**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS**

EDUARDO PEDRO MILAN

**Quitosana:Colágeno:Mangostão, preparo e
caracterização de *scaffolds* e géis.**

**Chitosan:Collagen:Mangosteen, obtainment and
characterization of scaffolds and gels.**

São Carlos

2017

EDUARDO PEDRO MILAN

**Quitosana:Colágeno:Mangostão, preparo e
caracterização de *scaffolds* e géis.**

**Chitosan:Collagen:Mangosteen, obtainment and
characterization of scaffolds and gels.**

Versão corrigida

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interunidades 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 para
obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de concentração: Bioengenharia

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis

São Carlos

2017

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.

Milan, Eduardo Pedro

M53q Quitosana:Colágeno:Mangostão, preparo e
caracterização de scaffolds e géis / Eduardo
Pedro Milan; orientadora Ana Maria de Guzzi
Plepis. São Carlos, 2017.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-
Graduação Interunidades em 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, 2017.

Quitosana. 2. Colágeno. 3. Extrato de
Mangostão.I. Título.

Nome: Milan, Eduardo Pedro

Título: Quitosana:Colágeno:Mangostão, preparo e caracterização de *scaffolds* e géis

Dissertação 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 para obtenção do título de mestre em Ciências.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dra: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a meus pais, irmãos e sobrinhos, por sempre me apoiarem até em horas de auto dúvida, nas incertezas da vida, pelo grande incentivo, ensinamentos da vida, e por serem as pessoas que são.

AGRADECIMENTOS

“Nós não somos imortais, mas podemos ser eternos”, Therezinha Rios.

Agradeço aqui todos que me importaram, aqueles que eu carrego comigo durante minha trajetória.

Agradeço à Profa. Dra. Ana Maria de Guzzi Plepis, pela orientação, amizade, e conhecimento oferecidos nesses tantos anos e principalmente pela oportunidade cedida e confiança em meu trabalho.

Agradeço a todos do ilustre Lab 8, os que já passaram por lá e os que lá agora residem, Max, Murilo, Lívia, Cris, Lucas F, Lucas Lindo, Cláudio, Mirella, Santiago, Dani, Sérgio, Fabi, Rebecca, Yasmin, Waldemir, Ézer, Glauco, Fernando, Danilo, Carla, Cintia, Cindia e Marília por tanta ajuda e memoráveis risos e descontrações que são tão essenciais quanto ar para vida. Especialmente Virginia, que sempre foi uma pessoa de confiança e convivência dentro deste laboratório, sempre acolhendo tão bem os novos membros, ensinando muito como pesquisador, principalmente como pessoa e jamais deixando de acreditar.

Agradeço aos meus grandes amigos de infância de minha cidade natal, e aos amigos que fiz durante este período na faculdade como Zé, Daw, Biro, Pelos, Julie, Tiago, Ricardo, Ana, Gabi, Munique, Leticia Fellipy Juh, Robs, Anderson e inúmeros mais que sempre me apoiaram, me desculpem se esqueci de alguém. São tantos que não há páginas suficientes.

Agradeço ao IQSC e à Bioengenharia pela infraestrutura e pela formação profissional. Aos excelentes funcionários que aqui trabalham e muito me ajudaram dos mais diversos setores (em especial Márcia, Márcio, Bernadete, Fábio, Rey, Yara, Cidinha e Renatinha que tiveram tanta paciência comigo) e fazem com que o nosso trabalho aconteça.

Aos professores do programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia

À CAPES pela bolsa concedida

À todos que contribuíram neste trabalho.

Obrigado.

RESUMO

MILAN, E. P. **Quitosana:Colágeno:Mangostão, preparo e caracterização de scaffolds e géis**. 2017. 110f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

A quitina é um biopolímero abundante na natureza e seu derivado, a quitosana é tido como excelente biomaterial na engenharia tecidual por sua versatilidade e propriedades, assim como colágeno que por sua presença natural no organismo e seu papel biológico fazem com que seja amplamente utilizado na medicina. As blendas destes biopolímeros possuem excelentes propriedades mecânicas devido às interações eletrostáticas e pontes de hidrogênio, e propriedades biológicas pelos materiais que as compõe, já demonstrando eficácia na regeneração tecidual. O extrato de *Garcinia mangostna L.*, ou extrato de mangostão, é pouco estudado no ocidente, mas no oriente é amplamente utilizado para fins medicinais, com propriedades promissoras na área de engenharia tecidual. A interação deste com as blendas de quitosana/colágeno ainda não foram estudadas. Este trabalho teve como objetivo a obtenção e estudo de *scaffolds* de quitosana/colágeno em diferentes proporções (1:1, 2:1 e 3:1) com extrato de mangostão em variadas concentrações (10, 20 e 30%). A quitosana foi extraída por desacetilação da β -quitina de gládios de lula, o colágeno aniônico foi obtido de tendão bovino por hidrólise alcalina e o extrato de mangostão foi obtido da casca do fruto. A caracterização da quitosana e assim como colágeno, extrato e misturas foram analisados por absorção na região do infravermelho (FT-IR), efetuou-se um ensaio reológico dos géis e os *scaffolds* foram submetidos à calorimetria exploratória diferencial (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), ensaios de intumescimento e liberação do extrato. Ensaio reológicos indicam um comportamento pseudoplástico para todas as amostras e se feito um tratamento matemático, o melhor modelo às quais estas se adaptam seria o modelo de Carreau. Os DSC dos *scaffolds* mostram que a adição de extrato tende a elevar a temperatura de desnaturação (T_d) do colágeno. Espectros FT-IR caracterizaram o extrato e não mostraram resultados conclusivos sobre a incorporação dele aos filmes. Fotomicrografias por MEV mostram alteração no tamanho médio de poros e canais com a adição de extrato. Ensaio de intumescimento dos *scaffolds* mostram uma diminuição de capacidade de absorção com adição de extrato, os ensaios de liberação feitos para os *scaffolds* das misturas mostram uma liberação entre 25-35% do extrato sendo as cinéticas de liberação modeladas pelo modelo de Kosmeyer-Peppas para a maioria das amostras. Obtendo-se assim géis e *scaffolds* que mostram resultados iniciais promissores e com acréscimo de estudos complementares podem vir a ser utilizados no campo da engenharia tecidual.

Palavras chave: Quitosana, Colágeno, Extrato de Mangostão.

ABSTRACT

MILAN, E. P. **Chitosan:Collagen:Mangosteen, obtainment and characterization of scaffolds and gels.** 2017. 110f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação Interunidades Bioengenharia – EESC/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Chitosan is an abundant biopolymer in nature, and it is an excellent biomaterial for tissue engineering due to its versatility and properties. Collagen, by the natural presence in the organism and to the biological role makes it widely used in medicine. These biopolymers blends have excellent mechanical properties due to electrostatic interactions and hydrogen bonds, and biological properties, demonstrating good efficiency in tissue engineering. The *Garcinia mangostana* L. extract, or mangosteen extract, is not very well studied in the western culture, but in the eastern, it is widely used in local medicine, with promising properties in tissue engineering field. The interaction between chitosan/collagen blends and mangosteen extract has not yet been studied. This study aims to obtain scaffolds from chitosan/collagen blends in different ratios, such as 1:1, 2:1 and 3:1 with different extract concentrations (10, 20 and 30%). Chitosan was obtained by deproteinization and deacetylation of β -chitin from squid's pens, anionic collagen was obtained from bovine tendon by alkaline hydrolysis, and the mangosteen extract was obtained from the hulls of fruits. Materials characterization was done by FT-IR, DSC, SEM, swelling and extract release in buffer solution. Rheological measurements were made with the gels formed from the mixture of the components. The rheological studies indicates a pseudo plastic behavior to all samples and by a mathematical treatment, the Carreau mathematical model was the best fitting. The DSC analysis for the collagen mixtures indicated a tendency to elevate the denaturation temperature with addition of extract. With the FT-IR results, we could obtain mangosteen extract spectrum but the mixtures spectrum did not show the extract incorporation. The photomicrographies obtained by SEM showed pore and channels alteration with extract addition. Swelling studies showed a decrease in swelling capacity after extract addition, release studies showed a 25-35% extract release by scaffolds and in most cases the kinetic was fitted by Kosmeyer-Peppas. Thus obtaining promising gels and scaffolds in the field of tissue engineering, but needing of further development.

Keywords: Chitosan, Collagen, Mangosteen Extract.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da estrutura da quitina	29
Figura 2 - Representação de α -quitina (A) e β -quitina (B)	30
Figura 3 - Representação do paralelismo das formas α , β e γ da quitina	30
Figura 4 - Representação da anatomia de uma lula	31
Figura 5 - Representação da estrutura de quitosana.....	32
Figura 6 - Esquema da formação da fibra de colágeno	35
Figura 7 - Esquema da hidrólise alcalina da molécula de colágeno	36
Figura 8 - (A) árvore de mangostão (B) fruto Mangostão	39
Figura 9 - Estrutura representativa de estrutura de xantonas.....	40
Figura 10 - Algumas estruturas das principais xantonas encontradas no extrato de mangostão. (A) α -mangostão; (B) γ -mangostão; (C) β -mangostão; (D) Garcinona E.....	40
Figura 11 – Fluxograma do processo de obtenção da quitosana	46
Figura 12 - Curva DSC demonstrando a determinação da temperatura de desnaturação... 51	
Figura 13 - Fluxograma do procedimento experimental	54
Figura 14 - Fotografia digital da quitosana obtida.....	55
Figura 15 - Fotografia digital do gel de colágeno obtido	56
Figura 16 - Fotografia digital do pó do extrato de mangostão.....	56
Figura 17 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> com variação de extrato: (A) Quitosana; (B) Colágeno	57
Figura 18 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> com variação de extrato: (A) QC11; (B) QC21; (C) QC31	57
Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica da quitosana	58
Figura 20 - Curva η_{sp}/C x Concentração, para cálculo de massa molar da quitosana	59
Figura 21 - Espectro de FTIR do extrato de mangostão.....	60
Figura 22 - Espectro de FTIR de α -mangostim em literatura ⁶⁵	61
Figura 23 - Espectro de FTIR dos filmes de Q (■), Col (■), QC11 (■), QC21(■) e QC31 (■)	62
Figura 24 - Espectro de FTIR na região de 2000 a 400 cm^{-1} dos filmes de Q (■), Col (■), QC11 (■), QC21(■) e QC31 (■) sem (contínua) e com 30% de extrato (tracejada).....	63

Figura 25 - Fotografia digital dos filmes de quitosana com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato.....	64
Figura 26 - Fotografia digital dos filmes de colágeno com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato.....	64
Figura 27 - Fotografia digital dos filmes de QC11 com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato.....	66
Figura 28 - Fotografia digital dos filmes de QC21 com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato.....	66
Figura 29 - Fotografia digital dos filmes de QC31 com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato.....	66
Figura 30 - Curvas DSC dos <i>scaffolds</i> de colágeno CM0 (—); CM10 (—); CM20 (—) e CM30 (—).....	67
Figura 31 - Curvas DSC para os <i>scaffolds</i> de colágeno neutralizados CM0 (—); CM10 (—); CM20 (—) e CM30 (—).....	68
Figura 32 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos <i>scaffolds</i> de quitosana: (A) QM0 (B) QM10 (C) QM20 (D) QM30. Aumento de 500x.....	70
Figura 33 - Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos <i>scaffolds</i> de quitosana: (A) QM0 (B) QM10 (C) QM20 (D) QM30. Aumento de 500x.....	70
Figura 34 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos <i>scaffolds</i> de colágeno: (A) CM0 (B) CM10 (C) CM20 (D) CM30. Aumento de 500x.....	71
Figura 35 - Fotomicrografias por MEV das secções transversais dos <i>scaffolds</i> de colágeno: (A) CM0 (B) CM10 (C) CM20 (D) CM30. Aumento de 500x.....	72
Figura 36 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos <i>scaffolds</i> : (A) QC11M0 (B) QC11M10 (C) QC11M20 (D) QC11M30. Aumento de 500x.....	73
Figura 37 - Fotomicrografias por MEV das secções transversais dos <i>scaffolds</i> : (A) QC11M0 (B) QC11M10 (C) QC11M20 (D) QC11M30. Aumento de 500x.....	74
Figura 38 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos <i>scaffolds</i> : (A) QC21M0 (B) QC21M10 (C) QC21M20 (D) QC21M30. Aumento de 500x.....	75
Figura 39 - Fotomicrografias por MEV das seções transversais <i>scaffolds</i> : (A) QC21M0 (B) QC21M10 (C) QC21M20 (D) QC21M30. Aumento de 500x.....	76
Figura 40 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos <i>scaffolds</i> : (A) QC31M0 (B) QC31M10 (C) QC31M20 (D) QC31M30. Aumento de 500x.....	77
Figura 41 - Fotomicrografias por MEV das secções transversais dos <i>scaffolds</i> : (A) QC31M0 (B) QC31M10 (C) QC31M20 (D) QC31M30. Aumento de 500x.....	78
Figura 42 - Valores de poros e canais com variações de extrato: (A) Tamanho médio de poros com variação de extrato; (B) Tamanho médio de canais com variação de extrato. Para os <i>scaffolds</i> Q (■), Col (■), QC11 (■), QC21(■) e QC31 (■)	79
Figura 43 - Curvas de absorção para os <i>scaffolds</i> : QM0 (■), QM10 (■), QM20(■) e QM30(■)	81

Figura 44 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> de quitosana 24 h após o término do ensaio de intumescimento: QM10; QM20 e QM30	81
Figura 45 - Curvas de absorção para as amostras de colágeno: CM0 (▪), CM10 (▪), CM20(▪) e CM30(▪)	83
Figura 46 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> de colágeno após o término do ensaio de intumescimento: CM0; CM20	83
Figura 47 - Curvas de absorção para as amostras de quitosana:colágeno(1:1): QC11M0 (▪), QC11M10 (▪), QC11M20(▪) e Q C11M30(▪)	84
Figura 48 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> após o término do ensaio de intumescimento: QC11M0; QC11M10; QC11M20 e QC11M30	84
Figura 49 - Curvas de absorção para as amostras de quitosana:colágeno (2:1): QC21M0 (▪), Q C21M10 (▪), Q C21M20(▪) e Q C21M30(▪)	85
Figura 50 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> após o término do ensaio de intumescimento: QC21M10; QC21M20 e QC21M30	87
Figura 51 - Curvas de absorção para as amostras de quitosana:colágeno(3:1): QC31M0 (▪), QC31M10(▪), QC31M20(▪) e QC31M30(▪)	88
Figura 52 - Fotografias digitais dos <i>scaffolds</i> após o término do ensaio de intumescimento: QC31M10; QC31M20 e QC31M30	88
Figura 53 - Espectro no UV-Visível para o padrão de α -mangostão em metanol	90
Figura 54 - (A) Espectros no UV-Visível para diferentes concentrações do extrato; (B) Curva de calibração para o extrato em 280 nm	91
Figura 55 - Curvas de liberação para as amostras de quitosana:colágeno(1:1), (2:1) e (3:1) 10% (▪), 20%(▪) e 30%(▪) de extrato.....	92
Figura 56 - Ensaios viscosidade em função do cisalhamento para os géis (—) CM0, (—) CM10, (—) CM20, (—) CM30	96
Figura 57 - Ensaios viscosidade em função do cisalhamento para amostras de quitsana (—) QM0,(—) QM10,(—) QM20, (—) QM30	97
Figura 58 - Ensaios viscosidade em função do cisalhamento para amostras (—) QC11M0, (—) QC11M10, (—) QC11M20, (—) QC11M30	99
Figura 59 - Ensaios viscosidade em função do cisalhamento para amostras (—) QC21M0, (—) QC21M10,(—) QC21M20, (—) QC21M30	100
Figura 60 - Ensaios viscosidade em função do cisalhamento para amostras (—) QC31M0, (—) QC31M10, (—) QC31M20, (—) QC31M30	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações da quitosana. ^{9,19}	33
Tabela 2 - Formas de colágeno e suas aplicações. ³¹	36
Tabela 3 - Valores de comprimento de onda de grupos de α -mangostão ⁶³	61
Tabela 4 - Temperatura de desnaturação (Td, °C) para cada <i>scaffold</i>	68
Tabela 5 - Temperatura de desnaturação (Td, °C) para cada <i>scaffold</i>	69
Tabela 6 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos <i>scaffolds</i> de quitosana.....	71
Tabela 7 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos <i>scaffolds</i> de colágeno.....	73
Tabela 8 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos <i>scaffolds</i> de QC11.....	75
Tabela 9 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos <i>scaffolds</i> de QC21.....	77
Tabela 10 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos <i>scaffolds</i> de QC31.....	79
Tabela 11 - Porcentagem de extrato liberado em 36 h, em tampão de HAc/NaAc pH 5,12. 93	
Tabela 12 - Mecanismos de liberação em Kosmeyer-Peppas. ⁷⁰	94
Tabela 13 - Valores de n para modelagem por Kosmeyer-Peppas.....	95
Tabela 14 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostras de Colágeno e suas variações com extrato.....	97
Tabela 15 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostras de Quitosana e suas variações com extrato.....	98
Tabela 16 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostra QC11 e suas variações com extrato.	99
Tabela 17 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostra QC21 e suas variações com extrato.	100
Tabela 18 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostra QC31 e suas variações com extrato.	101

ABREVIATURAS

C - Colágeno

DSC - Calorimetria Exploratória Diferencial

FT-IR - Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier

GA – Grau de Acetilação

HAc – Ácido Acético

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MRSA - *Staphylococcus Aureus* Resistente à Meticilina

Q - Quitosana

QC11 - Quitosana:Colágeno proporção 1:1 (massa/massa)

QC11M10 - Quitosana:Colágeno proporção 1:1 (massa/massa) e 10% de extrato de mangostão

QC11M20 - Quitosana:Colágeno proporção 1:1 (massa/massa) e 20% de extrato de mangostão

QC11M30 - Quitosana:Colágeno proporção 1:1 (massa/massa) e 30% de extrato de mangostão

QC21 - Quitosana:Colágeno proporção 2:1 (massa/massa)

QC21M10 - Quitosana:Colágeno proporção 2:1 (massa/massa) e 10% de extrato de mangostão

QC21M20 - Quitosana:Colágeno proporção 2:1 (massa/massa) e 20% de extrato de mangostão

QC21M30 - Quitosana:Colágeno proporção 2:1 (massa/massa) e 30% de extrato de mangostão

QC31 - Quitosana:Colágeno proporção 3:1 (massa/massa)

QC31M10 - Quitosana:Colágeno proporção 3:1 (massa/massa) e 10% de extrato de mangostão

QC31M20 - Quitosana:Colágeno proporção 3:1 (massa/massa) e 20% de extrato de mangostão

QC31M30 - Quitosana:Colágeno proporção 3:1 (massa/massa) e 30% de extrato de mangostão

Td - Temperatura de Desnaturação

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1 Biomateriais e Engenharia de tecidos	27
2.2 Quitina/Quitosana.....	29
2.3 Colágeno.....	34
2.4. Blendas Quitosana/Colágeno.....	37
2.5 Mangostão	38
3 OBJETIVOS.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 Obtenção da Quitosana.	45
4.1.1 Caracterização da Quitosana	46
4.1.1.1 Grau de Acetilação (G.A) da Quitosana	46
4.1.1.2 Determinação da Massa Molar Média.....	47
4.2 Obtenção do Gel de Colágeno Aniônico	48
4.3 Extrato Mangostão (<i>Garcinia mangostana L.</i>).....	49
4.4 Preparação dos Géis e <i>Scaffolds</i>	49
4.5 Caracterização dos Materiais.	50
4.5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho	50
4.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	51
4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	51
4.5.4 Ensaios de Intumescimento.....	52
4.6 Ensaios de Liberação de Extrato.....	52
4.7 Determinação de Propriedades Reológicas	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 Obtenção dos Materiais Iniciais, Misturas e <i>Scaffolds</i>	55
5.2 Caracterização	58

5.2.1 Caracterização da Quitosana	58
5.2.1.1 Grau de Acetilação (G.A).....	58
5.2.1.2 Massa Molar Média	59
5.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)	60
5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	67
5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura	69
5.2.5 Ensaio de Intumescimento	80
5.2.6 Ensaio de Liberação de extrato	89
5.2.7 Ensaio Reológicos.....	95
6 CONCLUSÃO.....	103
REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

A engenharia de tecidos consiste na melhoria do processo de regeneração tecidual e a utilização de *scaffolds* tornou-se usual nesta área, onde os polímeros naturais destacam-se pelas suas propriedades como biocompatibilidade, biodegradabilidade, entre outras.

Dentre os biopolímeros temos a quitosana, um polissacarídeo derivado de quitina, sendo muito empregada em diversos setores industriais, como tratamento de efluentes, indústria cosmética, agrícola, entre outras, e o colágeno, uma proteína, sendo a maior constituinte proteica presente nos mamíferos, e também possui grande aplicabilidade na área industrial, desde liberação de fármacos à produção de alimentos.

Ambos possuem alta biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade e suas blends podem ser utilizadas para aplicações diretas em regeneração tecidual. A matriz colagênica além de poder atuar como agente reconstrutor de tecidos, revestimento de queimaduras, suporte de crescimento celular, é ainda utilizado em estudos de liberação de fármacos. A quitosana possui aplicações semelhantes, apesar de alguns usos diferenciarem, sua estrutura permite também que se faça estudos de liberação controlada. A blenda quitosana:colágeno como *scaffold* devido as mesmas propriedades citadas já vem sendo estudada para utilização na área de engenharia tecidual, como cultura de células e auxílio na regeneração tecidual.

A partir do fruto de mangostão, conhecido no sudeste asiático, pode-se obter um extrato com propriedades antimicrobianas, antioxidante, antitumoral, antialérgicas dentre outras. Na literatura há poucos relatos de trabalhos utilizando o extrato em conjunto com biopolímeros^{1,2}, mas nenhum associado com a blenda de quitosana/colágeno. Diante disso, tem-se a possibilidade de explorar materiais ainda não muito conhecidos e que possuem propriedades que podem vir a ser de interesse para uma possível aplicação médica, sendo as interações do extrato com os biopolímeros utilizados para a formação dos *scaffolds* e gel ainda desconhecidas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais e Engenharia de tecidos

Uma definição de biomaterial aceita na comunidade científica é dada pela *American National Institute of Health* que diz que um biomaterial é “qualquer substância ou combinação de substâncias, sem ser fármacos, de origem natural ou sintética que pode ser utilizado por qualquer período de tempo, no qual melhora ou substitui parcialmente ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função corporal, com intuito de manter ou melhorar a qualidade de vida do indivíduo”³.

Para um biomaterial é desejável que este seja biocompatível, que é capacidade de um material atuar com uma resposta adequada do hospedeiro em uma aplicação específica⁴, não ser citotóxico, além de possuir características mecânicas e estruturais adequadas à aplicação desejada.

Os biomateriais são utilizados pela humanidade desde civilizações antigas, como olhos, orelha, e dentes artificiais utilizados desde civilização egípcia. Chineses e indianos utilizavam colas, ceras e tecidos para reconstruir partes do corpo perdidas ou defeituosas. Hoje após séculos de história, foram evoluindo juntamente com outros setores da ciência, e chegamos a seu atual uso. Hoje os biomateriais se dividem em três categorias, os cerâmicos, poliméricos, e os metais, sendo utilizados nas mais diversas áreas, como odontologia, oftalmologia, ortopedia entre outras.

Em 2016 o mercado de biomateriais movimentou 70,9 bilhões de dólares, com expectativas de alcançar 149 bilhões em 2021, um aumento devido a fatores como: aumento de fundos cedidos pelos governos, o aumento global de doenças cardiovasculares, avanços tecnológicos, o aumento de mercado de implantes, aumento em casos de cirurgias de quadris e joelhos, uma maior taxa de população geriátrica e um crescente desenvolvimento na área de engenharia tecidual⁵.

A técnica de se adicionar materiais à ferimentos é muito conhecida na atualidade e feito há séculos, hoje conhecida como engenharia tecidual, é uma área multidisciplinar, a qual depende das ciências exatas e biológicas e que estas trabalhem em conjunto a fim de auxiliar a regeneração e reparo de tecidos biológicos por meio de novas técnicas e desenvolvimento de novos biomateriais que possam ser

utilizados com este intuito, sendo o principal objetivo superar as limitações de tratamentos convencionais vigentes como cirurgias e transplantes⁶.

O termo “engenharia de tecidos foi cunhado apenas em 1988, no workshop da *National Science Foundation*, com uma definição similar a “ aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências para o a fim de entender a relação entre estruturas e funções em tecidos sadios ou não e o desenvolvimento de substitutos biológicos para restaurar, manter ou melhorar a função do tecido”⁷.

Nesta área há o grande uso de biomateriais poliméricos, sendo que estes podem ser divididos em duas categorias, os sintéticos e os de origem natural e tem sido estudados para utilização como implantes, na forma de parafusos e placas ósseas, suturas, dispositivos de liberação de fármacos, membranas com funções de auxílio em regeneração, e materiais terapêuticos, como próteses temporárias, dado por exemplo o uso de *scaffolds*.

Os “*scaffolds*” ou “arcabouços”, são suportes tridimensionais porosos biodegradáveis que tem como função estimular a adesão, crescimento e proliferação celular com intuito de auxiliar a regeneração do tecido danificado que também são utilizados na área farmacológica como dispositivos de liberação de fármacos.

A aplicação dos polímeros na área de biomateriais é tamanha que em 2003 foi responsável por 88% do mercado de biomateriais⁸.

Dentro dos biomateriais poliméricos, os polímeros de origem naturais podem ser considerados os primeiros biomateriais bioreabsorvíveis a serem utilizados clinicamente, devido a sua degradação in vivo. Esses materiais de origem natural são bioativos, e seus subprodutos são biocompatíveis, não tóxicos e possuem um custo acessível, pois muitas das vezes são considerados como subprodutos de outras indústrias. Os grupos funcionais presentes nos biopolímeros permitem diversas formas de modificação química ou enzimática, ou fortes interações com demais moléculas, dando uma vasta variedade de produtos com propriedades adaptáveis⁹. Dentre estes biopolímeros, alguns são: colágeno, quitosana, ácido hialurônico, elastina, fibrina e outros.

2.2 Quitina/Quitosana

Dentre inúmeros biopolímeros, a quitina tem um grande destaque, uma vez que é abundante na natureza, proveniente de fontes renováveis como exoesqueleto de crustáceos e insetos, paredes celulares de fungos, lulas e demais fontes biológicas gerando aproximadamente 10 bilhões de toneladas anuais¹⁰.

É um polímero de estrutura linear composto por duas unidades de 2-acetamida-2-deoxi-*D*-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas $\beta(1-4)$ ¹¹, por possuir regiões desacetiladas (algumas de suas regiões possuem o grupamento amino ao invés do *N*-acetil), é considerada um heteropolímero (Figura 1).

Figura 1 - Representação da estrutura da quitina

Fonte: autoria própria

As cadeias de quitina podem ter três tipos de arranjos, dependendo da forma em que estas se alinham e empacotam, os arranjos definidos como α , β e γ são diferenciados pelo paralelismo das cadeias que as compõe.

Caso as cadeias possuam um mesmo sentido, apresentando o chamado paralelismo a estruturação é denominada β , caso haja um antiparalelismo, intercalando o sentido das cadeias dá-se a denominação α . Já para forma γ -quitina sugere-se que seja um arranjo também antiparalelo, mas ocorrendo a cada dois monômeros sendo o terceiro antiparalelo a estes¹², as Figuras 2 e 3 apresentam representações desses arranjos.

Devido a esta disposição a α -quitina é a mais estável das formas, uma vez que este posicionamento possibilita ligações de hidrogênio, dificultando muitas vezes processos químicos, sendo a forma presente em crustáceos, insetos e fungos. A

forma β -quitina, presente em lulas e algas microscópicas possui forças intermoleculares relativamente fracas, possibilitando uma maior solubilidade em diversos solventes, uma maior susceptibilidade à reações químicas e maior intumescimento¹³.

Figura 2 - Representação de α -quitina (A) e β -quitina (B)

Fonte: Adaptado de RINAUDO, M., 2006¹⁴

Figura 3 - Representação do paralelismo das formas α , β e γ da quitina

Fonte: Autoria própria

Uma das fontes naturais de β -quitina são moluscos evoluídos, os Cefalópodes, como a lula, onde pode ser extraída na forma de seu gládio, a chamada pena, uma carapaça interna que tem uma função estrutural do organismo, dando sustentação a seu manto (Figura 4).

Apesar de grande potencial, a quitina não é muito explorada em meio comercial devido a uma baixa solubilidade. Devido a sua hidrofobicidade torna-se

insolúvel em solventes orgânicos e solventes diluídos comumente usados. No entanto sua forma parcialmente desacetilada, denominada de quitosana apresenta uma maior solubilidade em solventes ácidos fracos, como ácido acético e ácido fórmico, tornando-a uma forma mais adequada para aplicações destes polímeros.

Figura 4 - Representação da anatomia de uma lula

Fonte: blogmcientifica¹⁵

A quitina é convertida em quitosana através de processos de desacetilação que ocorrem em meios fortemente básicos ou hidrólise enzimática na presença de quitina deacetilase. Essa desacetilação promove a substituição de alguns grupos N-acetil presentes na cadeia de quitina por grupamentos amino, dando origem à quitosana mostrada na Figura 5.

O teor da reação de desacetilação provê o grau de acetilação (G.A) do polímero, um fator importante, pois esta diferença causa mudanças em propriedades físico-químicas da matéria (como a viscosidade, solubilidade e outros), distinguindo a quitina da quitosana, alguns autores consideram a quitosana uma quitina 30%¹⁶ acetilada, outros com 50%¹⁷.

Figura 5 - Representação da estrutura de quitosana

Fonte: autoria própria

Este parâmetro pode ser obtido de diversas maneiras: RMN de ^{13}C ou de ^1H ; espectroscopia no infravermelho ou na região do ultravioleta; cromatografia de permeação em gel; titulação condutimétrica; análise elementar e cromatografia gasosa¹⁸.

Outro quesito de distinção é a solubilidade do polímero. Como dito anteriormente a quitina possui baixa solubilidade, até em meios ácidos comumente utilizados, já a quitosana apresenta baixa solubilidade em meios básicos ou até neutros, no entanto tem boa solubilidade em ácidos fracos, principalmente em meios de ácidos diluídos como ácido acético, láctico, málico e fórmico¹⁹. A solubilidade da quitosana em meios levemente ácidos se dá devido a protonação de seus grupamentos amino, já a quitina, uma forma não tão desacetilada não apresenta este comportamento. A reação em meios ácidos da quitosana é representada por

Algumas propriedades químicas da quitosana incluem: Ser um amino polissacarídeo linear com grande conteúdo de nitrogênio; uma base fraca (os grupamentos aminos agem como nucleófilo); forma sais com ácidos orgânicos e inorgânicos; agente quelante e complexante, dentre outras.

Já suas propriedades biológicas, há muito tempo estudadas fazem da quitosana um excelente biopolímero para a área de engenharia de tecidos. Apresenta uma boa biodegradabilidade, é biocompatível (sendo atóxica), é um agente bacteriostático e antimicrobiano natural, tem capacidade de auxiliar no processo de

cicatrização, de formação de osteoblastos acelerando-os²⁰. Ainda pode ser moldada e utilizada de diversas formas, desde soluções e géis até filmes, esponjas e outros.

A quitina é vista como um sub-produto da indústria pesqueira, principalmente dos crustáceos, sendo que na grande maioria das vezes é tratada como dejetos e então descartada. No entanto sua conversão é economicamente viável, principalmente se considerada recuperação de carotenoides como a astaxantina utilizada como aditivo alimentar na aquicultura²⁰.

Países como Japão, Polônia, EUA, Austrália e Noruega já produzem a quitosana de forma comercial¹⁰, o mercado norte-mericano em 2015 foi estimado em USD 1,42 bilhão, e espera-se um grande crescimento com previsão de em 2025 alcançar em torno de USD 17,84 bilhão²¹, com uma grande expansão no mercado asiático como China e Índia, com grandes utilizações nas áreas farmacêutica, alimentícia e tratamento de água, dependendo de seu grau de pureza. Além destas, a quitosana possui um grande espectro de aplicações, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 - Aplicações da quitosana.^{10,20}

Categoria	Aplicações
Tratamento de água	Remoção de íons metálicos, de fenóis, proteínas, isótopos, de petróleo e derivados.
Agricultura	Utilizada na liberação controlada de agrotóxicos, fertilizantes, recobrimento de sementes e como aditivo na ração animal.
Celulósica	Aditivo para papel fotográfico e papel comum
Cosmética	Base em cremes para face, mãos, hidratantes e produtos capilares.
Analítica	Imobilizador de enzimas e células, uso em separação proteica, matriz em cromatografia de permeação em gel.
Alimentos	Clarificação de bebidas, preservante, antioxidante, emulsificante.
Biomédica/Farmacêutica	Tratamento de queimaduras, lentes de contato, diálise, agente hemostático, agente de liberação de fármacos.

2.3 Colágeno

A palavra “colágeno” foi criada em meados de 1800, provindo da união de dois termos de origem grega, “*kolla*” e “*gennao*”, traduzidos cola e “eu produzo” devido ao uso da época onde era o principal ingrediente de colas obtidas de partes animais como tendões, ligamentos e pele, levados à fervura²².

Nos dias atuais, o termo colágeno é utilizado para uma família de proteínas, onde são atualmente reconhecidos 29 tipos de colágeno numerados em algarismos romanos. O colágeno como um todo é a proteína mais abundante nos vertebrados, constituindo aproximadamente 30% da matéria orgânica do corpo dos animais e 60% das proteínas totais²³. Dentre os diferentes tipos de colágeno, o mais abundante, o colágeno tipo I, ou colágeno nativo também é o mais estudado, sendo encontrado na pele, tendões, ligamentos e ossos.

O colágeno tipo I é constituído de uma forma básica, o tropocolágeno, um entrelaçamento helicoidal, em sentido horário de três cadeias polipeptídicas, sendo duas cadeias $\alpha 1$ e uma cadeia $\alpha 2$, cada cadeia contendo em torno de 1050 aminoácidos. A estrutura resultante tem aproximadamente um diâmetro entre 1,4 e 1,5mm com 300 nm de comprimento e um peso molecular de 300 KDa.

Os arranjos destas três cadeias formam a chamada tripla hélice, estabilizada através de ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas²⁴, tendo uma grande quantidade de aminoácidos como glicina, prolina e hidroxiprolina, os quais se coordenam numa sequência conhecida como Gly-X-Y, onde X e Y pode ser qualquer aminoácido, mas na maioria das vezes X é prolina e Y hidroxiprolina ou hidroxilisina. Cada substituição acarreta em propriedades diferentes no conjunto²⁵, o posicionamento da glicina a cada sequência é essencial uma vez que esta permite o empacotamento dado pelo entrelaçamento das três cadeias.

No tecido biológico as cadeias $\alpha 1$ e $\alpha 2$ após formarem a molécula de pró-colágeno, sofre ações de peptidases para removerem ligações terminais soltas, formadas de pró-peptídeos, o resultante é chamado de molécula de tropocolágeno. Estas moléculas no tecido se arranjam em grupos de cinco, dispostas concêntricamente e alternadas umas em relação às outras de um quarto de seu comprimento e originam as chamadas microfibrilas²⁶, destas estruturas, ocorrem agregações laterais e longitudinais por um processo de fibrilogênese e através de

ligações cruzadas inter e intra moleculares, dando origem à fibra de colágeno (Figura 6).

Devido a sua estrutura, possui uma grande resistência à tração, sendo sua principal função no organismo de modular forças exercidas externamente ou internamente no organismo. Além disso, forma fibras insolúveis com alta força elástica, ocasionando a função de orientar tecidos em desenvolvimento²⁷.

Figura 6 - Esquema da formação da fibra de colágeno

Fonte: Adaptado de Krueger, T.E. 2013²⁸

A formação de fibras do colágeno do tipo I ocorre em meio de pH aproximadamente 7, e o resultante de cargas delas é nula, no entanto é capaz de se modificar o mesmo através de processos químicos ou enzimáticos, podendo-se manusear as cargas tanto para positivas, quanto negativas, dependendo de e quem o manuseia e sua necessidade de aplicação. Cargas positivas numa matriz de colágeno faz com que este seja usual para um crescimento celular, já com carga negativa, chamado de colágeno aniônico pode ser utilizado para crescimento de tecidos e liberação de fármacos^{29,30}.

No entanto, quando se obtém um colágeno, este geralmente possui baixa resistência mecânica e estabilidade térmica, devido ao processo que é submetido que faz com que as ligações cruzadas uma vez existentes se rompam, e acarretando um

novo padrão de interações eletrostáticas. Nesta forma de colágeno, os resíduos de aminoácidos de Asparagina e Glutamina presentes na cadeia sofrem uma hidrólise em seus grupamentos carboxiamida, gerando então um conjunto de cargas negativas, como mostrado na Figura 7

Figura 7 - Esquema da hidrólise alcalina da molécula de colágeno

Fonte: Adaptado de Batista,2008³¹

Utilizado em sua forma nativa ou reconstruída, possui alta biocompatibilidade, e é muito utilizado em diversas áreas, como cosméticos, alimentos, bebidas, cuidados com a saúde e farmacêuticos. Dentre os diversos tipos de colágeno, o colágeno tipo I é dado como o padrão ouro na área de engenharia tecidual, além de grande predominância, apenas poucas pessoas possuem rejeição corporal ou alergia à este. Na Tabela 2 encontram-se alguns dos principais usos industriais e biomédicos do colágeno e a forma utilizada.

Tabela 2 - Formas de colágeno e suas aplicações.³²

Aplicação	Forma do colágeno
Agente hemostático	Pó, esponjas, flocos
Vasos sanguíneos	Colageno reconstituído
Valvulas cardíacas	Válvula cardíaca porcina processada
Curativos de queimaduras	Esponjas, colágeno processado, compósitos
Liberação de fármacos	Várias formas biodegradáveis

O mercado global de colágeno foi avaliado em 2015 em três bilhões de dólares, e estima-se que em 2023 este valor alcance mais de cinco bilhões. No caso

do maior mercado de colágeno, o norte-americano, se deu uma predominância devido ao seu crescente uso em cosméticos e derivados, enquanto o mercado europeu possui grande participação na utilização de colágeno nos setores alimentício e farmacêutico³³. É observado que o setor industrial de colágeno possui um rápido crescimento no setor de pesquisa e desenvolvimento, sendo muito estudado para avanços no seu uso em liberação de fármacos, saúde e uso pessoal, e na área de regeneração tecidual.

2.4. Blendas Quitosana/Colágeno

A utilização de blendas no campo de polímeros é conhecida por unir dois polímeros de propriedades complementares, assim juntar as propriedades de dois polímeros ou biopolímeros em um só se torna altamente atrativo, no caso de biomateriais além das propriedades mecânicas, as propriedades biológicas seriam moduladas através da utilização blendas.

A junção entre quitosana e colágeno em forma de blendas ou *scaffolds* não ocorre naturalmente na natureza, mas a junção de ambos produz características únicas, e devido à grande abundância destes e suas propriedades naturais, as blendas já são muito conhecidos em literatura. Estes biomateriais são notórios por se complementarem, uma vez que sozinho o colágeno isolado possui pouca resistência mecânica e rápida biodegradação³⁴. Em sinergismo com a quitosana, resulta em um material que possui propriedades de grande aplicação em engenharia tecidual, apresentando boa estabilidade, biocompatibilidade e estrutura adequada para adesão e proliferação celular. As blendas de quitosana e colágeno tem sido utilizadas para fabricação de *scaffolds* para cultura de células humanas de carcinoma *in vitro*, para membranas para liberação controlada, e implantes³⁵. Ainda são estudadas na área de engenharia tecidual no crescimento de fibroblastos, osteoblastos, hepatócitos, células endoteliais pulmonares³⁶, testes *in vivo* mostraram que este material implantado em orelhas de coelhos deram apoio e proporcionaram infiltração de fibroblastos a partir do tecido lesionado³⁷

Os grupamentos OH- provindos de aminoácidos como a hidroxiprolina, e grupamentos COOH e NH₂ do colágeno são capazes de formar ligações de hidrogênio com a quitosana que possui grupamentos OH e NH₂ propícios a tal. Além disso, a cadeia de quitosana é capaz se enrolar na hélice tripla. Quando ionizados, os de

grupamentos NH^{+3} da quitosana e COO^- provindos do colágeno interagem através de forças eletrostáticas. A formação de blends entre estes dois materiais melhoram certas propriedades como resistência mecânica, sem alterar significativamente as características químicas de ambos polímeros.

2.5 Mangostão

No processo de cura de ferimentos, espécies reativas de oxigênio são formadas e liberadas no meio durante o processo, e podem danificar células, retardando o processo de cura. Assim materiais e substâncias antioxidantes conseguem acelerar o processo natural de cicatrização.

Recentemente o uso de plantas, e novos compostos naturais derivados delas têm aumentado, devido ao grande potencial medicinal destas, sendo foco de muitos estudos tanto em caracterização dos componentes envolvidos quanto no estudo de uso em associação a outros materiais ou até isoladamente. Dentro desta vasta área de possibilidades, uma fruta em questão que pode vir a se tornar um destaque é o mangostão, *garcinia mangostana* Linn da família *Clusiaceae* que vem de uma árvore de mesmo nome com crescimento lento e podendo chegar de 6 a 25 metros de altura (Figura 8).

Assume-se que tenha origem nas ilhas de Sonda e nas ilhas Molucas³⁸, arquipélagos do sudeste asiático, sendo hoje uma *commoditie* no mercado da região, podendo ser encontrado em países como, Índia, Filipinas, indonésia e na Tailândia, este último sendo o maior produtor, colhendo em torno de 240.000 toneladas do fruto em 2006³⁹ e em menores proporções em outros países tropicais. Chegou ao Brasil por volta de 1935 na Bahia e em 1942 no Pará, se espalhando e sendo produzido em menores escalas nos estados de Espírito Santo e em São Paulo⁴⁰.

O mangostão é um fruto de pequenas dimensões, redondo, que apresenta uma casca rígida de coloração roxo escuro/avermelhado e uma polpa esbranquiçada (Figura 8), macia e muito suculenta, sendo chamada por muitos de a rainha dos frutos, devido a um sabor distinto e muito apreciável^{41,42}. No Brasil, apesar de possuir focos de plantações ainda é pouco conhecida, mas vêm tomando grandes proporções no mercado internacional, sendo seu suco muito explorado comercialmente dado o apelo do fruto por suas propriedades medicinais.

Figura 8 - (A) árvore de mangostão (B) fruto Mangostão

Fonte: (A) GRIN National Genetic REsources Program ⁴³(B) Natural News⁴⁴

Há séculos a casca do fruto de mangostão é utilizada na medicina popular nos países do sudeste asiático para tratamento de diversas enfermidades como infecções, tuberculose, inflamações, cólera, diarreia, hemorroidas e outras⁴⁵. Não por menos, uma vez que o extrato de casca do fruto já mostrou propriedades antibacterianas, antialergênicas, anti-inflamatórias, antivirais, antitumorais e fortemente antioxidantes, devido à uma alta quantidade de compostos fenólicos, como xantonas, taninos e flavonoides⁴⁶.

Dentre os compostos obtidos deste extrato estão em grande proporção as xantonas, uma classe de compostos carbonílicos, sendo a estrutura primária um xanteno oxidado na posição 9 (Figura 9), similar a de flavonóides.

As xantonas são metabólitos secundários presentes em plantas e fungos antes utilizadas como larvicidas e fungicidas e que hoje atraem pesquisas devido às suas propriedades medicinais, agindo contra malária, sendo antioxidantes, anti-parasita, antifúngicos, antibacterianos, antiinflamatórios, analgésicos dentre diversas aplicações⁴⁷.

Figura 9 - Estrutura representativa de estrutura de xantonas.

Fonte: Autoria própria

No extrato da casca de mangostão foram isoladas cinquenta xantonas diferentes, sendo a primeira o α -mangostão em 1855, seguido de outras como β -mangostão, gama-mangostão, garcinona E, e outras. (Figura 10).

Figura 10 - Algumas estruturas das principais xantonas encontradas no extrato de mangostão. (A) α -mangostão; (B) γ -mangostão; (C) β -mangostão; (D) Garcinona E

Fonte: adaptado de Charernsriwilaiwat⁴⁸

Dentre os compostos que podem ser encontrados no extrato da casca de mangostão, o que é mais estudado é um dos compostos majoritários, a xantona α -mangostão (juntamente com o β -mangostão são os majoritários), suas propriedades atraem a atenção de diversas pesquisas devido às propriedades farmacológicas e potenciais aplicações.

O α -mangostão isolado se apresenta como um pó de coloração amarelada, ponto de fusão entre 180 e 181°C, baixa solubilidade em água e solúvel em metanol, sendo estável à temperatura ambiente⁴⁹.

Em literatura cita-se que este composto possui atividades biológicas como anti-inflamatório, antitumoral, antidiabético, antifúngico, antioxidante, antibacteriano, sendo mostrado que ele é ativo contra bactérias gram-positivas incluindo *S.aureus*, MRSA e não apresentando efeitos citotóxicos em fibroblastos gengivais humanos até uma concentração de 4mg ml⁻¹ ⁵⁰ sendo um composto muito promissor.

Em literatura o extrato de mangostão é comumente encontrado em casos de estudo de suas capacidades farmacológicas e antioxidantes, casos de extrações ou outros usos específicos. Têm sido encontrados também trabalhos com o uso de suas xantonas (principalmente o α -mangostão). Com a associação de biomateriais são poucos os estudos, alguns com a associação com a quitosana (para fabricação de nanofibras com α -mangostão⁴⁸) e com PVA⁵¹, e no caso de nanofibras de quitosana com extrato demonstraram resultados promissores na área de engenharia tecidual, com boa biocompatibilidade, biodegradabilidade e atividade antimicrobiana, mas nenhum com associação de colágeno ou de blendas com a quitosana.

3 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi a obtenção e caracterização de géis e *scaffolds* a partir de misturas de quitosana e colágeno aniônico com extrato de mangostão, a fim de obterem-se materiais que possam vir a ser utilizadas como biomateriais em engenharia de tecidos.

Objetivos secundários:

- Obtenção da quitosana a partir de gládios de lula e colágeno aniônico a partir de tendão bovino.
- Obtenção de extrato de mangostão.
- Preparação das misturas dos biopolímeros com o extrato de mangostão, variando a proporção de biopolímeros e de extrato.
- Caracterização reológica dos géis obtidas.
- Obtenção de *scaffolds* a partir das misturas.
- Caracterização dos *scaffolds* e misturas.
- Ensaios de liberação do extrato nos *scaffolds*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção da Quitosana.

A quitosana deste trabalho foi obtida a partir da extração da β -quitina provinda de gládios de lulas da espécie *Doryteuthis* spp. cedidos por Miami Comércio e Exportação de Pescados Ltda (Cananéia-SP).

Os gládios foram submetidos a um pré-processamento através de lavagem, para extrair resíduos como matéria orgânica e sais remanescentes da pesca. Feito isso os gládios foram secos, triturados e peneirados em malha de 60 mesh, com finalidade de se obter partículas menores que 250 μm .

Para a obtenção de quitosana foram feitos processos de desproteínização e desacetilação⁵². Partindo-se de uma massa inicial de 73,1 g, iniciou-se o tratamento dos gládios com uma solução de NaOH 0,3 mol L⁻¹ em uma proporção de massa de material: volume de solução de 1 g:10 mL sendo mantida uma temperatura de 80°C e agitação constante por 1 h. Este processo foi repetido mais uma vez para otimização. Após resfriada, a solução foi filtrada e o resíduo sólido foi lavado até atingir a neutralidade. Ao final desse processo obteve-se a β -quitina.

Partindo da β -quitina é necessário um processo de desacetilação para a obtenção da quitosana. Este se dá por um novo tratamento alcalino, mais agressivo que o anterior, com uma solução_(aq) de NaOH 40% (massa/massa) e proporção massa:volume solução de 1 g:20 mL, sendo o processo mantido em um sistema sob atmosfera de N_{2(g)} com agitação constante a 80°C por 3 h. Após filtração o processo foi repetido mais uma vez a fim de garantir uma maior eficiência sendo o resíduo sólido lavado como anteriormente e seco em estufa.

A Figura 11 mostra o processo em forma de fluxograma da obtenção de quitosana a partir dos gládios de lula.

Figura 11 – Fluxograma do processo de obtenção da quitosana

Fonte: Autoria Própria

4.1.1 Caracterização da Quitosana

4.1.1.1 Grau de Acetilação (G.A) da Quitosana

O grau de acetilação da quitosana é considerado um parâmetro importante para sua caracterização, uma vez que pode influenciar propriedades físico-químicas e biológicas como cristalinidade, hidrofobicidade e degradação⁵³. Pode ser determinado por métodos como titulação condutimétrica; espectroscopia na região do ultravioleta⁵⁴ e ressonância magnética nuclear (RMN).

Para este trabalho, foi utilizado o método de titulação condutimétrica, descrito por RAYMOND *et al.*, 1993⁵⁵, um processo não destrutivo, de baixo custo cujo resultados são confiáveis e similares aos obtidos pela técnica de RMN ¹H⁵⁶.

Para o ensaio, utilizou-se uma amostra de 250,3 mg de quitosana, que foi dissolvida por agitação constante por 24h em 50 mL de HCl 0,05 mol L⁻¹.

Após agitação foi diluída em 250 mL de água deionizada. Da solução resultante foram tomadas alíquotas de 50 mL e tituladas com NaOH 0,01 mol L⁻¹, previamente padronizado com ácido oxálico 0,100 mol. L⁻¹.

As titulações foram acompanhadas com um condutivímetro GEHAKA CG 2000 (São Paulo/SP, Brasil), que possibilitou a medição da variação de condutividade de cada solução, sendo que o grau de acetilação foi calculado por meio da equação:

$$\%GA = 1 - \left[\left(\frac{161 \times (V_2 - V_1) \times [NaOH]}{m} \right) \times 100 \right] \quad (2)$$

Da equação, o termo numérico 161 é relacionado à massa molecular média da unidade monomérica da quitosana em g mol^{-1} , a diferença entre os termos V_2 e V_1 é o volume (em litros) utilizada de $\text{NaOH}_{(s)}$ para a neutralização dos grupamentos amino da quitosana, $[NaOH]$ é a concentração em mol L^{-1} da solução de hidróxido de sódio utilizada e m é a massa de quitosana contida na alíquota titulada.

4.1.1.2 Determinação da Massa Molar Média

A determinação da massa molar média da quitosana foi feita utilizando-se a técnica de viscosimetria capilar, que resulta na massa molecular viscosimétrica média. Para tal, uma quantidade de quitosana foi previamente seca em estufa e desta tomou-se uma massa de 20 mg que foram dissolvidos em 25 mL de ácido acético 0,6 mol L^{-1} sob agitação constante por 24 h.

Após esta etapa foi adicionado à solução um volume de 25 mL de acetato de sódio 0,4 mol L^{-1} e retomou-se a agitação por mais 24h. Simultaneamente foi preparado um tampão 0,3 mol L^{-1} ácido acético/ 0,2 mol L^{-1} de acetato de sódio a um pH de 4,5 sob agitação por 1 h. O tampão foi usado para diluições da amostra de quitosana.

Foram preparadas amostras de 10 mL da solução de quitosana por diluições com tampão nas concentrações de 1,5 a $4,0 \times 10^{-4} \text{ g mL}^{-1}$. As medidas foram feitas através do tempo de escoamento determinado pelo espaço demarcado em um viscosímetro tipo Ubbelohde com auxílio de um cronômetro digital, sendo o sistema mantido a 25°C controlada por banho termostático (EDG equipamentos e controles Ltda, São Carlos/SP, Brasil).

As amostras foram repetidas 10 vezes cada e o valor utilizado para os cálculos foi a média aritmética.

A partir dos dados obtidos e das concentrações pré-determinadas foi possível então determinar a viscosidade reduzida a partir da equação 3:

$$\eta_{red} = \frac{t_{quit} - t_{solv}}{t_{solv}} \quad (3)$$

Onde η_{red} representa a viscosidade reduzida de cada solução de quitosana, t_{quit} é o média dos tempos (s) de escoamento para cada uma das soluções, t_{solv} é a média do tempo (s) de escoamento do solvente, no caso, o tampão. Tratando-se de uma solução polieletrólítica (quitosana em solução ácida diluída ou em tampão) pode-se obter da viscosidade reduzida a viscosidade intrínseca utilizando a relação de Huggins:

$$\frac{\eta_{sp}}{C} = [\eta] + k_H [\eta]^2 C \quad (4)$$

Para tal relação, tem-se que η_{sp}/C é igual à η_{red} , a viscosidade reduzida (mL g^{-1}), $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca (mL g^{-1}), k_H é a constante de Huggins e C é a concentração da solução (g mL^{-1}).

Com estes dados é possível traçar um gráfico de viscosidade reduzida versus concentração e, deste gráfico, extrapolando a uma diluição infinita determina-se a viscosidade intrínseca. Tal viscosidade determinada satisfaz a relação de Mark-Houwink Sakurada, podendo-se então determinar a massa molar média viscosimétrica da quitosana pela equação:

$$[\eta] = K' \bar{M}_v^\alpha \quad (5)$$

Sendo K e α são constantes dependentes da temperatura, e sistema polímero/solução, tratando-se da quitosana é dependente também do grau de acetilação da mesma, K diretamente dependente da viscosidade e α sendo variável de acordo com a flexibilidade da cadeia⁵⁷ e $\bar{M}$ é a massa molar média.

4.2 Obtenção do Gel de Colágeno Aniônico

O colágeno foi extraído a partir de tendão bovino utilizando um procedimento do Grupo de Bioquímica e Biomateriais do IQSC – USP⁵⁸. Para remoção de materiais orgânicos indesejáveis foi feita uma lavagem em solução salina 0,9% (NaCl) e água desionizada. Após limpo o tendão foi submetido à hidrólise em solução

alcalina por de 96 h, esta solução contendo sais (sulfatos e cloretos) e hidróxidos de metais alcalinos e alcalinos terrosos.

Após este período, o tendão foi removido das condições alcalinas e colocado em outra solução contendo sulfatos e cloretos dos íons Na^+ , K^+ e Ca^{2+} , durante 6h. O excesso de sais foi removido por lavagens em solução de ácido bórico 3%, água desionizada, seguida por solução de EDTA 0,3% e água desionizada.

O colágeno foi extraído com uma solução de ácido acético pH 3,5. Sua concentração foi determinada por liofilização em um liofilizador modelo Freeze Dryer Modulyo (Edwards High Vacuum International, West Sussex, UK) e a partir desta foi diluída à 1% (massa/massa) em ácido acético pH 3,5.

4.3 Extrato Mangostão (*Garcinia mangostana* L.)

Para a obtenção do extrato de mangostão partiu-se da fruta, comprada em comércio local. Das frutas foram retiradas as polpas e as cascas foram lavadas em água corrente para retirar resíduos e então secas em estufa. Uma vez secas as cascas foram quebradas, trituradas, moídas e peneiradas obtendo-se partículas menores que 500 μm .

Parte da massa foi submetida à extração através de refluxo em metanol, assim como descrito em literatura^{59,60,61}, utilizando metanol 70% e temperatura constante de 50°C. Após refluxo, foi feita roto-evaporação a temperatura de 40°C, o que resultou numa pasta, esta por sua vez foi submetida à fluxo de ar para a total retirada de metanol e então liofilizada, resultando no extrato de mangostão em pó que foi utilizado em todas etapas.

4.4 Preparação dos Géis e Scaffolds

As misturas foram preparadas através dos géis de quitosana e de colágeno. A quitosana foi solubilizada em ácido acético (HAc) 1% (volume/volume) à uma concentração de 2% (massa/volume), nomeando-a de Q e utilizou-se a solução de colágeno 1% (massa/massa), denominado de C, os biopolímeros foram misturados nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1 em massa, respectivamente e obtendo os géis QC11, QC21 e QC31.

A partir das blendas foram feitas as misturas com o extrato de mangostão (denominado pela sigla M), adicionado com auxílio de uma solução metanol/HAc (1:9). Foi adicionado o extrato de mangostão em diferentes teores (10, 20 e 30%) em relação à massa seca total da quitosana e do colágeno com agitação até que estivessem completamente homogeneizados obtendo as misturas QC11M10, QC11M20, QC11M30, QC21M10, QC21M20, QC21M30, QC31M10, QC31M20 e QC31M30.

Da mesma maneira, foram feitas as misturas de quitosana:mangostão e colágeno:mangostão. Às blendas sem mangostão adicionou-se o mesmo volume da solução de metanol e ácido acético adicionado àquelas que continham o extrato, sendo nomeadas QM0, CM0, QC11M0, QC21M0 e QC31M0.

Para obtenção dos *scaffolds* as misturas foram colocadas em moldes de Teflon®, congeladas em N_{2(l)} e posteriormente liofilizadas.

A neutralização dos *scaffolds* foi feita colocando-os em dessecadores com vapor de amônia por um período de 2 h, e sendo posteriormente submetidos à fluxo de ar até remover o excesso de amônia, sendo então armazenados e rotulados.

4.5 Caracterização dos Materiais.

A caracterização dos materiais foi feita com diferentes técnicas. No caso dos *scaffolds* foram feitos ensaios de intumescimento, ensaios de liberação do extrato, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e técnicas de análise térmica através de calorimetria exploratória diferencial (DSC) para amostras de colágeno. Ainda se caracterizou filmes das misturas e o extrato através de espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR), e determinaram-se as propriedades reológicas dos géis.

4.5.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

Os espectros foram obtidos de duas maneiras. Para a caracterização do extrato o espectro foi feito em KBr_(s), previamente seco e com grau de pureza necessário para tal análise. As misturas foram analisadas em filmes, preparados por método de *casting* em formas de teflon® e secos sob fluxo de ar e posteriormente colocados na presença de KOH_(s) amostras sem extrato e com 30% de extrato foram usadas para verificação de incorporação de extrato. O equipamento utilizado foi um

FT-IR Shimadzu IR Affinity – 1 (Tokyo, Japan), na região de $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$, com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 scans.

4.5.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A medida de calorimetria exploratória diferencial, DSC, é uma técnica de análise térmica pela qual pode se determinar eventos térmicos como transição vítrea, cristalinização e temperatura de desnaturação, através de um aumento controlado de temperatura. Através desta técnica é possível determinar a temperatura de desnaturação da hélice tripla colagênica, uma transição endotérmica, a partir do ponto médio da inflexão da curva (Figura 12)

Figura 12 - Curva DSC demonstrando a determinação da temperatura de desnaturação.

Fonte: Adaptado de LOCILENTO, D. A., 2012⁶²

As amostras em forma de *scaffold* de colágeno e colágeno contendo o extrato de mangostão nas três concentrações testadas em suas formas neutralizadas. Para as demais amostras a análise por DSC para a determinação de ponto de desnaturação se mostrou inviável devido à natureza das amostras que continham baixo teor de colágeno.

Ensaio de calorimetria exploratória diferencial foram feitos utilizando-se um DSC-2010 (TA Instruments, New Castle, USA) com variação de $5-120^\circ\text{C}$, em cadinhos herméticos de alumínio, com fluxo de nitrogênio (80 mL min^{-1}) a razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ e massas entre 15-20 mg.

4.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A MEV é uma técnica instrumental muito utilizada para caracterização morfológica de amostras sólidas, como *scaffolds*, devido à sua capacidade de aumento óptico com alta resolução, permitindo imagens com foco e aparência tridimensional.

As fotomicrografias foram obtidas a partir das amostras não neutralizadas tanto em sua superfície quanto para um corte transversal, colocadas em *stubs* de alumínio por meio de uma fita condutora de carbono e em suas bordas aplicava-se uma pequena camada de tinta prata, sendo recobertas com uma camada de ouro de 6 nm de espessura em um metalizador Coating System BAL-TEC MED 020 (BAL-TEC, Liechtenstein, Germany) com pressão na câmara de $2,00 \times 10^{-2}$ mbar, corrente de 60 mA e taxa de deposição de $0,60 \text{ nm s}^{-1}$, possibilitando a análise de suas superfícies. Utilizou-se o equipamento ZEISS LEO 440 (Cambridge, England) com detector OXFORD (model 7060), operando com feixe de elétrons de 20 kV. Para medição do diâmetro médio de Ferret (média das distâncias entre linhas paralelas tangentes à projeção do poro nos eixos x e y) para os poros e tamanho médio de canais foi utilizado o *software Image J* em fotomicrografias com aumento de 500 vezes.

4.5.4 Ensaios de Intumescimento

Os ensaios de intumescimento foram realizados para se avaliar e estimar a capacidade de cada *scaffold* de absorver líquidos para o caso utilizado um tampão ácido acético/acetato a um pH 5,12, que é um pH próximo ao encontrado na pele. Para os ensaios foram feitas previamente pesagens das amostras neutralizadas secas, então a amostra era alocada em recipiente contendo 10 mL de tampão à temperatura ambiente, e em tempos pré-determinados a amostra era então retirada, e o excesso de líquido era removido com auxílio de pedaços de papel de filtro com tamanhos padronizados (2,0 x 2,0 cm). O processo foi feito em triplicata para cada amostra. Com os dados coletados a absorção de líquido foi calculada pela equação 6, e obtendo-se a curva de absorção x tempo.

$$\% \text{ Absorção} = \frac{((\text{massa matriz reidratada}) - (\text{massa matriz liofilizada})) \times 100}{(\text{massa matriz liofilizada})} \quad (6)$$

4.6 Ensaios de Liberação de Extrato

O ensaio de liberação foi realizado no mesmo meio tampão utilizado para o ensaio de intumescimento, no entanto foi utilizada uma temperatura controlada de 36,5°C a fim de simular a temperatura do corpo humano e uma agitação constante, ambos controlados por um banho termostático Dubnoff, da Tecnall® (Piracicaba/SP, Brasil). Os *scaffolds* foram inicialmente pesados e então colocados em frascos contendo 25 mL do tampão pré-climatizado e em tempos pré-determinados retirou-se alíquotas que foram analisadas em 280 nm um espectrofotômetro de UV-Visível da HITACHI modelo U-3000 (Tokyo, Japan), interpolados em uma curva de calibração previamente feita com o extrato nas mesmas condições. Assim obteve-se a quantidade de extrato liberada para cada amostra.

Os ensaios foram feitos apenas para *scaffolds* das misturas com as diferentes concentrações de extrato, em triplicata.

4.7 Determinação de Propriedades Reológicas

A fim de se estudar uma correlação entre estrutura e propriedades das misturas antes e após a adição de extrato nas diferentes concentrações utilizadas foram realizados ensaios reológicos em reômetro AR1000N, da TA Instruments (New Castle, USA), com geometria cone/placa de 20 mm de diâmetro, ângulo de 2° e *gap* de 69 µm.

Para tal, foram performados ensaios de fluxo:

- Através da variação da taxa de cisalhamento de 0,05 a 150 s⁻¹ à 25°C para se determinar o comportamento da viscosidade quando submetida à cisalhamento.

Na Figura 13, é exposto todo o procedimento experimental em forma de fluxograma.

Figura 13 - Fluxograma do procedimento experimental

Fonte: Autoria Própria

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos Materiais Iniciais, Misturas e *Scaffolds*.

A quitosana foi obtida a partir de gládios de lula (Figura 14) pelos processos de desproteinização e desacetilação parcial da quitina conforme citado.

Para obtenção da quitina, foi feito o processo de desproteinização, que quebra das cadeias proteicas presentes no gládio, e a etapa de desacetilação da β -quitina feita em forte meio alcalino, sendo capaz de substituir os grupos aceto amino por grupos amino, não em totalidade, mas sim de forma parcial, caracterizando o polímero final como um heteropolímero. A quitosana final é um pó branco, e teve um rendimento mássico de 30,5%.

Figura 14 - Fotografia digital da quitosana obtida

O gel de colágeno obtido (Figura 15) possuía um aspecto gelatinoso e incolor e translucido. Sua concentração final foi de 1,7% (massa/massa), que foi diluído à uma concentração de 1% (massa/massa) quando necessário.

Figura 15 - Fotografia digital do gel de colágeno obtido

O extrato de mangostão, obtido das cascas utilizadas para o processo de extração teve um rendimento mássico de 21,4%, apresentando-se em forma de pó com coloração alaranjada (Figura 16).

Figura 16 - Fotografia digital do pó do extrato de mangostão

Os géis de quitosana:colágeno, foram preparadas em proporções de 1:1, 2:1 e 3:1, e tanto dos biopolímeros de base quanto das blendas, possuíam aspecto translúcidos, e seus *scaffolds* apresentavam coloração esbranquiçada.

Já ao se adicionar o extrato de mangostão nas diferentes concentrações foi possível observar uma mudança na coloração de seus géis, ficando mais amarelados, e tornando-se mais escuros à medida que se aumentou a concentração do extrato.

Os *scaffolds* das amostras sem e com extrato são mostrados nas figuras 17 e 18 e pode-se notar a mudança de coloração tanto nos *scaffolds* dos biopolímeros quanto das misturas.

Figura 17 - Fotografias digitais dos *scaffolds* com variação de extrato: (A) Quitosana; (B) Colágeno

Figura 18 - Fotografias digitais dos *scaffolds* com variação de extrato: (A) QC11; (B) QC21; (C) QC31

5.2 Caracterização

5.2.1 Caracterização da Quitosana

5.2.1.1 Grau de Acetilação (G.A)

O grau de acetilação determinado pelo método de titulação condutimétrica resultou na curva de titulação (Figura 19) e pode ser examinada por três retas distintas. A primeira porção da curva possui um caráter decrescente de condutividade no meio, que representa a neutralização do ácido clorídrico da solução pelo $\text{NaOH}_{(\text{aq})}$ ocorrendo uma queda abrupta nos valores de condutividade. A segunda reta consiste na desprotonação dos grupos amino da quitosana e um aumento sutil na condutividade da solução titulada. A terceira reta, de caráter ascendente, sendo pelo excesso de base em solução, voltando a ter uma grande quantidade de íons livres em solução e resultando na elevação da condutividade do meio.

Figura 19 - Curva de titulação condutimétrica da quitosana

Estas variações na condutividade da solução geram através de extrapolação matemática das retas, dois pontos de inflexão (v_1 e v_2), estes mostram o volume ($v_2 - v_1$) da solução de hidróxido que é necessário para a neutralização dos grupos amino protonados da quitosana em solução.

Com os valores de v_1 e v_2 e através da equação 2 pode-se calcular o grau médio de acetilação para a quitosana obtida que foi de $5,5\% \pm 1,1$, sendo o grau de desacetilação de $94,5 \pm 1,1 \%$.

5.2.1.2 Massa Molar Média

Pelo método de viscosimetria capilar obtiveram-se os diversos tempos de escoamento das soluções de quitosana e do tampão utilizado para dissolvê-la, resultando em um gráfico da viscosidade reduzida versus concentração de quitosana no tampão ácido acético/acetato de sódio (Figura 20) e pela extrapolação da reta à concentração zero, obteve-se a viscosidade intrínseca $[\eta]$ sendo o valor encontrado de 1799,17.

Como mencionado na parte experimental a massa molar média está relacionada à viscosidade intrínseca $[\eta]$ pela equação de Mark-Houwink-Sakurada (Equação 3), e as constantes K e α são tabeladas para um dado sistema polímero/GA/solvente/temperatura, sendo K utilizado com valor de 0,082 e α no valor de 0,76. Estas constantes estão relacionadas às interações polímero/solvente (quanto menor K , maior solvatação da molécula) e com a geometria da molécula (maiores valores indicam cadeias mais rígidas) respectivamente¹⁷. Por estes dados tabelados e pela utilização da Equação 4 o valor encontrado para a massa molar média foi de $5,1 \times 10^5 \text{ g mol}^{-1}$, sendo um valor condizente com o encontrado no grupo de bioquímica e biomateriais, e em literatura⁶³

Figura 20 - Curva η_{sp}/C x Concentração, para cálculo de massa molar da quitosana

5.2.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho (FT-IR)

Através da espectroscopia na região do infravermelho obtiveram-se os espectros do extrato, dos biopolímeros de base (quitosana e colágeno) e das misturas formadas, com 0 e 30% de extrato.

A Figura 21, mostra o espectro obtido em $\text{KBr}_{(s)}$ para o extrato de mangostão na faixa de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Figura 21- Espectro de FTIR do extrato de mangostão

O espectro para o extrato de mangostão mostra bandas em regiões como $1450\text{-}1617\text{ cm}^{-1}$ de deformações $\text{C}=\text{C}$ em anéis aromáticos, $1170\text{-}1082\text{ cm}^{-1}$ de deformação vibracional de anel piranosídico e na região $900\text{-}650\text{ cm}^{-1}$ bandas de baixa intensidade de ligações C-H aromáticas. Ao ser comparado com o espectro de α -mangostim⁶⁴ isolado (Figura 22), observa-se diversas similaridades, assim como quando se compara as bandas destacadas com as encontradas em literatura (Tabela 3), o que é esperado, uma vez que o α -mangostim é a principal xantona encontrada no extrato de mangostão⁴⁷, algumas das bandas se mostram deslocadas ao se comprar com o espectro padrão, o que era esperado devido à interação entre outros compostos presentes no extrato

Na Figura 22 é possível ver o espectro de α -mangostim obtido em literatura, na faixa de $4000\text{-}400\text{ cm}^{-1}$.

Tabela 3 - Valores de comprimento de onda de grupos de α -mangostão⁶⁴

Número de onda (cm^{-1})	Grupo
2860; 2920	Vibração C-H
1460; 1600	Vibração C=C aromático
1280	Vibração C-O-C de $-\text{OCH}_3$ de anel benzenico
1080; 1190	Vibração C-O ligados à hidroxilas
1080; 1190	Vibração C-O-C
1280; 1640	Vibração C=O de cetonas aromáticas
850	Vibração C-H aromáticos
667	Vibração O-H

Figura 22 - Espectro de FTIR de α -mangostim em literatura⁶⁵

Fonte: Adaptado de Aisha, A.F.A

Os espectros de FT-IR da quitosana, colágeno e suas misturas estão mostrados na Figura 23. O espectro para quitosana mostrou-se condizente com o esperado e com o que é normalmente obtido dentro dos ensaios do grupo, como em 1638 indicando grupos C=O sugerindo uma quitosana parcialmente desacetilada, em 1558 e 1410 cm^{-1} sendo de deformação N-H e de vibrações $-\text{OH}$ de grupos de álcoois primários³⁵.

Figura 23 - Espectro de FTIR dos filmes de Q (■), Col (■), QC11 (■), QC21 (■) e QC31 (■)

O espectro de colágeno mostrou bandas características como na região de 3300 cm⁻¹, de deformações O-H e N-H, banda em 1653 cm⁻¹, referente a Amida I (característica de deformação axial de ligações C=O e C-N), em 1558 cm⁻¹, de amida II (provinda principalmente de deformações angulares de ligações N-H e em menores proporções de deformações axiais C-N e C-C), de 1456 cm⁻¹ do anel pirrolidínico e em 1238 de Amida III (dependente tanto das condições experimentais quanto de propriedades naturais de cadeias laterais e ligações de hidrogênio)⁶⁶.

Nas misturas foi possível observar bandas de seus materiais de origem (Figura 23), como em 1653 cm⁻¹ provinda do colágeno e na região próxima a 1090 cm⁻¹ provindas da quitosana, mas deslocados devido às interações, por exemplo as eletrostáticas, ocorridas ao se formarem as misturas³⁴.

Para uma comparação das amostras com adição do extrato, foram utilizados os espectros nos comprimentos de onda de 2000-400 cm⁻¹. Os espectros das amostras de 0% e 30% de extrato foram sobrepostas para facilitar a visualização de alterações estruturais caso ocorressem.

Os espectros comparativos de colágeno sem extrato e com 30% de extrato são mostrados na Figura 24.

Figura 24 - Espectro de FTIR na região de 2000 a 400 cm^{-1} dos filmes de Q (■), Col (■), QC11 (■), QC21 (■) e QC31 (■) sem (contínua) e com 30% de extrato (tracejada).

Ao se sobrepor os espectros das amostras de colágeno com 0 e 30% de extrato pode se observar que não houve alterações significativas nos espectros, não ocorrendo formações de novas ligações. Os sinais de extrato de mangostão não se sobressaíram no espectro obtido uma vez que há uma sobreposição das faixas de absorção dos componentes.

Para os espectros da matriz de quitosana com 0 e 30% de extrato pode-se observar o mesmo efeito que nas matrizes colagênicas, não apresentando mudanças significativas nos espectros devido à sobreposição de regiões das bandas.

Para os espectros das blendas QC11, QC21 e QC31 com 0 e 30% de extrato ocorreu o mesmo efeito que dos biopolímeros separadamente, o que era esperado, uma vez que os espectros apenas das blendas já demonstravam uma grande quantidade de possíveis bandas na região de 2000-400 cm^{-1} , que poderiam e sobrepor às bandas do extrato.

Os espectros de quitosana, colágeno e extrato de mangostão proveram um maior conhecimento da caracterização dos materiais de base, em destaque o espectro de mangostão, o qual se assemelhou ao espectro de α -mangostão, dando indício que este pode ser utilizado como um parâmetro de comparação em outros ensaios. Já os espectros obtidos das amostras sem e com 30% de extrato apesar de não ser possível visualizar uma alteração no espectro ou picos específicos do extrato mostrando sua

incorporação é possível se afirmar que ela ocorreu ao se observar a coloração dos filmes que se tornaram amarelados, como mostrados nas Figuras 25 a 29.

Figura 25 - Fotografia digital dos filmes de quitosana com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato

Figura 26 - Fotografia digital dos filmes de colágeno com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato

Figura 27 - Fotografia digital dos filmes de QC11 com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato

Figura 28 - Fotografia digital dos filmes de QC21 com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato

Figura 29 - Fotografia digital dos filmes de QC31 com 0% (esquerda) e 30% (direita) de extrato

5.2.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Na Figura 30 são mostradas as curvas DSC para as quatro amostras de colágeno 96h, com e sem mangostão.

Figura 30 - Curvas DSC dos *scaffolds* de colágeno CM0 (—); CM10 (—); CM20 (—) e CM30 (—)

Pelas curvas pode-se notar o efeito do extrato de mangostão, o qual promoveu um deslocamento das Td para valores maiores, mostrando um aumento na temperatura de desnaturação ao se aumentar sua concentração (Tabela 4). Nas concentrações de 10 e 20% de mangostão nota-se uma tendência ao aumento na Td, já para a concentração de 30%, nota-se um efeito pronunciado de aumento na Td devido à um efeito de reticulação causado pelo extrato, possivelmente devido à ligações de hidrogênio promovido pela grande presença de grupamentos OH no extrato.

Pelo grande uso de colágeno há uma necessidade para a procura de melhores agentes reticulantes para diferentes demandas, são muito usuais agentes como glutaraldeído e compostos epóxi, porém estes possuem a desvantagem de apresentar toxicidade, assim devido às suas propriedades e capacidade de reticular o colágeno, o extrato de mangostão pode se tornar uma escolha interessante como agente reticulante.

Tabela 4 - Temperatura de desnaturação (T_d , °C) para cada *scaffold*.

Amostra	T_d (°C)
Colágeno	41,9
CM10	43,2
CM20	44,8
CM30	51,9

Após a neutralização das amostras, foi repetido o procedimento, os resultados então mostrados na Figura 31.

Figura 31 - Curvas DSC para os *scaffolds* de colágeno neutralizados CM0 (—); CM10 (—); CM20 (—) e CM30 (—)

A partir das curvas foi possível notar que as amostras neutralizadas também tiveram um deslocamento para maiores valores de T_d , como mostrado na Tabela 5.

Tabela 5 - Temperatura de desnaturação (Td, °C) para cada *scaffold*.

Amostra	Td (°C)
Colágeno	42,7
CM10	44,1
CM20	47,4
CM30	48,4

Assim como para as amostras não neutralizadas, é possível observar um aumento na Td com o acréscimo de extrato, sendo mais pronunciado o efeito em maiores concentrações de extrato.

5.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As fotomicrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura permitem uma análise tanto de superfície quanto transversal dos *scaffolds* com um intuito de caracterizar micro estruturalmente o material.

Foram obtidas fotomicrografias para superfície e na transversal dos *scaffolds*. Utilizou-se o software ImageJ® nas fotomicrografias com aumento de 500x, a fim de analisar o tamanho médio dos poros, através do diâmetro médio de Ferret, e tamanhos de canais.

Devido ao grande número de amostras, serão analisados os materiais de maneira a mostrar as fotomicrografias das superfícies e de seus canais separadamente, tomando como análise inicial os biopolímeros separadamente e depois suas misturas, cada um com a variação de concentração de extrato para então comparar o efeito da adição de extrato.

As Figuras 32 e 33 mostram as fotomicrografias obtidas para os *scaffolds* de quitosana com o aumento progressivo da concentração de extrato.

Figura 32 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos *scaffolds* de quitosana: (A) QM0 (B) QM10 (C) QM20 (D) QM30. Aumento de 500x

Figura 33 - Fotomicrografias por MEV da secção transversal dos *scaffolds* de quitosana: (A) QM0 (B) QM10 (C) QM20 (D) QM30. Aumento de 500x

Pelas fotomicrografias das amostras de quitosana com variação de extrato de mangostão, a amostra com 10% de extrato aparenta ter sua superfície com menos poros que as demais. No entanto, os dados obtidos pelo software e mostrados na Tabela 6 observa-se que a área dos poros teve pouca variação, assim apesar de visualmente ser menos porosa, seus poros permaneceram com áreas similares.

Essa tendência de diminuição na porosidade pode estar relacionada a uma interação entre os grupos amino da quitosana, que em meio ácido estão protonados, e os grupos hidroxilas das xantonas presentes no extrato.

Quanto as secções transversais podem ser observadas seus canais, que tanto visualmente quanto em termos numéricos apesar não ser possível se afirmar que houve mudança significativa com a adição de extrato, pode-se observar uma tendência de aumento de canais até uma concentração de 30%.

Tabela 6 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos *scaffolds* de quitosana

Amostra	Diâmetro médio de poros (μm)	Canais (μm)
QM0	46,1 $\pm$ 10,7	47,1 $\pm$ 18,3
QM10	40,4 $\pm$ 9,7	55,6 $\pm$ 21,4
QM20	48,3 $\pm$ 13,3	55,8 $\pm$ 13,5
QM30	40,5 $\pm$ 9,5	53,7 $\pm$ 10,6

As Figuras 34 e 35 mostram as fotomicrografias obtidas para os *scaffolds* de colágeno.

Figura 34 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos *scaffolds* de colágeno: (A) CM0 (B) CM10 (C) CM20 (D) CM30. Aumento de 500x.

Figura 35 - Fotomicrografias por MEV das secções transversais dos *scaffolds* de colágeno:(A) CM0 (B) CM10 (C) CM20 (D) CM30. Aumento de 500x

Pelas fotomicrografias das amostras de colágeno com variação de extrato de mangostão observa-se que em sua superfície ocorre uma diminuição da quantidade de poros à medida que se aumenta a concentração de extrato. A Tabela 7 mostra os diâmetros dos poros obtidas através do software, e assim como observado qualitativamente nas imagens, ocorre uma drástica redução da área dos poros com a adição e aumento na concentração de extrato. Essa diminuição chega a 9 vezes quando se observa as amostras sem extrato e com 30% de extrato.

Já na secção transversal, para os canais, nota-se que para a amostra apenas de colágeno há formação de canais delineados. No entanto, para as amostras contendo extrato de mangostão não se observa um padrão no interior das amostras, e estes não aparentavam uma formação de canais como é normalmente observado nestes. Ainda, para a amostra CM30 ocorre um aparente estriamento com algumas estruturas similares a poros de pequeno tamanho, tais fatores resultaram em uma não medição do tamanho dos canais.

Tabela 7 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos *scaffolds* de colágeno

Amostra	Diâmetro médio de poros (μm)	Canais (μm)
CM0	96,5 $\pm$ 16,2	--
CM10	60,3 $\pm$ 5,7	-
CM20	39,1 $\pm$ 7,5	-
CM30	36,6 $\pm$ 8,4	-

No colágeno tem-se grupos amino também protonados juntamente com a existência de grupos carboxílicos que em meio ácido estão na forma desprotonada e neste caso um efeito grande de reticulação como observado por DSC.

As Figuras 36 e 37 mostram as fotomicrografias obtidas para os *scaffolds* da mistura QC11.

Figura 36 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos *scaffolds*: (A) QC11M0 (B) QC11M10 (C) QC11M20 (D) QC11M30. Aumento de 500x

Figura 37 - Fotomicrografias por MEV das secções transversais dos *scaffolds*: (A) QC11M0 (B) QC11M10 (C) QC11M20 (D) QC11M30. Aumento de 500x

Para as amostras da mistura QC11, as fotomicrografias de superfície mostram que a presença de extrato na concentração de 10% diminui a quantidade e o tamanho dos poros (Tabela 8). Ao se aumentar a concentração de extrato ocorre um aumento do tamanho de poros, apesar de visualmente aparentar menos poros em relação à amostra sem mangostão.

Já para a análise da secção transversal desta mistura, através das imagens pode-se observar que em todas há a presença de canais, diferentemente das amostras de colágeno, e observa-se um comportamento mais semelhante às amostras de quitosana, onde os canais apresentam tamanhos semelhantes, e apesar de seus valores absolutos diferirem, seus erros indicam que há uma chance de sobreposição em seus tamanhos, sendo mais plausível assumir que estes são próximos.

Tabela 8 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos *scaffolds* de QC11

Amostra	Diâmetro médio de poros (μm)	Canais (μm)
QC11	53,6 $\pm$ 13,3	49,9 $\pm$ 26,5
QC11M10	21,6 $\pm$ 6,0	64,9 $\pm$ 7,1
QC11M20	44,6 $\pm$ 8,5	90,9 $\pm$ 30,4
QC11M30	53,3 $\pm$ 9,5	53,3 $\pm$ 8,5

As Figuras 38 e 39 mostram as fotomicrografias obtidas para os *scaffolds* da mistura QC21.

Figura 38 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos *scaffolds*: (A) QC21M0 (B) QC21M10 (C) QC21M20 (D) QC21M30. Aumento de 500x

Figura 39 - Fotomicrografias por MEV das seções transversais *scaffolds*: (A) QC21M0 (B) QC21M10 (C) QC21M20 (D) QC21M30. Aumento de 500x

No caso da mistura QC21 assim como em QC11 há uma redução mais proeminente para a concentração de 10% de extrato e ao aumentar a concentração

do extrato o tamanho médio de poros volta a aumentar. No entanto em comparação à blenda QC11, seus tamanhos médios de poros são muito maiores (Tabela 9).

Tabela 9 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos *scaffolds* de QC21.

Amostra	Diâmetro médio de poros (μm)	Canais (μm)
QC21	70,5 $\pm$ 10,9	99,7 $\pm$ 17,7
QC21M10	29,3 $\pm$ 9,2	38,1 $\pm$ 13,0
QC21M20	52,3 $\pm$ 14,3	43,3 $\pm$ 23,3
QC21M30	99,5 $\pm$ 10,6	38,3 $\pm$ 10,5

Já para a secção transversal diferentemente de QC11, a mistura QC21 é possível ver através da progressão das imagens que a adição de extrato à menor concentração aparenta apenas diminuir o tamanho de seus canais. Apesar de um aparente aumento do tamanho dos canais em função do aumento da concentração, os valores parecem ser muito semelhantes, independente da concentração de extrato.

As Figuras 40 e 41 mostram as fotomicrografias obtidas para os *scaffolds* da mistura QC31.

Figura 40 - Fotomicrografias por MEV das superfícies dos *scaffolds*: (A) QC31M0 (B) QC31M10 (C) QC31M20 (D) QC31M30. Aumento de 500x

Figura 41 - Fotomicrografias por MEV das secções transversais dos *scaffolds*: (A) QC31M0 (B) QC31M10 (C) QC31M20 (D) QC31M30. Aumento de 500x

A partir das fotomicrografias para os *scaffolds* QC31 sem extrato observou-se que a área média dos poros aumenta com a o aumento de proporção de quitosana. Já com a presença do extrato, estes *scaffolds* possuem a mesma tendência que os demais, com uma diminuição de área de poros (Tabela 10). Contudo, o aumento da concentração do extrato apenas diminui a área média dos poros, não ocorrendo um aumento dessa área como nos casos anteriores.

Para as secções transversais, há um inicial decaimento do tamanho dos canais, mas aumentam juntamente com acréscimo de extrato.

Tabela 10 - Valores de tamanhos médio de poros e canais dos *scaffolds* de QC31.

Amostra	Diâmetro médio de poros (μm)	Canais (μm)
QC31	$90,7 \pm 14,4$	$76,5 \pm 16,4$
QC31M10	$53,4 \pm 14,5$	$33,1 \pm 8,5$
QC31M20	$69,9 \pm 18,9$	$47,8 \pm 8,8$
QC31M30	$51,1 \pm 11,5$	$61,3 \pm 9,8$

A Figura 42 mostra os valores de poros e canais para todas as amostras para melhor visualização da variação tanto nos tamanhos dos poros quanto dos canais.

Figura 42 - Valores de poros e canais com variações de extrato: (A) Tamanho médio de poros com variação de extrato; (B) Tamanho médio de canais com variação de extrato. Para os *scaffolds* Q (■), Col (■), QC11 (■), QC21 (■) e QC31 (■)

Assim, para uma análise geral dos *scaffolds* QC, observou-se que tanto para as superfícies quanto secções transversais, não há um comportamento que se possa modelar para todos, apenas comportamentos distintos para cada espécie de *scaffold* utilizado.

É possível notar que para os *scaffolds* QC11 e QC21, há uma tendência de aumento no tamanho médio de poros para maior quantidade de extrato e sabe-se que materiais que se demonstra um aumento médio na porosidade, promove-se a absorção de líquidos fisiológicos, crescimento celular, entre outros⁶⁷.

5.2.5 Ensaios de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi utilizado para se determinar o comportamento dos *scaffolds* em meio tamponado, mimetizando assim uma situação de reidratação do biomaterial em lesões cutâneas.

Neste processo é importante observar o tempo necessário para a quantidade de fluido que é capaz de absorver. Este processo ocorre através de uma hidratação inicial do material, que se liga diretamente à área superficial do *scaffold*, hidratando grupamentos mais externos e havendo um intumescimento do material, permitindo que mais moléculas do fluído adentrem ao *scaffold*, preenchendo espaços entre as cadeias poliméricas e poros. No entanto da mesma maneira em que há uma força osmótica de penetração do fluído, há uma força de repulsão de fluído dada pela estrutura do *scaffold*, a qual tende a expulsar o fluído a fim de manter sua estrutura. No fim do processo há um equilíbrio entre as forças, resultando em um máximo de absorção do *scaffold*⁶⁹. O comportamento de absorção pode ser influenciado por propriedades como ligações de reticulação, polaridade e hidrofiliicidade/hidrofobicidade dos materiais.

As Figuras 43, 45, 47, 49 e 51 mostram o comportamento dos *scaffolds* em relação à absorção em um meio de solução tampão ácido acético/acetato a um pH de aproximadamente 5, seguidos de imagens dos *scaffolds* 24 horas após o ensaio (Figuras 44, 46, 48, 50 e 52).

Pode-se observar que os *scaffolds* de quitosana sem extrato conseguiram uma absorção máxima próxima a 1300%, tendo uma rápida ascensão inicial atingindo um máximo com um leve decaimento (Figura 43). Este comportamento deve-se à quitosana ser solúvel em meios levemente ácidos, isto incluindo tampões, no caso

deste trabalho cujo pH foi de 5,12, sendo o suficiente para provocar a dissolução do *scaffold*, não sendo possível obter uma fotografia digital após 24h (Figura 44).

Figura 43 - Curvas de absorção para os *scaffolds*: QM0 (■), QM10 (■), QM20(■) e QM30(■)

Figura 44 - Fotografias digitais dos *scaffolds* de quitosana 24 h após o término do ensaio de intumescimento: QM10; QM20 e QM30

Para as amostras com extrato observou-se que em todas as quantidades de extrato adicionadas houve uma maior absorção de fluido quando comparado à amostra sem extrato, sendo a amostra QM10 a com maior capacidade de absorção,

chegando acima de 7000-7500%, já as amostras QM20 e QM30 mostraram uma absorção muito semelhante.

A absorção destes *scaffolds* ocorreu rapidamente, abaixo de 5 minutos para QM20 e QM30, e por volta de 10 minutos para QM10. No entanto após 24 horas os *scaffolds* de QM10 encontravam-se fragmentados, o que não ocorreu para as maiores concentrações de extrato. Este comportamento deve estar atrelado à reticulação que o extrato promove na quitosana que é mais efetivo para os *scaffolds* com 20 e 30 % de extrato.

Ao se finalizar o teste de intumescimento, as matrizes foram deixadas em repouso por 24h, e então foram submetidas a um teste qualitativo de compressão e manuseio. Os *scaffolds* QM0 haviam se solubilizado por inteiro, QM10 como visto em foto fragmentaram-se, apenas mantendo um aspecto gelatinoso e amorfo.

Os *scaffolds* QM20 mantiveram sua estrutura original, no entanto a qualquer tentativa de manipulação se assemelhava a um fluido muito viscoso. Já QM30 mostraram-se mais resistentes que as demais, apesar de ainda se fragmentarem ao se aplicar um pouco de pressão, os *scaffolds* conseguiram manter seu formato e apresentaram certa resistência mecânica.

Com base nos resultados dos ensaios de intumescimento agora para os *scaffolds* de colágeno, sem e com a adição de extrato (Figura 45), pode-se observar que os *scaffolds* sem extrato obtiveram uma maior absorção do que aqueles com adição de extrato estando próximo a 2700%. E que quanto maior a quantidade de extrato menor foi a capacidade de absorção dos *scaffolds*, sendo muito inferiores àqueles sem extrato, com aproximadamente 2100% para CM10 e 600% para CM20 e CM30.

Os *scaffolds* apresentaram uma absorção estabilizada em aproximadamente 10 minutos, o acréscimo de extrato nos *scaffolds* dificulta a permeação de fluídos, possivelmente devido às reticulações causadas em maior quantidade, como visto nos ensaios térmicos.

Ao término do ensaio e passadas 24h dos *scaffolds* nos fluídos, executou-se o teste qualitativo de compressão, e como visto nas fotos digitais (Figura 46) apresentaram um maior enrijecimento em maiores concentrações de extrato mostrando-se, portanto mais resistentes à compressão. Os *scaffolds* mostraram-se capazes de reabsorver líquidos, no entanto mais lentamente do que os demais *scaffolds* testados.

Figura 45 - Curvas de absorção para as amostras de colágeno: CM0 (■), CM10 (■), CM20 (■) e CM30 (■)

Figura 46 - Fotografias digitais dos *scaffolds* de colágeno após o término do ensaio de intumescimento: CM0; CM20

CM0

CM20

A Figura 47 mostra os resultados de intumescimento para os *scaffolds* QC11 sem e com extrato de mangostão, pode-se observar um comportamento de absorção semelhante ao dos *scaffolds* de colágeno, onde com o acréscimo de extrato há uma diminuição da quantidade de fluido absorvida. Os *scaffolds* QC11M0 demonstraram uma grande capacidade de absorção, em torno de 5500%, e equilíbrio alcançado próximo aos 5 minutos, no entanto estes *scaffolds* demonstravam-se muito frágeis após o ensaio, e ao se manuseá-los facilmente se fragmentavam.

Para os *scaffolds* com extrato notou-se que à medida que se aumenta a concentração do extrato menor é a capacidade de absorção de fluído, semelhante ao comportamento dos *scaffolds* de colágeno, mas de maneira muito mais distinta para os *scaffolds* QC11M20 e QC11M30.

Todos os *scaffolds* tiveram um tempo de absorção máximo próximo a 5 minutos, a matriz QC11M10 teve um máximo de absorção por volta de 4500%, a com 20% de extrato obteve uma absorção de aproximadamente 3800% e a de 30% com menor absorção em torno de 3100%.

Os *scaffolds* de QC11 se mostraram de grande interesse devido ao comportamento que apresentaram após o ensaio. Apesar dos *scaffolds* sem extrato possuírem uma grande fragilidade, os com extrato mostraram-se altamente resistentes, ao se fazer um ensaio qualitativo de compressão notando-se que ao se comprimir (manualmente) os *scaffolds* não se fragmentavam, e conseguiam retomar a forma hidratada em poucos segundos (como mostrado nas fotografias digitais na Figura 48, sendo capazes de resistir à várias compressões.

Figura 47 - Curvas de absorção para as amostras de quitosana:colágeno(1:1): QC11M0 (■), QC11M10 (■), QC11M20(■) e Q C11M30(■)

Figura 48 - Fotografias digitais dos *scaffolds* após o término do ensaio de intumescimento: QC11M0; QC11M10; QC11M20 e QC11M30

Para os *scaffolds* da mistura QC21 (Figura 49) nota-se um comportamento similar ao de QC11 e dos *scaffolds* de colágeno, com uma diminuição de porcentagem de absorção com o aumento da concentração de extrato.

Assim como anteriormente os *scaffolds* sem extrato (QC21M0) obtiveram os maiores valores de absorção, em torno de 5000%, e assim como nos *scaffolds* de quitosana sem extrato (QM0) houve uma rápida ascensão com um posterior decaimento na curva de absorção, isto se deve novamente a solubilização do *scaffold*, resultando em perda de massa, assim também não foi possível obter uma fotografia digital dos mesmos, pois estes estavam totalmente solubilizados após 24 h (Figura 50).

Figura 49 - Curvas de absorção para as amostras de quitosana:colágeno (2:1): QC21M0 (■), Q C21M10 (■), Q C21M20(■) e Q C21M30(■)

Da mesma maneira que os *scaffolds* de colágeno e dos QC 11, os *scaffolds* QC21 com adição de extrato mostraram um decaimento na quantidade máxima de absorção, sendo inferior às amostras sem extrato.

Diferentemente dos *scaffolds* QC11 que expressaram uma queda contínua na absorção, com o acréscimo de extrato, os *scaffolds* QC21 mostraram que em todas as concentrações de extrato o resultado encontrado foi próximo a 2600%. Após o ensaio de intumescimento fez-se a mesma avaliação qualitativa de resistência à compressão para os *scaffolds* QC21.

Figura 50 - Fotografias digitais dos *scaffolds* após o término do ensaio de intumescimento:

QC21M10; QC21M20 e QC21M30

Para as concentrações 10 e 20% os *scaffolds* conseguiram manter a forma original, no entanto ao comprimi-los estes cediam à pressão e rompiam, já a concentração de 30% se mostrou resistente à múltiplas compressões, e conseguindo reabsorver o fluido.

Os *scaffolds* da mistura QC31 (Figura 51) apresentaram um comportamento semelhante ao observado para os QC21, sendo os *scaffolds* sem extrato os que mostram com maior absorção em relação aos com extrato.

As amostras de QC31M0 mostraram um perfil muito semelhante às amostras QM0 possuindo uma absorção mais demorada que as anteriores e um maior controle com relação à perda de massa durante o processo, mesmo perdendo massa devido à solubilidade e pela perda durante contato com o papel pelo processo de remoção de excesso, assim como as amostras de QM0, mesmo com tantos fatores de perda a absorção continuou a subir isto pode ser pela altíssima capacidade de absorção, o qual supera a perda de massa, fazendo com que a absorção tenda apenas a ter um crescimento, diferentemente das demais blends, isto pois a uma proporção 3:1 o efeito da quitosana é predominante neste quesito, e assim como em QC21 e QM0 ocorreu uma total solubilização da amostra ao final de um período de 24h (Figura 52).

Já para as amostras com extrato, o valor de absorção cai drasticamente, assim como visto nas demais misturas, e como em QC21, estas estabilizaram com valores muito próximos (em torno de 3000%).

Figura 51 - Curvas de absorção para as amostras de quitosana:colágeno(3:1): QC31M0 (■), QC31M10(■), QC31M20(■) e QC31M30(■)

Figura 52 - Fotografias digitais dos *scaffolds* após o término do ensaio de intumescimento: QC31M10; QC31M20 e QC31M30

Durante a análise qualitativa de compressão as amostras se comportam assim como em QC21, com as concentrações de 10 e 20% demonstrando uma menor resistência mecânica e se rompendo, já a uma concentração de 30% a matriz se mostrou mais resistente e capaz de reabsorver o fluido, no entanto este ocorria de uma maneira mais lenta que as demais amostras.

A partir dos ensaios de intumescimento foi possível observar algumas correlações com as porosidades das amostras na capacidade de absorção, e em outros a influência entre as interações de extrato e dos componentes.

No caso das amostras de quitosana, onde a superfície mostrava-se mais recoberta apesar de uma medida de porosidade mostrar que a média dos tamanhos de poros foi muito semelhante e a medida de seus canais não mostrou uma variação significativa, as amostras mostram uma grande interação com o extrato, onde a sua adição foi capaz de aumentar a capacidade de absorção em um primeiro momento, e ao se aumentar a concentração este tende a cair, mas ainda acima de patamares sem extrato, ainda se mostraram mais resistentes às maiores concentrações de extrato. Uma diminuição em porcentagem de absorção e um aumento nas qualidades mecânicas pode ser um indicativo de ligações cruzadas.

Já para as amostras de colágeno os resultados dos ensaios de intumescimento são de grande comparação aos resultados de MEV, para as amostras apenas de colágeno tanto canais quanto tamanho de poros diminuía drasticamente com a adição de extrato e aumento de sua concentração, sendo o mesmo comportamento que ocorreu para a absorção de fluido. Tal interação foi presente também para as misturas, onde em seus MEV apresentaram uma tendência à queda de tamanho de poros de tamanho de canais com a adição de extrato e com o aumento de sua concentração, e o perfil no intumescimento foi similar. Como visto em resultados de análises térmicas o extrato é capaz de reticular o colágeno, tal reticulação é ligada diretamente aos tamanhos de canais/poros e a capacidade de absorção das matrizes.

5.2.6 Ensaios de Liberação de extrato

O extrato de mangostão foi obtido a partir de frutos comprados em comércio local, não se sabendo a procedência, nem sendo feito um estudo sobre quantidade fenólica total ou composição do mesmo. No entanto sabe-se que as propriedades

físico-químicas das cascas de mangostão alteram-se tanto por natureza de peculiaridade de cada fruto e dependendo até de seus períodos de safra⁶⁸. Essa alteração ocorre, até na quantidade de antocianinas presente, sendo assim pode-se dizer que cada extrato obtido possui muitas variáveis não se tendo uma padronização de referência. No entanto há estudos da caracterização do principal componente encontrado nos extratos, o α -mangostão⁴⁸, e dentre esses o espectro no ultravioleta A Figura 53, mostra um espectro de α -mangostão (pureza de 97%) em metanol obtido em literatura observando-se dois picos, um em 243,4 nm e outro em 316,4 nm. Além disso, foram testados extratos em solventes semelhantes, como etanol e metanol em diferentes concentrações, havendo pequeno deslocamento nos picos, mas mostrando silhueta muito semelhante ao padrão⁷⁰.

Figura 53 - Espectro no UV-Visível para o padrão de α -mangostão em metanol

Fonte Adaptado de Aisha, A.F.A⁷⁰

A Figura 54 mostra os espectros de diferentes concentrações do extrato obtido em meio de tampão HAc/NaAc pH 5,12, que foi trabalhado, nota-se que há diferença dos picos observados da referência do α -mangostão, sendo encontrados por sua vez os picos em aproximadamente 227 nm e em 280 nm.

Tal deslocamento era esperado uma vez que na técnica de espectroscopia na região de UV-visível diversos fatores podem deslocar picos da mesma substância, como solvente e pH. Em meios diferentes propriedades como polaridade altera o ambiente eletrônico de cromóforos, alterando no comprimento de onda de sua absorção, e o pH pode alterar o equilíbrio químico da substância. Assim o meio trabalhado proveu também dois picos de absorção, no entanto deslocados.

Esses espectros obtidos em diversas concentrações permitiram a construção de uma curva de calibração (Figura 54), utilizada para o ensaio de liberação. Neste caso utilizou-se o pico em 280 nm, pois este permitiu a leitura dentro dos parâmetros de Lambert-Beer.

Figura 54 - (A) Espectros no UV-Visível para diferentes concentrações do extrato; (B) Curva de calibração para o extrato em 280 nm

Os testes de liberação foram realizados para os scaffolds QC11, QC21 e QC31, nas diferentes concentrações de extrato, mostrados na Figura 55.

Figura 55 - Curvas de liberação para as amostras de quitosana:colágeno(1:1), (2:1) e (3:1)
10% (■), 20%(■) e 30%(■) de extrato.

Pelos resultados obtidos podemos observar que os *scaffolds* QC31 tiveram uma liberação de extrato mais rápida que os outros, e que por sua vez QC21 foi mais rápido que QC11, assim sendo, ao se aumentar o teor de quitosana na amostra ocorreu uma liberação mais rápida do extrato. Isto sugere que o extrato está sendo mais retido pelo colágeno que tem uma influência menor quanto maior a presença de quitosana.

Apesar de uma liberação mais rápida para QC31, seguido por QC21 e QC11, as três misturas testadas apresentaram uma estabilização em sua liberação em no máximo 24h.

A Tabela 11 mostra a quantidade de extrato liberado a 36 h, em termos de porcentagem em relação à quantidade de extrato incorporado.

Tabela 11 - Porcentagem de extrato liberado em 36 h, em tampão de HAc/NaAc pH 5,12.

Scaffold	% extrato liberado em 36h
QC11M10	26,1±0,1
QC11M20	27,5±3,2
QC11M30	30,8±2,2
QC21M10	25,2±0,2
QC21M20	32,1±1,0
QC21M30	28,0±0,7
QC31M10	35,6±0,2
QC31M20	34,2±0,8
QC31M30	29,3±1,5

Pode-se observar que nestes resultados (Tabela 11) a liberação para todos os *scaffolds* esteve em um intervalo de 25 a 35%, sendo os *scaffolds* de QC31 os que apresentavam uma maior média de liberação em comparação aos de QC11 e QC21 que se mantiveram próximos, isto pode ser dados novamente pela maior quantidade de quitosana na amostra a qual além de auxiliar numa liberação mais rápida tende a auxiliar numa maior liberação de quantidade de extrato, restante do extrato incorporado aos *scaffolds* pode ser liberado de acordo com a biodegradação do *scaffold*.

Com os dados de liberação obtidos foi possível estabelecer um mecanismo de liberação adequado aos *scaffolds* utilizados. Para tal análise foram utilizados os resultados de liberação dos momentos iniciais onde havia uma maior taxa de liberação de fármaco, utilizando as primeiras 6 h dos ensaios que puderam ser ajustadas pela equação de Korsmeyer-Peppas (equação 7)

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (7)$$

Na qual M_t representa a quantidade de fármaco liberada até o tempo t , M_∞ é a quantidade total de fármaco incorporada no *scaffold*, K é uma constante cinética, t o tempo, e n , o expoente que indica o mecanismo de liberação, sendo K e n características do sistema *scaffold*-solvente.

O modelo de Kosmeyer-Peppas é um modelo utilizado em sistemas poliméricos de liberação de fármacos nos primeiros 60% de liberação, podendo ser utilizado em biopolímeros. Neste modelo a constante **n** fornece o mecanismo de liberação e é regido tanto pelo sistema que se encontra quanto pela forma geométrica do *scaffold*, no caso de *tablet*/cilíndrico o valor de **n** pode assumir os mecanismos descritos na Tabela 12.

Tabela 12 - Mecanismos de liberação em Kosmeyer-Peppas.⁷¹

Expoente de difusão	Mecanismo de liberação
0,45	Difusão Fickiana/Caso I
$0,45 < n < 0,89$	Difusão Anômala (não-Fickiana)
0,89	Transporte Caso-II
$n > 0,89$	Transporte super Caso-II

O valor de **n** pode ser obtido através de um gráfico de M_t/M_∞ em função do tempo, e é dado pelo coeficiente angular da equação da reta obtida, Para os *scaffolds* utilizados os valores de **n** são mostrados na Tabela 13.

Os *scaffolds* QC11M10 e QC21M10, não tiveram valores condizentes com os parâmetros estabelecidos pela modelagem, possivelmente devido à quantidade de extrato presente nestes, que é menor que nos demais, que não permitiram a aplicação do modelo de Kosmeyer-Peppas.

Já para os *scaffolds* de QC11 QC21 M20 e M30 pode-se notar que os valores de **n** encontram-se numa faixa em que o mecanismo é categorizado como uma cinética de transporte anômala, ou não-fickiana, indicando que a liberação é controlada pelos processos de difusão e de intumescimento simultaneamente.

Tabela 13 - Valores de **n** para modelagem por Kosmeyer-Peppas.

Scaffold	Coefficiente angular (n)	Coefficiente de correlação
QC11M10	--	--
QC11M20	0,49	0,9934
QC11M30	0,55	0,9881
QC21M10	--	-
QC21M20	0,75	0,9059
QC21M30	0,61	0,9498
QC31M10	0,29	0,9291
QC31M20	0,21	0,9849
QC31M30	0,13	0,9905

Os *scaffolds* de QC31 apresentaram valores de **n** menores que 0,45, categorizando-os como um mecanismo de liberação de difusão Fickiana, ou caso I, sendo um mecanismo de liberação de soluto através das camadas do *scaffold* devido a um gradiente, gerando um fluxo de soluto de áreas mais concentradas para áreas menos concentradas. Isto leva em consideração que a taxa penetração de líquidos é menor do que a taxa de relaxação das cadeias poliméricas. Valores abaixo de 0,45 são considerados como sendo casos de uma difusão “quase fickiana” onde a taxa de penetração é muito menor do que a taxa de relaxação⁷², gerando estes baixos valores, neste caso possivelmente causado por uma maior relação Q:C.

No caso das amostras estudadas, supõe-se que uma maior quantidade de colágeno nas amostras fez com que estas se tornassem mais rígidas devido à reticulação, esta maior rigidez fez com que os *scaffolds* QC11 fossem capazes de uma maior capacidade de intumescimento, e ao se modificar a proporção Q:C para QC31 uma maior quantidade de quitosana no meio fez com que a relação relaxação das cadeias poliméricas/intumescimento tornasse o mecanismo de liberação Fickiano/ “quase” Fickiano.

5.2.7 Ensaios Reológicos

Através dos ensaios reológicos de fluxo em função da taxa de cisalhamento pode-se observar qual o comportamento das misturas que apresentaram um comportamento pseudoplástico, ou seja, possuem a característica de ter sua viscosidade reduzida ao se aumentar a taxa de cisalhamento (como visto em materiais do cotidiano como shampoo, pasta de dentes e ketchup) sendo um comportamento típico de soluções poliméricas. Isto se deve, pois, cadeias poliméricas possuem uma natureza de emaranhamento, causando interações eletrostáticas e formação de ligações entre as cadeias de maneira inter e intra molecular, dificultando a fluidez do material, e ao se aplicar uma tensão de cisalhamento ocorre um ordenamento de cadeia, dando-as uma linearidade, desfazendo as interações, facilitando o escoamento, visualizado através da diminuição da viscosidade⁷³.

Os ensaios de viscosidade em função de cisalhamento resultaram em curvas que o melhor modelo matemático aplicável a elas é o modelo de Cross (equação 8).

$$\frac{\eta - \eta_0}{\eta - \eta_\infty} = \frac{1}{(1 + (k * \dot{\gamma})^m)} \quad (8)$$

O modelo de Cross prediz um comportamento da amostra no qual à baixa taxa de cisalhamento, num patamar inicial há um comportamento newtoniano, ou seja, não há alteração de viscosidade com a variação da taxa de cisalhamento, por este, pode-se estabelecer a viscosidade nula, ou η_0 . Ao aumentar a taxa, a viscosidade exibe um comportamento pseudoplástico, e em uma extrapolação ao infinito leva a um segundo patamar, podendo definir a viscosidade infinita η_∞ . A seguir seguem os resultados obtidos para os ensaios de fluxo para os géis.

É possível observar pelos ensaios com o gel de colágeno um comportamento de diminuição da viscosidade ao se aumentar a taxa de cisalhamento, ainda é possível notar que ao se aumentar a quantidade de extrato no gel há uma tendência a uma diminuição da viscosidade quando o gel se encontra em cisalhamento.

Figura 56 - Ensaio viscosidade em função do cisalhamento para os géis (—) CM0, (—) CM10, (—) CM20, (—) CM30

A partir da modelagem de Cross, pode-se obter os valores de η_0 para os géis, assim como mostrado na Tabela 14.

Tabela 14 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostras de Colágeno e suas variações com extrato.

Conc. Extrato (%)	η_0 (Pa s)	k	m
0	$1,0 \cdot 10^3$	41,1	0,88
10	$3,5 \cdot 10^3$	314,2	0,81
20	$2,1 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^4$	0,84
30	$8,4 \cdot 10^5$	$1,9 \cdot 10^5$	0,87

Diferentemente quando se encontra sob efeito de uma força cisalhante, os géis de colágeno mostram em um η_0 determinado pela modelagem de Cross que há um aumento de viscosidade a zero de cisalhamento, ao se adicionar o extrato.

Figura 57 - Ensaio viscosidade em função do cisalhamento para amostras de quitana (—) QM0, (—) QM10, (—) QM20, (—) QM30

Para os géis de quitosana, nota-se que há um *plateau* newtoniano à baixas taxas de cisalhamento, abaixo de $0,1 \text{ s}^{-1}$, e ao aumenta-las os géis passam a ter um comportamento pseudoplástico. Esses resultados mostram que no *plateau* newtoniano a viscosidade do gel tende a valores menores ao se adicionar 10% de extrato, no entanto ao se aumentar essa concentração a viscosidade do gel tende a aumentar. Isto pode ser melhor observado a partir da modelagem aplicada, através dos valores de η_0 (Tabela 15).

Tabela 15 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostras de Quitosana e suas variações com extrato.

Conc. Extrato (%)	η_0 (Pa s)	k	m
0	35,38	0,21	0,7
10	32,96	0,19	0,8
20	34,62	0,24	0,7
30	39,91	0,38	0,7

Para as amostras das misturas de quitosana:colágeno nas diferentes proporções, foram obtidos os seguintes resultados expressados nas Figuras 58, 59 e 60 e com as Tabelas 16, 17 e 18 com os valores obtidos a partir do modelo de Cross referentes para cada conjunto de amostras.

Figura 58 - Ensaio viscosidade em função do cisalhamento para amostras (—) QC11M0, (—) QC11M10, (—) QC11M20, (—) QC11M30

Na Tabela 16 encontram-se os valores obtidos a partir do modelo de Cross para as amostras de QC11.

Tabela 16 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostra QC11 e suas variações com extrato.

Conc. Extrato (%)	η_0 (Pa s)	k	m
0	$2,5 \times 10^2$	21,1	0,7
10	$1,7 \times 10^2$	13,5	0,7
20	$4,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^6$	0,5
30	$2,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^6$	0,6

Figura 59 - Ensaio viscosidade em função do cisalhamento para amostras (—) QC21M0, (—) QC21M10, (—) QC21M20, (—) QC21M30

A partir da modelagem de Cross pode-se obter a Tabela 17.

Tabela 17 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostra QC21 e suas variações com extrato.

Conc. Extrato (%)	η_0 (Pa s)	k	m
0	70,6	2,9	0,6
10	51,3	4,4	0,5
20	155	31	0,5
30	277	49	0,6

Figura 60 - Ensaio viscosidade em função do cisalhamento para amostras (—) QC31M0, (—) QC31M10, (—) QC31M20, (—) QC31M30

Na Tabela 18 encontram-se os valores obtidos a partir da modelagem de Cross para as amostras de QC31.

Tabela 18 - Valores obtidos pelo modelo de Cross para amostra QC31 e suas variações com extrato.

Conc. Extrato (%)	η_0 (Pa s)	k	m
0	49,4	0,89	0,68
10	34,4	0,78	0,64
20	65,9	2,86	0,61
30	94,7	6,52	0,59

Para as blendas de quitosana/colágeno foi possível observar que a presença de quitosana fez com que η_0 tendesse a diminuir à medida que se aumentava a proporção de quitosana na blenda. O comportamento de QC11 mostra uma similaridade com as amostras de colágeno, já ao se aumentar a proporção de quitosana nas blendas, os perfis das curvas obtidas se tornaram muito mais semelhantes à curva de quitosana, expressando a predominância desta nas blendas.

Pode-se observar que exceto colágeno, todas as amostras ao se acrescentar extrato à concentração de 10% tiveram seu η_0 reduzido, no entanto ao aumentar a concentração há uma tendência de aumentar η_0 . Para colágeno não houve decréscimo, o extrato tende apenas a aumentar seu η_0 . Pode-se supor que o efeito de decréscimo a baixas concentrações é devido à presença de quitosana na mistura e sua interação com o mangostão, mas ao aumenta-las estas interações com as misturas e até com a quitosana sozinha fazem com que o material se torne mais viscoso, indicando um efeito de reticulação pronunciável à maiores concentrações de extrato, uma maior viscosidade em géis pode se tornar interessante para aplicações em cremes ou outras bases de géis.

6 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos pode-se atingir os objetivos do trabalho, de se obter os materiais iniciais, as blendas, e as misturas, e destas partir para uma caracterização tanto em gel quanto em forma de *scaffold*.

Pelo ensaio reológico, estudo preliminar para possível aplicação dos materiais como cremes ou outras bases de gel, observou-se um comportamento pseudoplástico. Amostras com maiores quantidades de quitosana observa-se diminuição de η_0 ao se adicionar 10% de extrato, e aumento à maiores concentrações.

Os espectros de FT-IR não permitiram visualização de incorporação do extrato, mas a incorporação ficava clara, dada a visível mudança na coloração.

Com os *scaffolds* obtidos, observou-se que o extrato causa crescente reticulação no colágeno aumentando os valores de Td, e influência diferentes comportamentos para os seus poros e canais. No intumescimento observou-se rápida estabilização, um decaimento da capacidade de absorção com adição, mas manteve valores de interesse para absorção de fluídos, testes de compressão mostraram grande resistência dos *scaffolds* com extrato, em especial de QC11.

Testes de liberação tiveram liberação máxima entre 25-35%, o restante podendo ser liberado através da degradação e foram modelados em sua maioria por *Kosmeyer-Peppas*.

Assim, através deste trabalho permitiu-se um maior conhecimento sobre o extrato de *Garcinia mangostana L.*, dando maior visibilidade no contexto ocidental, e possíveis aplicações, tanto separadamente quanto em associação à biomateriais conceituados na área de engenharia de tecidos como quitosana e colágeno, que são desconhecidos em literatura, para futura aplicação na área de engenharia tecidual. Assim, dado o grande campo de estudo e sua importância é tido como necessário um maior aprofundamento, sendo que próximas etapas de estudos *in vitro* e *in vivo* poderão ser feitos.

REFERÊNCIAS

- 1 - TAOKAEW, S.; NUNKAEW, N.; SIRIPONG, P.; PHISALAPHONG, M. Characteristics and anticancer properties of bacterial cellulose films containing ethanolic extract of mangosteen peel. **Journal Biomaterial Science Polymer Edition**, v. 25, n. 9, p. 907-922, 2014.
- 2 - CHARERNSRIWILAIWAT, N.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; SUKMA, M.; OPANASOPIT, P.; Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, p. 333-343, 2013.
- 3 - BERGMANN C. P.; STUMPF, A. Dental Ceramics Microstructure, Properties and Degradation, **Topics in Mining, Metallurgy and Materials Engineering**, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013 DOI: 10.1007/978-3-642-38224-6_2
- 4 - RAMAKRISHNA, S.; MAYER, J.; WINTERMANTEL, E.; LEONG, K. W. Biomedical applications of polymer-copolymer materials: a review. **Composites Science and Technology**, v. 61, p. 1189-1224, 2001.
- 5 - MARKETS AND MARKETS, disponível em <<http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/global-biomaterials.asp>>. Acesso em 25 fev 2017.
- 6 - OLIVEIRA, L. S. de A. F.; OLIVEIRA, C. S.; MACHADO, A. P. L.; ROSA, F. P. Biomateriais com aplicação na regeneração óssea – método de análise e perspectivas futuras. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, p. 37-44, 2010.
- 7 - O'BRIEN, J.F.; Biomaterials & scaffolds for tissue engineering **Materials Today**, v.14(3), p.88-95, 2001.
- 8 - NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 762-798, 2007.
- 9 - PIRES, A.L.R.; BIERHALZ, A.C.K.; MORAES, A.M. Biomateriais: tipos, aplicações e mercado. **Química Nova**, v. 38, p. 957-971, 2015.
- 10 - ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A. Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications. **ChemBioEng Reviews**, v. 2, p. 1-24, 2015.
- 11 - SAITO, Y.; OKANO, T.; GAILL, F.; CHANZY, H.; PUTAUX, J. Structural data on the infra-crystalline swelling of β -chitin. **Biological Macromolecules**, v. 28, p. 81-88, 2000.
- 12 - CAMAPNA FILHO, S. P. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Química Nova**, v. 30. p. 644-650, 2007.

- 13 - WAHAB, M. A. E.; ABDU, E. S. Influence of starch and glycerol on the properties of chitosan by positron annihilation spectroscopy. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 116, p. 2874–2883, 2010.
- 14 - RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 603-632, 2006.
- 15 - BLOGMCIENTÍFICA, disponível em < <http://www.blog.mcientifica.com.br/alula-colossal/>> acesso em março, 2017.
- 16 - LI, Q.; DUNN, E. T.; GRANDMAISON, E. W.; GOOSEN, M. F. F. Applications and properties of chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 7, p. 370–397, 1992.
- 17 - TONHI, E. **Obtenção e caracterização de blendas colágeno:quitosana para utilização como biomaterial**. 1999. 89 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.
- 18 - SHIGEMASA, Y.; MATSUURA, H.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. **Biological Macromolecules**, v. 18, p. 237-242, 1996.
- 19 - GOPINATH, D.; AHMED, M. R.; GOMATHI, K.; CHITRA, K.; SEHGAL, P. K. JAYAKUMAR, R. Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films, **Biomaterials**, v. 25, p. 1911-1917, 2004.
- 20 - RAVI KUMAR, M. N. V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**. v.46, p. 1-27, 2000.
- 21 - GLOBAL MARKET INSIGHTS, disponível em < https://www.researchandmarkets.com/research/wmsr7d/chitosan_market> Acesso em 4 abril, 2017.
- 22 - ANATOMY WORDS, disponível em<<http://anatomyalmanac.blogspot.com.br/2007/10/collagen-comes-from-greek-kolla-glue.htm>> Acesso em 25 fev.2017.
- 23 - PRESTES, R.C. Colágeno e seus derivados: características e aplicações em produtos cárneos. **UNOPAR Cient. Ciênc. Biol. Saúde**, v. 15, p. 65-74, 2013.
- 24 - LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.. Collagen: The Fibrous Proteins of the Matrix. . **Molecular Cell Biology**, 4th edition. New York: W.H.Freeman, 2000.
- 25 - SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen structure and stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, p. 929-958, 2009.
- 26 - CHAURY, Z. F.; ROCHA, J. L.; PLEPIS, A. M. G.; ROSSI, M.; GOISSIS, G. Preparação e caracterização de Colágeno anionico por hidrolise seletiva de grupos carboxiamida internos **Polímeros**, v. 7, n. 2, p.40-46, 1997.

- 27 - CEN, L.; LIU, W.; CUI, L.; ZHANG, W.; CAO, Y. Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. **Pediatric Research**, v. 63, n.5, p. 492-496, 2008.
- 28 - KRUEGER, T. E.; MILLER, A. H.; WANG, J. Collagen Scaffolds in Bone Sialoprotein-Mediated Bone Regeneration. **The Scientific World Journal**, v. 2013, Article ID 812718, 6 p, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/812718>.
- 29 - BATISTA, T. M.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G. Thermal behavior of in vitro mineralized anionic collagen matrices. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 95, n. 3, p. 945-949, 2009.
- 30 - ZHANG, Z.; LI, G.; SHI, B. Physicochemical properties of collagen, gelatin and collagen hydrolysate derived from bovine lamed split wastes. **Journal of the Society of Leather Technologists and Chemists**, v. 90, p. 23-28, 2005.
- 31 - BATISTA, Thelma Matuura. **Mineralização In Vitro de Matrizes de Colágeno Aniônico Derivadas de Tecidos Biológicos**. 2008. 115 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.
- 32 - MEENA, C.; MENGI, S. A.; DESHPANDE, S. G. Biomedical and industrial applications of collagen. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences – Chemical Sciences**, v. 111, p. 319-329, 1999.
- 33 - GLOBAL MARKET INSIGHTS, disponível em <https://www.gminsights.com/industry-analysis/collagen-market>> Acesso em 25 de fev. 2017.
- 34 - TANGSADTHAKUN, C.; KANOKPANONT, S.; SANCHAVANAKIT, N.; BANAPRASERT, T.; DAMRONGSAKKUL, S. Properties of Collagen/Chitosan Scaffolds for Skin Tissue Engineering. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 16, n. 1, p. 37-44, 2006.
- 35 - SIONKOWSKA, A.; WISNIEWSKI, M.; SKOPINSKA, J.; KENNEDY, C. J.; WESS, T. J. Molecular interactions in collagen and chitosan blends. **Biomaterials**, v. 25, p. 795-801, 2003.
- 36 - FERNANDES, L. L.; RESENDE, C. X.; TAVARES, D. S.; SOARES, G. A.; CASTRO, L. O.; GRANJEIRO, J. M. Cytocompatibility of chitosan and collagen scaffolds for tissue engineering. **Polímeros**, v. 21, p. 1-6, 2011.
- 37 - DE SOUSA, H. C; BRAGA, M. E. M.; SOSNIK, A. **Biomateriais aplicados ao desenvolvimento de sistemas terapêuticos avançados**. Coimbra: [s.n.]. 770 p. ISBN 978-989-26-0880-8.
- 38 - PURDEUE AGRICULTURE, disponível em <https://hort.purdue.edu/newcrop/morton/mangosteen.html>> Acesso em: 30 de março, 2017.
- 39 - DICZBALIS, Y. **Farm and Forestry Production and Marketing Profile for Mangosteen (Garcinia mangostana)**. Holualoa, Hawai, fev 2011, p.14.

- 40 - SACRAMENTO, C. K.; COELHO JUNIOR, E.; CARVALHO, J. E. U.; HANSMÜLLER, C.; NASCIMENTO, W. M. O. Cultivo do Mangostão no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, p.195-203, 2007.
- 41 - PEDRAZA-CHAVERRI, J.; CÁRDENAS-RODRIGUEZ, N.; OROZCO-IBARRA, M.; PÉREZ-ROJAS, J.M. Medicinal Properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3227-3239, 2008.
- 42 - POTHITIRAT, W. CHOMNAWANG, M.T.; SUPABPHOL, R.; GRITSANAPAN, W. Comparison of bioactive compounds content, free radical scavenging and anti-acne inducing bacteria activities of extracts from the mangosteen fruit rind at two stages of maturity. **Fitoterapia**, v.80, p.442-447, 2009.
- 43 - GRIN National Genetic Resources Program Disponível em < www.ars-grin.gov/npgs/images/may/magazine/ > Acesso em maio, 2017.
- 44 - Natural News, Disponível em < www.naturalnews.com/mangosteen > Acesso em abril, 2017.
- 45 - SUNDARAM, B.M. GOPALAKRISHNAN, C.; SUBRAMANIAN, S.; SHANKARANARAYANAN, D.; KAMESWARAN, L. Antimicrobial activities of *Garcinia mangostana*. **Planta Medica**, v.48, p.59-60, 1983.
- 46 - MOONGKARDI, P.; KOSEM, N.; LUANRATANA, O.; JONGSOMBOONKUSOL, S.; PONGPAN, N. Antiproliferative activity of Thai medicinal plant extracts on human breast adenocarcinoma cell line. **Fitoterapia**, v.75, p.375-377, 2004.
- 47 - IBRAHIM, M.Y.; HASHIM, N.M.; MARIOD, A.A.; MOHAN, S.; ABDULLA, M.A.; ABDELWAHAB, S.I.; ARBAB, I.A. α -mangostin from *Garcinia mangostana* Linn: an update review of its pharmacological properties. **Arabian Journal of Chemistry**, 2014.
- 48 - CHARERNSRIWILAIWAT N.; ROJANARATA, T.; NGAWHIRUNPAT, T.; SUKMA, M.; OPANASOPIT, P.; Electrospun chitosan-based nanofiber mats loaded with *Garcinia mangostana* extracts. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 452, p.333-343, 2013.
- 49 - PubChem, open chemistry database, - <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Mangostin#section=Polymerization> , acesso em fev. 2017.
- 50 - KOH, J.; QIU, S.; ZOU, H.; LARKSHMINARAYANAN, R.; LI, J.; ZHOU, X.; TANG, C.; SARASWATHI, P.; VERMA, C.; TAN, D.T.H.; TAN, A. L.; LIU, S.; BEUERNAN, R.W. Rapid Bacterial action of alpha-mangostin against MRSA as a outcome of membrane targeting. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 834-844, 2013.
- 51 - OPANASOPIT, P.; RUKTANONCHAI, U.; SUWANTONG, O.; PANOMSUK, S.; NGAWHIRUNPAT, T.; SITTISOMBUT, C.; SUKSAMRAN, T.; SUPAPHOL, P. Electrospun poly(vinyl alcohol) fiber mats as carriers for extracts from the fruit hull of mangosteen. **Journal of Cosmetic Science**, v.59, p.233-242, 2008.

- 52 - KURITA, K.; TOMITA, K.; TADA, T.; ISHII, S.; NISHIURA, S.; SHIMODA, K. Squid Chitin as potential Alternative Chitin Source: Deacetylation Behavior and Characteristic Properties. **Journal of Polymer Science: Part AA Polymer Chemistry**, v.31, p.485-491, 1993.
- 53 - YUAN,Y.; CHESNITT,B.M.; HAGGARD, W.O.; BUMGARDNER, J.D Deacetylation of Chitosan: Material Characterization and in vitro Evaluation via Albumin Adsorption and Pre-Osteoblastic Cell Cultures, **Materials**, v.4, p. 1399-1416, 2011.
- 54 - TAN SC,KHOR E,TAN TK, WONG SM, The degree of deacetylation of chitosan: advocating the first derivative UV-spectrophotometry method of determination. **Talanta**, v.25, p. 713-719, 1998.
- 55 - RAYMOND ,L.; MORIN, F. G. MARCHESSALT, R. H. Degree of desacetylation of chitosan using conductimetric titration and solid state NMR. **Carbohydrate Research**. v. 246, p. 331, 1993.
- 56 - ALVARENGA, E. S.; OLIVEIRA, C. P.; BELLATO, C. R. An approach to understanding the deacetylation degree of chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 1155–1160, 2010.
- 57 - KASAAI, M. R. Calculation of Mark-Sakurada (MHS) equation viscosimetric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscosimetric constants data, **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 477-488, 2007.
- 58 - LACERDA, C.; PLEPIS, A. M. G.; GOISSIS, G. Hidrólise seletiva de carboxiamidas de resíduos de Asparagina e Glutamina em colágeno: preparação e caracterização de matrizes aniônicas para uso como biomateriais. **Química Nova**, v. 21, p. 267-271, 1998.
- 59 - JUNG, H.; SU, B.; KELLER, W.J.; MEHTA, R.G.; KINGHORN, A.D. Antioxidant Xanthones from the Pericarp of *Garcinia mangostana* (Mangosteen). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.2077-2082, 2006.
- 60 - ZARENA,A.S.; SANKAR,K.U.; A study of antioxidant properties from *Garcinia mangostana* L. pericarp extract. **Acta Scientiarum Polonorum,Technologia Alimentaria**, v.8(1), p.23-34, 2009.
- 61 - DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EdIPUCRS, 2007, v. 1, p. 9-10.
- 62 - 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 em Bioengenharia – EESCA/FMRP/IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

- 63 - LI,Q.; DUNN,E.T.; GRANDMAISON,E.W; GOOSEN, M.F.A. Applications and Properties of Chitosan. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**. p. 370-397, 1992.
- 64 - GUO,M.; WANG,X.; LU,X.; WANG,H.;BRODELIUS, P.E. α -Mangostin Extraction from the Native Mangosteen (*Garcinia mangostana* L.) and the Binding Mechanisms of α -Mangostin to HSA or TRF, PLoS One(published on-line) v. 11, 2016.
- 65 - AISHA, A.F.A.; IMAIL,Z.; ABU-SALAH, K.M.; MAJID, A.M.S.A. Solid Dispersions of α -mangostin Improve Its Aqueous Solubility Through Self-Assembly of Nanomicelles. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.101, p. 815-825, 2012.
- 66 - JABS,A. Determination of secondary Structure in Proteins by Fourier Transform infrared Spectroscopy (FT-IR). Disponível em: http://jenalib.leibniz-fli.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html. Acesso em 22 fev. 2017.
- 67 - DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: aplicações e preparação de amostras. Porto Alegre: EdIPUCRS, 2007, v. 1, p. 9-10.
- 68 - EI-SHERBINY, I.M.; YACOU, M.H. Hydrogels scaffolds for tissue engineering: Progress and Challenges. **Global Cardiology Science & Practice**, p.316-342, 2013.
- 69 - CHISTÉ,R.C.; DE FARIA,L.J.G.; LOPES,A.S; MATTIETTO, R.A Características físicas e físicoquímica da casca de mangostão em três períodos da safra, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.31, 2009.
- 70 - AISHA, A.F.A.; ABU-SALAH,K.M.; ISMAIL,Z.; MAJID, A.M.S.A Determination of total xanthenes in *Garcinia mangostana* fruit rind extracts by ultraviolet (UV) Spectrophotometry, **Journal of Medicinal Plants Research**, v.7, p. 29-35, 2013.
- 71 - SINGHVI,G.; SINGH,M.; REVIEW: IN-VITRO DRUG RELEASE CHARACTERIZATION MODELS. **International Journal of Pharmaceutical Studies and Research**, v. 2, p. 77-84, 2011.
- 72 - GANJI,F.; VASHEGHANI-FARAHANI, S.; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. **Iranian Polymer Journal**. v.19, p. 375-398, 2010.
- 73 - NAVARRO,R.F. **fundamentos de reologia de polímeros**. Caxias do Sul:Educs, p. 256, 1997.