana e seus componentes.	28
Figura 10 – Ilustração representando o as etapas do processo de cicatrização.	29
Figura 11 – Representação do processo de obtenção das amostras de quitosana com diferentes GA.....	34
Figura 12 – Amostras de quitosana de baixo (QB), médio (QM) e alto (QA) GA	45
Figura 13 – Curvas de titulação condutimétrica para as amostras QB (A), QM (B) e QA (C).	47
Figura 14 – Espectro de RMN ^1H para as amostras QA (—), QM (—) e QB (—).....	49
Figura 15 – Monômero da quitosana com destaque para a numeração dos H detectados por RMN ^1H	49
Figura 16 – Curva de viscosidade reduzida em função da concentração das soluções de quitosana da amostra QB.....	50
Figura 17 – Extrato etanólico da resina de jatobá.	52
Figura 18 – Espectro de absorção na região do infravermelho da resina de jatobá purificada.....	52
Figura 19 – Espectro de absorção na região do infravermelho da gelatina.....	54
Figura 20 – Soluções de QM, QMG e QMGR.	54
Figura 21 – G' e G'' em função da temperatura para: QBGR (● G' e ○ G''); QMGR (● G' e ○ G'') e QAGR (● G' e ○ G'').....	55
Figura 22 – Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras: QB (▲), QM (▲) e QA (▲).....	57

Figura 23 – Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras: QM (▲), QMG (■) e QMGR (●).....	57
Figura 24 – Determinação da CIM para a amostra QBGR contra <i>S. aureus</i>	60
Figura 25 – Filmes de quitosana/gelatina não neutralizados: secos (acima) e hidratados (abaixo).....	61
Figura 26 – Espectro de absorção no infravermelho das amostras QM (—), QMG (—) e QMGR (—).	63
Figura 27 – Espectro de absorção no infravermelho das amostras QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—).....	63
Figura 28 – Fotomicrografias dos filmes não neutralizados QBGR (A), QMGR (B), QAGR (C) e QMG (D), todas com um aumento de 1000x.	65
Figura 29 – Curvas termogravimétricas das amostras QA (—), QM (—) e QB (—) com suas respectivas derivadas (em tracejado).	66
Figura 30 – Curvas termogravimétricas dos filmes QAG (—), QMG (—) e QBG (—) neutralizados com suas respectivas derivadas (em tracejado).	66
Figura 31 – Curvas termogravimétricas dos filmes QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—) neutralizados com suas respectivas derivadas (em tracejado).	67
Figura 32 – Curvas termogravimétricas para resina de jatobá (—), gelatina (—) e QB (—) com suas respectivas derivadas (em tracejado).	67
Figura 33 – Curvas de intumescimento dos filmes QAG (—), QMG (—) e QBG (—) previamente neutralizados.	71
Figura 34 – Curvas de intumescimento dos filmes QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—) previamente neutralizados.	71
Figura 35 – Curvas de intumescimento dos filmes QAG (—), QMG (—) e QBG (—) não neutralizados.	72
Figura 36 – Curvas de intumescimento dos filmes QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—) não neutralizados.	73
Figura 37 – Filmes imersos por 72 h a 37°C em tampão ácido acético/acetato de sódio (pH 5,15).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores das variáveis utilizadas na determinação das M_v das amostras de quitosana.....	51
Tabela 2 – Temperatura de gelificação ($G' = G''$) para os géis de quitosana, quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/resina de jatobá.....	56
Tabela 3 – Valores das variáveis η_0 , η_∞ , k e m do modelo de Cross para as amostras.....	58
Tabela 4 – Valores médios de espessura dos filmes (mm).	62
Tabela 5 – Perdas de massa em percentagem para a resina de jatobá, a gelatina, as amostras de quitosana e os filmes.	68
Tabela 6 – Temperaturas de início da degradação (T_{onset}) para a resina de jatobá e os filmes.	70
Tabela 7 – Valores de permeação ao vapor de água a 25°C para os filmes.	74
Tabela 8 – Valores de solubilidade em água após 24 h (37°C) para os filmes.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

CBM – concentração bactericida mínima

CIM – concentração inibitória mínima

DMSO – dimetilsulfóxido

FT-IR – espectroscopia de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier

GA – grau de acetilação

GlcN – 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranoose

GlcNAc – 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose

MEV – microscopia eletrônica de varredura

MTT – brometo de tetrazolium

PBS – tampão fosfato salino

PV – permeação ao vapor de água

QA – quitosana de alto grau de acetilação

QAG – quitosana de alto grau de acetilação com gelatina

QAGR – quitosana de alto grau de acetilação com gelatina e resina de jatobá

QB – quitosana de baixo grau de acetilação

QBG – quitosana de baixo grau de acetilação com gelatina

QBGR – quitosana de baixo grau de acetilação com gelatina e resina de jatobá

QM – quitosana de médio grau de acetilação

QMG – quitosana de médio grau de acetilação com gelatina

QMGR – quitosana de médio grau de acetilação com gelatina e resina de jatobá

RMN ^1H – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

TG – termogravimetria

T_{onset} – temperatura de início da degradação térmica

TPV – taxa de permeação ao vapor de água

TSYEA – ágar extrato de levedura triptona de soja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	QUITOSANA.....	14
1.1.1	<i>Influência do GA da quitosana sobre suas propriedades.....</i>	<i>18</i>
1.2	GELATINA.....	21
1.3	BLENDA QUITOSANA/GELATINA.....	22
1.4	RESINA DE JATOBÁ.....	25
1.5	MATERIAIS PARA CICATRIZAÇÃO CUTÂNEA.....	28
2	OBJETIVOS.....	32
3	PARTE EXPERIMENTAL	33
3.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA	33
3.2	RESINA DE JATOBÁ.....	34
3.3	GELATINA.....	35
3.4	PREPARAÇÃO DOS FILMES	35
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS E GÉIS	36
3.5.1	<i>Determinação do grau médio de acetilação da quitosana.....</i>	<i>36</i>
3.5.2	<i>Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana.....</i>	<i>37</i>
3.5.3	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) dos materiais.....</i>	<i>39</i>
3.5.4	<i>Estudo reológico dos géis</i>	<i>39</i>
3.5.5	<i>Teste de atividade antimicrobiana dos géis e da resina de jatobá.....</i>	<i>40</i>
3.6	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	41
3.6.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR)</i>	<i>41</i>
3.6.2	<i>Medidas de espessura</i>	<i>42</i>
3.6.3	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura</i>	<i>42</i>
3.6.4	<i>Termogravimetria</i>	<i>42</i>
3.6.5	<i>Ensaio de intumescimento</i>	<i>42</i>
3.6.6	<i>Permeação ao vapor de água</i>	<i>43</i>
3.6.7	<i>Solubilidade em água.....</i>	<i>44</i>
3.6.8	<i>Análise estatística</i>	<i>44</i>
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45

4.1	OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE QUITOSANA	45
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS MATERIAIS.....	46
4.2.1	<i>Determinação do grau de acetilação da quitosana</i>	<i>46</i>
4.2.2	<i>Determinação da massa molar média viscosimétrica da quitosana</i>	<i>50</i>
4.2.3	<i>Resina de jatobá</i>	<i>52</i>
4.2.4	<i>Gelatina</i>	<i>53</i>
4.3	ESTUDO REOLÓGICO	54
4.4	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	59
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES.....	61
4.5.1	<i>Espectroscopia de absorção na região do infravermelho.....</i>	<i>62</i>
4.5.2	<i>Microscopia eletrônica de varredura</i>	<i>64</i>
4.5.3	<i>Termogravimetria</i>	<i>65</i>
4.5.4	<i>Intumescimento</i>	<i>70</i>
4.5.5	<i>Permeação ao vapor de água</i>	<i>73</i>
4.5.6	<i>Solubilidade em água.....</i>	<i>76</i>
5	CONCLUSÃO	79
6	REFERÊNCIAS*	80

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de ciências da saúde, sobretudo no último século, aumentou a expectativa de vida humana, fator que, juntamente com o contínuo aumento da população mundial tem justificado a necessidade de se desenvolver dispositivos que melhorem a qualidade de vida. Em vista deste fato, é indispensável a busca por novos biomateriais, isto é, substâncias isoladas ou sistemas compostos que possam ser usados na elaboração de dispositivos para fins terapêuticos com propriedades específicas a cada uso.¹

Biomateriais podem possuir tanto origem sintética quanto natural, contudo, uma vantagem de diversos biomateriais de origem natural é sua bioatividade, biocompatibilidade e o fato de não liberarem produtos citotóxicos durante sua degradação.¹ Um biomaterial de origem natural com diversas aplicações é a quitosana, um polissacarídeo encontrado em pequena quantidade em fungos ou obtido a partir da quitina, polímero encontrado em abundância na natureza, por um processo denominado desacetilação.^{2,3}

As aplicações da quitosana dependem de sua massa molar média, de seu grau médio de acetilação ($\overline{GA}$), uma variável relacionada à efetividade do processo de desacetilação da quitina), além da forma como se apresenta, isto é, como gel, fibra, nanopartícula, esponja, membrana, pó ou filme.⁴ Logo, materiais derivados de quitosana terão suas propriedades influenciadas pelas características da quitosana utilizada, pelo método e solvente usados na preparação do filme e pelo uso ou não de outros materiais em sua composição.^{5,6}

Filmes de quitosana costumam apresentar resistência mecânica limitada e pouca elasticidade. Uma alternativa para diminuir a rigidez destes materiais é a inclusão de gelatina, uma proteína animal obtida pela hidrólise parcial do colágeno, que por sua vez é o principal componente da matriz extracelular.^{7,8} Esta blenda polimérica quitosana/gelatina já foi testada no desenvolvimento de *scaffolds* para uso em engenharia de tecidos³, inclusive em formas complexas como protótipos de fígado⁸ ou de vasos sanguíneos⁹. Na forma de filmes, foi testada quanto a suas potenciais aplicações como embalagens comestíveis¹⁰ ou substituta de epiderme humana¹¹, apresentando resultados promissores em todos os casos.

Alguns autores relatam a incorporação de compostos bioativos, isto é, compostos com atividades biológicas como anti-inflamatória ou antioxidante, em filmes de quitosana para a obtenção ou melhora de propriedades. O óleo essencial de alecrim, responsável pela melhora de sua atividade antibacteriana¹² e o carvacrol, terpeno fenólico encontrado no óleo de orégano que não apenas melhora a atividade antimicrobiana deste material, mas também lhe confere atividade antioxidante¹³ são alguns exemplos destes compostos.

A resina de jatobá, comumente utilizada na medicina popular para tratamento de diversas enfermidades, é rica em terpenos, uma classe de compostos que podem apresentar distintas atividades, dentre elas, bactericida e anti-inflamatória. Contudo, na literatura não são encontrados relatos de estudos sobre o efeito da incorporação na matriz polimérica de resina de jatobá, um material produzido pelas árvores do gênero *Hymenaea* composto principalmente de diterpenos e sesquiterpenos, substâncias com potenciais atividades biológicas^{14,15}, o que motiva o estudo do efeito de sua incorporação sobre as propriedades de filmes de quitosana/gelatina.

1.1 Quitosana

Quitosana e quitina são polímeros lineares compostos por unidades 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) e 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) conectadas por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. Estes polissacarídeos se distinguem pela porção relativa de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (Figura 1), parâmetro denominado $\overline{GA}$. Quanto à sua massa molar, podem ser classificados como de baixa massa molar (< 50 kDa), de média massa molar (entre 50 e 150 kDa) ou de alta massa molar (> 150 kDa).^{16,17}

Figura 1 – Estruturas químicas da quitina e quitosana.

Fonte: Autoria própria.

A quitina é o principal constituinte do exoesqueleto de várias espécies, dentre elas diversos insetos e crustáceos, servindo nestes organismos como um material estrutural. Também é encontrada em paredes celulares de fungos e em moluscos, chegando ao posto de segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, menos abundante apenas que a celulose.¹⁸ Justamente por ser um polímero de origem natural, suas características e, consequentemente, de seu derivado quitosana, são influenciadas por sua fonte, sazonalidade e local de coleta. Geralmente a quitina é obtida a partir de resíduos da indústria pesqueira, e portanto, seu uso pode ainda ser considerado uma forma de redução do impacto ambiental causado por seu acúmulo.^{16,18}

Para o mercado mundial de quitosana, que em 2015 se estima ter movimentado 2,8 bilhões de dólares, se prevê um cenário favorável de crescimento nos faturamentos. A empresa de pesquisa de mercado e consultoria de gestão Global Market Insights, Inc. prevê que em 2024 esse mercado esteja movimentando cerca de 8 bilhões de dólares. Comercialmente, o polímero é empregado no tratamento de água e nas indústrias de cosméticos, de alimentos, agroquímica, biomédica e farmacêutica, tendo sido o uso no tratamento de águas o responsável por 30% do faturamento total em 2015. No tratamento de água é usada para remoção de matéria orgânica e inorgânica, servindo também para remoção de metais pesados em efluentes industriais.¹⁹

Esta previsão de crescimento no faturamento do mercado mundial de quitosana de quase 300% em apenas 9 anos está relacionado, sobretudo, às expectativas de aumento nos rendimentos com a aplicação de quitosana na área de tratamento de águas, em virtude da rápida industrialização e urbanização das nações do BRIC (Brasil, Rússia, Índia e China), e nas áreas biomédica e farmacêutica, para as quais também se projetam grandes expansões de mercado. Nas áreas de biomedicina e farmácia, o polissacarídeo é usado na produção de curativos, devido a suas contribuições para a cicatrização de feridas e como excipiente em medicamentos ou suporte para liberação controlada de fármacos.¹⁹

Apesar da quitina ser solúvel em poucos solventes, a quitosana apresenta solubilidade em soluções diluídas de ácidos orgânicos (devido à protonação dos grupos amino das unidades GlcN), propriedade relacionada à capacidade da quitosana de se apresentar sob diferentes formas, e consequentemente, ser estudada para utilização em uma ampla diversidade de aplicações²⁰, dentre as quais, seu uso na remoção de metais de águas residuárias²¹, na imobilização de enzimas²², no revestimento de alimentos²³ e, sobretudo, em estudos relacionados a biomateriais, como para materiais de usos odontológicos²⁴ ou para regeneração de tecido ósseo²⁵.

Na literatura há o relato de três estruturas polimórficas possíveis para a quitina, α , β e γ (Figura 2), sendo a primeira muito mais abundante e encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como carapaças de caranguejos e camarões, geralmente associada a material inorgânico e proteínas. Já a β -quitina, ocorre na forma de microfibrilas associadas a proteínas em estruturas também resistentes, porém flexíveis. A diferença entre estas duas formas está em seu empacotamento no estado sólido, mais denso na α -quitina devido ao emparelhamento antiparalelo de suas cadeias, o que facilita a ocorrência de ligações de hidrogênio entre as cadeias, enquanto na forma β o emparelhamento é paralelo. Esta diferença de empacotamento confere à β -quitina maior acessibilidade a reagentes, o que resulta em uma maior reatividade e, portanto, maior possibilidade de obtenção de derivados completamente modificados.^{16,26,27}

Figura 2 – Estruturas da (a) α -quitina e (b) β -quitina.

Fonte: Adaptado de RINAUDO, M., 2006²⁸, p. 606.

A γ -quitina é considerada como sendo formada por um arranjo intermediário entre os observados nas formas α e β , ou ainda, como uma simples distorção destas formas. Em lulas do gênero *Loligo* spp., a β -quitina é um dos principais constituintes dos gládios (Figura 3), enquanto a α -quitina compõe uma camada sobre as paredes do estômago e do esôfago e a γ -quitina compõe uma cutícula que recobre áreas do estômago diferentes das regiões onde se encontra a α -quitina.²⁰

Figura 3 – Gládios de lulas do gênero *Loligo* spp..

Fonte: NATURA MEDITERRANEO, 2016.²⁹

É comum a produção de filmes de quitosana pelo método de *casting*, no qual o polímero é solubilizado em solução diluída de ácido e seco em algum molde, contudo, estes filmes necessitam de um posterior processo de neutralização para remoção dos resíduos do ácido orgânico, uma vez que estes podem contribuir com alguma citotoxicidade. Além disso, a remoção de acetato da quitosana recupera os grupos amino do polímero, tornando-o mais hidrofílico e, portanto, melhora sua capacidade de adesão celular.^{18,30}

A quitosana pode ser metabolizada por certas enzimas humanas, com destaque para a lisozima, sendo, portanto, considerada biodegradável. É também reconhecida por intensificar as funções de algumas células do processo inflamatório, como macrófagos, fibroblastos e leucócitos e por permitir a adesão celular (devido a sua semelhança estrutural com os glicosaminoglicanos, componente principal da matriz extracelular), portanto, também auxilia no avanço do processo de cicatrização.^{11,18,31}

1.1.1 Influência do $\overline{GA}$ da quitosana sobre suas propriedades

Como o $\overline{GA}$ da quitosana expressa a quantidade média de unidades GlcNAc ao longo das cadeias poliméricas, este parâmetro influencia também as interações inter e intramoleculares no polímero, o que resulta em mudanças em diversas de suas propriedades, dentre elas sua cristalinidade quando em estado sólido. Trung et al.³² reportaram para amostras de quitosana, tanto na forma de pó quanto como filme, maiores índices de cristalinidade com a redução dos valores de $\overline{GA}$ destes materiais, efeito também reportado por Ziani et al.⁶

As propriedades mecânicas de qualquer polímero são dependentes, dentre outros fatores, de sua massa molar e cristalinidade. Uma vez que o $\overline{GA}$ da quitosana é uma característica estrutural que influencia diretamente a cristalinidade, este também influenciará diretamente as propriedades mecânicas dos filmes produzidos com estes polímeros. Trung et al.³² e Wenling et al.³³ relatam, inclusive, melhora nas propriedades mecânicas dos filmes de quitosana em função da redução no valor do $\overline{GA}$, uma vez que este fato é acompanhado de um ganho de cristalinidade no polímero, o que aumenta o número de ligações de hidrogênio intermoleculares e, portanto, a resistência mecânica.³²

O intumescimento, ou capacidade de absorção de água é outra propriedade dos filmes de quitosana influenciada pela variação de cristalinidade deste polímero decorrente de mudanças em seu $\overline{GA}$. O aumento da cristalinidade destes filmes que resulta da redução do $\overline{GA}$ da quitosana leva à formação de filmes com uma estrutura mais organizada e, portanto, mais compacta, o que reduz o volume disponível para acomodação de moléculas de água e, portanto, seu intumescimento. Por outro lado, quando se analisa a capacidade de absorção de

gordura ou de compostos negativamente carregados, a redução no $\overline{GA}$ reforça estas propriedades, já que leva ao aumento no número de grupos positivamente carregáveis na macromolécula, grupos com os quais estes compostos opostamente carregados deverão interagir.^{32,33}

A tensão superficial é uma propriedade fundamental para mensurar a molhabilidade de soluções de revestimento usadas em alimentos e assim avaliar sua aplicabilidade. Para amostras com uma variação no valor de $\overline{GA}$ de cerca de 35%, Ziani et al.⁶ reportam uma redução inferior a 10% nesta propriedade com a redução do $\overline{GA}$, contudo, ressaltam ainda que apesar da pequena diferença na propriedade, a adição de surfactantes, agentes que aumentam a molhabilidade reduzindo a tensão superficial, reduz a medida muito mais efetivamente nas amostras de menor $\overline{GA}$.⁶

Wenling et al.³³ reportam a ausência da influência do $\overline{GA}$ sobre as medidas de ângulo de contato de seus filmes, pois ao avaliar seis amostras com valores de $\overline{GA}$ entre 5 e 30%, os autores encontraram valores de ângulo de contato entre 75 e 80°, sem diferença significativa na medida entre as amostras, o que indica um caráter hidrofílico para os filmes testados. Quanto à permeação de vapor de água, propriedade de interesse no desenvolvimento de filmes para alimentos ou cicatrização de feridas, Ziani et al.⁶ também não observaram influência do $\overline{GA}$ da quitosana sobre a propriedade.

Embora a biodegradabilidade seja uma propriedade da quitosana interessante a aplicações biológicas, muitas vezes é necessário que o material em uso sofra uma lenta metabolização, evitando uma rápida perda de suas funções, como em sistemas de liberação de fármacos. Nestes casos, quitosanas com menor valor de $\overline{GA}$ devem ser preferivelmente adotadas, já que, de acordo com Trung et al.³², a lisozima, principal enzima responsável pela degradação da quitosana, quebra ligações mais rapidamente nas proximidades de unidades N-acetilglicosamina. Além disso, o fato de amostras com menor $\overline{GA}$ intumescerem menos diminui o acesso das enzimas ao polímero, contribuindo para que se observe uma taxa de degradação mais lenta nestas amostras.³²

Além de ser um polímero bioreabsorvível, isto é, apto a ser degradado e eliminado por rotas metabólicas de um organismo sem acúmulo ou efeitos colaterais²⁴, a quitosana apresenta atividade antimicrobiana, principalmente associada à presença de grupos amino protonados das unidades GlcN,

responsáveis pela interação eletrostática com as membranas celulares bacterianas carregadas negativamente. Esta interação pode levar tanto a mudanças na permeabilidade da membrana e posteriores desequilíbrios osmóticos, que inibem o crescimento dos microrganismos, quanto à hidrólise dos peptideoglicanos de sua parede e posterior liberação de seu conteúdo celular, podendo, portanto, ser classificada tanto como bacteriostática quanto como bactericida. Uma vez que a interação eletrostática dos grupos amino da quitosana é um fator fundamental no mecanismo de ação deste polímero frente aos microrganismos, é esperado que a variação do grau médio de acetilação da quitosana leve também a mudanças em sua atividade antimicrobiana, com melhores atividades para amostras mais desacetiladas, isto é, com menores valores de $\overline{GA}$.^{7,17,18}

Chatelet, Damour e Domard³⁴ demonstraram que filmes de quitosana não apresentaram citotoxicidade frente a fibroblastos ou queratinócitos, independentemente de seu $\overline{GA}$. Os autores ainda citam outros estudos nos quais são comprovadas a biocompatibilidade da quitosana frente a células endoteliais e epiteliais miocárdicas, hepatócitos, condrócitos e, inclusive, a compatibilidade com humanos e demais mamíferos por ensaios in vivo.

Apesar da variação do $\overline{GA}$ da quitosana não interferir na citotoxicidade deste polímero, Chatelet, Damour e Domard³⁴ relatam que maiores valores de $\overline{GA}$ diminuem a adesão celular de queratinócitos e fibroblastos, ressaltando ainda que a capacidade de adesão de fibroblastos em filmes de quitosana é duas vezes maior que a capacidade de adesão de queratinócitos, o que deve estar ligado a uma maior carga negativa nas membranas celulares dos fibroblastos.

Wenling et al.³³ e Chatelet, Damour e Domard³⁴ demonstraram que quitosanas com menores valores de $\overline{GA}$ promovem uma proliferação celular mais eficiente, tanto para células de Schwann (células responsáveis pela produção de mielina, substância envoltórias dos axônios de neurônios e responsável por seu isolamento elétrico) quanto para queratinócitos. Chatelet, Damour e Domard³⁴ ainda comentam que a mesma influência do $\overline{GA}$ foi encontrada por outros autores sobre a proliferação celular de outras células. Contudo, fibroblastos, células que aderem mais fortemente a estes filmes não apresentaram proliferação. Buscando compreender melhor o mecanismo de promoção da proliferação celular pelo polímero, Wenling et al.³³ avaliaram o efeito do $\overline{GA}$ da quitosana sobre a adsorção de

fibronectina e laminina, glicoproteínas com importante papel no processo de diferenciação, migração e adesão celular. Após não observarem influência do $\overline{GA}$ sobre a adsorção destas substâncias, os autores sugeriram que o teor de grupos amino no polímero deve estar influenciando diretamente a formação de complexos com fatores de crescimento e outros componentes do soro no qual o teste é feito, o que por fim resulta em mudanças na proliferação celular com a variação do $\overline{GA}$. Quanto ao fato dos fibroblastos não se proliferarem sobre os filmes de quitosana, Chatelet, Damour e Domard³⁴ sugerem que a alta capacidade de adesão das células ao filme polimérico deve estar ligada à citoestaticidade do material, que não permite às células ter a mobilidade necessária para sua proliferação. Portanto, os autores concluem indicando que para aplicações onde se visa o crescimento de fibroblastos, a quitosana seja combinada com outros materiais, como colágeno.

1.2 Gelatina

Gelatina é uma proteína obtida por meio da hidrólise do colágeno (Figura 4), proteína fibrosa e insolúvel encontrada principalmente em ossos, tendões e pele produzidos como resíduo do abate e processamento de animais. Pode ser classificada em tipo A ou B, em função do tratamento utilizado na sua produção ter sido ácido ou alcalino, respectivamente. É constituída por 18 diferentes aminoácidos, organizados em blocos flexíveis, tríades contendo sempre uma glicina na posição do terceiro aminoácido, e blocos rígidos, compostos por uma sequência de hidroxiprolina, prolina e glicina, apresentando uma estreita distribuição de massa molar.^{7,35}

Figura 4 – Representação do processo de obtenção da gelatina a partir das fibras de colágeno e seu processo de gelificação.

Fonte: Adaptado de NITTA GELATIN INC., 2016³⁶.

Uma das características de destaque da gelatina é sua capacidade de formar géis por meio do resfriamento de soluções previamente aquecidas desta proteína. Como a gelatina é obtida pela ruptura de diversas ligações entre as cadeias de colágeno, sugere-se que após o aquecimento de soluções deste polímero, ocorra uma reordenação de sua rede polimérica durante seu resfriamento, gerando pequenas regiões ordenadas que levam à formação de uma rede tridimensional altamente ramificada com alta retenção de água. Ademais, a gelatina é um material hidrossolúvel, capaz de formar filmes com propriedades mecânicas aceitáveis, biocompatível, biodegradável, de baixo custo e que contribui para a adesão, migração, diferenciação e proliferação celular.^{3,35}

Comercialmente, a gelatina é principalmente empregada na indústria de alimentos, na clarificação e estabilização de bebidas, produção de *marshmallows* e, também, adicionada a alimentos, tortas, pães, bolos, embutidos, geleias, entre outros. Contudo, a indústria farmacêutica também contribui consideravelmente para seu consumo, empregando a gelatina na fabricação de cápsulas e emulsões.³⁵

1.3 Blenda quitosana/gelatina

Nas moléculas de gelatina estão presentes grupos carboxílicos que tendem a interagir com os grupos amino protonados da quitosana pela formação de

interações eletrostáticas, formando um complexo polieletrólítico (Figura 5). As vantagens deste sistema incluem o aumento na permeação a vapor de água e melhoras na atividade biológica do material, já que estão presentes na gelatina sequências de aminoácidos arginina-glicina-aspartato, reconhecidas por promover a adesão e migração celular.^{3,10} Yang e colaboradores¹¹ afirmam, inclusive, que a blenda quitosana/gelatina estimula as sínteses de componentes do tecido conectivo e da matriz extracelular como ácido hialurônico, sulfato de condroitina e sulfato de queratina pela incorporação dos monômeros resultantes de sua degradação enzimática, e portanto, é um material indicado para aplicações envolvendo regeneração tecidual.

Figura 5 – Representação do complexo eletrólítico formado entre quitosana e gelatina. Em destaque estão os grupos NH_3^+ da quitosana e os grupos COO^- da gelatina.

Fonte: Autoria própria.

A blenda quitosana/gelatina apresenta diversas aplicações, sendo principalmente estudada em usos nas áreas de biomateriais e de alimentos. Seu uso na área de alimentos é comumente relacionado à conservação de alimentos. Sua utilização na cobertura de carne bovina foi estudada comparando seu desempenho com as misturas de quitosana com goma guar e quitosana com alginato, tendo sido relatado os melhores resultados para a mistura quitosana/gelatina, com redução no crescimento microbiano de cerca de 70% após sete dias em estoque a 4°C.³⁷

Buscando desenvolver um filme comestível para preservação de alimentos, Gómez-Estaca et al.³⁸ avaliaram a atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais, reconhecendo o óleo de cravo como agente de maior ação antibacteriana dentre os avaliados. Em seguida, os autores elaboraram filmes de quitosana/gelatina com o óleo e analisaram a viabilidade de sua utilização na conservação de peixe congelado, relatando a preservação da ação bactericida do óleo e, portanto, a potencial aplicabilidade do material.

Na área de biomateriais esta blenda polimérica já foi estudada na elaboração de suportes tridimensionais porosos e biocompatíveis (*scaffolds*) utilizando técnicas como impressão 3D³⁹ e eletrofiação⁴⁰, bem como pelo convencional método de liofilização³. As vantagens do uso combinado destes polímeros sobre o uso isolado da quitosana na elaboração de *scaffolds* incluem o ganho de propriedades mecânicas⁴⁰, bem como a redução no tamanho de poros, o aumento na taxa de degradação do material e a melhora na adesão e proliferação celular³. Lan et al.⁴¹ elaboraram *scaffolds* de quitosana extraída de pupas do bicho-da-seda com gelatina reticulados com taninos e avaliaram seu efeito hemostático, relatando para o material uma alta taxa de adsorção de líquidos, ausência de citotoxicidade, além de sua completa degradação quando aplicado na forma de implante subcutâneo, promovendo angiogênese e, portanto, sendo indicado como um excelente agente hemostático.

Outros biomateriais já foram desenvolvidos com a mistura quitosana/gelatina, como micropartículas usadas na confecção de comprimidos mucoadesivos para liberação controlada de fármacos⁴², para as quais foi observado um papel fundamental da gelatina no controle da liberação do medicamento. Há também relatos de seu uso na fabricação de filmes com adição de nanohidroxiapatita para aplicações em defeitos periodontais⁴³ ou com nanopartículas de prata, para controle microbiano⁴⁴.

Nagahama et al.⁴⁵ obtiveram filmes laminares da mistura quitosana/gelatina ao utilizar um hidrogel de quitosana para sua produção, relatando ganho de resistência mecânica e elasticidade para os filmes em comparação à quitosana tanto em medidas com os materiais secos quanto hidratados. Este ganho de elasticidade dos filmes com a inclusão da gelatina na matriz polimérica foi

relatado também por Hosseini et al.¹⁰ e Pereda et al.⁷, tendo os últimos relatado também o aumento na atividade antimicrobiana dos filmes.

Biomateriais desenvolvidos com a blenda quitosana/gelatina já demonstraram, inclusive, auxiliar no processo de cicatrização de feridas^{11,46}. Esponjas de quitosana e quitosana/gelatina com e sem curcumina foram testadas em feridas de coelhos, favorecendo os processos de cicatrização tanto pela formação da blenda com a gelatina quanto pela inclusão da curcumina, indicando ainda um ganho na capacidade de liberação da curcumina com a inclusão da gelatina⁴⁶. Yang et al.¹¹ elaboraram filmes de quitosana/gelatina com e sem queratinócitos humanos e avaliaram seu desempenho como uma epiderme alogênica para uso em regiões doadoras de enxertos de pele parciais (espessura próxima a 30 μm), regiões sujeitas à formação de cicatrizes hipertróficas. Os resultados indicaram que tanto a formação da blenda quanto a inclusão de uma camada de queratinócitos favorecem o processo de cicatrização das regiões doadoras, reduzindo até a um terço o tempo de fechamento da lesão e diminuindo a formação de cicatrizes hipertróficas, as quais podem apresentar um comprometimento das funções da região afetada.

A influência do $\overline{GA}$ da quitosana sobre as propriedades de microcápsulas de quitosana/gelatina com óleo essencial foram estudadas por Hussain, Iman e Maji⁴⁷, que relataram ganho na eficiência de incorporação do óleo e em sua posterior liberação, bem como redução no intumescimento com a redução no valor do $\overline{GA}$. Liu et al.⁴⁸ produziram filmes de quitosana/gelatina com três diferentes valores de $\overline{GA}$ da quitosana, observando que para as soluções formadoras de filmes com menor valor de $\overline{GA}$ interações mais fortes eram notadas por meio dos resultados dos ensaios reológicos, revelando módulos elástico e viscoso maiores. Os autores viram ainda que melhores propriedades mecânicas são observadas com a redução no $\overline{GA}$, como aumento da resistência à tração e da elasticidade.

1.4 Resina de jatobá

A resina de jatobá (Figura 6), também conhecida popularmente como jutaicica, é o exsudato produzido pelas raízes, tronco, vagens e folhas de árvores do gênero *Hymenaea*, gênero com cerca de quinze espécies localizadas entre as

Américas Central e do Sul, México e África. No Brasil, as árvores de jatobá são encontradas em regiões de cerrado e caatinga, desde a região Norte ao Sudeste brasileiro.^{15,49,50}

Figura 6 – Fotografia digital da resina de jatobá.

Fonte: Adaptado de Doménech-Carbó et al., 2009¹⁴, p. 82.

É comum o uso na medicina popular de cascas, flores e resina de jatobá, sendo a casca, por exemplo, utilizada no tratamento de problemas respiratórios, inflamações, dores no estômago, no peito e na coluna. Já a resina é indicada para o tratamento de bronquites e para cicatrização de feridas, sobretudo quando empregada na forma de emplasto. Industrialmente, a madeira do jatobá é utilizada tanto na fabricação de móveis quanto na construção civil, já sua resina é empregada na produção de vernizes e incenso.^{51,52}

Apesar da composição desta resina variar de acordo com a espécie, sazonalidade, local de plantio e órgão de extração na planta (folhas, raízes, tronco), de forma geral ela é composta por diterpenos e sesquiterpenos, duas classes de terpenos. Os terpenos são metabólitos secundários encontrados em óleos essenciais, resinas e tecidos de plantas e alguns microrganismos, sendo formados pelo arranjo linear ou cíclico de unidades de isopreno (Figura 7), molécula com fórmula química C_5H_8 . Enquanto sesquiterpenos são formados pela união de três unidades de isopreno, apresentando fórmula molecular $C_{15}H_{24}$, os diterpenos são formados por 20 carbonos, unindo quatro unidades isopreno. Em árvores do gênero *Hymenaea*, sesquiterpenos são encontrados principalmente na resina produzida por suas folhas, o que resulta em materiais mais fluidos, enquanto a resina viscosa produzida pelo tronco e pela vagem é composta principalmente de diterpenóides,

sendo associados por alguns autores principalmente à defesa a predadores, apresentando, por exemplo, função antimicrobiana e de oclusão de feridas.^{49,53}

Figura 7 – Representação da estrutura química do isopreno.

Fonte: Autoria própria.

A resina das espécies *H. martiana* e *H. courbaril*, por exemplo, possuem, além de diterpenos, flavonoides, lipídios, taninos, procianidinas e óleos essenciais.^{50,52} A espécie *H. courbaril* apresenta na composição de sua resina principalmente diterpenos labdânicos, dentre os quais, os ácidos resinosos copálico, eperuico, catívico, labdânico e o ácido labd-13-en-8-ol-15-oico.^{15,54}

Estudos com a seiva de jatobá da espécie *H. courbaril* indicaram atoxicidade para células sadias e efeito antigenotóxico, que pode ser atribuído a uma atividade antioxidante de alguns de seus componentes.⁵² De fato, alguns poucos terpenóides têm sido usados para fins terapêuticos, porém, nas últimas décadas as pesquisas a respeito das atividades destes compostos têm aumentado, revelando para compostos como os labdanos, atividades antibacteriana, anti-inflamatória e anti-tumoral.^{53,55} O ácido copálico (ácido cis/trans labd-8(20),13-dien-15-oico), representado na Figura 8, por exemplo, demonstrou ser atóxico para células normais além de apresentar atividade anti-inflamatória.⁵⁶

Figura 8 – Representação da estrutura química do ácido copálico.

Fonte: Adaptado de Doménech-Carbó et al., 2009¹⁴, p. 83.

1.5 Materiais para cicatrização cutânea

A primeira proteção do corpo humano é a pele (Figura 9), órgão que atua como uma barreira para agentes químicos, físicos e biológicos e é responsável pelo controle da temperatura corpórea, entre outras funções. Quando a pele sofre alguma lesão, como por queimaduras, traumatismos, infecções ou doenças, a perda do revestimento cutâneo pode gerar ao organismo consequências como uma maior suscetibilidade a infecções, redução da capacidade de secreção (fenômeno necessário para o controle da temperatura) ou a perda de outras de suas funções, podendo inclusive levar o indivíduo a óbito.^{57,58}

Figura 9 – Ilustração da pele humana e seus componentes.

Fonte: GoConqr, 2015.⁵⁹

Ferida cutânea é definida como qualquer interrupção na continuidade da estrutura normal da pele. Dentre outras classificações, feridas podem ser classificadas quanto à resposta de cicatrização, em agudas (que curam em semanas) ou crônicas (que levam meses a anos para curar) e quanto à espessura, como superficiais (apenas a epiderme), parciais (derme incompleta) ou totais (derme completa, podendo atingir o tecido subcutâneo).^{60,61}

A cicatrização de lesões é um processo complexo que envolve, além de fatores intrínsecos ao organismo do indivíduo em recuperação (como a facilidade de desenvolver os processos de recrutamento de leucócitos, inflamação, angiogênese,

deposição de colágeno e reepitelização), fatores externos como a temperatura e a umidade.⁶²

Quando a pele é sujeita a pequenas lesões, como em uma incisão superficial, ocorre a morte de um pequeno número de células e uma quebra na sua continuidade, que é rapidamente preenchida por um coágulo e se regenera sem formação de cicatrizes ou perda de função. Nestes casos, a cicatrização é dita por primeira intenção. Contudo, em lesões complexas, como aquelas com perda de extensa área de tecido ou com maior dificuldade de reparo, a regeneração espontânea pode levar a uma recuperação insatisfatória da arquitetura original do tecido, comprometendo suas propriedades e funções, sendo então denominada cicatrização por segunda intenção.⁶³

O processo de cicatrização é descrito por alguns autores como sendo dividido em três fases, inflamatória, proliferativa e de maturação, conforme representado pela Figura 10, contudo, não há de fato uma divisão clara entre o fim de uma destas etapas e o início da outra, pois como o gráfico desta figura mostra, a ocorrência das células agentes em cada estágio se sobrepõe nos limites entre uma etapa e a outra, como é o caso dos macrófagos, importantes agentes na etapa de inflamação que ainda ocorrem em menor proporção no início da proliferação e que já não atuam mais na remodelação.^{60,64}

Figura 10 – Ilustração representando o as etapas do processo de cicatrização.

Fonte: Isaac et al., 2010.⁶⁴

Registros do tratamento de feridas podem ser encontrados desde 3000 anos a.C., contudo, somente a partir da segunda metade do século XX foram conhecidos os benefícios da cicatrização em ambiente úmido, no qual a migração de células epiteliais no leito da ferida se mostrou mais intensa, fator que favorece o fechamento de feridas.⁶⁵

A partir da inclusão do conceito de cicatrização úmida no desenvolvimento de curativos, iniciou-se a produção de uma nova classe destes materiais, a das coberturas “interativas”, que diferem das coberturas “passivas” por não servirem apenas como barreira física. A importância da umidade para o processo de cicatrização está relacionada principalmente ao fato de que o ressecamento da ferida inviabiliza a migração das células epiteliais, que serão as responsáveis pela reconstituição do tecido danificado. Ademais, o ressecamento pode intensificar a sensação de dor, já que durante o ressecamento as terminações nervosas acabam sendo estimuladas. Outra vantagem da cicatrização úmida é a ação de desbridamento autolítico, uma vez que ambientes úmidos estimulam a fagocitose e a fibrinólise, isto é, a degradação da fibrina que compõe os coágulos.^{62,65}

No mercado existem atualmente mais de 2.000 itens para o tratamento de feridas, desde o mais simples curativo, apenas com a função de servir como barreira a agentes externos em uma ferida, como as gazes, soluções para limpeza e até mesmo os curativos mais complexos, denominados “ativos” por interferirem nas fases da cicatrização buscando acelerar a regeneração do tecido danificado. Contudo, a abordagem utilizada no tratamento destas lesões depende, entre outros fatores, da profundidade, tamanho e local da ferida, do tempo em que esta está aberta e da presença ou não de infecção.⁶⁰

Um ambiente favorável à reparação de lesões cutâneas é aquele onde a divisão e a migração celular, bem como a produção de colágeno e a angiogênese são estimuladas, de forma a promover a epitelização e a contração da ferida. Para estimular todos estes processos, além do controle da umidade, a regulação da temperatura e da oxigenação é fundamental, já que estudos demonstraram que um controle da temperatura de feridas em cicatrização na faixa de 37°C pode ser capaz de dobrar a atividade mitótica das células, e que a oclusão de feridas leva a um aumento na angiogênese devido ao fato de a hipóxia (diminuição da taxa de

oxigênio nos tecidos) resultante da oclusão da ferida ser um potente promotor da proliferação capilar. Materiais desenvolvidos para aplicações na área de cicatrização de feridas devem ser planejados levando em consideração possíveis interações alérgicas que o organismo possa desenvolver, a toxicidade dos componentes e dos resíduos de decomposição, a promoção da menor resposta inflamatória possível e a performance como uma barreira física a diversos agentes. Além disso, o controle das propriedades mecânicas, bem como a facilidade de aplicação e remoção do material e uma boa relação custo/benefício são pontos importantes a se considerar no desenvolvimento destes materiais.^{62,65}

Em suma, biomateriais para aplicação em feridas cutâneas necessitam ser atóxicos, hipoalergênicos, atuar como uma barreira física, provocar a menor resposta inflamatória possível e manter a umidade no local de aplicação, de modo a contribuir com a divisão e migração celular, produção de colágeno e angiogênese, e assim, promover a epitelização e contração da ferida.⁶⁵

Por se tratar de um processo complexo e dependente de diversos fatores, dentre eles, o nível de hidratação da ferida e a regulação da temperatura, algumas propriedades dos filmes estudados, como a permeação ao vapor de água e sua solubilidade deve ser avaliada, buscando se conhecer o perfil de atuação destes materiais em uma aplicação como material para cicatrização cutânea.

Portanto, uma vez que ainda não foi avaliado o efeito da inclusão da resina de jatobá, um produto natural constituído de diversos compostos com atividades biológicas, em filmes de quitosana/gelatina, e já que o $\overline{GA}$ da quitosana é um fator que influencia diretamente muitas de suas propriedades, esta pesquisa visa estudar o efeito deste fatores, o $\overline{GA}$ da quitosana e a inclusão de resina de jatobá, sobre as propriedades de filmes de quitosana/gelatina.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desta pesquisa é estudar a influência do grau médio de acetilação da quitosana e da inclusão da resina de jatobá sobre as propriedades de filmes da blenda quitosana/gelatina visando uma possível aplicação em cicatrização de feridas cutâneas superficiais.

Para tanto, foram propostos como objetivos parciais as seguintes atividades na pesquisa:

- Síntese e caracterização de amostras de quitosana com diferentes graus médios de acetilação, com a mínima alteração no valor de massa molar média destas;
- Preparação dos filmes de quitosana/gelatina com e sem resina de jatobá pelo método de *casting* e posterior neutralização;
- Caracterização dos filmes quanto a suas propriedades, como solubilidade em água, estabilidade térmica, grau de intumescimento, permeação ao vapor de água e atividade antimicrobiana.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Obtenção das amostras de quitosana

Gládios de lulas do gênero *Loligo* spp. cedidas por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda. (Cananéia-SP) foram lavados em água corrente para retirada de sais e material orgânico, secos em estufa a 40°C, triturados e separados com o auxílio de peneira de 0,250 mm. A extração de β -quitina dos gládios e a preparação da quitosana de menor grau de acetilação (QB) foram feitas, respectivamente, por meio de desproteínização e *N*-desacetilação, adaptando um método descrito em literatura⁶⁶.

Uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹ foi adicionada a 80,5 g de gládios moídos (1 g de gládio/15 mL de solução de NaOH) sob agitação mecânica e aquecimento a 80 $\pm$ 2°C por 1 h. O material obtido (β -quitina) foi filtrado e lavado. Para garantir uma eficiente remoção das proteínas o procedimento foi repetido. A β -quitina foi então novamente lavada com água destilada até a neutralidade, seca em estufa a 50°C, macerada e pesada.

A β -quitina foi submetida a tratamento alcalino com NaOH 40% (massa/massa) (1 g de β -quitina/20 mL de solução de NaOH) a 80 $\pm$ 1°C sob agitação mecânica por 3 h em atmosfera de N₂. O procedimento foi então repetido para garantir maior eficiência, sendo o material obtido (QB) lavado até a neutralidade, seco em estufa a 50°C e macerado.

A quitosana de médio grau de acetilação (QM) e a quitosana de alto grau de acetilação (QA) foram obtidas por meio de *N*-reacetilação da QB, conforme método descrito por Vachoud e colaboradores⁶⁷. Para obter a QM inicialmente preparou-se 500 g de solução 1% (massa/massa) de QB em ácido acético (1%). Em seguida se adicionou 500 mL de 1,2-propanodiol e a mistura foi agitada por 2h. Por fim, se adicionou 0,38 mL de anidrido acético à solução, deixando reagir durante a noite. O produto da reação (QM) foi precipitado por adição de NH₄OH até alcançar a neutralidade da solução, sendo então lavado, congelado e liofilizado. Ao executar o mesmo procedimento com 1,17 mL de anidrido acético se obteve a QA.

O esquema apresentado na Figura 11 resume o procedimento utilizado para obtenção das diferentes amostras de quitosana a partir dos gládios de lula.

Figura 11 – Representação do processo de obtenção das amostras de quitosana com diferentes GA.

Fonte: Autoria própria.

3.2 Resina de jatobá

A resina de jatobá cedida pelo professor Dr. Valcinir Aloísio Scalla Vulcani da Universidade Federal de Goiás foi obtida no município de Jataí-GO, extraída dos troncos de árvores adultas da espécie *Hymenaea courbaril*. Primeiramente a resina foi macerada e separada com peneiras. Para sua purificação foi feita uma solução de resina em etanol na proporção de 1:20 (massa/massa). A mistura foi aquecida até 50°C com agitação magnética por 1h em frasco fechado. Após resfriar, foi filtrada e determinado o teor do conteúdo insolúvel. A concentração de resina (C) na solução etanólica pôde então ser determinada pela equação (1), onde m_r é a massa de resina, m_i é a massa de material insolúvel da resina retida durante a filtração e m_s representa a massa de solução de resina em etanol obtida após filtração.

$$C = \frac{(m_r - m_i)}{m_s} \quad (1)$$

3.3 Gelatina

A solução de gelatina (Sigma®, tipo A) foi preparada por dissolução a 2% (massa/massa) em água deionizada seguida de gelatinização por aquecimento a $60 \pm 1^\circ\text{C}$ por 30 min sob agitação magnética.

3.4 Preparação dos filmes

Para preparar os filmes de quitosana/gelatina primeiramente foram misturados 3,0 g de solução 2% (massa/massa) de gelatina com 27,0 g de solução 1% (massa/massa) de cada quitosana sob agitação mecânica por 3h. Em seguida as soluções formadoras de filme foram desaeradas, colocadas em moldes de Teflon e secas em fluxo de ar. Os filmes preparados com gelatina e quitosana de baixo, médio e alto $\overline{GA}$ foram denominados, respectivamente, QBG, QMG e QAG. A concentração de gelatina adicionada à matriz polimérica foi pequena (aproximadamente 18,2% em massa) devido a dois fatores, o fato de que a principal função desta proteína é apenas reduzir a rigidez característica dos filmes de quitosana e, também porque, um dos objetivos deste estudo é avaliar o efeito do $\overline{GA}$ da quitosana sobre as propriedades dos materiais obtidos com este polissacarídeo, logo, o principal polímero constituinte dos filmes deve ser a quitosana.

O preparo dos filmes com resina de jatobá iniciou com a mistura de 3,0 g de gel 2% (massa/massa) de gelatina e 26,85 g de solução 1% (massa/massa) de quitosana. Uma alíquota de solução etanólica contendo 150 mg de resina foi então lentamente adicionada às misturas quitosana/gelatina sob agitação mecânica por 3h. Os géis foram desaerados, colocados em moldes de Teflon e secos em fluxo de ar. Os filmes preparados com a resina de jatobá, gelatina e quitosana de baixo, médio e alto $\overline{GA}$ foram denominados, respectivamente, QBGR, QMGR e QAGR. Os filmes foram neutralizados por imersões alternadas em NaHCO_3 $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (30 min) e água deionizada (15 min) repetidas três vezes, congelados e liofilizados.

3.5 Caracterização dos materiais e géis

Inicialmente foi feita a caracterização dos materiais utilizados na elaboração dos filmes e dos géis formadores destes. As amostras de quitosana foram caracterizadas quanto a seu $\overline{GA}$ (por titulação condutimétrica e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio), sua massa molar média viscosimétrica e sua estrutura, por espectroscopia de absorção na região do infravermelho.

A resina de jatobá e a gelatina também foram caracterizadas por espectroscopia de absorção na região do infravermelho e os géis de quitosana, quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/resina de jatobá foram caracterizados por ensaios reológicos, para determinação de seu comportamento viscoelástico.

Por fim, os géis das amostras QAG, QBG e QBGR, bem como a resina de jatobá foram testados em um ensaio de microdiluição em caldo, para avaliação do efeito do $\overline{GA}$ e da inclusão da resina de jatobá sobre a atividade antimicrobiana destes materiais.

3.5.1 Determinação do grau médio de acetilação da quitosana

Na determinação do $\overline{GA}$ da quitosana já foram aplicadas diversas técnicas, dentre elas a titulação⁶⁸, análise elementar²⁰, espectroscopias de absorção no infravermelho⁶⁹ e no ultravioleta²⁷ e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio⁷⁰. Cada técnica apresenta vantagens e limitações particulares, geralmente resultando em valores de $\overline{GA}$ consideravelmente diferentes. Considerando esse fato e, uma vez que a influência do $\overline{GA}$ da quitosana sobre as propriedades dos filmes produzidos será um dos fatores avaliados nesta pesquisa, duas técnicas diferentes foram utilizadas na caracterização do $\overline{GA}$ da quitosana, a titulação condutimétrica e a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Determinação do $\overline{GA}$ por titulação condutimétrica

As amostras de quitosana foram caracterizadas quanto a seu $\overline{GA}$ por titulação condutimétrica, conforme método descrito na literatura⁶⁸. 250 mg de

quitosana foram adicionados a 50 mL de HCl 0,05 mol L⁻¹ e a suspensão foi mantida sob agitação por 24 h. Em seguida a solução resultante foi diluída em balão volumétrico de 250 mL com água deionizada. Alíquotas de 50 mL foram tituladas com NaOH 0,1 mol L⁻¹ (previamente padronizado com ácido oxálico) acompanhando as variações de condutividade com um condutivímetro modelo Digimed DM32. As titulações foram feitas a 25°C e em triplicata.

Determinação do $\overline{GA}$ por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

Para determinação do $\overline{GA}$ da quitosana por RMN ¹H foi utilizado o método proposto e validado por Lavertu et al.⁷⁰, aplicável a amostras de quitosana de todos os valores de $\overline{GA}$. Inicialmente, 10 mg de cada amostra de quitosana foram suspensas em 1,96 mL de D₂O e 0,04 mL de DCl e a suspensão foi mantida sob agitação até completa solubilização do polímero e, então, parte desta solução foi transferida para um tubo apropriado. Os espectros de RMN ¹H das amostras de quitosana foram então obtidos no espectrômetro com transformada de Fourier da marca Agilent Technologies, modelo 500/54 Premium Shielded (equipamento da Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP) a 70°C, acumulando 64 varreduras. Após o tubo com a amostra ser inserido no magneto e sua temperatura estabilizar, utilizou-se uma sequência consistindo de um atraso de 6 s, um pulso de 90° de 11 ms e um tempo de aquisição de 2 s. Durante o intervalo de 6 s antes da aplicação do pulso de 90° foi realizada a supressão do sinal do solvente por saturação usando um pulso longo e de baixa potência na frequência do solvente.

3.5.2 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana

A massa molar média da quitosana foi determinada pelo método viscosimétrico²⁸. Apesar deste não ser um método absoluto, as constantes necessárias para sua aplicação já foram avaliadas em outros estudos⁶⁹, além deste ser um método acessível. O método se baseia na determinação da viscosidade intrínseca ($[\eta]$) do polímero e sua relação com a massa molar viscosimétrica média ($\overline{M}_v$) pela equação de Mark-Houwink (2).

$$[\eta] = K\overline{M}_v^\alpha \quad (2)$$

A viscosidade relativa de cada solução (η_{rel}) pode ser definida como a razão entre o tempo de escoamento desta solução (t_{sol}) e o do solvente (t_0) ou como a razão entre a viscosidade de uma solução (η_{sol}) e a do solvente (η_0), como mostra a equação (3).

$$\eta_{rel} = \frac{t_{sol}}{t_0} = \frac{\eta_{sol}}{\eta_0} \quad (3)$$

Já a viscosidade específica (η_{sp}) indica o ganho de viscosidade obtido com a adição do polímero ao solvente e é definido pela equação (4).

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 = \frac{(\eta_{sol} - \eta_0)}{\eta_0} = \frac{(t_{sol} - t_0)}{t_0} \quad (4)$$

Uma outra medida do ganho de viscosidade ocorrido com a adição da quitosana ao solvente, porém agora em função da concentração (C) deste polímero é a viscosidade reduzida (η_{red}), definida pela equação (5). Esta relação é válida para soluções diluídas, nas quais a variação de concentração não altera de modo significativo suas densidades.

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{C} \quad (5)$$

Finalmente, aplicando a equação (6), a partir da η_{red} é possível determinar o valor da viscosidade intrínseca, que está diretamente relacionada à massa molar viscosimétrica média da quitosana pela equação de Mark-Houwink (2), onde K e α são constantes relacionadas com o GA da quitosana e com o pH e a força iônica das soluções.

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{C} \right) \quad (6)$$

As soluções foram preparadas pela dissolução de aproximadamente 19 mg de cada quitosana em 50 mL de tampão ácido acético 0,3 mol L⁻¹/acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹ (pH 4,5) seguida de agitação por 24 h e filtração sob pressão positiva em membrana com diâmetro dos poros de 0,45 µm (Millipore). Os tempos de escoamento foram determinados com o uso de alíquotas de 15 mL em um viscosímetro capilar de vidro do tipo Ubbelohde a temperatura constante de 25°C. Foram feitas três determinações independentes de valores de tempo de escoamento para o tampão e para cada solução de diferente concentração, sendo adicionados sucessivamente 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0 mL do tampão para diluição iso iônica da solução de quitosana. As medidas foram feitas em um viscosímetro AVS-360 (SCHOTT) acoplado a um diluidor automático TITRONIC universal (SCHOTT), equipamento do

Grupo de Físico-Química Orgânica do IQSC/USP, sob responsabilidade do professor Dr. Sergio Paulo Campana Filho. Para a determinação do valor médio de massa molar viscosimétrica de cada quitosana, o valor de massa molar viscosimétrica foi determinado em triplicata.

3.5.3 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) dos materiais

Para análise das amostras de quitosana com diferentes $\overline{GA}$ por FT-IR, os géis de quitosana foram diluídos (1:3) em ácido acético 1% e secos em fluxo de ar. A gelatina teve seu espectro obtido por adição de um gel diluído de gelatina em pastilha de silício e posterior secagem sob fluxo de ar. Para eliminar a umidade das amostras de quitosana e gelatina, analisadas na forma de filme, estes foram mantidos em dessecador a baixa pressão na presença de $\text{NaOH}_{(s)}$. Já a solução etanólica de resina de jatobá foi seca em fluxo de ar, acondicionada em dessecador a baixas pressões na presença de parafina e, em seguida, macerada. A análise foi feita com o pó obtido, na forma de pastilha de KBr. Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu IR Affinitu-1 (equipamento da Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP) no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 16 varreduras acumuladas.

3.5.4 Estudo reológico dos géis

Após agitação e desaeração dos géis, os ensaios de reologia foram feitos em um reômetro de deformação controlada AR-1000N (TA Instruments), com geometria cone-placa de aço inoxidável de 20 mm, ângulo de 2° e *gap* de 69 μm . A temperatura do sistema foi controlada por sistema *Peltier* com variação de temperatura de 0,1°C. Primeiramente, foram feitos os ensaios de oscilação a 25°C, frequências de 1,0 Hz e variação na tensão de oscilação de 0,1 a 1000 Pa para determinação da região viscoelástica. Os módulos elástico (G') e viscoso (G'') foram obtidos em função da varredura de temperatura de 20 a 80°C com uma razão de aquecimento de 5°C min^{-1} , uma frequência constante de 1,0 Hz, deformação de 5,0%, com as amostras previamente estabilizadas na temperatura inicial (20°C). Os

ensaios de fluidez foram feitos com variação da taxa de cisalhamento de 0,1 a 1000 s⁻¹ a 25°C. O modelo de Cross⁷¹ foi aplicado para avaliar o comportamento de escoamento das amostras.

3.5.5 Teste de atividade antimicrobiana dos géis e da resina de jatobá

Os ensaios para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) da resina de jatobá e dos géis QAG, QBG e QBGR frente à linhagem de *S. aureus* foram feitos no Grupo de Biotecnologia Microbiana do IQSC/USP, de responsabilidade da professora Dr^a Márcia Nitschke, com o uso da técnica de microdiluição em caldo, segundo metodologia estabelecida pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*⁷².

Linhagem e condições de crescimento

As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) foram mantidas em caldo extrato de levedura triptona de soja acrescido de 20% de glicerol, sendo armazenadas em freezer a -20 °C. Os microrganismos foram semeados em placas de ágar extrato de levedura triptona de soja (TSYEA) e incubados por 24 h a 37°C. Em seguida, algumas colônias foram suspensas em solução salina (NaCl 0,86%) e sua concentração foi ajustada para aproximadamente 10⁸ UFC mL⁻¹ (Unidade Formadora de Colônias por mL) utilizando como padrão a escala 0,5 de McFarland.

Teste de atividade antimicrobiana

Inicialmente se adicionou a todas as cavidades de placas de microdiluição de 96 poços 100 µL de caldo Müeller Hinton (pH 5,5). Na sequência, se adicionou à primeira coluna 100 µL de cada amostra, realizando sucessivas diluições à metade da concentração, além de 20 µL de inóculo da linhagem bacteriana padronizado na concentração 10⁷ UFC mL⁻¹ às cavidades das colunas de 1 a 11, deixando como controle negativo a coluna 12. Como controle positivo de crescimento, utilizou-se caldo de cultura contendo o inóculo e caldo de cultura com inóculo e o solvente utilizado, etanol 1% para os géis ou dimetilsulfóxido (DMSO) 1% no caso da resina.

Após as placas de microdiluição serem incubadas por 24 h a 37°C, foram adicionados 20 µL de solução do corante brometo de tetrazolium (MTT) 1 mg mL⁻¹ em todas as cavidades das placas para melhor visualização do crescimento

microbiano. A CIM, definida como a menor concentração do analito capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano, foi determinada visualmente e, a partir das concentrações das amostras que não apresentaram crescimento visual foi possível analisar a concentração bactericida mínima (CBM). Com uma alça de inoculação esterilizada, uma alíquota do meio de cultura destas cavidades foi transferida para placas de TSYEA, seguido de incubação por 24 h a 37 °C. A menor concentração a não apresentar crescimento microbiano após incubação foi designada como a CBM. Os ensaios foram feitos com, no mínimo, três repetições independentes.

3.6 Caracterização dos filmes

Antes de serem analisados os filmes foram estocados em câmaras com higrômetro e mantidos sob umidade controlada (75%). Após duas semanas, estes foram submetidos a análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de absorção na região do infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), termogravimetria (TG), medidas de espessura, solubilidade, permeação de vapor de água e de grau de intumescimento.

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

Para análise dos filmes, os géis de quitosana/gelatina e de quitosana/gelatina/resina de jatobá foram diluídos (1:3) em ácido acético 1% (massa/massa) e secos em fluxo de ar. Para eliminar a umidade das amostras, os filmes obtidos após secagem foram mantidos em dessecador a baixa pressão na presença de NaOH_(s). Os espectros foram obtidos em espectrofotômetro Shimadzu IR Affinitu-1 (equipamento da Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP) no intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 16 varreduras acumuladas.

3.6.2 Medidas de espessura

A espessura dos filmes foi medida com o uso de um micrômetro (M110-25, Mitutoyo Mfg. Co., Ltd., Japão). Foram feitas medidas em dez diferentes pontos de cada amostra que foram utilizadas para cálculo dos valores médios de espessura.

3.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

Após fixação dos filmes nos suportes, estes foram recobertos com uma fina camada de liga ouro-paládio de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein) a pressão de 0,02 mbar na câmara, corrente de 60 mA e taxa de deposição de 0,60 nm/s. As fotomicrografias foram obtidas em um microscópio da marca ZEISS modelo LEO-440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (modelo 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. Tanto o metalizador quanto o microscópio pertencem à Central de Análises Químicas Instrumentais do IQSC/USP.

3.6.4 Termogravimetria

Os filmes foram analisados por termogravimetria visando conhecer seu perfil de decomposição térmica. Amostras com aproximadamente 10 mg foram submetidas à análise termogravimétrica com uma variação de temperatura de 25 a 800°C sob fluxo de ar sintético de 90 mL min⁻¹, com razão de aquecimento de 10°C min⁻¹. As medidas foram feitas em um equipamento Q50 da TA Instruments, do Grupo de Físico-Química Orgânica, sob responsabilidade da professora Dra. Agnieszka Joanna Pawlicka Maule.

3.6.5 Ensaio de intumescimento

Foram cortadas três amostras de cada filme, pesadas e, em seguida imersas em tampão fosfato salino (PBS) 0,01 mol L⁻¹ a pH 7,4 e 26 ± 1°C, sendo

retiradas para pesagem em tempos apropriados. Para pesagem, as membranas foram retiradas das soluções, colocadas em papel de filtro para remover o excesso de líquido e, então, pesadas. A quantidade de solução tampão absorvida pelos filmes foi calculada pela média dos resultados encontrados usando a equação (7),

$$\%Abs = \frac{(m_u - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (7)$$

sendo %Abs= percentual de PBS absorvido pelo filme, m_u = massa úmida e m_s = massa seca.

3.6.6 Permeação ao vapor de água

Os ensaios de permeação ao vapor de água foram feitos seguindo um método proposto por Garcia, Pinotti e Zaritzky⁷³, uma adaptação do método ASTM (American Society for Testing and Materials) E96. As amostras foram fixadas sobre as aberturas circulares com área de 70 mm² de frascos contendo cloreto de cálcio (umidade relativa de 0%). Em seguida, os frascos foram pesados e estocados em câmara de umidade controlada contendo solução de NaCl saturada (umidade relativa de 75%) a 25°C. Os frascos foram então pesados seis vezes durante um período de 24 h e a massa de vapor de água que permeou os filmes foi determinado pelo ganho de massa dos frascos.

Para determinar a taxa de permeação de vapor de água (TPV) foi construído um gráfico do ganho de massa (m , em g) em função do tempo (t , em s). Sua constante angular (m/t) foi usada no cálculo da TPV por meio da aplicação da equação (8), onde A é a área (m²) do filme disponível para permeação, ou seja, a área interna das aberturas dos frascos.

$$TPV = \frac{m}{t} \times \frac{1}{A} \quad (8)$$

Finalmente, a permeação ao vapor de água (PV) dos filmes foi determinada com o uso da equação (9), onde e é a espessura (m) dos filmes e ΔP é variação das pressões parciais de vapor de água observadas na atmosfera da câmara com umidade controlada e nos frascos com CaCl₂, que no caso é igual ao valor da constante à temperatura de realização do experimento, já que seu valor nos frascos contendo cloreto de cálcio é igual a zero.

$$PV = \frac{TPV.e}{\Delta P} \quad (9)$$

3.6.7 Solubilidade em água

Os testes de solubilidade em água dos filmes foram feitos adaptando o método descrito por Garcia, Pinotti e Zaritzky⁷³. Os filmes foram cortados em peças de 10 x 15 mm e mantidos em dessecador com KOH_(s) por cinco dias, com umidade relativa de 0%. Estes foram então pesados e imersos em 80 mL de água deionizada (pH 6,6), sendo mantidos sob agitação a 50 rpm a 37°C por 24h. Em seguida, as amostras foram removidas e secas a 60°C até massa constante. As medidas foram feitas em triplicata e a porcentagem de material solúvel em água foi então calculada aplicando a equação (10).

$$\text{Solubilidade (\%)} = \frac{(\text{Massa seca inicial}) - (\text{Massa seca final})}{(\text{Massa seca inicial})} \quad (10)$$

3.6.8 Análise estatística

A fim de evidenciar alterações significativas na solubilidade em água dos filmes, os resultados deste ensaio foram submetidos a análise estatística. Inicialmente os dados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para confirmar a distribuição normal dos valores analisados, sendo então empregados a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para encontrar diferenças significativas entre os dados, utilizando como nível de significância o valor de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção das amostras de quitosana

Ao contrário das carapaças de insetos e crustáceos, gládios de lula são estruturas parcialmente flexíveis e não rígidas. Uma razão para essa diferença é o menor conteúdo de carbonatos presente nos gládios, evidenciado pelo baixo teor de cinzas e metais relatados nestes.^{20,27} A quitina extraída de lulas possui estrutura do tipo β , portanto, é organizada de modo a apresentar maior distância entre suas cadeias, o que aumenta a acessibilidade a reagentes, e portanto, facilita seu intumescimento e aumenta sua reatividade.¹⁶ Portanto, para uso neste estudo se optou por obter as amostras de quitosana a partir de β -quitina extraída de gládios de lula e não incluir a desmineralização, procedimento de remoção da matéria inorgânica, sobretudo CaCO_3 e MgCO_3 , no processo de extração de β -quitina, reduzindo os custos de produção desta matéria-prima.

Os gládios moídos apresentaram um aspecto de flocos amarelados, tendo sido submetidos à desproteínização para remoção das proteínas ligadas à cadeia polissacarídica por ligações covalentes glicosídicas e sua liberação na forma de peptídeos ou aminoácidos livres⁷⁴. A β -quitina obtida apresentou coloração branca e após seca a massa determinada foi 32,6 g, o que corresponde a um rendimento de 40,5%. Este foi um rendimento aceitável, já que gládios de lulas contém entre 20 e 40% de sua massa composta por quitina⁷⁵.

Durante a *N*-desacetilação de β -quitina ocorreu a remoção parcial dos grupos acetila das unidades GlcNAc presentes na quitina, levando à obtenção da QB na forma de um pó branco e fino levemente amarelado (Figura 12).

Figura 12 – Amostras de quitosana de baixo (QB), médio (QM) e alto (QA) $\overline{GA}$.

Após seca, a massa obtida foi 25,5 g, correspondente a um rendimento de 78,2% em relação à massa de β -quitina. O rendimento desta etapa também foi aceitável, já que é comparável ao rendimento obtido por processo semelhante desenvolvido em nosso laboratório (79,4%)⁷⁶.

A *N*-reacetilação da quitosana ocorre por uma reação na qual um grupo amino não protonado de uma unidade GlcN promove um ataque nucleofílico a função carbonila do anidrido acético, sendo um processo útil para a preparação de amostras com diferentes valores de $\overline{GA}$ sem grande alteração da massa molar média⁷⁷. Portanto, é um método viável para produzir as amostras de quitosana utilizadas no estudo do efeito do $\overline{GA}$ sobre as propriedades dos filmes de quitosana/gelatina. A *N*-reacetilação é realizada na presença de diol para prevenir a hidrólise do anidrido acético, tornando mais efetiva a reação.⁷⁷ QM e QA apresentaram uma aparência de flocos esbranquiçados (Figura 12), pesando 4,13 e 3,99 g, respectivamente, o que representa rendimentos de 82,6 e 79,9%. Estes valores de rendimento revelam uma perda de material durante a reacetilação da quitosana, o que pode ter ocorrido no processo de lavagem ou durante as transferências de material.

4.2 Caracterização dos materiais

4.2.1 Determinação do grau de acetilação da quitosana

Determinação do $\overline{GA}$ por titulação condutimétrica

A condutividade de soluções está relacionada com a soma das contribuições de cada espécie iônica em solução à habilidade deste meio em conduzir eletricidade, e uma vez que os íons OH^- e H^+ são os que mais contribuem para esta medida, a titulação condutimétrica pode ser empregada no monitoramento das mudanças de condutividade em função da variação na concentração destes íons. A determinação do $\overline{GA}$ por esta técnica é um método de baixo custo aplicável a amostras de quitosana com um amplo intervalo de valores de $\overline{GA}$, não recomendado apenas para amostras com alto teor de grupos acetila, além de ser considerada uma

técnica de rotina capaz de garantir precisão e que leva a resultados próximos aos obtidos pela técnica de RMN ^1H .⁶⁸

As curvas obtidas na titulação com NaOH das amostras de quitosana em excesso de HCl são mostradas na Figura 13. As curvas são formadas por três retas, a primeira correspondente à neutralização do H^+ pela base e, portanto, é decrescente, indicando a redução brusca de condutividade da solução; a segunda reta representa o intervalo em que ocorre a desprotonação dos grupos amino da quitosana, o que resulta em um pequeno aumento na condutividade; e na última reta, em virtude do excesso de OH^- adicionado, ocorre um aumento na condutividade⁶⁸.

Figura 13 – Curvas de titulação condutimétrica para as amostras QB (A), QM (B) e QA (C).

Dois pontos de inflexão (V_1 e V_2) foram obtidos pela extrapolação das retas e assim o grau médio de acetilação em porcentagem (%GA) para cada amostra foi determinado pela equação (11), na qual 161 é a massa molecular média da unidade GlcN da quitosana (g mol^{-1}), $[\text{NaOH}]$ é a concentração da solução de NaOH (mol L^{-1}), m corresponde a massa de quitosana contida na alíquota titulada (g)

e $(V_2 - V_1)$ é o volume de base necessário para neutralizar os grupos amino da quitosana (L).⁷⁸

$$\%GA = \left(1 - \frac{161 \cdot (V_2 - V_1) \cdot [NaOH]}{m}\right) \cdot 100 \quad (11)$$

Os valores médios de grau de acetilação obtidos foram $7,4 \pm 0,4\%$ (QB), $20,0 \pm 1,9\%$ (QM) e $34,9 \pm 2,7\%$ (QA).

Determinação do $\overline{GA}$ por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN 1H)

Como apontado por Lavertu et al.⁷⁰, além da caracterização do $\overline{GA}$ da quitosana por RMN 1H apresentar vantagens como não necessitar de uma pesagem exata (uma vez que a massa ou concentração de quitosana não é considerada no cálculo da variável), não requisitar uma secagem completa do material e utilizar apenas uma pequena alíquota do polímero (4% da massa utilizada na titulação condutimétrica), a determinação por meio desta técnica não requer o emprego de padrões ou a construção de curvas de calibração, exige um preparo de amostra simples e apresenta resultados exatos com precisão.

A temperatura de 70°C foi escolhida para a análise por esta ser a temperatura na qual o pico do solvente não interfere com nenhum dos picos referentes a estrutura da quitosana.⁷⁰ Os espectros obtidos para as amostras de quitosana são apresentados na Figura 14.

Os picos observados em 2,3 ppm (H_{Ac}) referem-se ao CH_3 do grupo *N*-acetila, enquanto o pico em 4,9 ppm é atribuído ao H1 (Figura 15) de unidades GlcNAc, e, portanto, ambos aumentam de intensidade com o aumento no $\overline{GA}$ das amostras de quitosana. As unidades GlcN do polímero levam ao surgimento de picos em 3,5 ppm, referente ao H2 e em 5,2 ppm, relacionado ao H1. Na região entre 3,8 e 4,4 ppm estão os sinais atribuídos aos hidrogênios H2, H3, H4, H5, H6 e H6' (H_{2-6}) das unidades GlcN e GlcNAc e, por fim, o pico observado em 4,7 ppm é referente à ressonância do próton do solvente.⁷⁰ Vale ressaltar o fato de que o hidrogênio ligado ao carbono 1 origina dois sinais no espectro, os sinais em 4,9 e 5,2 ppm, referentes às duas possibilidades de grupos ligados ao carbono 2 (em unidades GlcN ou GlcNAc).

Figura 14 – Espectro de RMN ^1H para as amostras QA (—), QM (—) e QB (—) em $\text{D}_2\text{O}/\text{DCI}$ a 70°C .

Figura 15 – Mero da quitosana com destaque para a numeração dos H detectados por RMN ^1H . Os dois hidrogênios do carbono 6 não são mostrados.

Fonte: Adaptado de Lavertu et al., 2003⁷⁰, p. 1151.

Utilizando-se a equação (12), na qual são empregadas as áreas dos picos H_{Ac} e H_{2-6} , foi possível determinar-se o valor dos $\overline{GA}$ das amostras de quitosana.

$$\overline{GA}(\%) = \left(\frac{H_{\text{Ac}}}{\frac{H_{2-6}}{6}} \right) \times 100 \quad (12)$$

Os valores encontrados foram de 6,8% para QB, 23,9% para QM e 35,2% para QA, valores próximos aos determinados por titulação condutimétrica. A amostra que apresentou a maior diferença entre os valores determinados pelas duas técnicas foi a QM, com uma diferença de 3,9% no valor de $\overline{GA}$. Porém, dentre as duas

técnicas a determinação por RMN ^1H apresenta resultados mais exatos e precisos, portanto, os valores adotados serão os obtidos por esta técnica.

4.2.2 Determinação da massa molar média viscosimétrica da quitosana

A Figura 16 apresenta uma curva de viscosidade reduzida (η_{red}) em função da concentração das soluções de quitosana em tampão acetato de sódio/ácido acético (NaAc/HAc) da amostra de QB.

Figura 16 – Curva de viscosidade reduzida em função da concentração das soluções de quitosana da amostra QB.

A viscosidade intrínseca ($[\eta]$) foi determinada pela extrapolação à concentração zero da solução de quitosana pelo ajuste linear dos valores de η_{red} . Os valores de $[\eta]$, dos coeficiente de determinação (R^2), e de massa molar média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) determinados para cada amostra estão apresentados na Tabela 1, bem como os valores das constantes K e α utilizados para as amostras de quitosana com diferentes GA, determinados por Brugnerotto et al.⁶⁹.

O valor da $\overline{M}_v$ determinado para cada amostra de quitosana foi, portanto, de 273 ± 11 para QB, 211 ± 5 para QM e 197 ± 8 kDa para QA. Para o cálculo da $\overline{M}_v$ das amostras QB e QM foram utilizados os valores das constantes K e α determinados por Brugnerotto et al.⁶⁹ para amostras de quitosana com $\overline{GA}$ de,

respectivamente, 6 e 23%, valores condizentes com os determinados para QB e QM por RMN ^1H . Contudo, para a amostra QA, com $\overline{GA}$ de 35 %, os valores das constantes utilizados foram os determinados para o $\overline{GA}$ de 40 %, o valor de $\overline{GA}$ mais próximo para o qual a constante foi relatada. Caso os valores destas constantes variassem linearmente em função do $\overline{GA}$, os valores das constantes K e α para a amostra QA seriam 0,065 e 0,825, respectivamente, o que levaria a um valor de $\overline{M}_v$ de 204 ± 8 kDa para esta amostra, valor mais próximo do encontrado para QM.

Tabela 1 – Valores das variáveis utilizadas na determinação das $\overline{M}_v$ das amostras de quitosana.

Quitosana	Replicata	$[\eta]$ (mL g $^{-1}$)	R^2	K (mL mol g $^{-2}$)	α	M_v (g mol $^{-1}$)
QB	1	1602,26	0,99575	0,077	0,797	$2,62 \times 10^5$
	2	1709,79	0,99613	0,077	0,797	$2,84 \times 10^5$
	3	1653,41	0,99273	0,077	0,797	$2,72 \times 10^5$
	Média					$2,73 \times 10^5$
QM	1	1213,07	0,98452	0,069	0,799	$2,06 \times 10^5$
	2	1240,89	0,98901	0,069	0,799	$2,11 \times 10^5$
	3	1261,35	0,98901	0,069	0,799	$2,16 \times 10^5$
	Média					$2,11 \times 10^5$
QA	1	1563,66	0,99905	0,063	0,83	$1,97 \times 10^5$
	2	1511,69	0,99881	0,063	0,83	$1,89 \times 10^5$
	3	1615,28	0,99590	0,063	0,83	$2,05 \times 10^5$
	Média					$1,97 \times 10^5$

Embora fosse esperado que a *N*-reacetilação da quitosana não alterasse a massa molar do polímero, houve uma considerável redução no valor desta variável. Vale ressaltar que a despolimerização observada foi maior na amostra que reagiu com um maior volume de anidrido acético. Ao contrário do que autores como Xin-Yuan e Tian-Wei⁷⁹ e Lavertu e colaboradores⁷⁰ afirmam, Qun, Ajun e Yong⁸⁰ relatam reduções de até 50% no valor da massa molar em reações de *N*-reacetilação realizadas na presença de anidrido acético em excesso, mostrando inclusive que a extensão da despolimerização observada nessas reações aumenta com a concentração de anidrido acético. Porém, apesar das amostras *N*-reacetiladas não terem conservado o valor de massa molar, todas as amostras são

consideradas como sendo de alta massa molar (> 150 kDa)¹⁷. Horn⁷⁶ relata, para amostras de quitosana extraídas de gládios de lulas de modo semelhante, valores de massa molar de 437 kDa, isto é, também de alta massa molar.

4.2.3 Resina de jatobá

A purificação da resina de jatobá revelou um teor de 3,1% de material insolúvel, sendo obtido um extrato etanólico da resina (Figura 17) na concentração de 55,3 mg/g.

Figura 17 – Extrato etanólico da resina de jatobá.

O espectro na região do infravermelho obtido com a resina de jatobá purificada é apresentado na Figura 18.

Figura 18 – Espectro de absorção na região do infravermelho da resina de jatobá purificada.

As bandas em 2931, 2866, 1449 e 1387 cm^{-1} são referentes às ligações C–H em grupos metil, enquanto as ligações C=O de grupos carboxílicos dos ácidos da resina são observadas neste espectro pelas bandas em 1697 e o pico sobreposto em 1641 cm^{-1} . As bandas em 1175 e 1267 cm^{-1} apresentam um perfil já relatado para âmbar obtidos de outras resinas às quais se atribuiu a presença de ácido succínico esterificado⁸¹, casos onde a banda mais intensa serviu ainda como indicador da idade do material, se apresentando geralmente em 1265 cm^{-1} em uma resina recente e em 1235 cm^{-1} em âmbar. Por fim, em 887 cm^{-1} a banda estreita observada indica a presença de grupos metilenos exocíclicos enquanto em 698 cm^{-1} a pequena banda vista está relacionada com a polimerização da resina que leva a formação dos âmbar, já que esta banda é presente apenas nas resinas recentes.^{81,82} Portanto, além de apresentar as bandas características da resina de jatobá já relatadas, a caracterização por FT-IR da amostra permitiu atestar que a resina utilizada foi recentemente coletada.

A análise por FT-IR de uma amostra bruta de resina de jatobá (espectro não mostrado) revelou as mesmas bandas encontradas para a amostra pura, o que indica que o material retido durante a purificação da resina deve ser, de fato, constituído principalmente de impurezas como cascas da própria árvore da qual a resina foi extraída.

4.2.4 Gelatina

O espectro de absorção da gelatina na região do infravermelho é apresentado na Figura 19, no qual a banda intensa em 1657 cm^{-1} corresponde à amida I devido à deformação axial da ligação C=O; em 1552 cm^{-1} corresponde à amida II, referente ao estiramento da ligação C–N e à deformação angular N–H; em 1240 cm^{-1} refere-se à amida III devido ao estiramento C–N e a deformação N–H e, por fim, a banda referente a amida A da gelatina é encontrada na região de 3320 cm^{-1} .⁸³

Figura 19 – Espectro de absorção na região do infravermelho da gelatina.

4.3 Estudo reológico

As soluções de quitosana e aquelas com adição de gelatina apresentaram-se homogêneas, incolores e transparentes, enquanto os géis com adição de resina de jatobá também se mostraram homogêneos, porém esbranquiçados (Figura 20). Primeiramente foi determinada a região de regime viscoelástico linear para as amostras por meio da varredura dos módulos elástico (G') e viscoso (G'') em função da oscilação de tensão, sendo escolhido o valor de deformação de 5% para uso nos outros ensaios.

Figura 20 – Soluções de QM, QMG e QMGR.

A variação dos módulos G' e G'' em função da temperatura é exemplificada pelas curvas das amostras com resina (Figura 21), resultando em

curvas compostas por uma primeira região na qual estes módulos decrescem com o aumento da temperatura, comportamento típico de polímeros e uma segunda região onde ocorre um pronunciado aumento e inversão destes módulos, indicando a formação de um gel pela formação de uma rede de gel elástica⁸⁴. O ponto de gel, isto é, a temperatura na qual $G' = G''$ para cada amostra é mostrada na Tabela 2.

A transição de um comportamento predominantemente viscoso para elástico depende da presença de grupos hidrofílicos na quitosana, como os grupos amino, e da facilidade para destruir e reconstruir interações entre as cadeias de modo a formar um gel⁸⁵. Dentre as amostras de quitosana, QB apresentou a menor temperatura de gelificação, o que deve estar relacionado ao seu maior valor de massa molar, pois por possuir cadeias mais longas, a energia necessária para a formação de uma rede tridimensional de ligações mais organizada tende a ser menor. Já entre QM a QA, que apresentam valores de massa molar próximos, a temperatura de gelificação foi menor para a amostra de alto $\overline{GA}$, o que indica que a redução no número de unidades GlcN deve estar reduzindo o calor necessário para quebra das interações já existentes, facilitando assim a reorganização do polímero.

Figura 21 – G' e G'' em função da temperatura para: QBGR (● G' e ○ G''); QMGR (● G' e ○ G'') e QAGR (● G' e ○ G'').

Tabela 2 – Temperatura de gelificação ($G' = G''$) para os géis de quitosana, quitosana/gelatina e quitosana/gelatina/resina de jatobá.

Grau de acetilação da quitosana (%)	Temperatura de gelificação (°C)		
	Quitosana	Quitosana/gelatina	Quitosana/gelatina/resina
7 (QB)	62	65	56
24 (QM)	69	62	63
35 (QA)	67	64	64

A adição de gelatina à quitosana de menor $\overline{GA}$ aumentou a temperatura de gelificação, apresentando efeito oposto quando adicionada à QM e QA. Como resultado, as temperaturas de gelificação para as amostras com gelatina variaram menos em função do $\overline{GA}$ que as soluções de quitosana e as misturas com adição de resina. Ao se mesclar a uma quitosana de menor $\overline{GA}$ e, portanto, com mais unidades GlcN, a gelatina interagirá com os grupos amino deste polissacarídeo, diminuindo a disponibilidade destes grupos para a organização de junções físicas que levarão à formação da rede do gel. Por outro lado, a interação da gelatina com amostras de quitosana de maior $\overline{GA}$ pode resultar em grupos hidrofílicos livres na gelatina, devido à menor disponibilidade de grupos amino nestas amostras de quitosana, o que leva a uma redução na temperatura de gelificação, o que explicaria os resultados encontrados.

Por fim, é visível que a inclusão de resina de jatobá levou à redução da temperatura de gelificação apenas para QBG, efeito que deve estar relacionado ao fato dos componentes da resina, sobretudo diterpenos e sesquiterpenos, serem moléculas pequenas que podem aumentar o número de junções físicas na rede polimérica tridimensional, por apresentarem tanto grupos hidrofílicos (carboxílico e hidroxílico), quanto hidrofóbicos. Este efeito pode não ser observado nas amostras QMG e QAG em virtude das amostras QM e QA apresentarem menor disponibilidade de grupos livres para interagir com os componentes da resina, uma vez que a gelatina é adicionada à quitosana antes da inclusão da resina.

O gráfico de viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras de quitosana com diferentes $\overline{GA}$ é apresentado na Figura 22, enquanto a Figura 23 exibe como exemplo as curvas para os diferentes materiais preparados com a QM, a fim de destacar os efeitos da adição da gelatina e da resina de jatobá sobre esta propriedade.

Figura 22 – Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras: QB (▲), QM (▲) e QA (▲).

Figura 23 – Viscosidade em função da taxa de cisalhamento para as amostras: QM (▲), QMG (■) e QMGR (●).

Os ensaios de fluidez mostraram que todas as amostras apresentaram um comportamento newtoniano a baixas taxas de cisalhamento. O aumento desta taxa levou a um comportamento pseudoplástico, isto é, com redução da viscosidade em função do aumento da taxa de cisalhamento, efeito que está relacionado ao desemaranhamento e à organização das cadeias poliméricas.

O modelo de Cross (Equação 13) foi utilizado para o ajuste dos dados experimentais no estudo do comportamento de fluidez das amostras, sendo η_0 e η_∞ , respectivamente, as viscosidades (Pa s) no platô newtoniano a zero de cisalhamento e máxima a cisalhamento infinito, γ a taxa de cisalhamento (s^{-1}) e k e m as constantes índice de consistência (s) e índice de taxa (adimensional), respectivamente.

$$\frac{\eta - \eta_\infty}{\eta_0 - \eta_\infty} = \frac{1}{(1 + (k\gamma)^m)} \quad (13)$$

Os valores de η_0 , η_∞ , k e m para cada amostra são exibidos na Tabela 3. Os valores de viscosidade no platô newtoniano apresentaram uma expressiva redução quando se compara QB e QM, o que pode estar relacionado a redução de massa molar observada. Entre QM e QA a redução é menor, efeito provavelmente relacionado à redução no número de ligações de hidrogênio entre as cadeias poliméricas em virtude da redução no $\overline{GA}$ e, portanto, no número de grupos amino disponíveis, o que leva a uma redução na resistência do material ao escoamento.

Tabela 3 – Valores das variáveis η_0 , η_∞ , k e m do modelo de Cross para as amostras.

Amostra	η_0 (Pa s)	η_∞ (Pa s)	k (s)	m (adimensional)
QB	1,083x10 ¹	4,72x10 ⁻⁷	0,15970	0,7941
QM	2,843	1,10x10 ⁻²	0,04864	0,7724
QA	2,725	6,81x10 ⁻³	0,05317	0,7520
QBG	8,248	2,20x10 ⁻⁷	0,13860	0,7744
QMG	3,006	1,43x10 ⁻⁷	0,06680	0,7012
QAG	2,605	4,31x10 ⁻²	0,04061	0,8334
QBGR	1,238x10 ¹	3,36x10 ⁻⁶	0,17020	0,7740
QMGR	1,665	7,28 x10 ⁻³	0,03216	0,7370
QAGR	1,663	6,67x10 ⁻³	0,04028	0,7333

Finalmente, a adição da resina de jatobá aumentou o valor de η_0 na amostra de baixo $\overline{GA}$, porém, reduziu este valor nas amostras de médio e alto $\overline{GA}$. Este efeito pode estar relacionado à presença de grupos amino em quantidade suficiente na quitosana de menor $\overline{GA}$ para promover sua interação com os componentes da resina, aumentando a resistência da amostra ao escoamento. Já

nas amostras mais acetiladas estes grupos amino estão em sua maioria interagindo com a gelatina, o que impede o aumento de η_0 .

4.4 Atividade antimicrobiana

O microrganismo escolhido para os ensaios de atividade antimicrobiana foi a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, pois esta é encontrada sobretudo na pele, sendo associada a infecções que podem inclusive ser fatais.⁸⁶ A visualização do crescimento bacteriano por meio da adição de MMT se baseia no fato de que estes microrganismos, quando ativos, são capazes de converter o sal solúvel do composto (de coloração amarelo) em cristais de um precipitado roxo, o MTT formazam. Portanto, essa conversão depende da concentração dos microrganismos ou células analisados.⁸⁷

A fim de se evidenciar o efeito do $\overline{GA}$ da quitosana sobre a atividade antimicrobiana dos materiais desenvolvidos, primeiramente foi avaliada a atividade antimicrobiana das amostras QAG e QBG. A amostra QBG apresentou CIM e CBM de 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto para a amostra QAG a CIM observada foi também de 31,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém a CBM encontrada foi de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esta diferença entre a CIM e a CBM para a amostra QAG pode estar relacionada com a presença de gelatina na mistura, uma vez que esta proteína também contém grupos amino, protagonistas no processo de inibição do crescimento bacteriano por promover a interação com os microrganismos estudados⁷. Younes et al.⁸⁸ relatam o aumento da CIM de soluções de quitosana para um terço de seu valor ao aumentar seu $\overline{GA}$ em cerca de 30%, contudo, para as misturas de quitosana/gelatina, um aumento de 28% no valor do $\overline{GA}$ da quitosana levou a um aumento na CBM de apenas duas vezes, corroborando para a hipótese de contribuição da gelatina para o comportamento observado. Portanto, apesar da contribuição da gelatina para a ação bactericida das misturas, esta não chega a ser o suficiente para que a sua atividade se iguale à observada para a amostra QBG.

Em seguida, para avaliar o efeito da adição da resina sobre a mistura quitosana/gelatina avaliou-se a atividade antimicrobiana da resina de jatobá isoladamente e da amostra QBGR, já que a CIM e a CBM encontradas para a QB foram menores que os da QA. A Figura 24 ilustra como foi feita a determinação da

CIM contra *S. aureus* para a amostra QBGR pela técnica de microdiluição em caldo. A adição da resina de jatobá à mistura quitosana/gelatina levou à uma redução nos valores da CIM e da CBM, resultando em valores de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por outro lado, a resina de jatobá não foi capaz de inibir o crescimento microbiano em nenhuma das concentrações analisadas ($1,9$ a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$). A redução à metade nos valores de CIM e CBM após adição da resina de jatobá na mistura quitosana/gelatina sugere um possível efeito sinérgico com a inclusão do composto, já que, como mencionado por Demetzos e Dimas⁵³, diversos diterpenos labdânicos, compostos presentes na resina de jatobá, são reconhecidos por apresentam atividade antimicrobiana.

Figura 24 – Determinação da CIM para a amostra QBGR contra *S. aureus*.

Apesar da resina de jatobá isoladamente não ter acusado qualquer atividade antimicrobiana nas concentrações analisadas, dois processos podem ter interferido sobre este resultado, a filtração da resina durante sua purificação, que, quando realizada em solução de DMSO, levou à retenção de grande massa da resina no filtro, podendo estar então retendo compostos com a referida atividade, ou mesmo, a solubilização da solução de resina em DMSO no meio de cultura, que, por ser aquoso, leva a uma solubilização parcial do analito, reduzindo sua concentração real.

Para contornar o problema do uso de DMSO como solvente foram testados ainda o etanol e o 1,2-propanodiol na solubilização da resina, porém, ambos levaram a solubilizações menos satisfatórias que com o DMSO, portanto, recomenda-se que novos ensaios sejam feitos, utilizando-se um solvente mais apropriado ou, até mesmo, uma mistura de solventes, para confirmar o resultado obtido.

4.5 Caracterização dos filmes

Os filmes de quitosana/gelatina apresentaram aparência homogênea e coloração esbranquiçada, se tornando incolores quando hidratados. As amostras com adição de resina de jatobá mostraram-se amareladas e com a presença de alguns poucos pontos esbranquiçados sobre suas superfícies, como mostra a Figura 25.

Figura 25 – Filmes de quitosana/gelatina não neutralizados: secos (acima) e hidratados (abaixo).

Filmes incolores e transparentes, como os obtidos sem a resina de jatobá, apresentam a vantagem de permitir a observação direta da área de aplicação do material, e, portanto, podem facilitar a avaliação do processo de cicatrização da lesão por profissionais da saúde sem a necessidade da remoção deste.

Todas as amostras aparentaram possuir características mecânicas razoáveis o suficiente para permitir sua maneabilidade, mostrando um ganho manualmente perceptível de elasticidade quando hidratados.

Durante a neutralização dos filmes, devido a maior capacidade de intumescer das amostras de maior $\overline{GA}$, estas expandiram mais que QB, resultando após a secagem por liofilização em filmes mais finos e de maiores comprimento e largura. Por diminuírem de espessura, os filmes de QA perderam resistência mecânica de forma perceptível após a neutralização, resultando em filmes mais quebradiços e de mais difícil manuseio.

Os filmes secos apresentaram uma espessura média de $0,06 \pm 0,01$ mm, que foi reduzida para $0,05 \pm 0,01$ mm após a neutralização, conforme mostrado na Tabela 4.

Tabela 4 – Valores médios de espessura dos filmes (mm).

Amostra	Não neutralizada	Neutralizada
QBG	$0,07 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$
QBGR	$0,07 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0,01$
QMG	$0,05 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$
QMGR	$0,06 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
QAG	$0,07 \pm 0,02$	$0,06 \pm 0,02$
QAGR	$0,06 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$

Esta redução na espessura dos filmes após o processo de neutralização pode ser justificada pela saída dos resíduos de ácido acético presentes no material, que leva a uma diminuição do volume livre nas cadeias do polímero e, portanto, a um rearranjo molecular destas cadeias, organizando-se de modo mais compacto.¹⁸

4.5.1 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho

A região de interesse (2000 a 400 cm^{-1}) dos espectros FT-IR para os filmes produzidos com a quitosana de valor médio de $\overline{GA}$, antes e após inclusão da gelatina, bem como após adição da resina de jatobá é apresentada na Figura 26. Já os espectros dos filmes de quitosana/gelatina/resina de jatobá produzidos com amostras de quitosana de diferentes valores de $\overline{GA}$ são apresentados na Figura 27. Todas as amostras foram analisadas utilizando filmes não neutralizados.

Figura 26 – Espectro de absorção no infravermelho das amostras QM (—), QMG (—) e QMGR (—). **Figura 27** – Espectro de absorção no infravermelho das amostras QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—).

Os espectros da quitosana com os diferentes graus de acetilação são similares, variando apenas nas intensidades das bandas e podendo ser exemplificados pelo resultado apresentado para QM, que apresentou as bandas das amidas I e II em 1650 e 1560 cm^{-1} , respectivamente; uma banda média em 1410 cm^{-1} representando as deformações simétricas C–H, uma banda fraca em 1335 cm^{-1} correspondente ao grupo –CO–N–, três bandas próximas em 1155, 1082 e

1030 cm^{-1} que representam os estiramentos simétrico e assimétrico C–O–C, além de uma banda larga em 3350 cm^{-1} , que corresponde aos estiramentos O–H e N–H.⁷

Ao comparar o espectro obtido para QAGR ao de QBGR, foram observados o acréscimo na intensidade da banda de amida I e a redução na intensidade das bandas em 1410 e 1560 cm^{-1} (amida II) com o aumento no $\overline{GA}$ da quitosana. Já que a banda de amida I é atribuída à vibração da ligação C–O das unidades GlcNAc a banda em 1410 cm^{-1} representa as deformações simétricas C–H e a banda de amida II é proveniente das vibrações da ligação N–H e ao estiramento C–N, é esperado que um aumento no valor do $\overline{GA}$ e, portanto, na ocorrência de unidades acetiladas leve a estes efeitos.

A adição de gelatina levou à intensificação das bandas referentes à amida I e ao estiramento simétrico C–O–C, enquanto, por outro lado, a inclusão da resina de jatobá não modificou os espectros, possivelmente devido à sobreposição das bandas observadas no espectro da resina pelas bandas da quitosana e gelatina.

4.5.2 Microscopia eletrônica de varredura

As fotomicrografias dos filmes não neutralizados de quitosana/gelatina com adição de resina de jatobá, mostradas nas Figuras 28 (A, B e C), revelaram uma morfologia rugosa e irregular, independentemente do $\overline{GA}$, enquanto os filmes sem a resina apresentaram todos a formação de uma superfície lisa e compacta, como exemplificado por QMG (Figura 28D).

Ao contrário da quitosana e da gelatina, polímeros com elevada massa molar, os principais componentes da resina de jatobá são moléculas pequenas, como os diterpenos e os sesquiterpenos, portanto, a rugosidade observada nos filmes com adição de resina deve estar relacionada ao pequeno tamanho de cadeia destas moléculas. O tamanho reduzido e a hidrofobicidade destas moléculas faz com que sua distribuição não seja tão regular quanto a dos polímeros ao longo da amostra, resultando em pequenas regiões de agregados, nas quais se formam os relevos observados nas micrografias.

Figura 28 – Fotomicrografias dos filmes não neutralizados QBGR (A), QMGR (B), QAGR (C) e QMG (D), todas com um aumento de 1000x.

4.5.3 Termogravimetria

A análise dos filmes por termogravimetria visa elucidar seu perfil de degradação térmica, o que permite estudar o efeito de mudanças na composição ou na estrutura destes materiais sobre sua estabilidade térmica. As Figuras 29, 30 e 31 apresentam as curvas termogravimétricas obtidas para as amostras de quitosana, os filmes de quitosana/gelatina e os filmes de quitosana/gelatina com resina de jatobá, respectivamente. As Figuras 29 a 31 apresentam ainda as derivadas das curvas termogravimétricas, a fim de melhorar a visualização das diferentes etapas de perda de massa observadas para cada amostra, permitindo ilustrar a similaridade no perfil de degradação térmica observado para os conjuntos de amostras nos quais apenas o $\overline{GA}$ é alterado.

Figura 29 – Curvas termogravimétricas das amostras QA (—), QM (—) e QB (—) com suas respectivas derivadas (em tracejado).

Figura 30 – Curvas termogravimétricas dos filmes QAG (—), QMG (—) e QBG (—) neutralizados com suas respectivas derivadas (em tracejado).

Figura 31 – Curvas termogravimétricas dos filmes QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—) neutralizados com suas respectivas derivadas (em tracejado).

Para elucidar as mudanças no processo de degradação térmica dos filmes de quitosana/gelatina decorrentes da adição de resina de jatobá, a resina pura também foi analisada por termogravimetria. As curvas termogravimétricas para a resina de jatobá e para a gelatina, bem como suas derivadas são mostradas na Figura 32.

Figura 32 – Curvas termogravimétricas para resina de jatobá (—), gelatina (—) e QB (—) com suas respectivas derivadas (em tracejado).

A resina de jatobá, ao contrário dos filmes, é totalmente degradada abaixo de 550°C, o que deve estar relacionado ao menor tamanho de cadeia dos componentes da resina quando comparado às longas cadeias dos polímeros formadores dos filmes, quitosana e gelatina.

Para facilitar a comparação entre os perfis de degradação térmica observados para os filmes com e sem adição de resina de jatobá, assim como da gelatina e da resina de jatobá pura, os diferentes estágios de perda de massa e seus valores foram organizados na Tabela 5. A gelatina, as amostras de quitosana e os filmes de quitosana/gelatina apresentaram três estágios de perda de massa, o primeiro entre 25 e 200°C, referente a perda de água contida no material, um segundo estágio entre 200 e 400°C, no qual ocorre a degradação das cadeias poliméricas e um terceiro estágio a partir de 400°C, no qual ocorre a carbonização.⁶⁶

Tabela 5 – Perdas de massa em porcentagem para a resina de jatobá, a gelatina, as amostras de quitosana e os filmes.

Amostra	Perda de massa (%)			
	25-200°C	200-400°C	400-800°C	
QB	13,1	41,2	45,7	
QM	13,5	46,6	39,9	
QA	16,5	49,2	34,3	
QBG	15,4	39,4	45,2	
QMG	14,0	41,6	44,4	
QAG	17,2	41,2	41,6	
Gelatina	8,0	43,4	48,6	
	25-200°C	200-350°C	350-470°C	470-800°C
QBGR	12,3	27,4	28,1	32,2
QMGR	11,6	28,7	23,9	35,8
QAGR	12,5	28,7	25,0	33,8
Resina de jatobá	25-200°C	200-350°C	350-410°C	410-460°C
	1,5	16,7	43,3	20,3
				460- 800°C
				18,2

As perdas de massa para as amostras de quitosana foram diretamente influenciadas pela variação no valor do $\overline{GA}$. O aumento do $\overline{GA}$ do polímero levou a um aumento na característica higroscópica dos materiais, isto é, resultou em

aumento dos valores de perda de massa no primeiro estágio. Apesar de aumentos no valor do $\overline{GA}$ resultarem na substituição de grupos amino por grupos acetamida, mais hidrofóbicos, o que deveria reduzir a afinidade da quitosana com a água, estas mudanças devem levar também a uma expansão da estrutura polimérica tridimensional, uma vez que as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio deverão reduzir, facilitando o acesso às moléculas de água.

O valor de perda de massa na primeira etapa para a gelatina foi muito menor que o observado para as amostras de quitosana, ressaltando como a quitosana é um polímero altamente higroscópico. Porém, apesar da menor quantidade de água na gelatina, sua mistura com a quitosana levou a maiores valores de perda de massa no primeiro estágio, contudo, esse resultado pode ter sido observado em função de estarmos comparando as amostras de quitosana na forma de pó com as amostras de quitosana/gelatina na forma de filme, morfologia menos compacta e, portanto, com maior volume livre para adsorção de moléculas de água.

Para os filmes com adição de resina de jatobá ocorreu uma alteração no perfil de decomposição a partir de 200°C, passando a apresentar quatro estágios de perda de massa. Assim como para os filmes de quitosana/gelatina, a primeira etapa se refere à perda de água, porém a etapa de decomposição ocorreu em duas etapas, ao invés de uma, sendo a primeira entre 200 e 350°C e a segunda entre 350 e 470°C e, por fim, a carbonização iniciou a partir de 350°C. Como a resina de jatobá é composta por uma série de diferentes substâncias, dentre elas diversos diterpenos e sesquiterpenos, sua decomposição térmica ocorre em diversas etapas, com a degradação de grupos diferentes de substâncias em cada etapa. Portanto, a adição da resina à matriz polimérica deve levar a uma divisão da etapa de degradação do material em duas etapas (200-350°C e 350-470°C) por ocorrer principalmente a decomposição polimérica até 350°C e a decomposição dos demais componentes até 470°C.

A estabilidade térmica dos filmes sem resina de jatobá, medida por meio da temperatura de início da degradação (T_{onset}), aumentou ligeiramente com o aumento do $\overline{GA}$ (Tabela 6). Contudo, a expectativa era de que o oposto fosse observado, já que um aumento no $\overline{GA}$ leva à redução da cristalinidade do material, que deveria resultar em redução da estabilidade térmica. Logo, outro fator além da

cristalinidade deve estar influenciando a estabilidade dos filmes, levando ao resultado obtido.

Tabela 6 – Temperaturas de início da degradação (T_{onset}) para a resina de jatobá e os filmes.

Amostras	T_{onset} (°C)
QBG	265,7
QMG	266,2
QAG	272,6
QBGR	262,2
QMGR	260,9
QAGR	261,0
Resina de jatobá	236,0

A adição de resina de jatobá reduziu a estabilidade térmica de todas as amostras, o que se deve ao fato da própria resina de jatobá apresentar menor valor de T_{onset} . Contudo, essa redução foi maior conforme se aumentou o $\overline{GA}$, levando os filmes com resina de jatobá a apresentarem aproximadamente todos a mesma estabilidade térmica.

Apesar da redução da estabilidade térmica observada com a inclusão da resina de jatobá ou com a redução do $\overline{GA}$, todas as amostras apresentaram estabilidade térmica o suficiente para garantir seu uso em sistemas biológicos sem comprometimento de suas propriedades.

4.5.4 Intumescimento

A habilidade de absorver água é um importante requisito dos materiais para aplicação em regeneração cutânea, já que estes devem ser aptos a absorver o excesso de exsudato produzido pelo ferimento e, assim, manter o ambiente úmido. Como o ressecamento de lesões pode causar dor (pelo estímulo de terminações nervosas expostas durante este processo) e dificultar a migração das células epiteliais, responsáveis pela reconstituição do tecido danificado, a capacidade de intumescimento é um fator de extrema relevância para o avanço no processo de cicatrização de qualquer ferida.⁶⁵

As Figuras 33 e 34 apresentam, respectivamente, as curvas de intumescimento para os filmes de quitosana/gelatina e para aqueles com adição de resina de jatobá, todos previamente neutralizados.

Figura 33 – Curvas de intumescimento dos filmes QAG (—), QMG (—) e QBG (—) previamente neutralizados.

Figura 34 – Curvas de intumescimento dos filmes QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—) previamente neutralizados.

É evidente o efeito do $\overline{GA}$ da quitosana sobre esta propriedade dos filmes, exibindo valores de intumescimento consideravelmente maiores para os filmes conforme o aumento no $\overline{GA}$. Trung et al.³² relataram o mesmo efeito em filmes de quitosana derivada de α -quitina, relacionando estes resultados com a redução da cristalinidade dos filmes conforme o aumento no $\overline{GA}$. Como o intumescimento depende da presença de grupos hidrofílicos em regiões acessíveis, a redução na cristalinidade aumenta a disponibilidade destes grupos, levando ao efeito observado.

O efeito do $\overline{GA}$ sobre a absorção de PBS pelos filmes manteve-se mesmo com a adição de resina de jatobá, porém os valores de intumescimento ao fim de 24h de ensaio foram maiores no sistema composto apenas por quitosana e gelatina, revelando um efeito hidrofóbico com a inclusão do composto. Possivelmente os componentes da resina interagem com a quitosana e gelatina em concorrência com a água, reduzindo o grau de intumescimento.

Buscando estudar o efeito do processo de neutralização sobre o grau de intumescimento dos filmes foram testados também os filmes não neutralizados, cujas curvas de intumescimento obtidas são apresentadas nas Figuras 35 e 36. Os filmes com quitosana de menor $\overline{GA}$ (QBG e QBGR) não neutralizados apresentaram um perfil diferente de absorção, aumentando rapidamente sua massa durante os primeiros 10 minutos e então a reduzindo bruscamente, efeito que deve estar relacionado com a liberação do acetato em excesso presente nestes filmes.

Figura 35 – Curvas de intumescimento dos filmes QAG (—), QMG (—) e QBG (—) não neutralizados.

Após neutralização os filmes com quitosana de baixo e médio $\overline{GA}$ apresentaram redução nos valores de intumescimento independentemente da adição de resina, efeito relacionado com a redução do volume livre entre as cadeias para acomodação da água após a retirada do acetato.

Figura 36 – Curvas de intumescimento dos filmes QAGR (—), QMGR (—) e QBGR (—) não neutralizados.

Os valores de intumescimento apresentados pelos filmes neutralizados variaram de 130% (QBGR) a 450 % (QAG), portanto, os materiais desenvolvidos poderiam ser testados tanto para uso em feridas ressecadas, nas quais o material que menos intumesce poderia ser empregado previamente hidratado, buscando umedecer o local da lesão ou, ainda, para uso em feridas muito exsudativas, onde um material mais absorvente poderia ser empregado seco para controle da umidade local, buscando assim evitar um agravamento da lesão decorrente de maceração do tecido lesionado por acúmulo de exsudato.

4.5.5 Permeação ao vapor de água

A produção de exsudato em feridas é um processo que contribui para a obtenção de um ambiente úmido no local da lesão, condição favorável aos processos envolvidos na cicatrização. Contudo, a exposição deste fluido leva à sua

evaporação e ao ressecamento da ferida, retardando o processo de fechamento da lesão e aumentando a ocorrência de dor. Por outro lado, a completa impermeabilização da área da lesão restringe a saída de vapor de água, levando ao acúmulo de líquido na ferida que pode resultar em maceração do tecido.⁸⁹ Portanto, avaliar a permeação de vapor de água apresentada por cada filme é fundamental para se estudar a possibilidade de usar estes materiais na oclusão de lesões. A Tabela 7 apresenta os valores de permeação ao vapor de água (PV) obtida para os filmes neutralizados.

Tabela 7 – Valores de permeação ao vapor de água a 25°C para os filmes.

Amostra	PV (g m ⁻¹ s ⁻¹ Pa ⁻¹)
QBG	1,22 x 10 ⁻¹⁰
QMG	1,00 x 10 ⁻¹⁰
QAG	9,18 x 10 ⁻¹¹
QBGR	1,62 x 10 ⁻¹⁰
QMGR	1,28 x 10 ⁻¹⁰
QAGR	9,96 x 10 ⁻¹¹

O maior valor de PV medido dentre as amostras sem resina de jatobá foi o de QBG, 1,22 x 10⁻¹⁰ g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹. Ao aumentar o $\overline{GA}$ da quitosana as reduções no valor de PV foram da ordem de 18 e 25 %, respectivamente, para QMG e QAG, o que indica que essa redução deve ter sido provocada, de fato, pela mudança de $\overline{GA}$ e não pela redução na massa molar que ocorreu com a reacetilação, já que QMG e QAG apresentam valores de massa molar muito próximos e, ainda assim, diferiram em seus valores de PV.

Apesar de aumentos no valor do $\overline{GA}$ da quitosana resultarem na redução da cristalinidade dos materiais produzidos com este polímero e, portanto, aumentarem o volume livre destes, o que deveria facilitar a permeação de moléculas pequenas como a da água, outro efeito está envolvido com a permeação de vapor de água, a hidrofiliabilidade dos materiais, o que leva ao resultado obtido. O aumento no valor de $\overline{GA}$ reduz o número de unidades com grupo amino, diminuindo, portanto, sua afinidade à água, o que leva a redução nos valores de PV. Ziani et al.⁶ mediram a PV de filmes de quitosana derivada de α -quitina com $\overline{GA}$ de 4 e 39% e encontraram para ambos valores na ordem de 2,5 x 10⁻¹⁰ g m⁻¹ s⁻¹ Pa⁻¹, indicando

ausência de efeito do $\overline{GA}$ sobre a propriedade. Contudo, os filmes analisados pelos autores não foram neutralizados, o que sugere que a presença de resíduos de solventes usados em sua preparação deve ter interferido na medida, provavelmente por estes concorrerem com as moléculas de água na interação com os grupos amino, resultando em valores de permeação ao vapor de água muito semelhantes para os filmes produzidos.

Garcia, Pinotti e Zaritzky⁷³ relataram para filmes de quitosana derivada de α -quitina não neutralizados com $\overline{GA}$ de 15% um valor de PV de $4,5 \times 10^{-11} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$, enquanto López-Mata et al.¹³ observaram uma TPV equivalente a um valor de PV de $4,0 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para um filme produzido com quitosana também derivada de α -quitina, porém com $\overline{GA}$ de 34 % e adição de glicerol e Tween 80. Para filmes de quitosana com gelatina, Pereda et al.⁷ relataram que a adição de gelatina à matriz de quitosana reduziu o valor de PV em 11%, resultando em um valor de PV de $1,2 \times 10^{-10} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ para um filme neutralizado produzido com uma quitosana com $\overline{GA}$ de 10 % e com adição de glicerol. Este valor é semelhante ao encontrado para a amostra QBG.

Ao analisar os valores de PV dos filmes com adição de resina de jatobá percebe-se, primeiramente, que o efeito do $\overline{GA}$ sobre os filmes se mantém, observando o maior valor da propriedade para QBGR, com reduções de 21 e 39%, respectivamente, para QMGR e QAGR. Além disso, a adição de resina aumentou os valores de PV em todos os casos, sendo o incremento na propriedade maior quanto menor o $\overline{GA}$. Os aumentos observados foram de 33, 28 e 9% em relação aos filmes sem resina, para as amostras produzidas, respectivamente, com QB, QM e QA. A resina, por ser composta, principalmente de moléculas hidrofóbicas, deve estar aumentando a PV devido a um efeito relacionado ao volume livre na estrutura polimérica. Suas moléculas podem realizar interações intermoleculares com a quitosana e, assim, afastar suas cadeias entre si e das moléculas de gelatina, aumentando o volume por onde difundirão as moléculas de água. Nesse caso, é possível ainda que tal efeito leve ao aumento do número de grupos amino livres por dificultar a ocorrência de ligações de hidrogênio com a molécula de gelatina, o que também contribuiria para o efeito observado.

Xu et al.⁸⁹ avaliaram o efeito da permeação de vapor de água de poliuretanas com diferentes graus de porosidade sobre a cicatrização de feridas,

indicando que valores de PV da ordem de $6,5 \times 10^{-9} \text{ g m}^{-1} \text{ s}^{-1} \text{ Pa}^{-1}$ apresentaram os melhores resultados de regeneração tecidual. O maior valor de PV obtido para os filmes analisados apresenta um valor de PV equivalente a 2,5% do valor ideal, portanto, os valores de PV dos filmes estão abaixo da faixa ótima de ajuste desta propriedade, o que indica que alguma estratégia deve ser utilizada para melhorar esta, como a incorporação de plastificantes, como o glicerol⁷³.

4.5.6 Solubilidade em água

Conhecer a solubilidade dos filmes desenvolvidos é fundamental para se assegurar a viabilidade do uso destes materiais como coberturas para lesões cutâneas, visto que seu uso deverá ocorrer na presença de exsudato, um fluido rico em água, composto também por nutrientes e diversas células envolvidas com o processo de cicatrização. Ademais, não foram encontrados registros na literatura relatando a influência do $\overline{GA}$ da quitosana sobre esta propriedade, o que intensifica a relevância desta análise. Os valores de solubilidade em água (a 37°C) após 24 h determinados para cada amostra são listados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de solubilidade em água após 24 h (37°C) para os filmes.

Amostra	solubilidade (%)
QBG	$0,90 \pm 0,45^a$
QMG	$4,43 \pm 0,62^{a,b}$
QAG	$13,80 \pm 1,46^c$
QBGR	$0,40 \pm 0,40^{a,b,d}$
QMGR	$4,34 \pm 0,66^{a,b,d}$
QAGR	$10,09 \pm 1,12^c$

Valores com a mesma letra sobrescrita (a-d) não são significativamente diferentes ($p \geq 0,05$).

A análise dos valores de solubilidade dos filmes revela o efeito do $\overline{GA}$ da quitosana sobre esta propriedade, podendo-se notar um aumento na perda de material solúvel conforme se aumenta o $\overline{GA}$ das amostras. Este efeito, assim como o intumescimento, deve estar relacionado, ao aumento de cristalinidade observado nos filmes de quitosana com menores valores de $\overline{GA}$ ³², já que estes efetuam um

número maior de ligações de hidrogênio, devido à presença de mais grupos amino, levando à formação de regiões cristalinas no polímero. Essas regiões dificultam o acesso das moléculas de água por apresentarem uma organização compacta e por empregarem os grupos amino, hidrofílicos, na estabilização desta rede de interações, restringindo a interação da água com estes grupos.

Contudo, este efeito leva a diferenças significativas no valor de solubilidade apenas quando se comparam as amostras obtidas com a QB e a QA ou com a QM e a QA. No caso, por exemplo, das amostras QBGR e QMGR, ocorre um aumento de 10 vezes no valor da solubilidade, entretanto, não há diferença significativa entre os valores. Uma razão para tal fato é o pequeno número de replicatas utilizadas no ensaio, três repetições, o que leva a valores de desvio-padrão elevados. Portanto, a realização do ensaio com um número maior de replicatas deveria aumentar o número de resultados significativamente diferentes.

A adição da resina de jatobá também leva a reduções no valor de solubilidade dos filmes, com uma redução mais expressiva nos filmes elaborados com a QA, para os quais a redução na propriedade foi de 27 %. Contudo, a presença da resina não levou a mudanças significativas na solubilidade em água. O efeito de redução da solubilidade em água dos filmes com a inclusão da resina de jatobá deve estar relacionado à composição da resina, rica em compostos hidrofóbicos que dificultam o acesso das moléculas de água às cadeias poliméricas, diminuindo a solvatação destas moléculas. Este efeito deve contribuir para manter a integridade das funções de barreira dos materiais, contudo, por outro lado, reduz a liberação de seus componentes, que devido à sua bioatividade, poderiam vir a atuar de forma a acelerar o processo de cicatrização.

Portanto, é possível observar que a mudança do $\overline{GA}$ da quitosana é um fator que afeta a solubilidade dos filmes mais intensamente que a adição de resina de jatobá. Ao comparar as amostras QBG e QMG com a amostra QAGR, isto é, aumentando o $\overline{GA}$ da quitosana e adicionando resina de jatobá, o efeito observado é de aumento na solubilidade, indicando que o efeito de aumento da solubilidade em virtude do aumento do $\overline{GA}$ foi predominante sobre o efeito de redução na propriedade em virtude da adição de resina de jatobá.

López-Mata et al.¹³ relatam para filmes de quitosana com $\overline{GA}$ de 34% produzidos com adição de glicerol um valor de solubilidade em água de 55% após

24 h a 20°C, contudo, estes filmes foram analisados sem uma prévia neutralização. Quanto aos filmes obtidos por Pereda et al.⁷, produzidos utilizando quitosana com $\overline{GA}$ de 10% e glicerol e neutralizados por ajuste do pH das soluções formadoras de filmes com NaOH, estes apresentaram solubilidade em água de 16% após 24 h a 23°C, o que demonstra o efeito estabilizador da neutralização sobre a solubilidade destes materiais, uma vez que resíduos da solução ácida utilizada na preparação dos filmes podem diminuir o pH da água utilizada no ensaio, aumentando a solubilidade da quitosana. Pereda et al.⁷ produziram também filmes de quitosana/gelatina usando o mesmo processo de neutralização, observando no entanto, valores de solubilidade de 25%, o que mostra que a inclusão da gelatina aumenta a solubilidade da mistura.

Porém, o pH da pele é menor que o pH da água utilizada neste ensaio (pH 6,6), variando entre 4,0 e 6,0⁹⁰. Portanto, um ensaio qualitativo foi feito para avaliar a estabilidade destes filmes em condições mais semelhantes à observada em lesões cutâneas. A Figura 37 mostra os diferentes filmes de quitosana/gelatina após 72h em tampão ácido acético/acetato de sódio (pH 5,15) a 37°C.

Figura 37 – Filmes imersos por 72 h a 37°C em tampão ácido acético/acetato de sódio (pH 5,15).

Como pode-se observar, apenas as amostras com adição de resina de jatobá resistiram à solubilização na solução ácida, o que indica que para longos períodos de aplicação do material, o uso da mistura quitosana/gelatina deve ser evitado, a menos que se deseje a completa desintegração do curativo sem sua retirada. Para as amostras com adição de resina de jatobá a integridade física dos filmes foi mantida, indicando que estes materiais podem ser aplicados por tempos mais longos sem a perda de sua função de barreira.

5 CONCLUSÃO

A produção de amostras de quitosana com diferentes valores de $\overline{GA}$ (7%, 20% e 35%) foi possível, contudo, com pequena variação na massa molar, variação perceptível nas medidas de viscosidade das soluções. A resina de jatobá foi eficientemente solubilizada e sua purificação revelou um baixo teor de impurezas, enquanto sua caracterização por FT-IR indicou que o material foi recentemente coletado.

A avaliação da atividade antimicrobiana das soluções formadoras de filmes produzidas com adição de gelatina e com gelatina e resina de jatobá mostrou que tanto menores valores de $\overline{GA}$ quanto a inclusão de resina diminuem a CBM dos materiais. As amostras apresentaram atividade bactericida a partir das concentrações $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, para QAG, QBG e QBGR, indicando uma maior ação antimicrobiana para amostras de quitosana conforme aumenta o teor de unidades GlcN, bem como evidenciando um possível efeito sinérgico com a inclusão da resina de jatobá.

Os aspectos visuais, bem como a morfologia dos filmes não foi afetada pela variação no $\overline{GA}$, contudo, a inclusão de resina de jatobá levou à formação de uma superfície rugosa e alterou a coloração das amostras.

A influência do $\overline{GA}$ da quitosana sobre as propriedades de seus filmes com gelatina ficou evidente pelos ensaios de intumescimento, nos quais os filmes produzidos com quitosana de maior $\overline{GA}$ apresentaram a melhor capacidade de intumescer. Por outro lado, valores menores de $\overline{GA}$ aumentam a permeação ao vapor de água e reduzem em até 15 vezes sua solubilidade.

A resina de jatobá, por sua vez reduziu consideravelmente o intumescimento e, de maneira menos pronunciada, a estabilidade térmica dos filmes. Sua inclusão resultou ainda no aumento da permeabilidade ao vapor de água e na redução da solubilidade destes materiais, obtendo-se, inclusive, filmes resistentes à solubilização em meio ácido por um longo tempo de uso.

6 REFERÊNCIAS*

- 1 CHEN, F.-M.; LIU, X. Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 53, p. 86-168, 2016.
- 2 ASSIS, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HDMS. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 603-606, 2010.
- 3 THEIN-HAN, W. W.; SAIKHUN, J.; PHOLPRAMOO, C.; MISRA, R. D. K.; KITIYANANT, Y. Chitosan–gelatin scaffolds for tissue engineering: Physico-chemical properties and biological response of buffalo embryonic stem cells and transfectant of GFP–buffalo embryonic stem cells. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 9, p. 3453–3466, 2009.
- 4 JAYAKUMAR, R.; MENON, D.; MANZOOR, K.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomedical applications of chitin and chitosan based nanomaterials - A short review. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 2, p. 227-232, 2010.
- 5 BALAU, L.; LISA, G.; POPA, M. I.; TURA, V.; MELNIG, V. Physico–chemical properties of chitosan films. **Central European Journal of Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 638-647, 2004.
- 6 ZIANI, K.; OSES, J.; COMA, V.; MATÉ, J. I. Effect of the presence of glycerol and Tween 20 on the chemical and physical properties of films based on chitosan with different degree of deacetylation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2159-2165, 2008.
- 7 PEREDA, M.; PONCE, A. G.; MARCOVICH, N. E.; RUSECKAITE, R. A.; MARTUCCI, J. F. Chitosan-gelatin composites and bi-layer films with potential antimicrobial activity. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1372-1381, 2011.
- 8 JIANKANG, H.; DICHEN, L.; YAXIONG, L.; BO, Y.; HANXIANG, Z.; QIN, L.; BINGHENG, L.; YI, L. Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 1, p. 453–461, 2009.
- 9 ZHANG, L.; AO, Q.; WANG, A.; LU, G.; KONG, L.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 77A, n. 2, p. 277-284, 2006.
- 10 HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin–chitosan blend edible films. **Food Chemistry**, v. 136, n. 3-4, p. 1490–1495, 2013.
- 11 YANG, J.; WOO, S. L.; YANG, G. H.; WANG, J. M.; CUI, L.; LIU, W.; CAO, Y. L. Construction and clinical application of a human tissue-engineered epidermal membrane. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 125, n. 3, p. 901-909, 2010.
- 12 ABDOLLAHI, M.; REZAEI, M.; FARZI, G. Improvement of active chitosan film properties with rosemary essential oil for food packaging. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 4, p. 847-853, 2012.

* De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

- 13 LÓPEZ-MATA, M. A.; RUIZ-CRUZ, S.; SILVA-BELTRÁN, N. P.; ORNELAS-PAZ, J. J.; ZAMUDIO-FLORES, P. B.; BARRUEL-IBARRA, S. E. Physicochemical, antimicrobial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with carvacrol. **Molecules**, v. 18, n. 11, p. 13735-13753, 2013.
- 14 DOMÉNECH-CARBÓ, M. T.; CRUZ-CAÑIZARES, J.; OSETE-CORTINA, L.; DOMÉNECH-CARBÓ, A.; DAVID, H. Ageing behaviour and analytical characterization of the Jatobá resin collected from *Hymenaea stigonocarpa* Mart. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 284, n. 1-3, p. 81-92, 2009.
- 15 NAKANO, T.; DJERASSI, C. Terpenoids. XLVI. Copalic acid. **Journal of Organic Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 167-173, 1961.
- 16 ABDOL, E. S.; NAGY, K. S. A.; ELSABEE, M. Z. Extraction and characterization of chitin and chitosan from local sources. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 5, p. 1359-1367, 2008.
- 17 GOY, R. C.; BRITTO, D.; ASSIS, O. B. G. A review of the antimicrobial activity of chitosan. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 19, n. 3, p. 241-247, 2009.
- 18 CAMPOS, M. G. N.; MEI, L. H. I.; SANTOS-JUNIOR, A. R. Sorbitol-plasticized and neutralized chitosan membranes as skin substitutes. **Materials Research**, v. 18, n. 4, p. 781-790, 2015.
- 19 NASDAQ GLOBENEWSWIRE. **Chitosan Market size is expected to reach USD 7.90 billion by 2024**. Global Market Insights, 2016. Disponível em: <<https://globenewswire.com/news-release/2016/09/07/870020/0/en/Chitosan-Market-size-is-expected-to-reach-USD-7-90-billion-by-2024-Global-Market-Insights-Inc.html>>. Acesso em: 29 out. 2016.
- 20 LAVALL, R. L.; ASSIS, O. B. G.; CAMPANA-FILHO, S. P. β -Chitin from the pens of *Loligo* sp.: Extraction and characterization. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 13, p. 2465-2472, 2007.
- 21 JANEGITZ, B. C.; LOURENÇÃO, B. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, n.4, p. 879-884, 2007.
- 22 MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.
- 23 FALGUERA, V.; QUINTERO, J. P.; JIMÉNEZ, A.; MUÑOZ, J. A.; IBARZ, A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 6, p. 292-303, 2011.
- 24 TAVARIA, F. K.; COSTA, E. M.; PINA-VAZ, I.; CARVALHO, M. F.; PINTADO, M. M. A quitosana como biomaterial odontológico: estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 29, n. 1, p. 110-120, 2013.
- 25 OLIVEIRA, L. S. A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 9, p. 37-44, 2010.

- 26 CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- 27 CHANDUMPAI, A.; SINGHPIBULPORN, N.; FAROONGSARNG, D.; SORNPRASIT, P. Preparation and physico-chemical characterization of chitin and chitosan from the pens of the squid species, *Loligo lessoniana* and *Loligo formosana*. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 4, p. 467-474, 2004.
- 28 RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- 29 NATURA MEDITERRANEO. **Forum calamaro *Loligo vulgaris***. 2006. Disponível em: <http://www.naturamediterraneo.com/forum/topic.asp?TOPIC_ID=96474>. Acesso em: 31 out. 2016.
- 30 NORIEGA, S. E.; SUBRAMANIAN, A. Consequences of neutralization on the proliferation and cytoskeletal organization of chondrocytes on chitosan-based matrices. **International Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 2011, 2011.
- 31 THEIN-HAN, W. W.; MISRA, R. D. K. Biomimetic chitosan–nanohydroxyapatite Composite scaffolds for bone tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 4, p. 1182-1197, 2009.
- 32 TRUNG, T. S.; THEIN-HAN, W. W.; QUI, N. T.; NG, C.-H.; STEVENS, W. F. Functional characteristics of shrimp chitosan and its membranes as affected by the degree of deacetylation. **Bioresource Technology**, v. 97, n. 4, p. 659–663, 2006.
- 33 WENLING, C.; DUOHUI, J.; JIAMOU, L.; YANDAO, G.; NANMING, Z.; XIUFANG, Z. Effects of the degree of deacetylation on the physicochemical properties and Schwann cell affinity of chitosan films. **Journal of Biomaterials Applications**, v. 20, n. 2, p. 157-177, 2005.
- 34 CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, n. 3, p. 261-268, 2001.
- 35 DJAGNY, K. B.; WANG, Z.; XU, S. Gelatin: A valuable protein for food and pharmaceutical industries: Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 41, n. 6, p. 481-492, 2001.
- 36 NITTA GELATIN. **Collagen material business**. 201- Disponível em: <<http://www.nitta-gelatin.co.jp/english/company/business.html>>. Acesso em: 30 out. 2016.
- 37 BARANENKO, D. A.; KOLODYAZNAYA, V. S.; ZABELINA, N. A. Effect of composition and properties of chitosan-based edible coatings on microflora of meat and meat products. **Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria**, v. 12, n. 2, p. 149-157, 2013.
- 38 GÓMEZ-ESTACA, J.; LACEY, A. L.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M. C.; MONTERO, P. Biodegradable gelatina-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. **Food Microbiology**, v. 27, n. 7, p. 889-896, 2010.

- 39 NG, W. L.; YEONG, W. Y.; NAING, M. W. Polyelectrolyte gelatin-chitosan hydrogel optimized for 3D bioprinting in skin tissue engineering. **International Journal of Bioprinting**, v. 2, n. 1, p. 53-62, 2016.
- 40 DHANDAYUTHAPANI, B.; KRISHNAN, U. M.; SETHURAMAN, S. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin blend nanofibers for skin tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials**, v. 94B, n. 1, p. 264-272, 2010.
- 41 LAN, G.; LU, B.; WANG, T.; WANG, L.; CHEN, J.; YU, K.; LIU, J.; DAI, F.; WU, D. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 136, p. 1026-1034, 2015.
- 42 ABRUZZO, A.; CERCHIARA, T.; BIGUCCI, F.; GALLUCCI, M. C.; LUPPI, B. Mucoadhesive buccal tablets based on chitosan/gelatin microparticles for delivery of propranolol hydrochloride. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 12, p. 4365-4372, 2015.
- 43 HUNTER, K. T.; MA, T. In vitro evaluation of hydroxyapatite–chitosan–gelatin composite membrane in guided tissue regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 101A, n. 4, 2013.
- 44 PAUL, S.; JAYAN, A.; SASIKUMAR, C. S. Physical, chemical and biological studies of gelatin/chitosan based transdermal films with embedded silver nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 12, p. 975-986, 2015.
- 45 NAGAHAMA, H.; MAEDA, H.; KASHIKI, T.; JAYAKUMAR, R.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Preparation and characterization of novel chitosan/gelatin membranes using chitosan hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, n. 2, p. 255-260, 2009.
- 46 NGUYEN, V. C.; NGUYEN, V. B.; HSIEH, M.-F. Curcumin-loaded chitosan/gelatin composite sponge for wound healing application. **International Journal of Polymer Science**, v. 2013:106570, p. 1-7, 2013.
- 47 HUSSAIN, M. R.; IMAN, M.; MAJI, T. K. Determination of degree of deacetylation of chitosan and their effect on the release behavior of essential oil from chitosan and chitosan-gelatin complex microcapsules. **International Journal of Advanced Engineering Applications**, v. 2, n. 4, p. 4-12, 2013.
- 48 LIU, Z.; GE, X.; LU, Y.; DONG, S.; ZHAO, Y.; ZENG, M. Effects of chitosan molecular weight and degree of deacetylation on the properties of gelatine-based films. **Food Hydrocolloids**, v. 26, n. 1, p. 311-317, 2012.
- 49 LANGENHEIM, J. H.; STUBBLEBINE, W. H.; LINCOLN, D. E.; FOSTER, C. E. Implications of variation in resin composition among organs, tissues and populations in the tropical legume *Hymenaea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 6, n. 4, p. 299-313, 1978.
- 50 SILVA, M. S.; LEITE, K. R. B.; SABA, M. D. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Hymenaea martiana* Hayne (Caesalpinioideae-Fabaceae): espécie de uso medicinal em Caetité-BA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 673-679, 2012.

- 51 CHAVES, E. F. M.; BARROS, R. F. M. Diversidade e uso de recursos medicinais do carrasco na APA da Serra da Ibiapaba, Piauí, Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 3, p. 476-486, 2012.
- 52 VALE, C. R.; SILVA, C. R.; OLIVEIRA, C. M. A.; SILVA, A. L.; CARVALHO, S.; CHEN-CHEN, L. Assessment of toxic, genotoxic, antigenotoxic, and recombinogenic activities of *Hymenaea courbaril* (Fabaceae) in *Drosophila melanogaster* and mice. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 2712-2724, 2013.
- 53 DEMETZOS, C.; DIMAS, K. S. Labdane -type diterpenes: chemistry and biological activity. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 25, p. 235-292, 2001.
- 54 CUNNINGHAM, A.; MARTIN, S. S.; LANGENHEIM, J. H. Labd-13-en-8-ol-15-oic acid in the trunk resin of Amazonian *Hymenaea courbaril*. **Phytochemistry**, v. 13, n. 1, p. 294-295, 1974.
- 55 GIRÓN, N.; TRAVÉS, P. G.; RODRÍGUEZ, B.; LÓPEZ-FONTAL, R.; BOSCA, L.; HORTELANO, S.; HERAS, B. Supression of inflammatory responses by labdane-type diterpenoids. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 228, n. 2, p. 179–189, 2008.
- 56 VARGAS, F. S.; ALMEIDA, P. D. O.; ARANHA, E. S. P.; BOLETI, A. P. A.; NEWTON, P.; VASCONCELLOS, M. C.; VEIGA-JUNIOR, V. F.; LIMA, E. S. Biological activities and cytotoxicity of diterpenes from *Copaifera* spp. oleoresins. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6194-6210, 2015.
- 57 DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. 2005. 212 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química na área de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- 58 FERREIRA, M. C.; PAGGIARO, A. O.; ISAAC, C.; TEIXEIRA-NETO, N.; SANTOS, G. B. Substitutos cutâneos: conceitos atuais e proposta de classificação. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 26, n. 4, p. 696-702, 2011.
- 59 GOCONQR. **A pele**. 2014. Disponível em: <<https://www.goconqr.com/en/p/148644-a-pele-notes>>. Acesso em 18 nov. 2015.
- 60 MANDELBAUM, S. H.; SANTIS, E. P. D.; MANDELBAUM, M. H. S. A. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.
- 61 VELNAR, T.; BAILEY, T.; SMRKOLJ, V. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, p. 1528-1542, 2009.
- 62 GOMES, F. S. L.; CARVALHO, D. V. Tratamento de ferida: revisão da literatura. **Revista Mineira de Enfermagem**, v. 6, n. 1/2, p. 67-72, 2002.
- 63 RODAS, A. C. D. **Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos**. 2004. 149 f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

- 64 ISAAC, C.; LADEIRA, P. R. S.; RÊGO, F. M. P.; ALDUNATE, J. C. B.; FERREIRA, M. C. Processo de cura das feridas: cicatrização fisiológica. **Revista de Medicina (São Paulo)**, v. 89, n. 3/4, p. 125-131, 2010.
- 65 FIELD, C. K.; KERSTEIN, M. D. Overview of wound healing in a moist environment. **The American Journal of Surgery**, v. 167, n. 1A(suppl), p. 2S-6S, 1994.
- 66 HORN, M. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Interaction of anionic collagen with chitosan. Effect on thermal and morphological characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 2, p. 239-243, 2009.
- 67 VACHOUD, L.; ZYDOWICZ, N.; DOMARD, A. Formation and characterisation of a physical chitin gel. **Carbohydrate Research**, v. 302, n. 3-4, p. 169-177, 1997.
- 68 RAYMOND, L.; MORIN, F. G.; MARCHESSAULT, R. H. Degree of deacetylation of chitosan using conductometric titration and solid-state NMR. **Carbohydrate Research**, v. 246, n. 1, p. 331-336, 1993.
- 69 BRUGNEROTTO, J.; DESBRIÈRES, J.; ROBERTS, G.; RINAUDO, M. Characterization of chitosan by steric exclusion chromatography. **Polymer**, v. 42, n. 25, p. 9921-9927, 2001.
- 70 LAVERTU, M.; XIA, Z.; SERREQUI, A. N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M. D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 6, p. 1149-1158, 2003.
- 71 XIE, J.; JIN, Y.-C. Parameter determination for the Cross rheology equation and its application to modeling non-Newtonian flows using the WC-MPS method. **Engineering Applications of Computational Fluid Mechanics**, v. 10, n. 1, p. 111-129, 2016.
- 72 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: Approved Standard** – 9th ed. Wayne, 2012. v. 32, n. 2, p. 1-68. CLSI document M07-A9.
- 73 GARCIA, M. A.; PINOTTI, A.; ZARITZKY, N. E. Physicochemical, water vapor barrier and mechanical properties of corn starch and chitosan composite films. **Starch**, v. 58, n. 9, p. 453-463, 2006.
- 74 MIZANI, A. M.; AMINLARI, B. M. A new process for deproteinization of chitin from shrimp head waste. In: EUROPEAN CONGRESS OF CHEMICAL ENGINEERING, 6., 2007, Copenhagen. **Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)**. Copenhagen: Universidade do Porto, 2007. p. 1-8.
- 75 KURITA, K. Chitin and chitosan: Functional biopolymers from marine crustaceans. **Marine Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 203-226, 2006.
- 76 HORN, M. M. **Blendas e filmes de quitosana/amido de milho: estudo da influência da adição de polióis, oxidação do amido e razão amilose/amilopectina nas suas propriedades**. 2012. 147 f. Tese (Doutorado em Química Analítica e Inorgânica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

- 77 LAVERTU, M.; DARRAS, V.; BUSCHMANN, M. D. Kinetics and efficiency of chitosan reacylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, n. 2, p. 1192-1198, 2012.
- 78 TORRES, M. A.; VIEIRA, R. S.; BEPPU, M. M.; SANTANA, C. C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 4, p. 306-312, 2005.
- 79 XIN-YUAN, S.; TIAN-WEI, T. New contact lens based on chitosan/gelatin composites. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 19, n. 6, p. 467-479, 2004.
- 80 QUN, G.; AJUN, W.; YONG, Z. Effect of reacylation and degradation on the chemical and crystal structures of chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 104, n. 4, p. 2720-2728, 2007.
- 81 TAPPERT, R.; MCKELLAR, R. C.; WOLFE, A. P.; TAPPERT, M. C.; ORTEGA-BLANCO, J.; MUEHLENBACHS, K. Stable carbon isotopes of C3 plant resins and ambers record change in atmospheric oxygen since the Triassic. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 121, p. 240-262, 2013.
- 82 LANGENHEIM, J. H.; BECK, C. W. Infrared spectra as a means of determining botanical sources of amber. **Science**, v. 149, n. 3679, p. 52-55, 1965.
- 83 URIARTE-MONTOYA, M. H.; ARIAS-MOSCOSO, J. L.; PLASCENCIA-JATOMEA, M.; SANTACRUZ-ORTEGA, H.; ROUZAUD-SÁNCHEZ, O.; CARDENAS-LOPEZ, J. L. Jumbo squid (*Dosidicus gigas*) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan-collagen biofilms. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4212-4219, 2010.
- 84 TANG, Y.-F.; DU, Y.-M.; HU, X.-W.; SHI, X.-W.; KENNEDY, J. F. Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly (vinyl alcohol) blend hydrogel. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 4, p. 491-499, 2007.
- 85 MONTEBAULT, A.; VITON, C.; DOMARD, A. Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1633-1643, 2005.
- 86 CHAO-HSUAN, C.; WANG, Y.; NAKATSUJI, T.; LIU, Y.-T.; ZOUBOULIS, C. C.; GALLO, R. L.; ZHANG, L.; HSIEH, M.-F.; HUANG, C.-M. An innate bactericidal oleic acid effective against skin infection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: A therapy concordant with evolutionary medicine. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 391-399, 2011.
- 87 TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279-285, 1987.
- 88 YOUNES, I.; SELLIMI, S.; RINAUDO, M.; JELLOULI, K.; NASRI, M. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities. **International Journal of Food Microbiology**, v. 185, p. 57-63, 2014.

89 XU, R.; XIA, H.; HE, W.; LI, Z.; ZHAO, J.; LIU, B.; WANG, Y.; LEI, Q.; KONG, Y.; BAI, Y.; YAO, Z.; YAN, R.; LI, H.; ZHAN, R.; YANG, S.; LUO, G.; WU, J. Controlled water vapor transmission rate promotes wound-healing via wound re-epithelialization and contraction enhancement. **Scientific Reports**, v. 6: 24596, p. 1-12, 2016.

90 ALI, S. M.; YOSIPOVITCH, G. Skin pH: From basic science to basic skin care. **Acta Dermato Venereologica**, v. 93, n. 3, p. 261-267, 2013.