DANILO ANDRE LOCILENTO

**PREPARO, OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ESPONJAS QUITOSANA/COLÁGENO PARA
LIBERAÇÃO CONTROLADA DE EXTRATO DE
SEMENTE DE UVA.**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / 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: Bioengenharia

Orientador: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos,
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

L811p

Locilento, Danilo Andre

Preparo, obtenção e caracterização de esponjas quitosana/colágeno para liberação controlada de extrato de semente de uva. / Danilo Andre Locilento; orientadora Ana Maria de Guzzi Plepis. São Carlos, 2012.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos; Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, 2012.

1. Quitosana. 2. Colágeno. 3. Extrato de semente de uva. 4. Liberação controlada. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

DANILO ANDRÉ LOCILENTO
MESTRADO EM CIÊNCIAS
ÁREA DE BIOENGENHARIA

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS
- GRADUAÇÃO INTERUNIDADES BIOENGENHARIA
EESC – FMRP - IQSC DA UNIVERSIDADE DE SÃO
PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovado em: 05 / 10 / 2012

PROFA. DRA. ANA MARIA DE GUZZI PLEPIS
(ORIENTADORA)

Instituto de Química de São Carlos – USP

Resultado: aprovado

Assinatura: Ana Maria de Guzzi Plepis

PROFA. DRA. ELIANA CRISTINA DA SILVA
RIGO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de
Alimentos – USP

Resultado: aprovado

Assinatura: EC Rigo

PROFA. DRA. FERNANDA DE FREITAS
ANIBAL

Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Resultado: aprovado

Assinatura: Fernanda de Freitas Anibal

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a mulher que eu amo Ana Frederica, minha esposa, amante e amiga, incentivadora e companheira desde o início desta jornada, que mesmo nos momentos mais difíceis se manteve ao meu lado e que hoje conduz com maestria nossa família (Nós vencemos esta etapa).

Às minhas lindas filhas que eu amo tanto, Ana Clara e Ana Luíza, que foram extremamente compreensivas e que souberam lidar com minha ausência em vários momentos.

Aos meus pais, Arnaldo e Conceição, por me apoiarem na decisão de voltar aos estudos, por sempre se mostrarem solícitos em todos os momentos e principalmente pelo amor, dedicação e amparo dados a mim e aos meus irmãos.

Aos meus irmãos, Fabio e Renato, pelo apoio e conselhos.

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Ana Maria de Guzzi Plepis pela orientação, oportunidade, incentivo, amizade e por acreditar e confiar no meu trabalho.

À Dra Virgínia C. A. Martins pelo incentivo, amizade, cooperação e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr Marcio de Paula pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Ao André Luiz Tognon pelo auxílio nas análises de FTIR.

Ao Prof Dr Sergio A. Yoshioka pela amizade e momentos de descontração.

Às farmacêuticas Paula e Cristina da farmácia Aquactiva, pelo auxílio na obtenção do extrato de semente de uva.

Aos amigos do Grupo de Bioquímica e Biomateriais pelos momentos de descontração e que de alguma maneira contribuíram na elaboração deste trabalho.

À Capes pela bolsa concedida.

A todos que, de alguma maneira, contribuíram na elaboração deste trabalho.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim.”*

Chico Xavier

RESUMO

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

Visando à obtenção de biomateriais que atuem como suporte que direcione e auxilie o processo de regeneração tecidual, materiais poliméricos naturais como a quitosana e o colágeno têm sido estudados. A utilização da quitosana e do colágeno se baseia em propriedades como: biocompatibilidade, ação antimicrobiana, capacidade de ativar macrófagos, estimular a proliferação celular e baixa antigenicidade. Também se tem buscado a utilização de fitoterápicos como, por exemplo, o extrato de semente de uva que no processo de cicatrização tecidual, atua estimulando o fator de crescimento endotelial vascular (angiogênese) e proliferação de fibroblastos. Este trabalho teve como objetivo o preparo e caracterização de esponjas de quitosana/colágeno e quitosana/colágeno/glicerol (1:1) e (1:2) contendo extrato de semente de uva. A caracterização foi feita por calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), absorção de tampão fosfato salino (PBS) e liberação *in vitro* do extrato de semente de uva. Estudos de DSC mostraram que ocorre um aumento na temperatura de desnaturação do colágeno com o aumento da concentração do extrato, indicando um efeito de reticulação que é mais pronunciado nas esponjas (1:2) e na presença de glicerol. Os espectros FTIR mostraram que ocorre um deslocamento das bandas de amida I e II devido à interferência do anel aromático presente no extrato. O aumento da proporção de colágeno, de extrato e a adição do glicerol contribuíram para o aumento no número e diâmetro dos poros das esponjas, observados por MEV. A presença do extrato aumenta a capacidade de absorção de PBS das esponjas, o aumento da concentração de extrato aumenta a velocidade de absorção, mas diminui sua capacidade de absorção. Ensaios de liberação *in vitro* mostraram que as quantidades de extrato liberado em meio PBS aumentaram até as primeiras 24 h. A maior porcentagem de liberação ocorreu para a esponja Q1C2E2 (44%). A presença do glicerol influenciou na liberação do extrato, diminuindo-a. Os valores de n mostraram que a liberação do extrato ocorreu por difusão, no qual os valores estão próximos 0,5 caracterizando um mecanismo de transporte Fickiano, exceto para as esponjas Q1C1E05 e Q1C2GE05, sendo por transporte anômalo ($0,5 < n < 0,89$).

Palavras-chave: Quitosana, colágeno, extrato de semente de uva e liberação controlada.

ABSTRACT

LOCILENTO, D. A. **Preparation, obtaining and characterization sponge chitosan / collagen for controlled release of grape seed extract**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

Aiming to obtain biomaterials that act as a support to direct and assist the process of tissue regeneration, natural polymeric materials such as collagen and chitosan have been used. The use of chitosan and collagen is based on properties such as biocompatibility, antimicrobial activity, low antigenicity, ability to activate macrophages and stimulate cell proliferation. The use of herbal medicines, for example, grape seed extract in the process of tissue healing, acts by stimulating vascular endothelial growth factor (angiogenesis) and fibroblast proliferation. This work aimed to the preparation and characterization of chitosan/collagen and chitosan/collagen/glycerol sponges (1:1) and (1:2) containing grape seed extract. The characterization was made by differential scanning calorimetry (DSC), infrared absorption spectroscopy (FTIR), scanning electron microscopy (SEM), absorption of phosphate buffered saline (PBS) and *in vitro* release of grape seed extract. DSC studies have shown that there is an increase in denaturation temperature of collagen with increasing extract concentration, indicating a crosslinking effect that is more pronounced in the sponges (1:2) in the presence of glycerol. The FTIR spectra show that there is a displacement of bands I and amide II due to interference of the aromatic ring present in the extract. Increasing the proportion of collagen, extract and addition of glycerol contributed to the increase in the number and diameter of the pores of the sponges, observed by SEM. The presence of the extract increases the absorption capacity of PBS in the sponges, the concentration of the extract increases the absorption rate, but decreases its absorbent capacity. *In vitro* release tests showed that the released amounts of extract increased up to 24 h. The highest percentage of release was observed for the sponge Q1C2E2 (44%). The presence of glycerol influenced the release of the extract, decreasing it. The values of n showed that the release occurred by diffusion of the extract, in which the values are close to 0.5 featuring a Fickian transport mechanism, except for the sponges Q1C1E05 and Q1C2GE05, that occurred by anomalous transport ($0.5 < n < 0.89$).

Keywords: Chitosan, collagen, grape seed extract, controlled release.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: ILUSTRAÇÃO MOSTRANDO AS DIFERENTES CAMADAS DA PELE. CAMADA MAIS EXTERNA A EPIDERME, ABAIXO A DERME E MAIS PROFUNDAMENTE A HIPODERME (ESTAÇÃO, 2012).	17
FIGURA 2: ILUSTRAÇÃO DAS SUBCAMADAS QUE CONSTITUEM A EPIDERME (MEDIC, 2011).	18
FIGURA 3: ILUSTRAÇÕES DE LESÕES NA PELE POR FERIMENTOS AGUDOS: (A) DILACERAÇÃO E (B) PERFURAÇÃO.	20
FIGURA 4: ILUSTRAÇÃO DE LESÃO PROGRESSIVA DA PELE (ÚLCERA DE DECÚBITO) DECORRENTE DE FERIMENTO CRÔNICO (MODERN, 2011).	21
FIGURA 5: ESQUEMA ILUSTRATIVO COM AS DIFERENTES ETAPAS DE CICATRIZAÇÃO, MOSTRANDO A ATUAÇÃO DAS FIBRINAS NA COAGULAÇÃO, FATORES DE CRESCIMENTO E MATRIZ EXTRACELULAR NO INÍCIO DA INFLAMAÇÃO, AÇÃO DOS MACRÓFAGOS NA INFLAMAÇÃO E ATUAÇÃO DAS CÉLULAS DE FIBROBLASTOS SINTETIZANDO COLÁGENO NA FASE PROLIFERATIVA ATÉ O FECHAMENTO DO FERIMENTO (PILONIDAL, 2010).	22
FIGURA 6: REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS ESTRUTURAS POLIMÓRFICAS DE QUITINA, SENDO QUE AS SETAS REPRESENTAM AS CADEIAS POLIMÉRICAS NO SENTIDO DO TERMINAL NÃO REDUTOR PARA O REDUTOR (CAMPANA FILHO <i>ET AL.</i> , 2007).	26
FIGURA 7: ESQUEMAS DAS ESTRUTURAS QUÍMICAS DA QUITINA E QUITOSANA.	26
FIGURA 8: ESQUEMA EM QUE MOSTRA A FORMAÇÃO DA FIBRA COLÁGENO ORIUNDA DO TROPOCOLÁGENO. ADAPTADO DE (CAMPBELL, 1995).	28
FIGURA 9: ESQUEMA DA DESNATURAÇÃO DO COLÁGENO.	29
FIGURA 10: ESQUEMA REPRESENTATIVO DA HIDRÓLISE ALCALINA DOS GRUPOS CARBOXIAMIDAS. ...	30
FIGURA 11: IMAGEM DA <i>VITIS VINÍFERA</i> DE COLORAÇÃO AZULADA E DE SUAS SEMENTES.	32
FIGURA 12: ESTRUTURA QUÍMICA DO NÚCLEO FLAVAN-3-OL (ESQUERDA) E PROANTOCIANIDINA (DIREITA).	32
FIGURA 13: UNIDADES MONOMÉRICAS DAS PRINCIPAIS PROANTOCIANIDINAS.	33
FIGURA 14: ESQUEMA MOSTRANDO AS POSSÍVEIS INTERAÇÕES ENTRE O COLÁGENO E A PROANTOCIANIDINAS (CARVALHO, 2007).	34
FIGURA 15: COMPARAÇÃO ILUSTRATIVA DAS VARIAÇÕES DE CONCENTRAÇÃO DE FÁRMACOS ADMINISTRADOS POR MÉTODOS CONVENCIONAIS DE MULTI DOSAGEM (A) E SISTEMA DE LIBERAÇÃO CONTROLADA (B), SENDO A, A ADMINISTRAÇÃO DO FÁRMACO.	35
FIGURA 16: ESQUEMA DOS MECANISMOS DE LIBERAÇÃO EM MATRIZES POLIMÉRICAS (BAJPAI <i>ET AL.</i> , 2008).	38
FIGURA 17: ESQUEMA DA ESTRUTURA QUÍMICA DO GLICEROL.	42
FIGURA 18: ESQUEMA DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DA QUITOSANA A PARTIR DO GLÁDIO DE LULA. ..	46

FIGURA 19: ALTERAÇÃO DOS GRUPOS ACETIL DA QUITINA POR GRUPOS AMINOS OBTENDO A QUITOSANA.....	46
FIGURA 20: ESQUEMA DA OBTENÇÃO DO COLÁGENO ANIÔNICO 96H.....	47
FIGURA 21: FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS ESPONJAS (1:1).	48
FIGURA 22: FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DAS ESPONJAS (1:2).	49
FIGURA 23: CURVA REPRESENTATIVA DA DETERMINAÇÃO DA Td POR DSC.	53
FIGURA 24: FOTOGRAFIA DIGITAL DO GLÁDIO DE LULA (RESEARCH, 2012).	57
FIGURA 25: FOTOGRAFIA DIGITAL DA QUITOSANA OBTIDA A PARTIR DO GLÁDIO DE LULA.	57
FIGURA 26: FOTOGRAFIA DIGITAL DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA COMERCIAL (ESQUERDA) E DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA PURIFICADO (DIREITA).	58
FIGURA 27: FOTOGRAFIA DIGITAL DAS ESPONJAS (1) Q1C1E05, (2) Q1C1E1, (3) Q1C1E2.	59
FIGURA 28: FOTOGRAFIA DIGITAL DAS ESPONJAS (1) Q1C1E05, (2) Q1C1E1, (3) Q1C1E2 E (4) Q1C1GE05, (5) Q1C1GE1, (6) Q1C1GE2.....	59
FIGURA 29: FOTOGRAFIA DIGITAL DAS ESPONJAS (8) Q1C1, (9) Q1C2, (10) Q1C1G E (11) Q1C2G....	60
FIGURA 30: CURVA DE TITULAÇÃO CONDUTIMÉTRICA DA QUITOSANA PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU MÉDIO DE ACETILAÇÃO.	61
FIGURA 31: CURVA DE VISCOSIDADE REDUZIDA EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DAS SOLUÇÕES DA QUITOSANA.....	62
FIGURA 32: GRÁFICO DO ESPECTRO DE ABSORBÂNCIA PARA (A) EXTRATO COMERCIAL, (B) EXTRATO PURIFICADO E (C) EXTRATO NEUTRALIZADO.	63
FIGURA 33: CURVAS DE DSC PARA AS ESPONJAS: (A) Q1C2; (B) Q1C2E05; (C) Q1C2E1; (D) Q1C2E2	64
FIGURA 34: CURVAS DE DSC PARA AS ESPONJAS COM GLICEROL: (A) Q1C2G; (B) Q1C2GE05; (C) Q1C2GE1; (D) Q1C2GE2.	65
FIGURA 35: CURVAS DE DSC PARA AS ESPONJAS: (A) Q1C1; (B) Q1C1E05; (C) Q1C1E1; (D) Q1C1E2	65
FIGURA 36: ESPECTRO DE FTIR DO COLÁGENO ANIÔNICO.	67
FIGURA 37: ESPECTRO DE FTIR DA QUITOSANA.	68
FIGURA 38: ESPECTROS DO EXTRATO COMERCIAL (A), EXTRATO PURIFICADO (B) E EXTRATO NEUTRALIZADO (C).	69
FIGURA 39: ESPECTRO DE FTIR DAS ESPONJAS Q1C1 (A), Q1C1E05 (B), Q1C1E1 (C), Q1C1E2 (D)...	70
FIGURA 40: ESPECTRO DE FTIR DAS ESPONJAS Q1C1G (A), Q1C1GE05 (B), Q1C1GE1 (C), Q1C1GE2 (D).....	71
FIGURA 41: ESPECTRO DE FTIR DAS ESPONJAS Q1C2 (A), Q1C2E05 (B), Q1C2E1 (C), Q1C2E2 (D)...	72
FIGURA 42: ESPECTRO DE FTIR DAS ESPONJAS Q1C2G (A), Q1C2GE05 (B), Q1C2GE1 (C), Q1C2GE2 (D).	73
FIGURA 43: FOTOMICROGRAFIA DA ESPONJA Q1C1G EM AUMENTO DE X200 (A) E X1000 (B).	75

FIGURA 44: FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS Q1C1GE2 (A) E Q1C1GE1 (B) EM AUMENTO DE x5000.....	75
FIGURA 45: FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS Q1C1E1 (A) E Q1C2E1 (B) EM AUMENTO DE x500.	76
FIGURA 46: FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS Q1C2 (A) E Q1C2E2 (B) EM AUMENTO DE x500.	76
FIGURA 47: FOTOMICROGRAFIAS DAS ESPONJAS Q1C2E05 (A) E Q1C2GE05 (B) EM AUMENTO DE x500.....	76
FIGURA 48: PERFIL DE ABSORÇÃO DE PBS DAS ESPONJAS Q1C1 (A), Q1C1E05 (B), Q1C1E1 (C), Q1C1E2 (D).....	78
FIGURA 49: PERFIL DE ABSORÇÃO DE PBS DAS ESPONJAS Q1C1G (A), Q1C1GE05 (B), Q1C1GE1 (C), Q1C1GE2 (D).	78
FIGURA 50: PERFIL DE ABSORÇÃO DE PBS DAS ESPONJAS Q1C2 (A), Q1C2E05 (B), Q1C2E1 (C), Q1C2E2 (D).....	79
FIGURA 51: PERFIL DE ABSORÇÃO DE PBS DAS ESPONJAS Q1C2G (A), Q1C2GE05 (B), Q1C2GE1 (C), Q1C2GE2 (D).	79
FIGURA 52: CURVA DE CALIBRAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA EM TAMPÃO PBS.....	80
FIGURA 53: PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA DAS ESPONJAS : Q1C1E05 (A), Q1C1E1 (B), Q1C1E2 (C)	80
FIGURA 54: PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA DAS ESPONJAS : Q1C1GE05 (A), Q1C1GE1 (B), Q1C1GE2 (C).....	81
FIGURA 55: PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA DAS ESPONJAS : Q1C2E05 (A), Q1C2E1 (B), Q1C2E2 (C).....	81
FIGURA 56: PERFIL DE LIBERAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA DAS ESPONJAS : Q1C2GE05 (A), Q1C2GE1 (B), Q1C2GE2 (C).....	82
FIGURA 57: GRÁFICO COM O PERFIL PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE N PARA AS ESPONJAS Q1C1E05 (A), Q1C1E1 (B) E Q1C1E2 (C)	83
FIGURA 58: GRÁFICO COM O PERFIL PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE N PARA AS ESPONJAS Q1C1GE05 (A), Q1C1GE1 (B) E Q1C1GE2 (C).....	83
FIGURA 59: GRÁFICO COM O PERFIL PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE N PARA AS ESPONJAS Q1C2E05 (A), Q1C2E1 (B) E Q1C2E2 (C)	84
FIGURA 60: GRÁFICO COM O PERFIL PARA OBTENÇÃO DOS VALORES DE N PARA AS ESPONJAS Q1C2E05 (A), Q1C2E1 (B) E Q1C2E2 (C)	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DAS PROANTOCIANIDINAS DE ACORDO COM O PADRÃO DE HIDROXILAÇÃO (OU SUBSTITUIÇÃO) DA MOLÉCULA DE FLAVAN-3-OL (SUN; SPRANGER, 2005).....	33
TABELA 2: POLÍMEROS NATURAIS COM SUAS PROPRIEDADES E APLICAÇÕES EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO (GRUND, BAUER, FISCHER, 2011).	36
TABELA 3: POLÍMEROS NATURAIS COM SUAS PROPRIEDADES E APLICAÇÕES EM SISTEMAS DE LIBERAÇÃO (GRUND, BAUER, FISCHER, 2011).	37
TABELA 4: TIPOS DE SISTEMAS MATRICIAIS E SEUS MODOS DE LIBERAÇÃO (LYRA <i>ET AL.</i> , 2007).....	38
TABELA 5: NOMENCLATURA DAS DIFERENTES AMOSTRAS DE ESPONJAS.....	49
TABELA 6: VALORES DE PH OBTIDOS ANTES DO PROCESSO DE NEUTRALIZAÇÃO E APÓS O PROCESSO.....	60
TABELA 7: VALORES DE TEMPO MÉDIO DE ESCOAMENTO, VISCOSIDADE ESPECIFICA E VISCOSIDADE REDUZIDA DAS SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE QUITOSANA.....	62
TABELA 8: TEMPERATURA DE DESNATURAÇÃO (Td) DAS ESPONJAS, OBTIDAS POR DSC.....	66
TABELA 9: VALORES DO NÚMERO DE ONDA.....	74
TABELA 10: VALORES DO TAMANHO MÉDIO DOS POROS DAS ESPONJAS	77
TABELA 11: VALORES DE MÁXIMA LIBERAÇÃO DO EXTRATO DE SEMENTE DE UVA LIBERADO DAS ESPONJAS.....	82
TABELA 12: VALORES DE N E ÍNDICE DE CORRELAÇÃO LINEAR (R)	85

LISTA DE ABREVIATURAS

DSC – Calorimetria exploratória diferencial.

FTIR – Espectroscopia no infravermelho.

GA – Grau de acetilação.

KBr – Brometo de potássio.

MEV – Microscopia eletrônica de varredura.

MM – Massa molar.

N₂ – Gás nitrogênio.

PBS – Tampão fosfato salino.

Quit/col – Quitosana e colágeno

Q1C1 – Quitosana / colágeno (1:1)

Q1C1E05 – Quitosana / colágeno (1:1) / extrato 0,5%

Q1C1E1 – Quitosana / colágeno (1:1) / extrato 1%

Q1C1E2 – Quitosana / colágeno (1:1) / extrato 2%

Q1C1G – Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25)

Q1C1GE05 – Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25) / extrato 0,5%

Q1C1GE1 – Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25) / extrato 1%

Q1C1GE2 – Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25) / extrato 2%

Q1C2 – Quitosana / colágeno (1:2)

Q1C2E05 – Quitosana / colágeno (1:2) / extrato 0,5%

Q1C2E1 – Quitosana / colágeno (1:2) / extrato 1%

Q1C2E2 – Quitosana / colágeno (1:2) / extrato 2%

Q1C2G – Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25)

Q1C2GE05 – Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25) / extrato 0,5%

Q1C2GE1 – Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25) / extrato 1%

Q1C2GE2 – Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25) / extrato 2%

Td – Temperatura de desnaturação.

SUMÁRIO

Resumo, abstract

Lista de ilustrações

Lista de tabelas

Lista de abreviaturas

1. Introdução	15
1.1. <i>Revisão Bibliográfica.</i>	16
1.1.1. Pele	16
1.1.2. Ferimentos, processo de cicatrização e curativos.	19
1.1.2.1. Ferimentos	20
1.1.2.2. Processo de cicatrização	21
1.1.2.3. Curativos	23
1.1.3. Biomateriais	24
1.1.3.1. Quitosana.....	25
1.1.3.2. Colágeno.....	28
1.1.3.3. Blenda Quitosana/Colágeno	31
1.1.4. Extrato de semente de uva.....	31
1.1.5. Mecanismos de liberação de fármacos	35
1.1.6. Plastificantes.....	42
2. Objetivo	44
3. Experimental	45
3.1. <i>Obtenção da quitosana</i>	45
3.2. <i>Obtenção do colágeno aniônico</i>	46
3.2.1. Determinação da concentração do colágeno por liofilização.....	47
3.3. <i>Extrato de semente de uva</i>	47
3.4. <i>Obtenção das esponjas</i>	48
3.5. <i>Caracterização</i>	50
3.5.1. Determinação de grau médio de acetilação da quitosana (GA%) por titulação condutimétrica.....	50
3.5.2. Determinação da massa molar média da quitosana por viscosimetria capilar.	51
3.5.3. Espectroscopia de ultra violeta.....	52
3.5.4. Análise térmica.....	53

3.5.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)	53
3.5.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	54
3.5.6. Microscopia eletrônica de varredura	54
3.5.7. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do extrato de semente de uva.	55
3.5.8. Absorção de tampão fosfato salino (PBS)	55
4. Resultados e discussão.....	57
4.1. Obtenção da quitosana	57
4.2. Determinação da concentração do colágeno por liofilização.....	57
4.3. Purificação do extrato de semente de uva	58
4.4. Obtenção das esponjas (aspectos macroscópicos)	59
4.5. Caracterização	61
4.5.1. Determinação do grau médio de acetilação da quitosana (%GA) por titulação condutimétrica.....	61
4.5.2. Determinação da massa molar média da quitosana por viscosimetria capilar.	62
4.5.3. Espectroscopia de ultravioleta.....	63
4.5.4. Análise térmica – Calorimetria exploratória diferencial.....	64
4.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)	67
4.7. Microscopia eletrônica de varredura.....	74
4.8. Absorção de tampão fosfato salino (PBS)	77
4.9. Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do extrato de semente de uva	79
5. Conclusões	86
6. Referências Bibliográficas.....	87

1. Introdução

A pele é o maior órgão do corpo nos vertebrados e desempenha um papel crucial em muitas funções, tais como proteção contra agressões externas, homeostasia de fluidos, regulação da temperatura corpórea e detecção sensorial (FALANGA *et al.*, 2007). Estas funções podem ser prejudicadas na ocorrência de danos ou perda de integridade da pele, causada normalmente por ferimentos cutâneos (TSURUTA *et al.*, 2002).

Logo após o início do ferimento, desencadeia-se o processo de cicatrização que compreende uma sequência de eventos bioquímicos e celulares objetivando a restauração do tecido lesado (MARTIN; LEIBOVICH 2005). Para ferimentos de grandes extensões como queimaduras ou decorrentes de alguma doença como a diabetes, o organismo muitas vezes não é capaz de obter êxito na regeneração do tecido lesado, tornando o ferimento a entrada para outras doenças e infecções.

As tentativas humanas de intervir no processo de cicatrização de ferimentos remontam à antiguidade, demonstrando que desde então já se reconhecia a importância de proteger as feridas de forma a evitar complicações às pessoas portadoras de tais lesões. (GOMES; CARVALHO, 2002). Para tal, eram utilizados curativos constituídos dos mais diversos materiais de acordo com o conhecimento empírico e algumas vezes por influências religiosas da época. Com o passar do tempo e o aumento do conhecimento, o curativo foi se modificando e tornando-se cada vez mais eficaz.

Nas últimas décadas houve uma importante expansão na pesquisa médica para o desenvolvimento de curativos que possuam propriedades de biomateriais visando à reparação tecidual (ZHONG; ZHANG; LIM, 2010). Biomateriais possuem características de biocompatibilidade e biofuncionalidade, o que proporciona uma melhor interação entre o material e o tecido (VERT, 2007).

Biomateriais derivados de polímeros naturais como a quitosana e o colágeno, têm se destacado por aceitar diversas formas de aplicação como: géis, filmes, esponjas e hidrogéis, o que traz flexibilidade na forma de obtenção do curativo de acordo com o tipo de ferimento, tornando-o mais eficazes, além da quitosana e o colágeno possuírem propriedades biológicas que auxiliam o processo de regeneração tecidual (ZHONG; ZHANG; LIM, 2010).

Atualmente busca-se não somente os curativos que possuem atividade na regeneração tecidual devido aos materiais que o compõe, mais também por possuir a capacidade de

transportar fármacos, medicamentos, fatores de crescimento, hormônios e outros, atuando no controle de liberação local destes agentes, otimizando suas ações terapêuticas e tornando-os mais seguros.

Fármacos fitoterápicos veem sendo utilizados no processo de regeneração tecidual e têm se mostrado promissores (PEREIRA *et al.*, 2005; GARROS *et al.*, 2006). O extrato de semente de uva possui propriedades antioxidantes com atividade cardioprotetora, antitumoral, antibacteriana e anti-inflamatória (CHO *et al.*, 2009) e na regeneração tecidual, estimula proliferação de fibroblastos, entre outros (KIM *et al.*, 1997).

Com o intuito de elaborar um curativo para regeneração tecidual, este trabalho propôs a obtenção de esponjas compostas da mistura quitosana e colágeno como matriz de liberação controlada de extrato de semente de uva.

1.1. Revisão Bibliográfica.

1.1.1. Pele

A pele é um órgão distinto do corpo humano devido a sua extensão e importância das suas funções (SILVA, 2006). Uma dessas funções é o isolamento das estruturas internas corporais do ambiente externo. Sendo, a pele, considerada a fronteira entre o organismo humano e o ambiente. Outras funções podem ser destacadas, como (HARRIS, 2003):

- Manutenção da homeostase.
- Manutenção da integridade do organismo.
- Controle de temperatura.
- Controle da perda de água do organismo.
- Metabolismo de vitamina D.
- Sensoriais.

Para servir como barreira protegendo o organismo de agentes externos e ainda possuir diferentes funções, a pele é uma estrutura complexa composta por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1).

Figura 1: Ilustração mostrando as diferentes camadas da pele. Camada mais externa a epiderme, abaixo a derme e mais profundamente a hipoderme (ESTAÇÃO, 2012).

- **Epiderme:** É a camada mais externa da pele e a de menor espessura, mas por possuir uma organização estrutural bem definida, é a responsável pela homeostase da pele. A epiderme divide-se em quatro subcamadas: estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo (Figura 2) (SILVA, 2006).

O estrato basal é a camada mais profunda da epiderme e nela ocorre a proliferação de células germinativas que se diferenciam e formam as camadas superiores da epiderme.

- No estrato espinhoso e granuloso as células sofrem modificações, principalmente quanto ao formato, tornando-se mais achatadas e unidas entre si, tornando-as mais coesas e aumentando a resistência da epiderme.
- O estrato córneo é a camada mais externa da epiderme e nela encontram-se as células denominadas queratinócitos, provenientes da queratina, responsáveis por formar uma estrutura resistente que impede a entrada de agentes externos, promovendo também proteção contra danos físicos e químicos. Principalmente nas palmas das mãos e sola dos pés.

Todo o processo de migração de células do estrato basal até o estrato córneo ocorre em aproximadamente 28 dias, ou seja, a cada 28 dias todas as células da epiderme são renovadas (SILVA, 2006).

Figura 2: Ilustração das subcamadas que constituem a epiderme (MEDIC, 2011).

- **Derme:** A derme está disposta abaixo da epiderme e constitui a maior parte da pele onde estão dispostos todos os anexos como, glândulas sebáceas e sudoríparas além do folículo piloso. É uma área bastante vascularizada e com muitas terminações nervosas com receptores de sensações como: frio, calor, dor e tato. A derme é composta por colágeno, elastina e glicosaminoglicanas. As células fibroblásticas estão abundantemente presentes nessa área, produzindo enzimas fundamentais para o processo de cicatrização (METCALFE; FERGUSON, 2007; HARRIS, 2003).
- **Hipoderme:** É composta por tecido adiposo e está disposta abaixo da derme, é responsável pela termo regulação e termo isolamento do organismo (HARRIS, 2003).

Para que a pele, este importante órgão do corpo humano, possa desempenhar com eficácia suas funções de proteção e homeostase do organismo, é importante que sua integridade seja mantida. Danos à pele devido a traumas e lesões interferem em suas funções, expondo o organismo a ação de agentes externos e comprometendo a homeostase (ZHONG; ZHANG; LIM, 2010).

1.1.2. Ferimentos, processo de cicatrização e curativos.

Desde a antiguidade os ferimentos e seu processo de cicatrização geram fascínio e preocupação, por esse motivo muitos avanços nessa área foram alcançados. Atualmente, graças as constantes pesquisas e desenvolvimento na área, existem critérios de abordagens aos diferentes tipos de ferimentos e diferentes tipos de curativos para estes ferimentos (MANDELBAUM, 2003). Mas nem sempre foi assim. Na antiguidade muito dos procedimentos ocorriam por observações empíricas e religiosas.

A civilização egípcia se destacou no interesse de intervir nos processos de cicatrização uma vez que acreditavam que os ferimentos eram portais de entrada e saída de demônios no corpo. A farmacopeia egípcia descrevia inicialmente como uso terapêutico, excrementos, ovos, leite e carne crua de animais. Com o tempo passou-se a utilizar ceras e mel de abelha, além de curativos utilizando faixas de linho embebidos com vinhos, extratos e óleos aromáticos. Foram também os egípcios os primeiros a suturar um ferimento (SIPOS *et al.*, 2004).

Com Hipócrates a medicina iniciou uma adequação nos procedimentos e um melhor conhecimento dos processos de cicatrização, criando os conceitos de cicatrização de primeira e segunda intenção, preconizando também a limpeza dos ferimentos com água morna, vinho e vinagre (MANDELBAUM, 2003).

No início do século XX iniciou-se a utilização de algodão e gaze para recobrir o ferimento e na segunda guerra mundial, os antissépticos e antimicrobianos tópicos como o líquido de Dakin (solução diluída de hipoclorito de sódio e bicarbonato de sódio) e derivados do iodo e mercúrio, foram amplamente difundidos nas intervenções do processo cicatricial. A partir dos anos 50 e 60 surgem os primeiros filmes transparentes com permeação ao vapor e nesse momento verificou-se que os ferimentos úmidos possuíam uma melhor resposta cicatricial se comparados aos ferimentos secos, criando desta forma, novos procedimentos no tratamento dos ferimentos e dos processos de cicatrização, conhecida e utilizada até os dias atuais (MANDELBAUM, 2003).

1.1.2.1. Ferimentos cutâneos

O ferimento cutâneo é descrito como uma ruptura da anatomia estrutural normal da pele, resultante de danos térmicos, físicos ou de intervenção médica. De acordo com a natureza do processo cicatricial os ferimentos são divididos em crônicos e agudos (TSURUTA *et al.*, 2002).

Os ferimentos agudos (Figura 3) são lesões que geralmente curam completamente dentro de algumas semanas e normalmente são causados por queimaduras (decorrentes de radiação, eletricidade, produtos químicos e fontes térmicas) e danos mecânicos (escoriações, contato de fricção entre pele e superfície dura, ferimentos penetrantes e cirúrgicos) (PERCIVAL 2002).

Figura 3: Ilustrações de lesões na pele por ferimentos agudos: (a) dilaceração e (b) perfuração.

Já os ferimentos crônicos são lesões que dificilmente se regeneram ou levam muito tempo para que isso ocorra e são provenientes de infecções bacterianas em ferimentos mal tratados, doenças vasculares, diabetes e por pressão que acometem pessoas acamadas favorecendo o aparecimento de úlceras de decúbito (MOORE *et al.*, 2006).

Os ferimentos também são classificados de acordo com o comprometimento tecidual (TAZIMA; VICENTE; MORIYA, 2008). (Figura 4).

- Estágio I: comprometimento da epiderme apenas, sem perda tecidual.
- Estágio II: ocorre perda tecidual e comprometimento da epiderme, derme ou ambas.
- Estágio III: há comprometimento total da pele e necrose de tecido subcutâneo, entretanto não atinge a fáscia muscular.

- Estágio IV: há extensa destruição de tecido, chegando a ocorrer lesão óssea ou muscular ou necrose tissular.

Figura 4: Ilustração de lesão progressiva da pele (úlcer de decúbito) decorrente de ferimento crônico (MODERN, 2011).

1.1.2.2. Processo de cicatrização

A cicatrização de ferimentos é um processo complexo que envolve a organização de células, sinais químicos e matriz extracelular no intuito de reparar o tecido lesado.

O processo de cicatrização é desencadeado logo após o rompimento tecidual e é dividido em três fases que ocorrem simultaneamente, são elas: fase de coagulação e inflamatória, fase proliferativa e fase remodeladora (SHAW; MARTIN, 2009) (Figura 5).

a) *Fase de coagulação e inflamatória:* O ferimento provoca um extravasamento de exsudato contendo plaquetas gerando um coágulo oclusivo, logo após ocorre à liberação de produtos como substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases que sinalizam para outras fases. A formação do coágulo colabora na criação da rede de fibronectina, formando assim uma matriz de suporte aos fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos. Junto à fase de coagulação, células inflamatórias (neutrófilos e macrófagos) começam a migrar para a área afetada.

- Os neutrófilos são os primeiros a migrar e atuam por três dias, sendo responsáveis pela fagocitose das bactérias.

- Macrófagos atuam do 3º ao 10º dia, são responsáveis pela fagocitose de bactérias e desenvolvimento do tecido de granulação.

b) *Fase Proliferativa*: É o fechamento da ferida e é dividida em re-epitelização, fibroplasia e angiogênese.

- *Re-epitelização*: migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais. Acredita-se que fatores de crescimento sejam os responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio.

- *Fibroplasia e formação da matriz*: formação do tecido de granulação que depende dos fibroblastos que além de produtor de colágeno tem importância na produção de elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases.

- *Angiogênese*: é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a reparação. As células endoteliais migram para a área ferida, onde ocorre sua proliferação e acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

c) *Fase Remodeladora*: É o movimento centrípeto das bordas da ferida, onde ocorre a remodelação da ferida que pode durar até meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema (VELNAR; BAILEY; SMRKOLJ, 2009).

Figura 5: Esquema ilustrativo com as diferentes etapas de cicatrização, mostrando a atuação das fibrinas na coagulação, fatores de crescimento e matriz extracelular no início da inflamação, ação dos macrófagos na inflamação e atuação das células de fibroblastos sintetizando colágeno na fase proliferativa até o fechamento do ferimento (PILONIDAL, 2010).

Algumas variáveis como idade, existência de doenças, alterações de coagulação e outros podem influenciar o processo de cicatrização. Desta forma, curativos que possam auxiliar e facilitar o processo de cicatrização.

1.1.2.3. Curativos

Documentos da civilização egípcia descrevem o uso de curativos compostos pelos mais diversos tipos, entre eles os derivados de fibras vegetais, fibras de linho, gordura animal e mel (SIPOS *et al.*, 2004). Empiricamente neste período já se conhecia a necessidade e importância da absorção do exsudato, da proteção física e da atividade antimicrobiana exercida pelos curativos no intuito de proteger o ferimento e garantir a sua cicatrização de forma adequada (FONDER *et al.*, 2008).

Atualmente, estudos clínicos e científicos comprovam a necessidade e a importância dos curativos como agentes terapêuticos locais criando um ambiente ideal, favorecendo o processo de cicatrização e aumentando a qualidade de vida das pessoas acometidas pelos ferimentos (GOOSSENS; CLEENEWERCK, 2010).

Os curativos são utilizados de acordo com a natureza e condições fisiológicas dos ferimentos (FONDER *et al.*, 2008). Propriedades como manter o ferimento úmido, promover proteção mecânica e física, absorver o exsudato impedindo a proliferação bacteriana, promover as trocas de curativo sem prejudicar o ferimento além de proporcionar boa aceitação do indivíduo e gerar baixos custos são os objetivos buscados quanto ao desenvolvimento de determinado curativo. (GOOSSENS; CLEENEWERCK, 2010).

Existem vários tipos de curativos que são classificados de acordo com o material utilizado na sua fabricação e sua forma (BOATENG & MATTHEWS, 2008). Os curativos mais conhecidos são (KUJATH; MICHELSEN, 2008):

- Derivados de alginatos (Sorbisan®, Algisite®): Compostos por alginato de cálcio e combinado com carboximetilcelulose tem capacidade de intumescimento possuindo boa absorção ao exsudato, possibilita o debridamento, diminuindo o risco de infecções do ferimento. Utilizado normalmente no início do ferimento.
- Hidrofibras (Aquacel®): Produzidos a partir de celulose que quando em contato com os fluidos do ferimento formam um gel de alta capacidade de absorção de exsudato, com fácil remoção para possíveis trocas. Indicado para ferimentos exsudativos.

- Hidrogéis (Nu-gel®, Aquaform®): Normalmente constituídos por amido, os hidrogéis possuem alta capacidade de retenção de água e devido a isso são utilizados em ferimentos secos e necrosados.
- Hidrocolóide (Granuflex®, Tegisorb®): Constituído por gelatina, pectina e celulose, formam um gel adesivo que interage com o ferimento. Promovem o debridamento dos tecidos necróticos facilitando a formação de tecido de granulação.
- Filmes (Tegaderm®, Bioclusive®): Produzidos a partir de poliuretano e revestidos por adesivo, são transparentes permitindo o monitoramento do ferimento. São permeáveis possibilitando trocas gasosas e vapor d'água. São pouco absorventes, indicados para ferimentos superficiais com pouco exsudato.
- Espumas (Liofoam®, Tielle®): Produzidos a partir de poliuretano, possuem boa capacidade de absorção sem interação com o ferimento e são semipermeáveis.

Um segmento diferente vem se projetando no desenvolvimento de curativos, que são os chamados curativos biológicos ou curativos bioativos. Estes curativos são constituídos de biomateriais, participando ativamente da formação de novos tecidos e auxiliando o processo de cicatrização. Dentre os materiais utilizados estão o colágeno, ácido hialurônico, quitosana e elastina. (BOATENG; MATTHEWS, 2008).

1.1.3. Biomateriais

Os biomateriais são definidos como materiais sintéticos, naturais ou naturais modificados, destinados a ter contato e interagir com o sistema biológico. (ISO 10993-1:1997). Os biomateriais naturais são: cartilagens, polímeros naturais, como: quitosana, colágeno, celulose, borracha natural. Entre os biomateriais sintéticos encontram-se: metais, polímeros sintéticos, cerâmicas e os compósitos (SCHECHTMAN; ZAVAGLIA 2000). De acordo com cada tipo de interação tecidual, os biomateriais terão comportamentos distintos classificados em: bioinertes, bioativos, biotoleráveis e biorreabsorvíveis (TUR, 2009). Dos quais:

- Bioinertes: Pouca interação com o meio, formação fibrosa em volta do material. Exemplo: Zircônia, Alumina, Titânio e Carbono.

- Bioativos: Interagem com os tecidos do organismo, promovendo reações que favorecem e estimulam o desenvolvimento destes tecidos. Exemplo: Biovidros e vitrocerâmicas, hidroxiapatita e compostos de fosfato de cálcio.
- Biotoleráveis: Possuem reações bioquímicas na interação material – tecido, às vezes nocivo, mas toleradas pelo organismo, ocorre estímulo à formação de involucro fibroso do material. Exemplo: Polímeros sintéticos e metais.
- Biorreabsorvíveis: Com o tempo de contato com os tecidos são degradados e consumidos pelo organismo. Exemplo: fosfato tricálcico e polímeros poli (ácido láctico) e poli (ácido glicólico).

Além de todas essas propriedades os biomateriais devem, principalmente, apresentar biocompatibilidade e biofuncionalidade, que corresponde à habilidade do material induzir uma resposta adequada a uma aplicação específica quando em contato com o organismo (VERT, 2007).

Os biomateriais são utilizados amplamente nas próteses ortopédicas e oculares, cirurgias cardiovasculares, curativos de reparação tecidual e sistema de liberação de fármacos (RATNER; BRYANT, 2004).

Na área de regeneração tecidual, diversas pesquisas têm sido realizadas nos últimos anos visando à obtenção de biomateriais que atuem como suporte e preencham apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Por apresentar biocompatibilidade e baixa toxicidade devido às características semelhantes a dos materiais biológicos, o colágeno tem se destacado como biomaterial, assim como a quitosana, que por aceitarem formas diversas de aplicações (géis, filmes, esponjas, hidrogéis e outros), mostram-se promissores no uso como curativos para cicatrização e regeneração tecidual (ZHONG; ZHANG; LIM, 2010).

1.1.3.1. Quitosana

A quitosana é derivada da quitina, um polissacarídeo existente na natureza e é o principal componente do exoesqueleto de crustáceos, moluscos e insetos. Sua presença também ocorre em parede celular de fungos e leveduras (KUMAR *et al.*, 2004). Por sua

biocompatibilidade, a quitosana é amplamente utilizada na área da agricultura, biotecnologia e produtos farmacêuticos (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Na natureza, a quitina apresenta três diferentes tipos de arranjos em suas cadeias. As formas α , β e γ (Figura 6). A forma α possui cadeias paralelas e antiparalelas alternadamente, na natureza são encontradas em crustáceos, insetos e fungos (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007). A forma β possui todas as cadeias paralelas e são encontradas em lulas. A forma γ possui cadeias paralelas e entre elas uma cadeia antiparalela, são encontradas em casulos de insetos (MATHUR; NARAG, 1990).

Figura 6: Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não redutor para o redutor (CAMPANA FILHO *et al.*, 2007).

A quitosana é obtida a partir da desacetilação (grupos acetil removidos dos grupos acetamino, formando aminas) da quitina, que é igualmente constituída por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β (1-4) (Figura 7). Com a desacetilação da quitina, a quitosana apresenta um maior número de unidades 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose, tornando-a mais solúvel em soluções aquosas diluídas em ácidos orgânicos e inorgânicos (AZEVEDO *et al.*, 2007).

Figura 7: Esquemas das estruturas químicas da quitina e quitosana.

O grau de desacetilação do polissacarídeo determina a diferença entre quitina e quitosana. Usualmente é considerada quitosana quando se obtêm uma desacetilação maior que 50% (HIRANO, 1996). A desacetilação da quitosana é considerada uma característica importante, podendo influenciar no desempenho e na sua aplicação (KHAN; PEH; CHANG, 2000). O grau de desacetilação pode ser determinado por vários métodos, como a espectroscopia de absorção no infravermelho, espectroscopia de ultravioleta, titulação condutimétrica e outros (SHIGEMASA *et al.*, 1996).

A utilização da quitosana como biomaterial é baseada em inúmeras propriedades, dentre elas destacam-se sua biocompatibilidade, bioadesividade, atuação na abertura das junções epiteliais (BERGER *et al.*, 2004), possuindo ainda ação antimicrobiana, atividade homeostática, capacidade de ativar macrófagos, estimular a migração e proliferação celular, promove a formação de tecido de granulação, além de orientar a reorganização da histo-arquitetura celular em feridas (MUZZARELLI, 2009).

Por suas propriedades, a quitosana pode ser utilizada em várias aplicações médicas, tais como em medicamentos oculares tópicos, lentes de contato, sistemas de liberação controlada e curativos (NIEKRASZEWICZ, 2005).

Uma das características mais promissoras da quitosana é sua excelente habilidade em ser processada em estruturas porosas (esponja, membrana e “scaffolds”), para uso em transplante de células, curativos e liberação de fármacos (DENKBAS, 2006).

O uso da quitosana em curativos para cicatrização de ferimentos vem se mostrando bastante eficaz (BROWN; DAYA; WORLEY, 2009). Curativos desenvolvidos na forma de esponjas e membranas porosas de quitosana são capazes de apresentar excelente permeabilidade ao oxigênio, controlar a perda de água por evaporação e promover a drenagem de exsudato das lesões. Em experimentos com modelos animais, a quitosana mostrou ter influência em todos os estágios de cicatrização do tecido (ALEMDAROGLU *et al.*, 2006; MUZZARELLI, 2009). Também apresentou substancial diminuição no tempo de tratamento, com mínima formação de cicatrizes (PAUL; SHARMA, 2004).

As propriedades antes mencionadas fazem da quitosana um importante biomaterial utilizado em sistemas de liberação controlada de fármacos, com ampla variedade de vias de administração, como: oral, nasal, ocular, transdérmico, vaginal e curativos. Tais apresentações de sistemas de liberação estão baseadas na estrutura física e na forma obtida da quitosana, como: nanopartículas, microesferas, membranas, filmes, esponjas e outros (DENKBAS *et al.*, 2006).

1.1.3.2. Colágeno

O colágeno é uma proteína sintetizada por células do tecido conjuntivo denominado fibroblastos. No corpo humano o colágeno representa mais da metade da proteína total e 70% do peso seco da pele, além de ser o constituinte mais importante da matriz extracelular. O colágeno é encontrado na pele, cartilagens, ossos e tendões, tendo como característica a formação de fibras insolúveis possuindo muita resistência elástica, controlando as diferentes intensidades de forças exercidas pelo organismo e de fundamental importância na constituição dos tecidos (SHOULDERS; RAINES, 2009).

No corpo humano existem 29 tipos de colágenos, que se diferenciam por sua estrutura primária das cadeias α . Dentre os 29 tipos, o colágeno tipo I é o mais conhecido estruturalmente e mais presente no organismo (PARENTEAU-BAREIL *et al.*, 2010). Sua estrutura é composta por uma unidade monomérica, denominada tropocolágeno, constituído por duas cadeias polipeptídicas iguais ($\alpha 1$) e uma cadeia polipeptídica ($\alpha 2$), contendo 1055 ($\alpha 1$) e 1029 ($\alpha 2$) resíduos de aminoácidos compostas de glicina, prolina e hidroxiprolina. Estas três cadeias se entrelaçam através de ligações de hidrogênio formando uma estrutura conhecida como tripla hélice. As interações entre unidades de tropocolágeno originam as microfibrilas, que quando agregadas (fibrilogênese) formam as fibrilas insolúveis e posteriormente as fibras de colágeno (OKUYAMA, 2008) (Figura 8).

Figura 8: Esquema em que mostra a formação da fibra colágeno oriunda do tropocolágeno. Adaptado de (CAMPBELL, 1995).

A tripla hélice do colágeno é suscetível a aumentos de temperatura, podendo ocasionar uma desorganização da sua estrutura helicoidal, descaracterizando as fibras do colágeno (MILES; GHELASHVILI, 1999).

O aquecimento do colágeno causam efeitos reversíveis ou irreversíveis, onde o aquecimento moderado pode resultar no desdobramento do colágeno, devido à quebra de algumas ligações de hidrogênio, que são restauradas (reversíveis) com a diminuição da temperatura. Em situações de aquecimento intenso ocorre uma transformação irreversível da estrutura helicoidal da hélice tripla do colágeno para uma estrutura aleatória (desorganizada), denominada desnaturação do colágeno (Figura 9). Acredita-se que esta desnaturação ocorra devido à quebra de sequências mais longas de ligações de hidrogênio responsáveis pela estabilidade da hélice tripla (WRIGHT; HUMPHREY, 2002).

Figura 9: Esquema da desnaturação do colágeno.

No colágeno do tipo I as fibras se formam naturalmente em $\text{pH} \sim 7,0$ propiciando a máxima interação eletrostática entre as unidades de tropocolágeno, tornando a estrutura com cargas neutralizadas. Mas, o colágeno pode possuir cargas positivas ou cargas negativas, dependendo do tipo de reação que a matriz é submetida. Reações de esterificação produzem matrizes catiônicas, utilizadas como arcabouço para crescimento celular (REID; GORHAM; LACKIE, 1993). Outras reações produzem matrizes aniônicas como, por exemplo, a hidrólise seletiva de grupos carboxiamidas dos resíduos de aminoácidos asparagina e glutamina das cadeias α do tropocolágeno (Figura 10), utilizadas principalmente como suporte de crescimento de tecidos e sistemas de liberação de fármacos (BET, 2000). A reação de hidrólise seletiva promove de acordo com o tempo de reação um aumento total de até 125 cargas por unidade de tropocolágeno (LACERDA; PLEPIS; GOISSIS, 1998), sendo este o método utilizado na obtenção do colágeno aniônico empregado neste trabalho.

Figura 10: Esquema representativo da hidrólise alcalina dos grupos carboxiamidas.

O colágeno não apresenta citotoxicidade e nem antigenicidade. Possui propriedades como hemostasia, capacidade de orientar a formação de tecidos em desenvolvimento, além de ser biodegradável, biorreabsorvível e biocompatível, tornando propícia sua utilização como biomaterial. O colágeno também possui a característica de ser formulado de diferentes formas como filmes, membranas, hidrogéis e esponjas (NAIR *et al.*, 2010).

Como biomaterial, o colágeno é utilizado em várias áreas da saúde, como no uso de arcabouços para migração e proliferação celular, como no crescimento ósseo, utilizando o colágeno recoberto por hidroxiapatita ou fosfato de cálcio, nas doenças vasculares, enxertos de pele artificiais, curativos que auxiliam no processo de cicatrização tecidual e matrizes de sistemas de liberação de fármacos (PARENTEAU-BAREIL *et al.*, 2010).

A função do colágeno no processo de cicatrização é bem esclarecida. Estudos de culturas realizadas *in vitro* demonstraram claramente que o colágeno, sendo um substrato natural para células, é altamente essencial para mantê-las com sua morfologia e fenótipo normal. A matriz de colágeno oferece uma estrutura de suporte que atua como guia e estimula a formação tecidual (LEE; SINGLA; LEE, 2001).

A utilização do colágeno na forma de esponjas como curativo no auxílio do processo de cicatrização, se mostra bastante eficiente. Preparadas a partir do processo de liofilização, as esponjas possuem porosidade que variam de acordo com a concentração do colágeno e velocidade de congelamento (SCHOOOF *et al.*, 2001, YANNAS; BURKE 1990). As esponjas de colágeno têm apresentado resultados significativos no auxílio como curativo no tratamento de queimaduras, úlceras de pressão e úlceras de decúbito (CHENGCAN, 2006).

As vantagens na utilização das esponjas estão na capacidade de absorção do exsudato presente no ferimento, ao mesmo tempo, manter o ferimento úmido, ação essencial para o processo de cicatrização, promovendo também uma barreira física contra o meio externo, prevenindo danos mecânicos e infecções bacterianas secundárias (ALBU, TITORENCU,

GHICA, 2011). Além das ações físicas, as esponjas de colágeno, devido a sua porosidade promovem a mobilidade e o crescimento celular entre os poros, permitindo a formação tecidual de granulação e epitelial sobre o ferimento (THERAMACHI *et al.*, 1997; GORHAM, 1991).

O uso de esponjas de colágeno está relacionada aos sistemas de liberação de fármacos, no qual garante alta concentração local do fármaco e baixa concentração sistêmica, tornando o uso mais seguro e a resposta ao tratamento mais eficaz. O uso de esponjas de colágeno como matriz de liberação de fármacos inclui, liberação de antibióticos, fator de crescimento, hormônios, vitaminas e outros (NAIR *et al.*, 2010).

1.1.3.3. Blenda Quitosana/Colágeno

Tanto quitosana quanto o colágeno possuem muitas aplicações como biomateriais, incluindo o uso como curativos no processo de cicatrização. A associação dos dois materiais tem como objetivo a melhora de suas propriedades mecânicas e biológicas (YE, *et al.*, 2007).

A interação entre a quitosana e o colágeno ocorre na maioria das vezes por forças eletrostáticas, entre os grupamentos $-NH_3^+$ da quitosana e os grupamentos $-COO^-$ do colágeno e em algumas situações essa interação pode ocorrer por ligações de hidrogênio. (TARAVEL; DOMARD, 1995, TARAVEL; DOMARD, 1995a).

Misturas de colágeno e quitosana têm sido usadas, por exemplo, como arcabouços de cultura *in vitro* de células e como membranas, filmes e esponjas na liberação controlada de fármacos. Estudos realizados em esponjas de quitosana/colágeno mostraram uma maior resistência à degradação enzimática se comparadas a esponjas somente de colágeno e ou quitosana. Também constatou-se que a quitosana promove um aumento da resistência biomecânica das esponjas (ARPORNMAEKLONG, 2008).

1.1.4. Extrato de semente de uva

A uva é uma fruta obtida da Videira (*Vitis spp.*), uma trepadeira de caule espesso e resistente. O fruto tem formato arredondado ou elipsoide, podendo ser branco, verde, amarelo,

rosado, vermelho ou azulado (Figura 11) de acordo com a variedade. A polpa aquosa do fruto pode envolver até quatro sementes de coloração escura .

Figura 11: Imagem da *Vitis Vinífera* de coloração azulada e de suas sementes.

No Brasil, a produção de uvas em 2007 atingiu cerca de 1,35 milhões de toneladas (MELLO, 2007), sendo 47% destinadas á elaboração de vinhos, sucos, destilados e outros derivados, gerando resíduos que podem ser aproveitados como ingredientes para elaboração de novos produtos. Estes subprodutos apresentam, cada vez mais, um interesse econômico acrescido ainda da importância ambiental.

O extrato de semente de uva é obtido de subprodutos do processo de fabricação do vinho ou suco de uva, tendo como principal componente as proantocianidinas ou tanino condensado.

As proantocianidinas são oligômeros ou polímeros de unidades monoméricas de flavan-3-ol (Figura 12) e quando aquecidos em meio ácido estes compostos originam antocianidinas (XIE *et al.*, 2003)

Figura 12: Estrutura química do núcleo flavan-3-ol (esquerda) e proantocianidina (direita).

A hidroxilação (ou substituição) da molécula de flavan-3-ol permite separar as proantocianidinas em várias classes, como por exemplo: procianidinas, prodelfinidinas, propelargonidinas, profisetidinas e prorobinetidinas, sendo as duas primeiras classes, as mais comuns (SUN; SPRANGER, 2005) (Tabela 1).

Tabela 1: Classificação das proantocianidinas de acordo com o padrão de hidroxilação (ou substituição) da molécula de flavan-3-ol (SUN; SPRANGER, 2005).

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

As procianidinas e as prodelfinidinas, quando hidrolisadas, liberam, respectivamente, cianidinas e delfinidinas, sendo que a unidade formadora das procianidinas são catequinas e epicatequinas e das prodelfinidinas são galocatequinas e epigalocatequinas (SUN; SPRANGER, 2005) (Figura 13).

Figura 13: Unidades monoméricas das principais proantocianidinas.

A estrutura das proantocianidinas é variada e não depende apenas do tipo do núcleo flavan-3-ol, mas também do grau de polimerização, do tipo de radical substituído bem como a posição onde essa substituição acontece.

Os efeitos benéficos do extrato de semente de uva são provenientes da capacidade de eliminação de radicais livres, sendo esta atividade antioxidante superior a outros antioxidantes

conhecidos, como vitamina C, vitamina E e β -caroteno. Alguns dados clínicos demonstram ação antioxidante 20 vezes mais potente que a vitamina C e 50 vezes mais potente que a vitamina E. (CHO *et al.*, 2009).

As proantocianidinas possuem variadas atividades farmacológicas e biológicas, incluindo: cardioprotetora, antitumoral, bactericida, anti-inflamatória e antioxidante (CHO *et al.*, 2009). Atuam também como facilitador da cicatrização tecidual devido a estimulação do fator de crescimento endotelial vascular (angiogênese) (KHANNA *et al.*, 2001), proliferação de fibroblastos e aumento da síntese de matriz extracelular, incluindo colágeno e fibronectina (KIM *et al.*, 1997).

Outro atributo importante das proantocianidinas refere-se a sua capacidade de atuação com agente reticulador de colágeno, descrito por (HAN *et al.*, 2003). Onde se observou que as interações entre as proantocianidinas e o colágeno podem ocorrer de quatro maneiras: interações covalentes, iônicas, hidrofóbicas e ligações por ligações de hidrogênio. As ligações de hidrogênio ocorrem entre as hidroxilas, muito presentes nas proantocianidinas, com os grupamentos amida do aminoácido prolina (Figura 14), presente na constituição da hélice tripla do colágeno, promovendo a estabilidade da interação das proantocianidinas com o colágeno (HE *et al.*, 2011).

Figura 14: Esquema mostrando as possíveis interações entre o colágeno e a proantocianidinas (CARVALHO, 2007).

O uso de proantocianidinas como agente reticulador, atribui algumas vantagens se comparado com outros agentes como, por exemplo, o glutaraldeído. Na qual (HAN *et al.*,

2003) verificou que o aumento na temperatura de desnaturação do colágeno com a adição de proantocianidina e glutaraldeído foi semelhante, melhorando significativamente as propriedades mecânicas do material. Mas, os resultados de citotoxicidade, proliferação de fibroblastos e síntese de colágeno, obtidos pela adição de proantocianidina foram expressivamente melhores se comparados aos do glutaraldeído, estabelecendo uma associação importante para obtenção de biomateriais compostos por colágeno.

1.1.5. Mecanismos de liberação de fármacos

Sistemas de liberação controlada e prolongada de fármacos surgiram durante os anos 1980 e tornaram-se uma tecnologia comercialmente importante. A liberação controlada de uma substância ou fármaco estabelece um ambiente terapêutico desejável com ótima resposta, efeitos colaterais mínimos e eficácia prolongada (KIM *et al.*, 2009).

A liberação controlada de fármacos apresenta vantagens sobre os sistemas convencionais. Em formulações convencionais após a administração, a concentração plasmática do fármaco se eleva atingindo o valor máximo e depois diminui, esses níveis oscilantes de concentrações podem provocar períodos de ineficácia e toxicidade. Nos sistemas de liberação controlada a concentração plasmática do fármaco se mantém constante e dentro da concentração terapêutica (janela terapêutica) (PERCIVAL, 2002) (Figura 15).

Figura 15: Comparação ilustrativa das variações de concentração de fármacos administrados por métodos convencionais de multi dosagem (a) e sistema de liberação controlada (b), sendo A, a administração do fármaco.

Outras vantagens também são observadas nos sistemas de liberação controlada como o direcionamento de ação do fármaco, reduzindo a concentração sistêmica, diminuindo efeitos indesejáveis e aumentando a segurança. Redução da frequência do tratamento medicamentoso, mantendo a concentração terapêutica efetiva (TANAKA *et al.*, 2006)

Vários dispositivos são empregados nos sistemas de liberação controlada como (PERCIVAL, 2002):

- Transportadores celulares de fármacos: São utilizadas células como eritrócitos, leucócitos e fibroblasto para carregar enzimas e fármacos.
- Lipossomos: São vesículas artificiais compostas de uma ou mais camadas bilipídicas, no qual o fármaco é encapsulado no interior dessas camadas. São utilizadas no direcionamento da ação do fármaco em alvos específicos.
- Bombas de liberação: As bombas são utilizadas interna ou externamente, na qual a taxa de liberação do fármaco é ajustável e constante. Administram insulinas, heparinas, morfina e outros.
- Sistemas poliméricos: São os sistemas mais importantes na liberação de fármacos pela ampla gama de materiais e formas empregadas no desenvolvimento dos sistemas.

Os polímeros utilizados em sistemas de liberação controlada de fármacos são divididos essencialmente em polímeros naturais e sintéticos. Os polímeros naturais (Tabela 2) são facilmente encontrados e normalmente são biodegradáveis e biocompatíveis (GRUND, BAUER, FISCHER, 2011).

Tabela 2: Polímeros naturais com suas propriedades e aplicações em sistemas de liberação (GRUND, BAUER, FISCHER, 2011).

Polímeros naturais	Propriedades	Aplicações em sistemas de liberação	biodegradável
Albumina	Atóxico e antiimunogênico	Nanoencapsulamento, microencapsulamento de insulinas, doxorrubicina e outros.	+
Celulose e derivados	Mucoadesivo, forma hidrogéis, biocompatível, atóxico.	Microencapsulamento, bombas osmóticas, sistema oral, nasal, gástrico e vaginal de liberação.	-
Quitosana e derivados	Mucoadesivo, hemostático, cicatrização de ferimentos, formação de géis e filmes, baixa toxicidade	Liberação de genes, hidrogéis, microesferas, nanofibras, sistema oral, nasal e gástrico de liberação.	+
Colágeno	Biocompatível, formação de géis.	Curativos, microencapsulamento, filmes e membranas.	+
Dextrano e derivados	Formação de géis, liberação de injetáveis	Hidrogéis, liberação de genes	+
Gelatina	Biocompatível	Reticulação de hidrogéis, microencapsulamento de proteínas.	+
Heparina e derivados	Anticoagulante e antitrombótico	Fator de crescimento, proteases.	+
Ácido hialurônico	Formação de géis	reticulação de hidrogéis antibacterianos, medicamentos antiinflamatórios, DNA.	+

Os polímeros sintéticos (Tabela 3) têm na sua produção ampla variedade de composições com propriedades distintas para cada necessidade, o que não ocorre nos polímeros naturais. Mas, tem como desvantagem a falta de biocompatibilidade na maioria dos materiais, promovendo reações inflamatórias e alérgicas com o passar do tempo (GRUND, BAUER, FISCHER, 2011).

Tabela 3: Polímeros sintéticos com suas propriedades e aplicações em sistemas de liberação (GRUND, BAUER, FISCHER, 2011).

Polímeros sintéticos	Propriedades	Aplicações em sistemas de liberação	biodegradável
Acrílicos	Biocompatível,	Liberação transdérmica, implantes, liberação sub-cutânea.	-
Poli (aminoácidos)	Hidrofílico, biocompatível	Liberação de medicamentos citostáticos e genes.	+
Poli (anidridos)	Hidrofóbico, biocompatível, não teratogênico	Implante na pele e córnea, aplicação sub-cutânea	+
Policarbonatos	Termoplástico, resistente após hidrólise, biocompatível, alta resistência mecânica, difícil esterilização.	Implantes com PEG para agentes anticancerígenos.	+
Poli (ácido láctico), Poli (ácido glicólico) e copolímeros	Termoplástico, alta transição vítrea, atóxico, biocompatível	Micro e nanopartículas contendo esteróides, anticorpos, proteínas, peptídeos, antibióticos e vacinas	+
Poliuretanos	Biocompatível, formação de hidrogéis	Microcápsulas para liberação de proteínas	+
Poliétileno (acetato vinílico)	Biocompatível, hidrofóbico, atóxico	Implantes tópicos ocular, sistemas oral, vaginal, transdérmico de liberação, microencapsulamento	-
Silicones	Fisiologicamente inerte, baixa toxicidade	Liberação de hormônios, antibióticos, sistema de liberação transdérmico	-

O uso de polímeros possibilita a utilização de liberação de fármacos por sistemas matriciais, constituídos por diversos tipos de polímeros e tem como vantagens a versatilidade, eficácia e baixo custo de produção (LOPES, 2005).

Os sistemas matriciais de liberação de fármacos são divididos nos seguintes grupos (Tabela 4) (LYRA *et al*, 2007):

Tabela 4: Tipos de sistemas matriciais e seus modos de liberação (LYRA *et al.*, 2007).

	Exemplos	Tipo	Modo de liberação
Matrizes inertes	Etilcelulose, polietileno e outros	Reservatório	Liberação controlada por difusão
Matrizes insolúveis em água e erodíveis	Triglicerídeos, cera de carnaúba, óleo de ricino hidrogenado e outros	Monolítico	Bio-erosão
Matrizes hidrofílicas	Metilcelulose, alginato de sódio, carboximetilcelulose sódica, carbômeros e outros	Monolítico	Liberação por intumescimento, difusão e erosão

Nos sistemas matriciais, o fármaco pode se encontrar homogeneamente disperso na matriz polimérica (monolítico), dentro de um reservatório ou adsorvido em sua superfície, e na sua liberação estão envolvidos processos físicos e químicos, incluindo a degradação e erosão do polímero, difusão do fármaco pelos poros da matriz, penetração de água na matriz, promovendo o intumescimento (Figura 16) e pela combinação dos mecanismos de difusão e intumescimento (KIM *et al.*, 2009).

Figura 16: Esquema dos mecanismos de liberação em matrizes poliméricas (BAJPAI *et al.*, 2008).

De forma geral, para analisar qual o mecanismo de liberação envolvido nos sistemas de liberação controlada, existem inúmeras equações matemáticas para os mais diversos materiais e formas. Alguns autores como COSTA, SOUSA LOBO, 2001, descrevem mais de 50 equações matemáticas utilizadas para elucidar os mecanismos de liberação controlada de fármacos.

Nos sistemas de liberação de fármacos em matrizes poliméricas, as equações matemáticas mais conhecidas e utilizadas são (COSTA, SOUSA LOBO, 2001; LOPES, 2005):

- Cinética de ordem zero: Baseia-se na liberação lenta do fármaco, expresso pela equação 1:

$$\frac{M_t}{M_0} = K_0 t \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo,

M_t/M_0 : Quantidade de fármaco liberado no meio

K_0 : Constante cinética

t : Tempo de liberação

Este modelo é utilizado nas liberações controladas na qual a velocidade de difusão do fármaco é menor que a velocidade de dissolução formando uma solução saturada, tornando a liberação do fármaco constante. Mas, na prática esse fenômeno quase não ocorre.

- Equação de Higushi: Utilizada para descrever a velocidade de liberação a partir de um sistema matricial, expressa na equação 2:

$$\frac{M_t}{M_0} = K_H \sqrt{t} \quad (\text{Equação 2})$$

Sendo,

K_H : Constante de liberação de Higushi.

Neste modelo a liberação do fármaco está baseada na difusão da lei de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo. Em sistemas que intumescem esta equação é inapropriada, pois o transporte do fármaco pode se dar pelo relaxamento das cadeias poliméricas. Este modelo pode ser aplicado com maior exatidão em matrizes insolúveis que não intumescem.

- Equação semi-empírica proposta por Korsmeyer, Peppas: Descreve a liberação do fármaco quando o mecanismo que prevalece é uma combinação da difusão do fármaco (transporte Fickiano) e do transporte Caso II (não-Fickiano), controlado pelo relaxamento das cadeias poliméricas, expressa pela equação 3:

$$\frac{M_t}{M_0} = Kt^n \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo,

K: Constante cinética

n: Expoente de liberação que caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco.

Esta equação é geralmente utilizada para interpretar a liberação do fármaco quando o mecanismo não é bem conhecido ou resulta da combinação de dois processos, na qual, se tem não só a difusão do fármaco, que obedece ao transporte Fickiano, mas também o fenômeno de inchamento e relaxamento que ocorre na transição de um estado semirrígido para um mais flexível, chamado transporte Caso II.

Em matrizes poliméricas geralmente quando $n = 0,5$, o mecanismo que controla a liberação do fármaco é a difusão (transporte Fickiano). Quando $n > 0,9$, corresponde à cinética de ordem zero, controlada por mecanismo de transporte de Caso II, ou seja, pelo fenômeno de intumescimento do polímero. Valores de n ($0,5 < n < 0,9$) indicam cinética de transporte anômalo que ocorre quando o mecanismo de difusão e intumescimento se dá simultaneamente (RITGER; PEPPAS, 1987).

- Equação de Peppas e Sahlin: Está baseada na equação proposta por Korsmeyer *et al.* e foi proposta para quantificar os fenômenos responsáveis pela liberação (difusão e relaxamento), expresso na equação 4:

$$\frac{M_t}{M_0} = K_1 t^m + K_2 t^{2m} \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo,

K_1 e K_2 : Constantes que refletem as contribuições dos mecanismos de difusão e relaxamento

m : Expoente de difusão

Este modelo está diretamente relacionado ao modelo proposto por Korsmeyer, Peppas, sendo utilizado quando se quer obter informações complementares relativas aos mecanismos de liberação de fármacos.

Neste trabalho foi adotado como modelo de estudo dos mecanismos de liberação do extrato de semente de uva a equação de KORSMEYER, PEPPAS, 1981 (equação 3).

Os sistemas de liberação de fármacos não estão só relacionados a formas farmacêuticas de uso interno. Formas de liberação transdérmicas e dérmicas, como os adesivos transdérmicos e os curativos, veem se mostrando bastante eficazes (PRAUSNITZ; LANGER, 2008).

Os curativos fornecem excelente meio de liberação de fármaco diretamente no local da ferida, sem que haja necessidade de constantes trocas (COSTACHE *et al.*, 2010). Outra vantagem é a maior adesão ao tratamento especialmente das feridas crônicas, onde há necessidade de trocas constantes de curativo (LEE; PARK, 2000).

Dentre os tipos de curativos utilizados, destacam-se os derivados de polímeros sintéticos e naturais. Dentre os sintéticos inclui-se: poli (ácido lático-glicólico), poli (vinil pirrolidona), poli (óxido de etileno), poli (álcool vinílico) entre outros. Para os curativos poliméricos naturais, destacam-se a quitosana, celulose e colágeno, normalmente utilizados na forma de filmes, membranas, hidrogéis e esponjas (COSTACHE *et al.*, 2010).

Os mecanismos de liberação de fármacos em curativos poliméricos estão principalmente relacionados ao processo de hidratação do curativo por fluidos da ferida (exsudatos), intumescimento do polímero e interação curativo/ferimentos, permitindo a difusão do fármaco presente no curativo com o ferimento (BOATENG; MATTHEWS, 2008).

Os medicamentos utilizados em curativos para liberação controlada, normalmente são aqueles que têm atividade local sobre o ferimento, auxiliando na desinfecção, debridamento e limpeza do ferimento, nos quais se encaixam os antissépticos (poli-vinil-pirrolidona), antimicrobianos (gentamicina, ofloxacina, tetraciclina e outros) e micropartículas de prata. Também são utilizados nos curativos fatores de crescimento que estimulam a proliferação de células que promovem a cicatrização dos ferimentos (BOATENG; MATTHEWS, 2008).

1.1.6. Plastificantes

Os plastificantes são aditivos comumente empregados em materiais poliméricos, com o objetivo de melhorar suas capacidades mecânicas e aumentar a flexibilidade. São substâncias com massa molecular menor em relação ao polímero, geralmente líquidos, que quando adicionados ao polímero formam um material mais macio, mais flexível que o respectivo polímero (SCHLEMMER; SALES, 2010).

Existem algumas teorias para explicar a ação dos plastificantes, como a da lubrificação, onde o plastificante agiria como lubrificante interno, reduzindo a fricção entre as cadeias poliméricas e a teoria do gel, onde o plastificante quebraria as interações entre as cadeias do polímero, tais como, pontes de hidrogênio e força de Van der Waals, aumentando a flexibilidade das cadeias. (DI GIOIA; GUILBERT, 1999).

A escolha da concentração de plastificante utilizada é de suma importância, pois interfere diretamente nas características do material a ser obtido, modificando o coeficiente de difusão, resultando na alteração da permeabilidade aos gases e ao vapor de água (FARLEY; MOMAHAN; GERMAN, 1996).

A fim de verificar as possíveis alterações físico-químicas e mecânicas, da adição de plastificante na composição das esponjas quitosana/colágeno, foi utilizado o glicerol, um poliálcool (Figura 17). Dentre as características físico-químicas do glicerol destacam-se as propriedades de ser um líquido oleoso, incolor e viscoso. Solúvel em água e álcool em todas as proporções e pouco solúvel em éter, acetato de etila e dioxano e insolúvel em hidrocarbonetos (ARRUDA; RODRIGUES; FELIPE, 2006).

Figura 17: Esquema da estrutura química do glicerol.

Devido à combinação de propriedades físico-químicas como não toxicidade, ausência de cor e odor, o glicerol é uma substância com grande variedade de aplicações, destacando-se

como agente plastificante na obtenção de filmes poliméricos (LAVORGNA; PISCITELLI; MANGIACAPRA, 2010).

2. Objetivo

Obtenção de esponjas a partir de polímeros naturais (quitosana e colágeno) e fitoterápico (extrato de semente de uva), com potencial de uso na regeneração da pele.

Objetivos específicos:

- Desenvolvimento e caracterização de esponjas quitosana/colágeno/extrato com metodologia reprodutível.
- Estudos de liberação *in vitro* do extrato em meio a tampão fosfato salino (PBS).
- Avaliação da adição do glicerol nas características das esponjas e liberação do extrato.
- Avaliação do extrato de semente de uva como agente reticulante do colágeno aniônico.

3. Experimental

3.1. Obtenção da quitosana

Para obtenção da quitosana foi utilizado a β -quitina extraída do gládio de lula (*Loligo spp*), obtido em Cananéia – SP, por Miami pescados.

A partir do gládio de lula até obtenção da quitosana seguiram-se as seguintes etapas (HORN; MARTINS; PLEPIS, 2010) (Figura 18):

O gládio de lula foi lavado para eliminar resíduos, seco, triturado e separado com peneira obtendo-se partículas uniformes.

No processo de desmineralização utilizou-se 40 g de gládio moído e adicionou-se solução de HCl 0,55 mol L⁻¹ mantido à temperatura ambiente por 2 h com agitação mecânica constante. Após este processo a solução foi filtrada, separando o gládio da solução de HCl. O gládio então sofreu diversas lavagens com água destilada até obter a neutralização. O sólido foi separado por filtração e seco.

Após a desmineralização adicionou-se ao sólido obtido solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹ na proporção (1:10 g / mL) do sólido para a solução, com agitação constante e temperatura controlada à 80°C, mantido por 1 h. O sólido foi lavado com água destilada até a neutralidade e seco.

Para a desacetilação da β -quitina, adicionou-se uma solução de NaOH 40% na proporção (1:20 g / mL), com agitação constante e temperatura controlada de 80°C em atmosfera de nitrogênio (N₂) por 3 h. O sólido foi lavado com água destilada até a neutralidade e seco, obtendo-se a quitosana (Figura 19). A desacetilação foi repetida para garantir a eficácia do procedimento.

Figura 18: Esquema do processo de obtenção da quitosana a partir do gládio de lula.

Figura 19: Alteração dos grupos acetil da quitina por grupos aminos obtendo a quitosana.

3.2. Obtenção do colágeno aniônico

O colágeno aniônico foi obtido a partir de tendão bovino e preparado no laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, descrito resumidamente pelas seguintes etapas (BATISTA; MARTINS; PLEPIS, 2009):

- Após a lavagem, o tendão bovino foi tratado com uma solução alcalina contendo 6% de DMSO e sais (cloretos e sulfatos).
- Removido da solução após 96 h, o material foi equilibrado em solução aquosa com cloretos e sulfatos.

- Os sais foram removidos por lavagens sucessivas com H_3BO_3 3%, água destilada, EDTA 0,3% e água destilada até condutividade constante.
- O colágeno foi então extraído com uma solução de ácido pH 3,5.

A figura 20 mostra o esquema de obtenção do colágeno.

Figura 20: Esquema da obtenção do colágeno aniônico 96 h.

3.2.1. Determinação da concentração do colágeno por liofilização

A concentração da solução de colágeno foi determinada por liofilização de amostras de 2,5 gramas previamente congeladas em nitrogênio líquido e liofilizadas até a obtenção de massa constante em um liofilizador (modelo DRYER modulyo-EDWARDS). O resultado é a média de três liofilizações independentes.

3.3. Extrato de semente de uva

O extrato de semente de uva foi obtido da Empresa Galena – Química e Farmacêutica Ltda, com o nome comercial Procianin® (extrato de semente de uva padronizado), contendo quantidade superior a 96% de proantocianidinas.

Para obtenção da maior concentração possível de proantocianidina presente no extrato de semente de uva foi feita purificação do extrato. O extrato foi diluído em ácido acético 0,5% (em volume) na proporção 0,15 g/10 mL, sob agitação magnética por 3 h. A mistura foi filtrada em papel de filtro e a solução obtida foi congelada em nitrogênio líquido e liofilizada para novamente tornar o extrato em forma de pó.

3.4. Obtenção das esponjas

No intuito de preparação das esponjas, inicialmente foi necessária a preparação da solução de quitosana 1% (em massa) obtida a partir da dissolução do pó de quitosana em solução aquosa de ácido acético a 1% (em volume) e mantida sob agitação mecânica por 24 h. Após foram preparadas duas misturas, compostas pela solução de quitosana 1% (em massa) e solução de colágeno 1% (em massa). Na primeira mistura foi utilizada uma proporção de quitosana/colágeno (1:1) e na segunda mistura utilizada uma proporção de quitosana/colágeno (1:2), sendo denominadas, respectivamente, Q1C1 e Q1C2. A mistura Q1C1 foi dividida em duas partes e em uma das partes foi acrescido 0,25% (em massa) de glicerol. O mesmo foi feito com a mistura Q1C2, originando desta forma as misturas Q1C1G e Q1C2G.

Para a adição do extrato, as misturas Q1C1, Q1C2, Q1C1G e Q1C2G, foram divididas em quatro partes, a primeira parte não recebeu o extrato e às três partes restantes foi adicionado uma concentração de extrato, sendo entre 0,5%, 1% e 2% (em massa).

As misturas foram deaeradas em dessecador sob vácuo, pesadas e colocadas em moldes de Teflon®, congeladas em nitrogênio líquido e submetidas à liofilização (modelo Dryer modulyo - Edwards) por aproximadamente 9 h, obtendo assim os materiais em forma de esponja (Figura 21 e 22), denominadas como mostrado na Tabela 5

Figura 21: Fluxograma da obtenção das esponjas (1:1).

Figura 22: Fluxograma da obtenção das esponjas (1:2).

Tabela 5: Nomenclatura das diferentes amostras de esponjas.

Q1C1	Quitosana / colágeno (1:1)
Q1C1E05	Quitosana / colágeno (1:1) / extrato 0,5%
Q1C1E1	Quitosana / colágeno (1:1) / extrato 1%
Q1C1E2	Quitosana / colágeno (1:1) / extrato 2%
Q1C1G	Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25)
Q1C1GE05	Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25) / extrato 0,5%
Q1C1GE1	Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25) / extrato 1%
Q1C1GE2	Quitosana / colágeno / glicerol (1:1:0,25) / extrato 2%
Q1C2	Quitosana / colágeno (1:2)
Q1C2E05	Quitosana / colágeno (1:2) / extrato 0,5%
Q1C2E1	Quitosana / colágeno (1:2) / extrato 1%
Q1C2E2	Quitosana / colágeno (1:2) / extrato 2%
Q1C2G	Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25)
Q1C2GE05	Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25) / extrato 0,5%
Q1C2GE1	Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25) / extrato 1%
Q1C2GE2	Quitosana / colágeno / glicerol (1:2:0,25) / extrato 2%

Por serem obtidas a partir de soluções em ácido acético 1% (em volume), as esponjas podem ter um excesso deste material em sua composição, interferindo tanto nos ensaios *in vitro* de liberação do extrato como também em um possível ensaio *in vivo*, fazendo-se necessário a neutralização do excesso de ácido acético.

O método escolhido para a neutralização do ácido presente foi o de saturação da atmosfera com NH_4OH (hidróxido de amônia). As esponjas foram acondicionadas por dois dias em dessecador na presença do NH_4OH . Após este período as esponjas foram acondicionadas sob fluxo de ar e protegidas da luz por sete dias.

Para a verificação da neutralização das esponjas, amostras foram submetidas a análise utilizando pHmetro. Para tal, amostras das esponjas neutralizadas foram imersas em aproximadamente 10 mL de água destilada com pH 5,83. Mediu-se o pH das soluções contendo as esponjas nos tempos: 30 minutos, 24 e 72 horas.

3.5. Caracterização

3.5.1. Determinação de grau médio de acetilação da quitosana (GA%) por titulação condutimétrica

Para determinação do grau de acetilação da quitosana foi utilizado o método de titulação condutimétrica (CARDOSO, 2008), escolhido como rotina no Laboratório de Bioquímica e Biomateriais do Instituto de Química de São Carlos, no qual os resultados observados são semelhantes àqueles obtidos por ressonância magnética nuclear (RMN) (SANTOS *et al.*, 2003). A amostra de quitosana (0,25 g) foi solubilizada em 50 mL de uma solução de HCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação por 15 h. A solução então foi transferida para um balão volumétrico de 250 mL e o volume ajustado com água destilada. Alíquotas de 50 mL da solução foram tituladas. Como agente titulante usou-se uma solução de hidróxido de sódio a $0,091 \text{ mol L}^{-1}$. A neutralização da solução foi medida através de condutivímetro da marca Digimed, modelo DM-32. As análises foram realizadas em triplicata. O grau de acetilação foi calculado pela equação 5:

$$\% \text{GA} = \left(1 - \frac{161 \times (V_2 - V_1) \times [\text{NaOH}]}{m} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo,

- %GA: Grau de acetilação.
- 161: Massa molar média da unidade repetitiva de quitosana (g/mol).
- ($v_2 - v_1$): Volume de hidróxido de sódio consumido para neutralizar a quitosana (mL).
- [NaOH]: Concentração da solução de hidróxido de sódio (mol L^{-1}).
- m: Massa de quitosana contida na alíquota titulada (g).

3.5.2. Determinação da massa molar média da quitosana por viscosimetria capilar.

Para a determinação da massa molar da quitosana o uso do método da viscosimetria capilar é a mais utilizada por sua simplicidade dos procedimentos requeridos (TSAIH; CHEN, 1999).

As amostras foram obtidas a partir do preparo de uma solução contendo 20 mg de quitosana, dissolvida em 25 mL de ácido acético $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação constante por 24 h. Após, adicionou-se 25 mL de acetato de sódio $0,4 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação constante por mais 24 h.

Separadamente, preparou-se um tampão $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ de ácido acético e $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de acetato de sódio em pH 4,5, que foi utilizado como padrão no tempo de escoamento, além de ser utilizado nas diluições da solução padrão para garantir que a força iônica das soluções se mantivessem constantes. Com sucessivas diluições da solução padrão, foram obtidas soluções contendo 0,40; 0,35; 0,30; 0,25; 0,20; 0,18 e 0,15 g/L.

Alíquotas de 5 mL de cada solução foram transferidas para um viscosímetro capilar do tipo Ubbelohde, sob temperatura constante de 25°C . Para cada solução foram realizadas 10 medidas de tempo, as médias foram calculadas e utilizadas para determinar a viscosidade específica de cada solução. Para tal foi utilizada a equação 6:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo, (n_{sp}) viscosidade específica, (t) tempo de escoamento do tampão, (t_0) tempo de escoamento da amostra.

Para determinar a massa molar da quitosana, além da viscosidade específica, ainda é necessário a determinação da viscosidade reduzida e a viscosidade intrínseca.

A viscosidade reduzida é determinada pela equação 7:

$$n_{red} = \frac{n_{sp}}{C} \quad (\text{Equação 7})$$

Sendo, (n_{sp}) viscosidade específica, (C) concentração da solução (g / L).

A viscosidade intrínseca é determinada pela extrapolação da diluição infinita da reta de viscosidade reduzida versus a concentração da solução. Com o valor da viscosidade reduzida, utilizando a equação de Mark-Houwink-Sakurada (equação 8) é possível obter a massa molar média da quitosana.

$$[n] = K M^{\alpha} \quad (\text{Equação 8})$$

Na qual, $[n]$ viscosidade intrínseca, (K) e (α) são constantes determinadas pelo grau de acetilação da quitosana, temperatura e solvente utilizados (RINAUDO, 2006).

3.5.3. Espectroscopia de ultra violeta

Para as análises do extrato de semente de uva, foram usados o extrato comercial, mantido com suas propriedades originais, o extrato purificado, resultado da dissolução e filtragem do extrato comercial em ácido acético 0,5% e o extrato neutralizado, proveniente da exposição do extrato purificado em atmosfera de hidróxido de amônio para neutralizar o ácido acético excedente presente no extrato após a purificação. Os extratos foram diluídos em (PBS) na proporção 0,1 mg/mL. As leituras foram feitas em espectrofotômetro de UV-visível da HITACHI, modelo U-1100, em comprimento de onda de 278,6 nm.

3.5.4. Análise térmica

A análise térmica foi definida por MACKENZIE, 1979, como sendo um conjunto de técnicas nas quais uma propriedade física de uma substância e/ou seus produtos de reação é medida, enquanto a amostra é submetida a uma programação de temperatura. Dentre as técnicas conhecidas, está a calorimetria exploratória diferencial (DSC), utilizada neste trabalho.

3.5.4.1. Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

Para as análises de calorimetria exploratória diferencial foi utilizado o equipamento da TA – Instruments, modelo DSC 2010.

Para as análises das esponjas foram utilizados em média 10 g de esponja no suporte de alumínio hermético, sob fluxo de ar sintético de 80 mL min^{-1} , com razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, com variação de $5 - 120^\circ\text{C}$.

Neste estudo usou-se o DSC para determinar a temperatura de desnaturação do colágeno (Td), calculado a partir do ponto médio da inflexão da curva DSC (Figura 23).

Figura 23: Curva representativa da determinação da Td por DSC.

3.5.5. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros foram obtidos em um espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), modelo Bomem MB-102. Foram realizados 32 scans por espectro, com resolução de 4 cm^{-1} e a faixa de medição foi de 4000 a 400 cm^{-1} .

Para obter o espectro da quitosana foi utilizada uma solução diluída de quitosana 1% em ácido acético 1% (em volume) e gotejada em uma placa de silício, que foi acondicionada em dessecador com pastilhas de hidróxido de sódio por 48 h para evaporação do solvente e secagem da pastilha.

Para o colágeno foi utilizada uma solução diluída em ácido acético 1% (em massa) do colágeno. Desta solução foi retirada uma gota e adicionada sobre uma placa de silício, que foi acondicionada em dessecador com pastilhas de hidróxido de sódio por 48 h para evaporação do solvente e secagem da pastilha.

No caso do extrato, foram utilizados os extratos comercial, purificado e neutralizado. Cada um deles foi preparado utilizando pastilha de KBr, previamente seco em estufa por 24 h e macerado em almofariz de ágata, na proporção de 1:100 (extrato/KBr).

As esponjas foram preparadas em pastilhas de KBr e confeccionadas a partir da maceração das esponjas em almofariz e incorporação do KBr na proporção 1:100 (esponjas/KBr).

3.5.6. Microscopia eletrônica de varredura

As estruturas morfológicas das esponjas foram analisadas em um microscópio eletrônico de varredura, LEO - modelo 440. As amostras foram fixadas em suporte de alumínio por fitas condutoras de grafite e recobertas com uma camada de ouro em um metalizador Balsers – modelo SDC 050. O tamanho dos poros das esponjas foram medidos através do software UTHSCSA Image Tool versão 3.0.

3.5.7. Ensaio de liberação *in vitro* do extrato de semente de uva.

As esponjas foram imersas em frascos contendo 100 mL de solução de tampão fosfato salino (PBS) pH 7,4 e colocados em um Banho Dubnoff sob agitação de 75 rpm e temperatura constante de 37°C. Alíquotas de 3,0 mL foram retiradas em intervalos de tempo que variaram de 10 min a 120 h e retornadas após análise. A leitura foi feita em espectrofotômetro de UV-visível da HITACHI, modelo U-1100, em comprimento de onda de 278,6 nm. Para a determinação da quantidade de extrato liberado na solução foi elaborada uma curva de calibração do extrato em solução de tampão PBS. O ensaio foi realizado em triplicata.

3.5.8. Absorção de tampão fosfato salino (PBS)

Para o ensaio de absorção foram confeccionadas esponjas em moldes circulares de aproximadamente 1,5 cm de diâmetro. As esponjas foram neutralizadas e mantidas em dessecador com pastilhas de hidróxido de sódio e sílica para retirada de umidade. As esponjas foram pesadas até que seu peso se mantivesse constante.

Devido as dificuldades em se precisar os valores de absorção das esponjas, por conter algumas variáveis que influem nos dados, foi proposto um procedimento a fim de diminuir as variáveis e padronizar os dados.

As esponjas foram colocadas em frascos contendo tampão PBS e em intervalos de tempo específicos foram retiradas do tampão, o excesso de solução das esponjas foi retirado utilizando papel filtro com dimensões de 2 cm X 3 cm por um tempo aproximado de 5 segundos. Após, as esponjas foram pesadas e retornadas aos frascos para novas tomadas de tempo.

Em cada amostra o processo foi realizado em quintuplicata. A quantidade de tampão absorvido pela esponja foi calculada pela média dos resultados encontrados usando a equação 9 (ARPORNMAEKLONG *et al.*, 2008).

$$\%sol. = \frac{(m_u - m_s)}{m_s} \times 100 \quad (\text{Equação 9})$$

Sendo,

% sol. = Percentual de solução absorvida pela esponja.

m_u = Massa úmida.

m_s = Massa seca.

4. Resultados e discussão

4.1. Obtenção da quitosana

A quitosana foi obtida a partir do gládio de lula (*Loligo spp*) (Figura 24), após o processo de desmineralização, desproteinização e desacetilação, sendo esta a etapa em que os grupos acetamidos são substituídos por grupos aminos, obtendo a quitosana propriamente dita.

O rendimento de todo o processo foi de aproximadamente 30% do peso inicial de gládio.

Como características macroscópicas a quitosana obtida (Figura 25) apresentou coloração branca e em forma de grânulos com diferentes gramaturas.

Figura 24: Fotografia digital do gládio de lula (RESEARCH, 2012).

Figura 25: Fotografia digital da quitosana obtida a partir do gládio de lula.

4.2. Determinação da concentração do colágeno por liofilização

Determinou-se, através do processo de liofilização, a concentração da solução de colágeno como sendo de $1,24 \pm 0,02\%$ (em massa). A partir da obtenção da concentração do

colágeno, este foi diluído com ácido acético 1% até que fosse obtida uma concentração de 1% (em massa).

4.3. Purificação do extrato de semente de uva

O rendimento da purificação do extrato foi de aproximadamente 75%. Após o processo para purificação do extrato (filtração, congelamento e liofilização) ocorreram mudanças de coloração entre os extratos (Figura 26). Observou-se uma coloração mais clara do extrato purificado, o que pode ter ocorrido devido à remoção de alguns componentes fenólicos como as antocianidinas, despolimerizadas das proantocianidinas, presentes no extrato e responsáveis pela coloração avermelhada das uvas, presentes principalmente na casca das uvas (SHI *et al.*, 2003, DIXON *et al.*, 2005). Não houve outras mudanças significativas quanto às características macroscópicas do extrato, houve sim uma melhora na solubilização do extrato em água e soluções de ácido fraco.

O material retido no filtro foi também liofilizado e apresentou-se insolúvel em soluções aquosa e de ácido fraco, indicando a ausência de proantocianidina no material, uma vez que esta é solúvel em água e em ácidos fracos e diluídos (SHI, 2003).

Figura 26: Fotografia digital do extrato de semente de uva comercial (esquerda) e do extrato de semente de uva purificado (direita).

4.4. Obtenção das esponjas (aspectos macroscópicos)

Observou-se quanto aos aspectos macroscópicos das esponjas que de acordo com o aumento da concentração de extrato incorporado a esponja, sua coloração foi se intensificando, iniciando com uma coloração bege para as esponjas contendo 0,5% de extrato até uma coloração mais escura para as esponjas contendo 2% de extrato, como mostra a Figura 27. Este padrão de diferenciação na coloração ocorreu em todos os grupos de esponjas, ou seja, Q1C1E, Q1C2E, Q1C1GE e Q1C2GE.

Figura 27: Fotografia digital das esponjas (1) Q1C1E05, (2) Q1C1E1, (3) Q1C1E2.

Outro aspecto de diferenciação ocorreu entre as esponjas com glicerol, no qual, notou-se que as esponjas possuíam uma superfície com um aspecto mais liso e uniforme se comparado às esponjas sem glicerol (Figura 28), além da aparente maior flexibilidade.

Figura 28: Fotografia digital das esponjas (1) Q1C1E05, (2) Q1C1E1, (3) Q1C1E2 e (4) Q1C1GE05, (5) Q1C1GE1, (6) Q1C1GE2.

Entre as esponjas sem o extrato de semente de uva não era possível diferenciá-las logo após o processo de liofilização, mas, após duas semanas, as esponjas com glicerol começaram a apresentar uma deformação em suas bordas, como mostra a Figura 29, com esta deformação mais acentuada para a esponja Q1C2G. Isto ocorreu provavelmente pelo grande poder higroscópico do glicerol associado a hidrofilicidade do colágeno, tornando as esponjas mais hidrofílicas e mais suscetíveis às condições do ambiente

Figura 29: Fotografia digital das esponjas (8) Q1C1, (9) Q1C2, (10) Q1C1G e (11) Q1C2G.

As esponjas de proporções quitosana/colágeno (1:1) e (1:2), não apresentaram diferenças significativas em seus aspectos macroscópicos.

A neutralização das esponjas, por meio de saturação da atmosfera por hidróxido de amônio, mostrou-se um método eficaz para a neutralização de ácido acético presente no material, como mostra a tabela 6, foi possível observar o aumento do pH da solução que continham as esponjas neutralizadas, no qual estes valores se mantiveram próximos ao pH da água destilada (5,83), demonstrado que além de neutralizar o ácido presente, houve a volatilização do NH_4OH que não reagiu com o ácido do material.

Tabela 6: Valores de pH obtidos antes do processo de neutralização e após o processo.

Esponja	Sem neutralizar	Neutralizadas		
	pH inicial	Imersão de 30 min	Imersão de 24 h	Imersão de 72 h
Q1C1	4,12	5,38	5,78	5,77
Q1C2	4,18	5,25	5,86	5,87
Q1C1E1	4,28	5,42	5,95	5,92
Q1C2E1	4,32	5,46	5,90	5,89
Q1C1GE2	4,36	5,54	5,89	5,90
Q1C2GE05	4,21	5,30	5,81	5,82

4.5. Caracterização

4.5.1. Determinação do grau médio de acetilação da quitosana (%GA) por titulação condutimétrica

Para o cálculo do grau médio de acetilação da quitosana por titulação condutimétrica usa-se o gráfico com os valores de condutividade versus o volume de NaOH utilizado na titulação. As titulações foram feitas em triplicatas e obtida a média dos valores. A figura 30 mostra uma das curvas de titulação condutimétrica.

Figura 30: Curva de titulação condutimétrica da quitosana para determinação do grau médio de acetilação.

Com o auxílio do gráfico de titulação foi possível determinar o valor de V_1 (ponto no qual determina o fim da neutralização do HCl pelo NaOH) e V_2 (neutralização total do ácido fraco pertencente aos grupos amino da quitosana) (CARDOSO, 2008), sabendo-se a massa de quitosana, a concentração de NaOH e os valores de V_1 e V_2 , a equação 5 pôde ser utilizada.

Desta forma, o grau médio de acetilação obtido foi de $8,82 \pm 0,30\%$. Ou seja, obteve-se uma quitosana com aproximadamente 91% de desacetilação.

4.5.2. Determinação da massa molar média da quitosana por viscosimetria capilar.

Com os valores da tabela 7 foi possível obter o valor da viscosidade intrínseca, através da elaboração da curva de viscosidade reduzida versus a concentração, mostrada na figura 3

Tabela 7: Valores de tempo médio de escoamento, viscosidade específica e viscosidade reduzida das soluções com diferentes concentrações de quitosana.

Concentração (g mL ⁻¹)	Tempo médio de escoamento (s)	Viscosidade específica (mL g ⁻¹)	Viscosidade reduzida (mL g ⁻¹)
Solução padrão	508,977	-----	-----
1,5x10 ⁻⁴	633,162	0,243989414	1626,596063
1,8x10 ⁻⁴	659,593	0,295919069	1643,994828
2,0x10 ⁻⁴	680,656	0,337302078	1686,51039
2,5x10 ⁻⁴	730,045	0,434337897	1737,351588
3,0x10 ⁻⁴	785,399	0,543093302	1810,311007
3,5x10 ⁻⁴	838,265	0,646960471	1848,458489
4,0x10 ⁻⁴	925,443	0,818241295	2045,603238

Com a extrapolação da curva de viscosidade reduzida, determinou-se o valor da viscosidade intrínseca como sendo de 1446,22 mL g⁻¹.

Figura 31: Curva de viscosidade reduzida em função das concentrações das soluções da quitosana.

De acordo com RINAUDO, 2006, os valores de K e α para um grau de acetilação da ordem de 9% é de 0,074 mL g⁻¹ e 0,80, respectivamente. Utilizando a equação 8 de Mark-

Houwink-Sakurada foi possível determinar a massa molar média da quitosana, resultando em $2,31 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$.

4.5.3. Espectroscopia de ultravioleta

Para as proantocianidinas, presentes no extrato, o espectro de absorvância apresenta dois picos característicos. O primeiro na faixa de 200 a 220 nm, referentes aos grupos fenólicos existentes e o segundo em torno de 278 nm, referentes às procianidinas poliméricas que compõem as proantocianidinas (HÜMMER; SCHREIER, 2008). Neste trabalho o pico máximo de absorvância observado do extrato de semente de uva foi no comprimento de onda de 278,6 nm, estando de acordo com o que é descrito na literatura. A fim de verificar alterações nos extratos que foram purificados e neutralizados, foi realizado um ensaio para o extrato comercial, extrato purificado e extrato neutralizado (Figura 32). Os espectros mostraram que não houve mudança no pico de absorvância, indicando que os processos de purificação e neutralização não interferiram nas características do extrato.

Figura 32: Gráfico do espectro de absorvância para (a) extrato comercial, (b) extrato purificado e (c) extrato neutralizado.

4.5.4. Análise térmica – Calorimetria exploratória diferencial.

As medidas de DSC realizadas com colágeno foram baseadas na transição endotérmica característica da mudança estrutural da hélice tripla do colágeno, relativa à transição de colágeno para gelatina. Esta transição surge a partir de uma descontinuidade da linha de base, proporcional a diferença de transferência de calor antes e após a desnaturação, podendo assim determinar a temperatura de desnaturação (T_d) (NICULA, 2002).

As curvas DSC (Figura 33) permitiram a determinação da temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno presente nas esponjas. Observou-se um aumento expressivo na temperatura de desnaturação das esponjas quitosana/colágeno (1:2) com a presença do extrato e quanto maior a concentração deste maior a temperatura de desnaturação, indicando que o extrato promove reticulação no colágeno, como já observado por (HAN et al., 2003).

Figura 33: Curvas de DSC para as esponjas: (a) Q1C2; (b) Q1C2E05; (c) Q1C2E1; (d) Q1C2E2

Para as esponjas contendo glicerol (Figura 34) observou-se também um aumento na temperatura de desnaturação em comparação a esponja sem extrato, sendo de cerca de 25°C para a concentração de 0,5% de extrato e de 32°C para 1% e 2% de extrato.

Figura 34: Curvas de DSC para as esponjas com glicerol: (a) Q1C2G; (b) Q1C2GE05; (c) Q1C2GE1; (d) Q1C2GE2.

Nas esponjas com proporção de quitosana/colágeno (1:1) com extrato (Figura 35), a temperatura de desnaturação do colágeno ocorreu com valores bastante próximos aos vistos nas esponjas de proporção (1:2). Mas o ponto de inflexão das curvas são menos intensos se comparadas as anteriores Figura 33 e 34, isso se deve a menor concentração de colágeno existente nestas esponjas.

Figura 35: Curvas de DSC para as esponjas: (a) Q1C1; (b) Q1C1E05; (c) Q1C1E1; (d) Q1C1E2

Os pontos de inflexão das esponjas (1:1) contendo glicerol, se mostraram pouco definidos nas curvas de DSC, o que impossibilitou precisar o ponto exato de desnaturação do

colágeno, podendo ser explicado pela interferência causada pelo glicerol. A tabela 8 mostra os valores de Td obtidos para as esponjas.

Tabela 8: Temperatura de desnaturação (Td) das esponjas, obtidas por DSC

Esponja	Td (°C)
Q1C1	46,8
Q1C1E05	70,7
Q1C1E1	74,0
Q1C1E2	80,3
Q1C2	44,7
Q1C2E05	68,5
Q1C2E1	74,0
Q1C2E2	77,4
Q1C2G	46,9
Q1C2GE05	72,3
Q1C2GE1	79,2
Q1C2GE2	79,3

Nas esponjas de proporção (1:2) com extrato, a presença do glicerol induz um aumento na Td, provavelmente pelo efeito plastificante que aumenta o volume entre as cadeias poliméricas (SOBRAL *et al.* 2001; BANGYEKAN *et al.*, 2006), facilitando o acesso da proantocianidina, um dos principais componentes do extrato de semente de uva e responsável pelo efeito reticulante (HAN *et al.*, 2003).

Devido à ampla utilização do colágeno, cada vez mais se faz necessário o uso de agentes reticulantes para melhorar ou alterar as características do mecanismo e de degradabilidade do colágeno de acordo com sua demanda. Vários agentes reticulantes têm sido utilizados, como por exemplo, o formaldeído, glutaraldeído e compostos epóxi, mas todos têm a desvantagem de apresentarem toxicidade mesmo em baixas concentrações. Desta maneira, a proantocianidina derivada do extrato de semente de uva pode ser uma escolha interessante como agente reticulante, já que apresenta baixa toxicidade e possui biocompatibilidade (HAN *et al.*, 2003).

4.6. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR)

O infravermelho compreende a região do espectro eletromagnético entre o visível e a micro onda. A região mais utilizada está entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} . A absorção na região do infravermelho depende do aumento da energia de vibração ou de rotação associado com uma ligação covalente, desde que esse aumento resulte numa variação do momento dipolar da molécula. Isso significa que quase todas as moléculas contendo ligações covalentes mostrarão algum grau de absorção no infravermelho.

De modo geral, os espectros obtidos são traduzidos para um gráfico em função da porcentagem de transmitância, fazendo com que as bandas de absorção apareçam na curva como picos descendentes.

O espectro do colágeno aniônico (Figura 36) apresenta as seguintes bandas principais: em 1653 cm^{-1} , amida I, proveniente ao estiramento da carbonila, em 1560 cm^{-1} , amida II, proveniente das vibrações da ligação N-H e ao estiramento C-N, em 1450 , esterioquímica dos anéis pirrolidínicos, em 1240 cm^{-1} às vibrações da amida III, devido ao estiramento C-N e a deformação N-H.

Figura 36: Espectro de FTIR do colágeno aniônico.

O espectro da quitosana (Figura 37) apresenta uma banda intensa em 3370 cm^{-1} , devido ao estiramento das hidroxilas, onde ocorre na mesma região o estiramento de grupos N-H. Em 1635 cm^{-1} , correspondente a amida I, proveniente do estiramento de carboxilas. Em

1560 cm^{-1} , a amida II, proveniente das vibrações da ligação N-H e ao estiramento C-N e em 1080 cm^{-1} , características de estiramento C-OH.

Figura 37: Espectro de FTIR da quitosana.

De acordo com EGAWA, 2007, o espectro de absorção na região do infravermelho do glicerol mostra uma banda intensa em 3650–3584 cm^{-1} , correspondente à vibração de estiramento do grupo O-H de álcool, uma banda entre 1260–1000 cm^{-1} devido ao estiramento da ligação C-O. Em álcoois primários e secundários as vibrações da ligação O-H interferem na ligação C-H produzindo duas bandas de absorção, uma próxima de 1420 cm^{-1} e outra em 1330 cm^{-1} .

Devido ao processo de purificação e neutralização do extrato de semente de uva, fez-se uso do FTIR para verificar possíveis alterações causadas pelos processos. Foram feitos espectros utilizando o extrato comercial, extrato purificado e extrato neutralizado (Figura 38), no qual foi possível observar uma banda intensa em 1612 cm^{-1} e outra de menor intensidade em 1521 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento do anel aromático C=C-C, em 1445 cm^{-1} , devido ao estiramento dos grupos C=C do anel aromático, em 1285 cm^{-1} , corresponde ao estiramento C-O decorrente da estrutura do anel pirano, presentes nos taninos e em 1090 cm^{-1} , deformação dos grupos C-H do anel aromático e grupos O-H.

Os espectros mostram que os processos de purificação e neutralização do extrato não promoveram alterações no extrato, pois não foram observados aparecimentos ou deslocamento de picos na região do espectro.

Figura 38: Espectros do extrato comercial (a), extrato purificado (b) e extrato neutralizado (c).

Também foram obtidos espectros de todas as esponjas como mostram as figuras 39 a 42. Os espectros na região do infravermelho para as esponjas mostram que a adição do extrato de semente de uva promoveu um deslocamento das bandas de amida I (1650 cm^{-1}) e amida II (1555 cm^{-1}) aumentando o deslocamento de acordo com o aumento da concentração de extrato, como mostra a tabela 9. Este deslocamento das amidas I e II está relacionado à interferência causada pelo anel aromático presentes no extrato (1612 e 1521 cm^{-1}) e com o aumento da concentração de extrato, conduz ainda mais este deslocamento para próximo dos valores referentes ao anel aromático. Outro aspecto observado foi o encurtamento da banda entre $1235 - 1240\text{ cm}^{-1}$ relativa a amida III do colágeno e o surgimento da banda entre $1280 - 1285\text{ cm}^{-1}$ em relação ao aumento da concentração de extrato, sugerindo que a banda referente ao anel pirano do extrato (1285 cm^{-1}) promove uma sobreposição de acordo com o aumento da concentração de extrato sobre a banda de amida III do colágeno.

Com os espectros na região do infravermelho obtidos das esponjas não foram identificadas quaisquer alterações nas bandas dos espectros das esponjas contendo glicerol em comparação com os espectros das esponjas sem glicerol.

Figura 39: Espectro de FTIR das esponjas Q1C1 (a), Q1C1E05 (b), Q1C1E1 (c), Q1C1E2 (d).

Figura 40: Espectro de FTIR das esponjas Q1C1G (a), Q1C1GE05 (b), Q1C1GE1 (c), Q1C1GE2 (d).

Figura 41: Espectro de FTIR das esponjas Q1C2 (a), Q1C2E05 (b), Q1C2E1 (c), Q1C2E2 (d).

Figura 42: Espectro de FTIR das esponjas Q1C2G (a), Q1C2GE05 (b), Q1C2GE1 (c), Q1C2GE2 (d).

A tabela 9 mostra os valores do número de onda para as principais bandas observadas nos espectros, com suas devidas atribuições.

Tabela 9: Valores do número de onda.

	Número de onda (cm ⁻¹)									
	Amida I	Amida II	Anel Pirrolidínico	Amida III	Estiramento de grupos O-H	Estiramento de grupos C-H	Estiram. de grupos C-O	Anel aromático C=C-C	Anel aromático C=C	Anel pirano C-O
Colágeno	1653	1560	1450	1240	3320	—	—	—	—	—
Quitossana	1635	1560	—	—	3370	1080	—	—	—	—
Extrato	—	—	—	—	3390	1090	—	1612,1521	1445	1285
Glicerol	—	—	—	—	3650, 3584	1420, 1330	1260, 1000	—	—	—
Q1C1	1650	1555	1450	1240	3390	1080	—	—	—	—
Q1C1E05	1650	1550	1450	1240	3390	1080	—	—	—	1280
Q1C1E1	1636	1525	1445	—	3390	1080	—	—	—	1280
Q1C1E2	1622	1525	1445	—	3390	1080	—	—	—	1280
Q1C1G	1655	1555	1455	1235	3390	1078	—	—	—	—
Q1C1GE05	1650	1535	1445	1235	3390	1078	—	—	—	1285
Q1C1GE1	1631	1535	1445	—	3390	1078	—	—	—	1285
Q1C1GE2	1620	1530	1445	—	3390	1078	—	—	—	1285
Q1C2	1655	1547	1455	1235	3390	1080	—	—	—	—
Q1C2E05	1650	1545	1450	1235	3390	1080	—	—	—	1285
Q1C2E1	1640	1530	1450	—	3390	1078	—	—	—	1285
Q1C2E2	1620	1527	1450	—	3390	1078	—	—	—	1285
Q1C2G	1655	1552	1453	1235	3390	—	—	—	—	—
Q1C2GE05	1655	1552	1453	1240	3390	—	—	—	—	1285
Q1C2GE1	1642	1534	1453	—	3390	—	—	—	—	1285
Q1C2GE2	1620	1528	1450	—	3390	—	—	—	—	1285

4.7. Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das microestruturas, tais como tamanho dos poros, distribuição, porosidade e interconectividade são fatores preponderantes na interação das esponjas com meio fisiológico, promovendo absorção de líquidos fisiológicos, crescimento celular entre os poros e determinando o mecanismo de liberação de fármacos (ARPORNMAEKLONG *et al.*, 2008; BOATENG; MATTHEWS, 2008).

Para avaliação da morfologia das esponjas foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 43 corresponde à fotomicrografia da esponja Q1C1G, na qual foi possível identificar a formação de poros com interconectividade, correspondente a morfologia das esponjas. Na figura 44, as imagens das esponjas Q1C1GE2 (A) e Q1C1GE1 (B), mostraram o extrato de semente de uva em meio à estrutura da esponja, sendo que nas demais fotomicrografias não foi possível identificar o extrato.

Comparando as imagens das esponjas na figura 45, Q1C1E1 (A) e Q1C2E1 (B), notou-se que a maior quantidade de colágeno conferiu as esponjas um aumento da porosidade com aumento no diâmetro destes poros. Outro efeito observado foi referente à mudança estrutural das esponjas em diferentes concentrações de extrato, como visto na figura 46, Q1C2 (A) e Q1C2E2 (B), na qual a maior concentração de extrato promoveu maior formação de poros. O glicerol igualmente ao extrato também promoveu um aumento no número de poros (Figura 47).

Figura 43: Fotomicrografia da esponja Q1C1G em aumento de x200 (A) e x1000 (B).

Figura 44: Fotomicrografias das esponjas Q1C1GE2 (A) e Q1C1GE1 (B) em aumento de x5000.

Figura 45: Fotomicrografias das esponjas Q1C1E1 (A) e Q1C2E1 (B) em aumento de x500.

Figura 46: Fotomicrografias das esponjas Q1C2 (A) e Q1C2E2 (B) em aumento de x500.

Figura 47: Fotomicrografias das esponjas Q1C2E05 (A) e Q1C2GE05 (B) em aumento de x500.

A tabela 10 mostra o tamanho dos poros das esponjas, estabelecidos pela média de 25 determinações com aumento de 500x.

Tabela 10: Valores do tamanho médio dos poros das esponjas

Esponja	Tamanho médio dos poros
Q1C1E1	$23,99 \pm 3,17$
Q1C2E1	$39,12 \pm 13,22$
Q1C2	$39,82 \pm 5,48$
Q1C2E2	$65,70 \pm 12,35$
Q1C2E05	$59,51 \pm 11,07$
Q1C2GE05	$68,88 \pm 6,16$

4.8. Absorção de tampão fosfato salino (PBS)

Para o ensaio de absorção foi utilizado tampão fosfato salino, uma vez que os ensaios de liberação também foram realizados com esta solução. As esponjas foram submetidas a pesagens em intervalos de tempo ao longo de 180 minutos. A quantidade de tampão absorvido pela esponja foi calculada pela média dos resultados encontrados usando a equação 9. Com a média desses valores em função do tempo determinado para cada pesagem, geraram perfis de absorção das esponjas como mostram as figuras 48 a 51.

De forma geral, as esponjas após 30 minutos em contato com o PBS, alcançam sua carga de absorção máxima. Para as esponjas contendo glicerol esta ação ocorre ainda mais rápido, entre os primeiros 15 minutos, mas sua taxa de absorção é menor que as esponjas sem glicerol. Ou seja, elas absorvem mais rápido e em menor quantidade em relação ao seu peso. Isso é explicado pela alta hidrofiliabilidade do glicerol, absorvendo a água com maior rapidez e por ocupar os espaços dentro da esponja, existe uma menor absorção de água. Outro fator importante apresentado, diz respeito ao aumento da hidrofiliabilidade das esponjas, provenientes da adição do extrato de semente de uva, mostrando que o extrato aumenta consideravelmente a absorção de água pelas esponjas. Esta relação é inversamente proporcional à concentração de extrato presente nas esponjas, onde menor a concentração de extrato, maior é sua absorção, como observado por HE *et al.*, 2011.

Figura 48: Perfil de absorção de PBS das esponjas Q1C1 (a), Q1C1E2 (b), Q1C1E1 (c), Q1C1E05 (d).

Figura 49: Perfil de absorção de PBS das esponjas Q1C1G (a), Q1C1GE2 (b), Q1C1GE1 (c), Q1C1GE05 (d).

Figura 50: Perfil de absorção de PBS das esponjas Q1C2 (a), Q1C2E2 (b), Q1C2E1 (c), Q1C2E05 (d).

Figura 51: Perfil de absorção de PBS das esponjas Q1C2G (a), Q1C2GE2 (b), Q1C2GE1 (c), Q1C2GE05 (d).

4.9. Ensaio de liberação *in vitro* do extrato de semente de uva

Para a determinação da quantidade de extrato liberado na solução foi elaborada uma curva de calibração do extrato em solução de tampão PBS (Figura 52).

Figura 52: Curva de calibração do extrato de semente de uva em tampão PBS.

Com os valores da equação da reta estabelecidos e com os valores de absorbância nos tempos estabelecidos, foi possível calcular a concentração e a porcentagem do extrato de semente de uva liberado em meio PBS.

Os ensaios *in vitro* de liberação do extrato de semente de uva das esponjas são mostrados nas Figuras 53 a 56. De forma geral, inicialmente a liberação foi bastante rápida atingindo quase que sua totalidade liberada em cada amostra nas primeiras 5 h. Em todas as amostras a liberação atingiu a concentração máxima em torno de 24 h (Tabela 11), permanecendo constante após esse período.

Figura 53: Perfil de liberação extrato de semente de uva das esponjas : Q1C1E05 (a), Q1C1E1 (b), Q1C1E2 (c)

Figura 54: Perfil de liberação do extrato de semente de uva das esponjas : Q1C1GE05 (a), Q1C1GE1 (b), Q1C1GE2 (c).

Figura 55: Perfil de liberação extrato de semente de uva das esponjas : Q1C2E05 (a), Q1C2E1 (b), Q1C2E2 (c).

Figura 56: Perfil de liberação do extrato de semente de uva das esponjas : Q1C2GE05 (a), Q1C2GE1 (b), Q1C2GE2 (c).

A liberação de extrato para a amostra Q1C2E2 é de aproximadamente 44% enquanto que para Q1C2E0,5 tem-se por volta de 26%, em 24 h, indicando que neste sistema a liberação é dependente da concentração. As esponjas contendo glicerol apresentaram uma porcentagem de liberação menor que as esponjas sem glicerol. Essa diminuição pode ser associada a maior interação que ocorre entre o glicerol e a estrutura da esponja, na qual o glicerol compete com a água, diminuindo a hidratação da esponja e consequentemente o fenômeno de difusão e intumescimento, responsáveis pela liberação do extrato.

Tabela 11: Valores de máxima liberação do extrato de semente de uva liberado das esponjas.

Esponja	Quantidade de extrato liberado (%)
Q1C1E05	28,0
Q1C1E1	38,5
Q1C1E2	44,0
Q1C1GE05	27,5
Q1C1GE1	32,5
Q1C1GE2	43,5
Q1C2E05	28,5
Q1C2E1	40,5
Q1C2E2	44,5
Q1C2GE05	25,5
Q1C2GE1	34,0
Q1C2GE2	43,0

Para o entendimento do tipo de mecanismo de liberação predominante nas esponjas, devem-se analisar os resultados de acordo com os valores de n , obtidos através da equação 3, proposta por KORSMEYER, PEPPAS, 1981.

Com os valores conhecidos do logaritmo de M_0/M_t e logaritmo em função do tempo, foi possível obter os valores de n a partir da elaboração dos gráficos mostrados pelas figuras 57 a 60.

Figura 57: Gráfico com o perfil para obtenção dos valores de n para as esponjas Q1C1E05 (a), Q1C1E1 (b) e Q1C1E2 (c)

Figura 58: Gráfico com o perfil para obtenção dos valores de n para as esponjas Q1C1GE05 (a), Q1C1GE1 (b) e Q1C1GE2 (c)

Figura 59: Gráfico com o perfil para obtenção dos valores de n para as esponjas Q1C2E05 (a), Q1C2E1 (b) e Q1C2E2 (c)

Figura 60: Gráfico com o perfil para obtenção dos valores de n para as esponjas Q1C2E05 (a), Q1C2E1 (b) e Q1C2E2 (c)

Sendo o valor de n o expoente de liberação que, de acordo com o valor numérico que assume, caracteriza o mecanismo de liberação do fármaco. Quando o valor de n é próximo de 0,5 ocorre o transporte de difusão ou Fickiano, se n é próximo de 0,9 ocorre o transporte de Caso II ou não-Fickiano que se dá pelo intumescimento e relaxação do sistema e quando o valor de n está entre 0,5 e 0,89 ocorre o transporte anômalo que são os fenômenos simultâneos do transporte Fickiano e Caso II (RUVALCABA *et al.*, 2009).

Os valores de n , bem como o índice de correlação linear das esponjas estão descritos na tabela 12.

Tabela 12: Valores de n e índice de correlação linear (r)

Esponja	Coefficiente angular (n)	Coefficiente de correlação (r)
Q1C1E05	0,620	0,991
Q1C1E1	0,328	0,988
Q1C1E2	0,403	0,973
Q1C1GE05	0,435	0,997
Q1C1GE1	0,464	0,992
Q1C1GE2	0,301	0,987
Q1C2E05	0,917	0,985
Q1C2E1	0,568	0,960
Q1C2E2	0,212	0,988
Q1C2GE05	0,629	0,995
Q1C2GE1	0,403	0,997
Q1C2GE2	0,151	0,994

Os valores de n mostram que a liberação do extrato ocorre, para a maioria das esponjas, por meio de difusão, no qual os valores estão próximos 0,5 caracterizando um mecanismo Fickiano. Para as esponjas Q1C1E05 e Q1C2GE05 ocorre por transporte anômalo ($0,5 < n < 0,89$).

A presença de glicerol leva a uma diminuição no valor de n para a maioria das esponjas, tendo-se para a esponja Q1C2E0,5 um efeito ainda mais pronunciado fazendo com que ocorra uma modificação na característica de liberação passando de um transporte não Fickiano, predominantemente em função do intumescimento da esponja, para o transporte anômalo observado na esponja Q1C2GE2, onde ocorre a difusão simultaneamente ao intumescimento.

Para as esponjas contendo extrato a 2% (QCE2 e QCGE2) os valores de n obtidos são relativamente baixos em comparação aos outros, não sendo possível até o momento caracterizar o tipo de transporte envolvido na liberação do extrato para essas esponjas.

5. Conclusões

O extrato de semente de uva promove reticulação no colágeno aniônico presente nas esponjas. Essa reticulação é dependente da concentração do extrato e da presença de glicerol. Para as esponjas de proporção (1:1) com glicerol, não foi possível observar o ponto de Td.

O extrato de semente de uva promove o deslocamento das bandas de amida I e amida II, no qual o deslocamento se faz mais pronunciado com o aumento da concentração do extrato, sugerindo que deslocamento seja resultado da interferência exercida pelo valor da banda do anel aromático do extrato e não por uma eventual interação entre extrato e esponja.

Maiores concentrações de extrato e colágeno nas esponjas aumentam sua porosidade, assim como o glicerol que também promoveu um aumento na porosidade das esponjas.

O extrato de semente de uva conferem as esponjas um aumento considerável da absorção de água, mas esta relação é inversamente proporcional a concentração de extrato. Esponjas com glicerol possuem absorção mais rápida, mas em menor porcentagem se comparadas as esponjas sem glicerol.

A liberação do extrato de semente de uva ocorre principalmente nas cinco primeiras horas e permanece constante após 24 h, o que torna essa dinâmica interessante no uso de curativos onde se queira uma ação imediata.

A quantidade de extrato liberado é dependente de sua concentração e da presença de glicerol.

A liberação do extrato ocorre de forma geral por difusão ou Fickiano e a presença de glicerol diminui o valor do coeficiente angular (n) alterando o mecanismo de liberação.

Com a análise dos resultados obtidos foi possível concluir que as esponjas Q1C1E1 e Q1C2E1 se mostraram com as melhores condições na busca de um curativo com liberação controlada de extrato de semente de uva, apresentando boa liberação do extrato, estabilidade térmica em temperatura corpórea, porosidade adequada na sua morfologia e absorção de água.

6. Referências Bibliográficas¹

ALBU, M.G.; TITORENCU, I.; GHICA, M.V. **Collagen-Based Drug Delivery Systems for Tissue Engineering**. Biomaterials application of nanomedicine, p. 333-358, 2011.

ALEMDAROGLU, C.; DEGIM, Z.; CELEBI, N.; ZOR, F.; OZTURG, S.; ERDOGAN, D. **An investigation on burn wound healing in rats with chitosan gel formulation containing epidermal growth factor**. Burns, v. 32, p. 319-327, 2006.

ARPORNMAEKLONG, P.; PRIPATNAMONT, P.; SUWATWIROTE, N. **Properties of chitosan-collagen sponges and osteogenic differentiation of rat-bone-marrow stromal cells**. International journal of oral and maxillofacial surgery, 37(4), pag 357-66, 2008.

ARRUDA, P. V.; RODRIGUES, R.C.L.B. e FELIPE, M.G.A. **Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metabólica**, Revista Analítica, v. 26, p. 56-62, 2006.

AZEVEDO, V.; CHAVES, S.; BEZERRA, D.; FOOK, L.; COSTA, A. **Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais**. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 2(3), 27–34, 2007.

BANGYEKAN, C.; AHT ONG, D.; SRIKULKIT, K. **Preparation and properties evaluation of chitosan-coated cassava starch films**. Carbohydrate Polymers, p. 61-71, 2006.

BAJPAI, A.K.; SHUKLA, S.K.; BHANU, S.; KANKANE, S. **Responsive polymers in controlled drug delivery**. Process in Polymer Science. v. 33(11) p. 1088-1118, 2008.

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

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. **Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 57, p. 19-34, 2004.

BET, MARCOS ROBERTO. **Colágeno aniônico: Propriedades físico químicas, estruturais e comportamento biológico**. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BOATENG, J.; MATTHEWS, K. **Wound healing dressings and drug delivery systems: a review**. Journal of pharmaceutical science. v. 97(8), p. 2892-2923, 2008.

BROWN, M.A.; DAYA, M.R.; WORLEY, J.A. **Experience with chitosan dressings in a civilian EMS system**. *The Journal of Emergency Medicine*, v. 37(1), p. 1-7, 2009.

¹De acordo com a Associação de Brasileira de Normas Técnicas NBR6023.

CAMPANA-FILHO, S. P.; de BRITO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R. L.; **Quim. Nova**, 30, 644, 2007.

CAMPBELL, N.A., Biology. 1995. Editions du renouveau pedagogique Inc. St. Laurent. Acesso em 25 Junho 2012.

CARDOSO, Márcia Barreto. **Contribuição ao estudo da reação de desacetilação de quitina: estudos da desacetilação assistida por ultra-som de alta potência**. Tese (Doutorado em Físico-Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

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

CHENGCAN, Y.; PING Y.; HAO, W.; ZHENGANG, Z. **Acceleration of wound healing in traumatic ulcers by absorbable collagen sponge containing recombinant basic fibroblast growth factor**. Biomed. Mater., p. 33-37, 2006.

CHO, M.L.; HEO, Y.J.; PARK, M.K.; OH, H.J.; PARK, J.S.; WOO, Y.J.; JU, J.H. **Grape seed proanthocyanidin extract (GSPE) attenuates collagen-induced arthritis**. Immunology letters, v. 124(2), p. 102-110, 2009.

COSTA, P.; SOUSA LOBO, J.M. **Modeling and comparison of dissolution profiles**. European Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 13, p. 123-133, 2001.

COSTACHE, M.C.; QU, H.; DUCHEYNE, P.; DEVORE, D.I. **Polymer-xerogel composites for controlled release wound dressings**. Biomaterials, v. 31(24), p. 6336-6343, 2010.

DENKBAS, E.B. **Perspectives on: Chitosan Drug Delivery Systems Based on their Geometries**. Journal of Bioactive and Compatible Polymers, v. 21(4), p. 351-368, 2006.

DI GIOIA, L.; GUILBERT, S. **Corn protein based thermoplastic resins: Effect of some polar and amphiphilic plasticizers**. J. Agricultural and Food Chemistry, v. 47, p. 1254-1261, 1999.

DIXON, R.; XIE, D.; SHARMA, S. **Proanthocyanidins – A final frontier in flavonoid research?** New Phytologist – Review, v.165, p. 9-28, 2005.

EGAWA, Edgar Yuji. **Caracterização térmica e reológica de blendas de glicerol: Colágeno tipo I de diferentes tecidos**. Dissertação (Mestrado em Química analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

ESTAÇÃO DIGITAL MÉDICA. **Pinta na pele: sistema para o aprendizado do reconhecimento precoce de cânceres da pele**. Disponível em: <http://www.estacaodigitalmedica.com.br/pintanapele/histologia.htm>. Acesso em 21 Junho 2012.

FALANGA, V.; FARIA, K.; ROBERT, L.; JOSEPH, V. **Bioengineered skin constructs. Principles of Tissue Engineering**. Academic Press, 3 ed., p. 1167–1185, 2007.

FARLEY, P.; MOMAHAN, F.J.; GERMAN. **Interfacial interactions in edible emulsion films from whey protein isolate**. Food Hydrocolloids, v. 11(3), p. 245-252, 1996.

FONDER, M.A.; LAZARUS, G.S.; COWAN, D. A.; ARONSON C.B., KOHLI, A. R.; MAMELAK, A.J. **Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings**. Journal of the American Academy of Dermatology, v. 58(2), 2008.

GARROS I.C.; CAMPOS A.C.L.; TAMBARA E.M.; TENORIO S.B.; TORRES O.J.M.; AGULHAM MA, et al. **Extrato de passiflora edulis na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico**. Acta Cir Bras., 21(supl. 3): 55, 2006.

GOMES, F.S.L.; CARVALHO, D.V. **Tratamento de ferida: revisão da literatura**. Rev. Min. Enferm., 6(1/2), p. 67-72, 2002.

GOOSSENS, A.; CLEENEWERCK, M.B. **New wound dressings: Classification, tolerance**. European journal of dermatology. v. 20, p. 24-26, 2010.

GORHAM, S.D.; **Collagen**, in: D. Byrom, Biomaterials, Stockton Press, New York, p. 55–122. 1991.

GRUND, S.; BAUER, M.; FISCHER, D. **Polymers in drug delivery – State of the art and future trends**. Advanced Engineering materials, v. 3, p. 61-87, 2011.

HAN, B.; JAUREQUI, J.; TANG, B. W.; NIMNI M. E. Proanthocyanidin: **A natural crosslinking reagent for stabilizing collagen matrices**. J. Biomedical Materials, v. 65A, p. 118-124, 2003.

HARRIS, M.I.N.C. **Pele: Estrutura, propriedades e envelhecimento**. Editora Senac São Paulo. 3 edição – São Paulo. 2003.

HE, L.; MU, C.; SHI, J.; ZHANG, Q.; SHI, B.; LIN, W. **Modification of collagen with a natural cross-linker, procyanidin**. International journal of biological macromolecules, v. 48(2), p. 354-359, 2011.

HIRANO, S.; **Biotechnology**. Annual Research, v.2, p. 237-258, 1996.

HORN, M.M.; MARTINS, V.C.A.; PLEPIS, A.M.G. **Determinação da energia de ativação em hidrogeis poliméricos a partir de dados termogravimétricos**. Rev. Polímeros, v. 20(3), p. 201-204, 2010.

HÜMMER, W.; SCHREIER, P. **Analysis of proanthocyanidins**. Molecular Nutrition & Food Research, v.52(12), p. 1381-98, 2008.

ISO 10993-1 Biological evaluation of medical devices. Part1: **Evaluation and testing**. 1997.

- KHAN, T. A.; PEH, K. K.; CHANG, H. S. **Mechanical, bioadhesive strength and biological evaluations of chitosan films for wound dressing.** J. Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, v.3(3), p. 303-311, 2000.
- KHANNA, S.; ROY, S.; BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; SEN, C. K. **Up regulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract.** Free Radic. Biol. Med., v. 31, p. 38-42, 2001.
- KIM, S.; KIM, J.H.; JEON, O.; KWON, I.C.; PARK, K.. **Engineered polymers for advanced drug delivery.** European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics, v. 71(3), p. 420-430, 2009.
- KIM, S.J.; LIM, M.H.; CHUN, I.K.; WON, Y.H. **Effects of flavonoids of Gingko biloba on proliferation of human skin fibroblast.** Skin Pharmacol. 10(4), p. 200-205, 1997.
- KORSMEYER, R.W.; PEPPAS N.A. **Swelling-Controlled Release from Hydrophilic Polymeric Networks, Proceed. Symp. Controlled Rel. Bioact. Mater.,** v. 8, p. 85-89, 1981.
- KUJATH, P.; MICHELSEN A. **Wounds: From physiology to wound dressing.** Deutsches Ärzteblatt International, v. 105(13), p. 239-248, 2008.
- KUMAR, M.N.; MUZZARELLI, R.A.; MUZZARELLI, C.; SASHIWA, H.; DOMB, A.J. **Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives.** Chem. Rev., v. 104, p. 6017-6084, 2004.
- LACERDA, C.; PLEPIS, A. M.; G.; GOISSIS, G. **Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de asparagina e glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais.** Quim. Nova, v. 21, p. 267-71, 1998.
- LAVORGNA, M.; PISCITELLI, F.; MANGIACAPRA, P.; et al. **Study of the combined effect of both clay and glycerol plasticizer on the properties of chitosan films.** Carbohydrate Polymers. v. 82(2), p. 291-298. 2010.
- LEE, C.H.; SINGLA, A.; LEE, Y. **Biomedical applications of collagen.** International J. Pharmac., v. 221(1,2), p. 1-22, 2001.
- LEE, J.W.; PARK, R.J.H. **Bioadhesive-based dosage forms: The next generation.** J Pharm Sci, v. 89, p. 850-866, 2000.
- LYRA, M.A.M.; SOARES-SOBRINHO, J.L.; BRASILEIRO, M.T.; ROCA M.F.; BARRAZA, J.A.; VIANA, O.S.; ROLIM-NETO, P.J. **Sistemas matriciais hidrofílicos e mucoadesivos para liberação controlada de fármacos.** Lat. Am. J. Pharm., v. 26(5), p. 784-793, 2007.
- LOPES, C.; LOBO, J. **Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 41(2), p. 143-154, 2005.
- MACKENZIE, R.C. **Termochim.** Acta. 28 1 , 1979.

- MANDELBAUM, S.H.; SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. **Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte I.** An Bras. Dermatol., v. 78(4), p.393-410, 2003.
- MARTIN, P.; LEIBOVICH, S.J. **Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly.** Trends Cell Biol. 15, p. 599-607, 2005.
- MATHUR, N.K.; NARAG, C.K.; **J. Chem. Educ.**, 67, 11, 1990.
- MEDIC ON WEB. **Epiderms struture and functions.** 2011. Disponível em <http://mediconweb.com/skin-health/epidermis-structure-and-functions>. Acesso em 21 Junho 2012.
- MELLO, L.M.R. **Vinicultura brasileira: panorama 2007.**
- METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. **Tissue engineering of replacement skin: The crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration.** Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society, v. 14(4), p. 413-37, 2007.
- MILES, C.A.; GHELASHVILI, M. **Polymer-in-a-box mechanism for the thermal stabilization of collagen molecules in fibers.** Biophysical Journal, v. 6, p. 3243-3252, 1999.
- MODERN MEDICAL GUIDE. **Ulcer of the skin – Skin ulcer.** Disponível em: <<http://www.modernmedicalguide.com/ulcer-of-the-skin-skin-ulcer>> Acesso em 18 Junho 2011.
- MOORE, K.; McCALLION, R.; SEARLE, R.J.; STACEY, M.C.; HARDING, K.G. **Prediction and monitoring the therapeutic response of chronic dermal wounds.** International Wound Journal, v. 3, p. 89–96, 2006.
- MUZZARELLI, R.A.A. **Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone.** Carbohydrate Polymers, v. 76(2), p. 167-182, 2009.
- NAIR, R.; SEVUKARAJAN, M.; BADIVADDIN, T.M.; KUMAR, C.K.A. **Collagen based drug delivery systems: A review.** v. 1(7), p. 288-304. 2010.
- NICULA, R. **Introduction to differential scanning calorimetry.** Practical course, University Rostock, 2002.
- NIEKRASZEWICZ, A.; **Chitosan medical dressings.** Fibres & Textiles in Easter Europe, v. 13(6), p. 16-18, 2005.
- OKUYAMA, K. **Revisiting the molecular structure of collagen.** Connective Tissue Research. v. 49(5), p. 299-310, 2008.
- PARENTEAU-BAREIL, R.; GAUVIN, R.; BERTHOD, F. **Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications.** Materials, v. 3(3), p. 1863-1887, 2010.
- PAUL, W.; SHARMA, C. P.; **Chitosan and alginate wound dressings: a short review.** Trends in Biomaterials & Artificial Organs, v. 18, p. 18-23, 2004.

- PERCIVAL, J.N. **Classification of wounds and their management**. Surgery v. 20, p. 114–117, 2002.
- PEREIRA, C.O.; LIMA, E.O.; OLIVEIRA, R.A.G.; TOLEDO, M.S.; AZEVEDO, A.K.A.; GUERRA, M.F.; PEREIRA, R.C. **Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa - Paraíba, Brasil**. Rev. Bras. Plant Med., v. 7(3), p. 9-17, 2005.
- PILONIDAL SUPPORT ALLIANCE. **Wound healing: In depth**. 2010. Disponível em: http://www.pilonidal.org/aftercare/wound_healing_indepth_php Acesso em 18 Junho 2011.
- PRAUSNITZ, M.R.; LANGER, R. **Transdermal drug delivery**. Nature biotechnology, v. 26(11), p. 1261-1268, 2008.
- RATNER, B.D.; BRYANT, S.J. **Biomaterials: where we have been and where we are going**. Annual review of Biomedical Engineering, v. 6(1), p. 41-75, 2004.
- REID, G.G.; GORHAM, S.D.; LACKIE, J. M. **The attachment, spreading and growth of baby hamster kidney cells on collagen, chemically modified collagen-composite substrat**. J. Mat. Sci. Mat. Med., v. 4, p. 201-209, 1993.
- RESEARCH AND COLLECTIONS. **Some cephalopods: Inking about squid pens**. 2012. Disponível: <<http://www.naturalscienceresearch.wordpress.com/2012/06/11/some-cephalopods-inking-about-squid-pens/>>. Acesso em: 01 Julho 2012.
- RINAUDO, M. **Chitin and chitosan: properties and applications**. Progress in Polymer Science, v. 31, p. 603-632, 2006.
- RITGER, P.; PEPPAS, N.A. **A simple equation for description of solute release. II. Fickian and anomalous release from swellable devices**. J. Control. Release, v. 5(1), p. 37-42, 1987.
- RUVALCABA, A.M.; SANCHEZ, J.C.; BECERRA, F.; CRUZ-BARBA, L.E.; GONZALEZ, A. **Swelling characterization and drug delivery kinetics for a polyacrylamide acid/chitosan hidrogels**. Polymer Letters, v. 3, p. 25-32, 2009.
- SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, E.R.; CAMPANA FILHO, S.P.; CAVALHEIRO E.T.G. **Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens**. Polímeros, v. 13(4), p. 242-249, 2003.
- SCHLEMMER, D.; SALES, M.J.A. **Preparação, caracterização e degradação de blendas PS/TPS usando glicerol e óleo de buriti como plastificantes**. Rev. Polímeros. v.20(1), p. 6-13, 2010.
- SCHOOOF, H.; APEL, J.; HESCHEL, I; RAU, G. **Control of pore structure and size in freeze-dried collagen sponges**. Journal of biomedical materials research, v. 58(4), p. 352-7, 2001.

- SHAW, T.J.; MARTIN P. **Wound repair at a glance**. Journal of Cell Science. v. 122(18), p. 3209-3213, 2009.
- SCHECHTMAN, H.; ZAVAGLIA, C. A. C. **O estado da arte dos biomateriais no Brasil**. Anais do CBEB, p. 8-14, 2000.
- SHI, J.; YU J.; POHORLY, J.E.; KAKUDA Y. **Polyphenolics in grape seeds – Biochemistry and functionality**. Journal of Medicinal Food. v. 6(4), p. 291 – 299, 2003.
- SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. **Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of desacetylation in chitin**. Biological Macromolecules, v.18, p.237-242, 1996.
- SHOULDERS M.D.; RAINES, R.T. **Collagen structure and stability**. Annu Rev Biochem. v. 78, p. 929–958, 2009.
- SILVA, P. **Farmacologia** / Penildon Silva. Guanabara Koogan, 7 edição, Rio de Janeiro. 2006.
- SIPOS, P.M.D.; GYÖRY H.; HAGYMÁSI, M.D.; ONDREJKA M.D.; BLÁZOVICS A. **Special wound healing methods used in ancient Egypt and the mythological background**. World journal of surgery, v. 28(2), p. 211-216, 2004.
- SOBRAL, P. J. A.; MENEGALLI, F. C.; HUBINGER, M. D.; ROQUES, M. A. **Mechanical water vapor barrier and thermal properties of gelatin based edible films**. Food HydroColloids, v. 15, p. 423-432, 2001.
- SUN, B.; SPRANGER, I. **Review: Quantitative extraction and analysis of grape and wine proanthocyanidins and stilbenes**. Ciência Téc. Vitiv., v. 2, p. 59-89, 2005.
- TANAKA N.; IMAI K.; OKIMOTO K. UEDA S., TOKUNAGA Y. **Development of novel sustained-release system, disintegration-controlled matrix tablet (DCMT) with solid dispersion granules of nifedipine (II): In vivo evaluation**. Journal Control. Release, v.112, p. 51-56, 2006.
- TARAVEL, M.N.; DOMARD A. **Collagen and its interaction with chitosan II. Influence of the physicochemical characteristics of collagen**. Biomaterials. v. 16(11), p. 565-571, 1995a.
- TARAVEL, M.N.; DOMARD, A. **Collagen and its interactions with chitosan III. Some biological and mechanical properties**. Biomaterials, v. 17 p. 451-455. 1995.
- TAZIMA, M.F.G.S.; VICENTE, Y.A.M.V.A.; MORIYA T., **Biologia da ferida e cicatrização**. Fundamentos em clínica cirúrgica, v. 2, p. 259-64, 2008.
- TERAMACHI, M.; NAKAMURA, T.; YAMAMOTO, Y.; KIYOTANI, T.; TAKIMOTO, Y.; TONHI, E.; PLEPIS, A.M.G. **Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana**. Química nova, v. 25(6), p. 943-948, 2002.

TSAIH, M. I. N. L.; CHEN, R. H. Molecular weight determination of 83% defree of decetylation chitosan with non-gaussian and wide range distribution by high-performance size exclusion chromatography and capillary viscometry. Journal of Applied Polymer Science. V. 7, p. 1905-1913, 1999.

TSURUTA, D.; GREEN, K.J.; GETSIOS, S.; JONES J.C.R. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. Trends Cell Biol, v.12, p. 355–357, 2002.

TUR, K. Biomaterials and tissue engineering for regenerative repair of articular cartilage defects. Turk Journal of Rheumatology. v. 24, p. 206-217, 2009.

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(5), p. 1528-1542, 2009.

VERT, M. Polymeric biomaterials: Strategies of the past vs. strategies of the future. Process in Polymer Science. v. 32(8), p. 755-761, 2007.

WRIGHT N.T.; HUMPHREY, J.D. Denaturation of collagen via healing: An irreversible rate process. Annu Rev. Biomed. Eng., v. 4, p. 109-128, 2002.

XIE, D.Y.; SHARMA, S.B.; PAIVA, N. L.; FERREIRA, D.; DIXON, R.A. Role of anthocyanidin reductase, encoded by BANYULS in plant flavonoid biosynthesis. Science, v. 299, p. 396-399. 2003.

YANNAS I.V., BURKE J.F., Design of an artificial skin. Part I, Basic design principles, J. Biomed. Mater. Res., v. 14, p. 65–81. 1990.

YE, Y.; DAN, W.; ZENG, R.; LIN, H.; DAN, N.; GUAN, L.; MI, Z. Miscibility studies on the blends of collagen/chitosan by dilute solution viscometry. European Polymer Journal. v. 43(5), p. 2066-2071, 2007.

ZHONG, S. P.; ZHANG, Y. Z.; LIM, C. T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction. Nanomedicine and Nanobiotechnology, v. 2, p. 510-525, 2010.