INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS COMO COMPOSTOS
DERMO-EPIDÉRMICOS**

ANDREA CECILIA DORIÓN RODAS

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

Orientador:
Dra. Monica Beatriz Mathor

EXEMPLAR REVISADO PELA AUTORA

SÃO PAULO
2004

Aos meus pais Fernando e Estela, pelo apoio e compreensão.

Aos meus irmãos Maria Cláudia e Mauricio, pela ajuda.

Aos meus sobrinhos Pedro e Murilo, pelas risadas.

Agradecimentos

À Dra. Monica Beatriz Mathor, por ser um exemplo profissional a todo o momento, por sua dedicação, por tudo.

À CAPES, pela bolsa cedida.

Ao IPEN, pela oportunidade de desenvolvimento deste trabalho.

Ao CQMA e colegas, pela acolhida no início dos trabalhos.

Ao CTR e colegas, pelo acolhimento.

Ao CBM, por permitir a utilização das instalações de cultura celular.

À Divisão de Ensino, em especial a Ilze Puglia e Fernando Moreira, pela grande atenção.

Ao Eng^o Ademar Lugão, pelo estimado apoio, auxílio e orientação sobre a parte polimérica do trabalho.

Ao Dr. José Roberto Rogero, que sempre me apoiou nos assuntos relacionados à Pós-graduação.

À Dra. Lilian Lopérlogo, pelo ensinamento do “estado da arte” da preparação das membranas.

Ao Dr. Luiz Henrique Catalani, que colaborou com idéias valiosas neste trabalho.

À Dra. Marisa Herson, pelo inestimável auxílio com a cultura celular.

À Dra Olga Zazuco Higa, por permitir o uso irrestrito de seus laboratórios.

À Silvana Altran, pela ajuda na obtenção da cultura primária de queratinócitos.

Ao Laboratório de Microcirurgia Plástica da FMUSP, pelas trocas de idéias e trabalhos.

À Sizue Ota Rogero pelo inestimável apoio e incentivo.

Ao Dr. Januz M. Rosiak e Dr. Ireneusz Ianik do Institute of Applied Radiation Chemistry - Polônia, responsáveis pelo meu treinamento em membranas de hidrogéis reticuladas pela radiação.

À International Atomic Energy Agency, pelo financiamento do treinamento em membranas de hidrogéis como biomateriais.

Ao PADCT-MCT, pela aprovação do projeto: “Cultura de queratinócitos sobre bases poliméricas para utilização como substitutos dermo-epidérmicos”.

À Thiana Ohnuki, aluna de Iniciação Científica extremamente aplicada e grande companheira.

Ao Dr. Bronislaw Polakiewicz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela desacetilação da quitosana deste trabalho.

À Dra. Flavia Martellini, pelo fornecimento das quitosanas Aldrich.

A Eng^o. Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira, pela irradiação das amostras e grande carinho.

À Fatima Klingbell, pela grande ajuda no laboratório e amizade.

Ao Celso Vieira, pela paciente análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao João Ezequiel de Oliveira e Luiz Otávio Komiskas pelas análises no HPLC.

À Dra. Luci Brocardo Machado, pelas sugestões no trabalho.

À Dra. Susy Frey Sabato, pela troca de informações.

Ao Dr. Rodolfo Politano, pela ajuda na confecção da patente.

Às Dra. Ligia Ely Morganti Ferreira Dias e Maria Aparecida Pires Camillo, pela ajuda na infra-estrutura laboratorial.

À equipe da Biblioteca do IPEN, pela constante ajuda.

Ao Dr. Reynaldo Daniel Pinto, pela incalculável ajuda.

Ao técnico Eduardo Moura, pela ajuda na realização de análises demoradas.

À Selma Cecília Bourroul e Cynara Viterbo, pelo apoio.

À Elide Mastena pelo apoio, incentivo e grande amizade.

Às grandes amigas Rute Marlene Batista e Carla da Costa Guimarães, por estarem presente nos momentos mais difíceis.

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS COMO COMPOSTOS DERMO-EPIDÉRMICOS

Andrea Cecilia Dori3n Rodas

RESUMO

Neste trabalho foi estudada a forma33o de membranas para obten33o de compostos dermo-epid33rmicos. A por33o d33rmica foi desenvolvida utilizando-se mistura de pol33meros sint33ticos, o poli(33lcool vin33lico) - PVA33 ou poli(vinilpirrolidona) – PVP, com pol33mero natural, a quitosana. As membranas foram reticuladas pela radia33o γ ou glutaralde33do. A por33o epid33rmica destas membranas foi formada por queratin33citos cultivados *in vitro*, os quais foram semeados sobre as membranas correspondentes e verificada sua intera33o. As membranas que melhor interagiram com os queratin33citos foram aquelas preparadas com quitosana pela reticula33o com glutaralde33do, por33m n33o satisfazendo as caracter33sticas mec33nicas de manipula33o. As membranas que possu33am as melhores caracter33sticas mec33nicas, por33m com moderada intera33o com os queratin33citos, foram as compostas de PVA33, liofilizada e intumescida com quitosana. Os componentes foram caracterizados isoladamente, bem como as membranas formadas pelos mesmos. O PVA33 foi caracterizado quanto a sua dose gel e a quitosana quanto 33 determina33o das constantes de Mark-Houwink, grau de acetila33o e dissolu33o em diferentes valores de pH. As membranas foram caracterizadas quanto a sua cin33tica de intumescimento com 33gua. Na membrana de PVA33 com quitosana incorporada foi avaliada sua degrada33o *in vitro*, determinada sua cin33tica de intumescimento com a quitosana e estimado o tamanho do poro. As membranas de quitosana reticuladas com glutaralde33do foram caracterizadas quanto 33 cin33tica de intumescimento e verificado o poss33vel desprendimento de glutaralde33do. As duas membranas caracterizadas isoladamente foram unidas para forma33o de uma 33nica membrana, como a parte d33rmica do composto, onde a membrana de PVA33 incorporada com quitosana foi recoberta com a membrana de quitosana reticulada com glutaralde33do. Quitosanas de outras proced33ncias foram avaliadas na intera33o com os queratin33citos.

PREPARATION OF MEMBRANES AS DERMAL EPIDERMAL COMPONENT

Andrea Cecilia Dori3n Rodas

ABSTRACT

Membrane formations were studied to obtain dermal-epidermal compounds. The dermal portion was developed using synthetic polymers mixture, poly(vinyl alcohol)-PVA/ or poly(vinylpyrrolidone)-PVP, with natural polymers, and chitosan. The membranes were crosslinked by gamma irradiation or glutaraldehyde. The epidermal portion of these membranes was formed by keratinocytes cultured *in vitro*, seeded on these membranes to verify their interaction. The membranes that interacted better with keratinocytes were those prepared with chitosan by glutaraldehyde crosslinking, although not satisfying handling mechanical characteristics. The best mechanical characteristic was observed at PVA/ membranes frezed dried and chitosan incorporated, but with moderate keratinocytes interaction. The components were characterized separately as well as the membranes formed by both. The PVA/ was characterized as to its gel dose and to chitosan were determined Mark-Houwink equation, deacetylation degree and solubility under changes of pH. The membranes were characterized as to their swelling kinetic degree in water. In the membrane of PVA/ with chitosan incorporated was evaluated its degradation *in vitro*, swelling kinetic degree with chitosan solution and the pore size. The chitosan membranes crosslinked by glutaraldehyde were characterized as to their swelling kinetic degree and verified the possibility of deattached glutaraldehyde. Membranes characterized separetelly were joined to perform the ideal dermal component, where the PVA/ with chitosan incorporated membrane was covered by chitosan crosslinked by glutaraldehyde membrane. Chitosan from other sources were evaluated in the interaction with keratinocytes.

Lista de reagentes

- acetonitrila – Carlo Erba Reagenti RS-PLUS, código 412392
- adenina - Sigma A 9795
- ágar (grau técnico no. 3) – Oxoid
- água purificada - Millipore – grau ultrapuro tipo Milli-Q
- DNPH (2,4 – dinitrofenilhidrazona) – Fluka, Buchs, Switzerland
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) - Gibco n. 11965-092
- EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) - Sigma E 6758
- EGF– “epidermal growth factor” - Rh EGF R&D Systems 236-EG
- F12 Ham - Gibco n. 11765-054
- fibroblastos de camundongo - ATCC, cód. CCL92
- glutamina - Gibco n. 25030-081
- glutaraldeído - VETEC Química fina Ltda, título: 25%
- hidrocortisona - Sigma H 0396
- insulina - Sigma I 1882
- polietileno glicol PEG 600 - Oxiteno S.A.
- poli(álcool vinílico) PVA 72K - Química Especializada Erich Ltda
- poli(vinil pirrolidona) PVP 90K - Gaf Chemica
- quitosana (FCF): Polymar-Ceará, gentilmente desacetilada pelo Dr. Bronislaw Polakiewicz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.
- quitosana de alto peso molecular (A): Aldrich 448869 – proveniente de caranguejo
- quitosana de médio peso molecular (M): Aldrich 419417 flakes (Coarse ground) – proveniente de caranguejo
- quitosana padrão (P): Polymar – Ceará, proveniente da casca de camarão.
- solução antibiótico/antimicótico de penicilina/estreptomicina/anfotericina - Gibco n.15240-062
- solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9%) – Áster Produtos Médicos LTDA
- soro bovino de bezerro - Gibco n. 16030-074
- soro fetal bovino - HyClone – Fetalclone III SH30109.03
- toxina colérica - Sigma C 3012
- triiodotironina - Sigma T 5516
- tripsina - Sigma T 0646

Lista de equipamentos

- agitador magnético – Brinkmanm, horizon stirrer. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- autoclave sala de embalagem – autoclave vertical Mod. 415, FANEN – SP. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- balança analítica - Shimadzu AW 220. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- banho termostatizado – Lactea Labortécnica. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- banho termostatizado - Schott Gerate, CT 050 Localizado no Institute of Applied Radiation Chemistry – Technical University of Lodz, Polônia.
- bomba à vácuo – Waters modelo DOA – U 152 - AA. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- bomba de aspiração – Quimis, Q 321.13. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- centrífuga – FANEN, EXCELSA BABY II, modelo 206 – R . Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- espectrofotômetro na região do ultravioleta (Pharmacia Biotech modelo Ultrospec III). Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- espectrômetro na região do infravermelho Bomem MB –100 FTIR. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- estufa ventilada – Estufa retilínea, FANEN Ltda., mod. 320/2. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- fluxo laminar - VECO. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- fotômetro de espalhamento de luz BIC Dynamic Light Scattering photometer. Localizado no Institute of Applied Radiation Chemistry – Technical University of Lodz, Polônia.
- freezer –20°C – Bosch, Ecoplus 230. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- freezer –70°C – Nuaire TM –85°C ultralow freezer. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- Gamma Cell 200 (Fabricante Atomic Energy of Canadá Limited – Ottawa, Canadá; dimensões: diâmetro de 14 cm e altura de 20 cm; taxa de dose durante a realização dos experimentos: 7,48 a 4,43 kGy/h) . Localizado no CTR – IPEN/CNEN-SP

- HPLC (High Performance Liquid Chromatography) da marca Shimadzu. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- incubadora de CO₂ - Queue, modelo Stabil-Therm. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- manta de aquecimento para extrator de Soxhlet – Quimis, Q 321.13. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- microscópio eletrônico de varredura da marca Philips, modelo XL 30. Localizado no CPP – IPEN/CNEN-SP
- microscópio óptico tipo invertido (Nikon modelo TMS com câmera fotográfica acoplada – Nikon AF N6006) . Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- pHmetro Orion modelo 230 A. Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- prensa hidráulica Torr para preparação de pastilhas de KBr para análise de amostras por infravermelho.
- pulverizador (“sputtering”) Bal-Tec modelo SCD 050. Localizado no CPP – IPEN/CNEN-SP
- purificador de água (Millipore – Milli-Q). Localizado no CBM – IPEN/CNEN-SP
- viscosímetro capilar automático - Schott Gerate, AVS 310. Localizado no Institute of Applied Radiation Chemistry – Technical University of Lodz, Polônia.
- viscosímetro capilar, tipo Ubbelohde - Schott Gerate, 531 01. Localizado no Institute of Applied Radiation Chemistry – Technical University of Lodz, Polônia.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	15
JUSTIFICATIVA E INOVAÇÃO	19
OBJETIVO	20
2 CONSIDERAÇÕES GERAIS	22
1. A pele	22
2. Reparo e cicatrização	26
3 Cultura de queratinócitos <i>in vitro</i>	30
4. Intervenções no reparo e cicatrização da pele	32
5. Engenharia de tecidos	39
6. Hidrogéis	44
6.1. PVA	45
6.2. PVP	45
7. Polissacarídeos	45
7.1. Quitosana	46
8. Radiação ionizante	47
8.1. Efeito da radiação ionizante em macromoléculas	48
9. Caracterização física e química	50
9.1. Intumescimento	50
9.2. Análise sol-gel	50
9.3. Microscopia	53
9.3.1. Microscopia óptica	53
9.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	53
9.4. Espalhamento de luz (light scattering)	53
9.5. Viscosimetria	54
9.6. Espectroscopia	55
9.6.1. Região do infravermelho	55
9.6.2. Região do ultravioleta	56
9.7. Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS	59
Fluxograma de trabalho	60
1 Preparação de membranas	61
1.1. Reticulação pela radiação	61
1.1.1. Sem quitosana	61
1.1.2. Com quitosana	61
1.1.3. Só quitosana	62

1.2. Reticulação física por aquecimento ou química pelo glutaraldeído	62
2. Testes qualitativos de resistência física para escolha das membranas	63
2.1. Após a preparação	63
2.2. Durante a desembalagem	63
2.3. Na manipulação	63
3. Cultura <i>in vitro</i> de queratinócitos e fibroblastos	63
3.1. Fibroblastos	64
3.2. Queratinócitos	64
3.2.1. Obtenção das células isoladas	64
3.2.2. Manutenção das culturas	65
4. Cultura dos queratinócitos sobre as membranas	66
4. 1. Avaliação da morfologia dos queratinócitos sobre as membranas	66
5. Análise das membranas e seus componentes	67
5.1. Determinação do intumescimento	67
5.2. Caracterização dos componentes das membranas	67
5.2.1. Caracterização do PVA ℓ	67
5.2.1.1. Determinação da fração sol/gel	67
5.2.2. Caracterização da quitosana	68
5.2.2.1. Determinação das constantes de Mark-Houwink	68
5.2.2.1.1. Análise viscosimétrica	69
5.2.2.1.2. Análise por espalhamento de luz	69
5.2.2. Determinação do grau de acetilação	69
5.2.2.3. Determinação da dissolução em diferentes valores de pH	70
5.3. Membranas como substituto dérmico	71
5.3.1. Membrana de PVA reticulada pela radiação e liofilizada	71
5.3.1.1. Cinética de intumescimento da membrana de PVA liofilizada, com solução de quitosana	71
5.3.1.2. Avaliação da degradação da membrana <i>in vitro</i>	71
5.3.1.3. Avaliação do tamanho do poro por microscopia eletrônica de varredura	72
5.3.2. Membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído	72
5.3.2.1. Determinação de resíduos de glutaraldeído na água de lavagem das membranas	72
5.3.2.2. Cinética de intumescimento destas membranas com água purificada	73
5.3.3. União das membranas de PVA ℓ liofilizada e intumescida com solução de quitosana e a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído	73
5.3.3.1. Preparação com secagem completa das membranas	73
5.3.3.2. Preparação sem secagem da membrana de PVA ℓ liofilizada e intumescida com solução de quitosana	74
5.3.3.3. Verificação da adesão e do crescimento celular	74
6. Comparação do comportamento dos queratinócitos sobre membranas preparadas a partir de diferentes quitosanas	75

7. Estimativa de custos do composto dermo-epidérmico	75
4 RESULTADOS	76
1. Preparação de membranas	77
1.1. Reticulação pela radiação	77
1.1.1 Sem quitosana	77
1.1.2 Com quitosana	77
1.1.3 Só quitosana	77
1.2. Reticulação por aquecimento ou química pelo glutaraldeído	77
1.2.1. Reticulação física	78
1.2.2. Reticulação química com glutaraldeído	78
2. Testes qualitativos de resistência física para escolha das membranas	78
2.1. Após a preparação	78
2.2. Durante a desembalagem	79
2.3. Na manipulação	79
3. Cultura <i>in vitro</i> de queratinócitos e fibroblastos	80
3.1. Fibroblastos	80
3.2. Queratinócitos	80
3.2.1 Obtenção das células isoladas	80
3.2.2 Manutenção das culturas	81
4. Cultura dos queratinócitos sobre as membranas	81
4.1 Avaliação da morfologia dos queratinócitos sobre as membranas	81
5. Análise das membranas e seus componentes	83
5.1. Determinação do intumescimento	83
5.2. Caracterização dos componentes das membranas	84
5.2.1. Caracterização do PVA/	84
5.2.1.1. Determinação da fração sol/gel	85
5.2.2. Caracterização da quitosana	86
5.2.2.1. Determinação das constantes de Mark-Houwink	86
5.2.2.1.1. Análise viscosimétrica	86
5.2.2.1.2. Análise por espalhamento de luz	87
5.2.2.1.3. Cálculos para determinação das constantes de Mark-Houwink	88
5.2.2.1.4. Cálculo da massa molecular ponderal média da quitosana	89
5.2.2.2. Determinação da dissolução de quitosana em diferentes valores de pH	89
5.2.2.3. Determinação do grau de acetilação	90
5.3. Membranas como composto dérmico	91
5.3.1. Membrana de PVA/reticulada pela radiação e liofilizada	91
5.3.1.1. Cinética de intumescimento da membrana de PVA/liofilizada, com solução de quitosana	91
5.3.1.2. Avaliação da degradação da membrana <i>in vitro</i>	93
5.3.1.3. Avaliação do tamanho do poro por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	94
5.3.2. Membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído	95
5.3.2.1. Determinação de resíduos de glutaraldeído na água de lavagem das membranas	95

5.3.2.2 Cinética de intumescimento destas membranas com água purificada	96
5.3.3. União das membranas de PVA/ liofilizada e intumescida com solução de quitosana e a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído	97
5.3.3.1. Preparação com secagem completa das membranas	97
5.3.3.2. Preparação sem secagem da membrana de PVA/ intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6M.	97
5.3.3.3 Verificação da adesão e do crescimento celular	97
6. Comparação do comportamento dos queratinócitos sobre membranas preparadas a partir de diferentes quitosanas.	99
7. Estimativa de custos do componente dermo-epidérmico	104
 5 DISCUSSÃO	 105
 6 CONCLUSÕES	 120
 APÊNDICE A - Quadro 1 de avaliações experimentais dos componentes poliméricos das membranas no processo de preparação	 123
APÊNDICE B - Relatório da estimativa do custo da membrana como composto dermo-epidérmico	130
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 139

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A pele foi um dos primeiros órgãos a se beneficiar com a engenharia de tecidos [95]. Novas tecnologias foram desenvolvidas para confecção de substitutos cutâneos, após 1975 [76], quando foram estabelecidos os protocolos para o cultivo de células epidérmicas *in vitro*, e seu posterior uso em tratamento de feridas como auto-enxerto, que permitem ao paciente receber suas células amplificadas *in vitro* [76].

Ao final dos anos 70, iniciou-se o desenvolvimento do Integra[®], o qual pode ser destacado como o mais bem sucedido projeto desenvolvido neste campo de pesquisa, sendo atualmente é um dos produtos mais utilizados [45] para tratamento de feridas que requeiram enxerto. O Integra[®] é constituído por uma membrana de colágeno que quando fixada à ferida, sofre invasão dos vasos sanguíneos promovendo sua vascularização. Após duas semanas, um epitélio cultivado *in vitro* pode ser colocado nesta membrana vascularizada, e este suporte é degradado pelo organismo, e após alguns anos, todo este sistema terá sido degradado e substituído por tecido do próprio paciente [16].

Os conceitos de preparação do Integra[®] [107] impulsionaram as pesquisas para o desenvolvimento de novas matrizes com a finalidade de utilização destas membranas como substituto dermo-epidérmico e podendo ser encontradas variações desta membrana com a introdução de outros polímeros como colágeno / quitosana / sulfato de condroitina [26, 27], colágeno / sulfato de condroitina [65, 66]

Outras composições poliméricas sem colágeno utilizando polímeros de origem natural têm sido desenvolvidas como quitina/quitosana [8, 9, 20], ácido hialurônico [34] e fibrina [69] para a mesma finalidade.

Um substituto dermo-epidérmico deve satisfazer algumas condições básicas como: propriedade adequada ao manuseio, resistência ao rasgo, resistência à tração, controle de sua estrutura e tamanho de poros, possuir degradação controlada com formação de produtos atóxicos, não produzir reações

inflamatórias, propiciar a invasão de células endoteliais para formação de novos vasos e outras células, como fibroblastos [12, 13, 15, 107].

As membranas poliméricas de origem sintética tem sido alvo de estudos para sua utilização como substituto dermo-epidérmico, pois algumas delas possuem compatibilidade com o organismo, como no caso das membranas preparadas a partir de polímeros formadores de hidrogel.

Estes polímeros tem sido usados como curativos de ferida [84] e seu emprego na medicina vem aumentando [50]. Os polímeros sintéticos utilizados para esta função correspondem aos hidrogéis que, de acordo com as condições de preparação, podem adquirir formato de membranas, as quais apresentam resistência à manipulação e, de acordo com o grau de reticulação, formam redes de poros suficientemente grandes para diversas aplicações [71].

Os hidrogéis são redes de polímeros absorvedoras de água (estruturas reticuladas) ou copolímeros hidrofílicos. Os hidrogéis podem ser classificados de acordo com sua estrutura física ou química. Na aplicação biomédica, os hidrogéis são classificados em neutros ou iônicos. Os hidrogéis podem ser preparados com vários tipos de precursores e por várias vias de polimerização e reticulação, podendo também ser preparados em várias formas tridimensionais, o que lhes confere uma infinidade de aplicações. Os hidrogéis podem ser biodegradáveis, inertes ou reativos e, certamente, podem responder a mudanças nas suas propriedades conforme as variações do ambiente em que se encontram. As principais propriedades dos hidrogéis são: alto grau e rápida cinética de intumescimento, permeabilidade a proteínas e biocompatibilidade [72].

Os géis preparados a partir de polímeros sintéticos possuem características mecânicas adequadas que podem ser modificadas de acordo com a aplicação desejada, porém possuem pouca ou nenhuma capacidade de degradação quando implantados em um organismo vivo, o que pode limitar seu uso.

Para incrementar a interação do hidrogel no organismo, dependendo da sua finalidade, é possível a incorporação de outras moléculas poliméricas biologicamente ativas, como o caso de polissacarídeos.

Um dos diversos tipos de polissacarídeo utilizados para proporcionar esta característica é a quitosana, um copolímero de origem natural que interage com o organismo sofrendo degradação *in vivo*, originando produtos atóxicos [64].

A quitosana é produzida em diferentes partes do mundo em larga escala, inclusive no Brasil. Com a quitosana podem ser preparados filmes, fibras e esferas, que possuem uma ampla aplicação em produtos farmacêuticos, cosméticos, biomateriais, materiais agrícolas e produtos alimentícios. Possui propriedades biológicas como biocompatibilidade (atóxico) e biodegradabilidade, acelera a recuperação de feridas, reduz o nível de colesterol sanguíneo e estimula os efeitos do sistema imunológico, além de ter se mostrado um composto bacteriostático e fungistático [4].

A quitosana preparada na forma de membrana apresenta compatibilidade com os queratinócitos [8, 9, 20, 108], porém os pesquisadores citam a dificuldade de trabalhar com estas membranas por serem de pouca resistência ao rasgo e grande variabilidade das características físico – químicas da matéria - prima.

JUSTIFICATIVA E INOVAÇÃO

OBJETIVO

JUSTIFICATIVA E INOVAÇÃO

A utilização de polímeros para confecção de uma membrana dérmica tem a vantagem de não transmitir agentes patogênicos de um paciente a outro, como no caso de enxertos alógenos, e as células cultivadas nessas membranas podem ser obtidas de biópsias do próprio paciente, caracterizando um autoenxerto.

Atualmente existe uma grande preocupação na utilização de compostos provenientes de mamíferos, como por exemplo, o colágeno bovino, que pode conter contaminação por agentes patológicos. A utilização de polímeros de origem natural, provenientes de outras fontes como crustáceos, algas e plantas, diminui a probabilidade de contaminação dos pacientes.

Polímeros sintéticos apresentam pouca ou nenhuma, degradação *in vivo*, porém apresentam boas propriedades mecânicas de resistência ao rasgo. Polímeros naturais, em sua maioria, apresentam degradação *in vivo*, porém os materiais formados por estes, não apresentam boas propriedades mecânicas.

Pela combinação de polímeros sintéticos com polímeros naturais em uma formulação para desenvolvimento de um substituto dermo-epidérmico pode-se associar as vantagens de ambos.

A utilização de polímeros sintéticos misturados com polímeros naturais, devem promover a soma das propriedades de ambos para o desenvolvimento de formulações idealizando a confecção de um composto dermo-epidérmico, sendo elas: resistência mecânica, biodegradabilidade controlada e estimular a interação com as células em estudo.

A inovação deste trabalho está na determinação de formulações de baixo custo com as características acima citadas, constituída de uma mistura de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis, para utilização como composto dermo-epidérmico permanente, de maneira que não haja necessidade de retirada da membrana, e sim que esta seja naturalmente incorporada e substituída ao longo do tempo pelo organismo.

OBJETIVO

Desenvolvimento de membranas, de baixo custo, compostas de polímeros sintéticos com capacidade de formar hidrogel pela radiação ionizante, nos quais seja incorporado um polímero natural, com a possibilidade de degradação no organismo ao qual será implantado.

Estas membranas devem apresentar as seguintes características:

- ✓ Ser composta de uma mistura de polímeros sintético e natural, que possibilite a restauração das funções da derme.
- ✓ Possibilitar a formação de um epitélio humano sobre essa membrana, pela adição de queratinócitos humanos, os quais poderão restaurar a função epidérmica.
- ✓ Possuir características físicas que possibilitem o seu manuseio e propiciem a moldagem ao leito da ferida
- ✓ Possibilitar a degradação controlada

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

2 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. A pele

A pele é o órgão mais pesado do corpo humano, possui de 3 a 3,5 kg, sendo também um dos órgãos mais extensos, de 1,5 a 2 m² num adulto jovem de estatura média. Sua espessura corresponde em média a 1,5 mm. De acordo com a região: 1 mm nas pálpebras, 3 mm ou mais nas palmas e plantas dos pés [73].

Antes de tudo, a pele constitui a primeira linha de defesa contra as agressões de nosso meio ambiente, porém não sendo uma barreira intransponível. A mesma está estruturada em três camadas: a camada mais superficial é a epiderme; a camada média, a derme; e a camada profunda, a hipoderme [73].

A pele se forma a partir do ectoderma durante a vida embrionária, de onde derivam a epiderme e os anexos cutâneos, e do mesoderma que formará a derme, os vasos e os músculos pilo-motores [73, 75]. Na FIG. 2-1 verifica-se o esquema da morfologia da pele.

FIGURA 2-1. Representação esquemática da pele e seus anexos [101].

A epiderme tem a espessura de uma folha de papel [73]. Sua espessura varia em média de 0,06 a 1 mm. As células que compõem a epiderme são: os queratinócitos, representando 80% das células que compõem o epitélio; os

melanócitos, que representam 13% da população de células e tem a função de produzir melanina, dando origem à cor da pele; as células de Langerhans, representando 4% da população celular da epiderme, desempenham função como sistema imunológico; e ainda podemos encontrar as disco de Merkel, receptoras do sentido do tato [75]. Na epiderme não são encontrados vasos sanguíneos e suas trocas metabólicas são realizadas através da linfa intersticial ou intercelular [73, 75].

Quantitativamente os queratinócitos são as células mais importantes da epiderme, com 80% de representação [75]. Estas células têm a função de manutenção das propriedades de impermeabilização e defesa do organismo ao meio ambiente e se encontram dispostas em quatro diferentes camadas, as quais representam os estágios de seu ciclo celular [73, 75]. As camadas que compõem a epiderme, da porção interna à externa, são: camada basal ou germinativa (*stratum germinativum*), composta por uma fileira de células; camada espinhosa (*startum spinosum*), formada por 5 ou 6 camadas de células; camada granulosa (*stratum granulosum*), formada por 3 a 5 camadas de queratinócitos achatados; e por fim, camada córnea (*startum corneum*), que varia sua espessura e camadas de células de acordo com a região da pele [73, 75]. A FIG. 2-2 representa esquematicamente a aparência dos queratinócitos nas camadas da epiderme.

FIGURA 2-2. Representação esquemática dos queratinócitos nas camadas da epiderme [10].

Os queratinócitos basais apresentam estrutura de células com núcleo volumoso, possuem forma cúbica ou cilíndrica e seu comprimento é de 6 μm [75]. Estas células germinativas são as que possuem maior capacidade de divisão, que ocorre por mitose. Estas células estão unidas entre si por estruturas em forma de “botões” entre suas membranas. Estes botões são os desmossomos, que são formados por tonofilamento que, quando ligados à membrana basal, são chamados de hemidesmossomos, os quais se ligam a proteínas de ancoragem como colágeno tipo IV e tipo VII [75].

Os queratinócitos da camada espinhosa medem 12 μm de comprimento e se prolongam horizontalmente nas camadas superficiais [73]. Nestas camadas, os desmossomos são mais numerosos e compactos, promovendo uma maior coesão entre as células [73, 75]. É observada ainda a presença de melanossomas no citoplasma destas células, introduzidos pelos melanócitos [73, 75].

Os queratinócitos da camada granulosa apresentam diâmetro horizontal de 25 μm [73]. As organelas citoplasmáticas e a cromatina do núcleo tornam-se raras, a membrana plasmática se espessa e os feixes de tonofilamentos aglutinam-se na forma horizontal. Pode-se ainda verificar a presença de duas novas estruturas: os grãos de queratoialina, que surgem na forma de grânulos atravessados pelos tonofilamentos; e os corpos laminares, que preenchem os espaços intercelulares, separando as células granulosas da primeira camada de células córneas [73, 75].

Os queratinócitos da camada córnea são chamados de corneócitos e se caracterizam pela morfologia planar e hexagonal. Cada corneócito mede aproximadamente 30 μm de comprimento [73]. Constata-se o desaparecimento do núcleo e das organelas citoplasmáticas. As células apresentam-se cheias de queratina, ocorrendo espessamento da membrana plasmática, fortemente unidas entre si, com exceção da camada descamante [73, 75].

A queratinização da epiderme ou queratogênese, corresponde a uma morte celular programada, compreendendo dois fenômenos simultâneos, a divisão por mitose das células da camada germinativa e a migração vertical destas células com conseqüente diferenciação, que corresponde a uma série de

modificações morfológicas e bioquímicas, em que a célula basal se transforma em célula córnea [73].

As células basais da epiderme estão devidamente acomodadas sobre uma membrana, a membrana basal ou junção dermo - epidérmica, que tem a função de unir a epiderme à derme e também funciona como um filtro de difusão entre os elementos de nutrição e metabólitos. Dela são provenientes as papilas dérmicas, aumentando a superfície de trocas entre os dois tecidos, a qual é composta de fibras de colágeno, em sua maioria do tipo IV e VII, que fixam os queratinócitos à derme, e glicoproteínas como elastina e laminina [73, 97].

A junção dermo-epidérmica é constituída por duas porções que podem ser distinguidas ao microscópio. Estas porções são chamadas de lâmina lúcida e lâmina densa [97].

A lâmina lúcida separa a lâmina densa da membrana plasmática das células da camada basal da epiderme. Apresenta numerosas estruturas finas que a atravessam perpendicularmente, ligando a região dos hemidesmosomos dos queratinócitos à lâmina densa. Estas estruturas são chamadas de filamentos de ancoragem, compostos principalmente por laminina e colágeno do tipo VII [97].

A lâmina densa encontra-se entre a lâmina lúcida e a derme propriamente dita. Apresenta-se como uma homogênea camada fina granular, onde são fixados os hemidesmosomos em toda sua extensão. A lâmina densa é composta em sua maioria por colágeno do tipo IV que se encontra ligado às integrinas e ao sulfato de heparina [97].

A camada média da pele, chamada de derme, é um tecido conjuntivo, originário na mesoderme. Nela estão presentes vasos sanguíneos e linfáticos, além de numerosas terminações nervosas. Uma de suas principais funções é a de servir como tecido de sustentação para a epiderme. Nela são encontrados fibroblastos e células do sistema imunológico, como macrófagos, linfócitos e granulócitos [73, 75].

Os fibroblastos são as células denominadas “residentes” na derme. São células achatadas, de forma estelar ou alongadas como fusos. Estes são responsáveis pela síntese das diferentes macromoléculas que compõe a matriz extracelular, e possuem intensa atividade durante o processo de cicatrização. A matriz extracelular produzida pelos fibroblastos é composta por diferentes tipos de colágeno, sendo o mais abundante o do tipo I, correspondendo a

aproximadamente 80% da matriz extracelular. Em menor proporção existem as fibras elásticas, como a elastina, com importante função de sustentação [73, 75].

Finalmente, abaixo da derme encontra-se a hipoderme. Sendo constituída de lobos gordurosos limitados por travessões de fibras de colágeno provindas da derme, que vão se fixar nas aponevroses dos músculos ou no periósteo dos ossos, limitando assim, a mobilidade da pele. As funções da hipoderme são de armazenagem e reserva de lipídeos sob forma de triglicerídeos, modelador da silhueta, protege o organismo de ações mecânicas, como compressão, e regula a temperatura corpórea [73].

2. Reparo e cicatrização

A cicatrização é uma resposta da pele quando sua continuidade é interrompida por um traumatismo mecânico (corte), químico ou térmico (queimadura). São colocados em jogo processos complexos que levam à edificação de “nova” epiderme e de “novo” tecido conjuntivo graças à atividade das células normalmente presentes na pele [22].

O processo de cicatrização é dividido em dois tipos: cicatrização de primeira intenção e cicatrização de segunda intenção. A cicatrização de primeira intenção é predominante quando ocorre uma incisão, ou corte, na superfície da pele [22].

A incisão causa morte de um limitado número de células epiteliais e do tecido conectivo, bem como uma quebra na continuidade da membrana basal. A obliteração do espaço incisional acontece com o preenchimento do local com um coágulo sanguíneo que contém fibrina e células sanguíneas; a desidratação da superfície do coágulo forma uma casca que cobre a ferida [22].

A cicatrização por segunda intenção ocorre pela extensa perda de células e tecido, como ocorrem em infartos, ulcerações inflamatórias, formações de abscesso, e superfícies de feridas que formam largos defeitos, o processo de reparo é mais complicado. O denominador comum para estas situações é um extenso defeito tecidual que pode ser preenchido. A regeneração de células parenquimais não consegue reconstituir completamente a arquitetura original. Abundante tecido de granulação cresce na sua margem para o reparo completo [22].

A cicatrização por segunda intenção difere da cicatrização de primeira intenção em vários aspectos [22]:

- 1 - Inevitavelmente, grandes defeitos teciduais inicialmente possuem mais fibrina e mais debris necróticos e o exudato deve ser removido. Conseqüentemente, a reação inflamatória é mais intensa.
- 2 - Uma quantidade maior de tecido de granulação é formada. Quando um grande defeito ocorre em tecidos profundos, tais como em vísceras, o tecido de granulação com suas numerosas células brancas são responsáveis pelo seu fechamento, pois não ocorre drenagem para a superfície.
- 3 - Talvez a característica mais clara que diferencia as cicatrizações de primeira e segunda intenção é o fenômeno da contração da ferida, que ocorre em toda sua superfície.

A cura de feridas é um fenômeno complexo e ordenado, envolvendo vários processos como: a indução de um processo agudo de inflamação pelo ferimento, regeneração das células parenquimais, migração e proliferação das células parenquimais e células do tecido conectivo, síntese de matriz extra celular, remodelagem do tecido conectivo e componentes do parênquima, e colagenização com aquisição da resistência da ferida [22].

Inicialmente, a formação do coágulo sanguíneo, por si só, funciona como uma proteção temporária dos tecidos expostos da ferida e providencia um leito provisório sobre e através do qual, células podem migrar durante o processo de reparo. O coágulo consiste de plaquetas inclusas em uma malha de fibras constituídas de fibrinas reticuladas derivadas da trombina pela clivagem do fibrinogênio, juntamente com fibronectina plasmática, vitronectina e trombospodina. O coágulo também serve como um reservatório de citocinas e fatores de crescimento que são liberados com a ativação da degranulação das plaquetas. Este “coquetel” inicial de fatores de crescimento promove o início do processo de fechamento da ferida, pois promove as sinalizações quimiotáticas para recrutamento das células inflamatórias circulantes ao local, iniciando o movimento tecidual de reepitelização e contração do tecido conectivo, com estimulação da resposta angiogênica [22, 54].

Neutrófilos e monócitos são atraídos para o local da ferida por uma grande variedade de sinais quimiotáticos. Isto inclui não somente a liberação de fatores de crescimento das plaquetas, mas também metabólitos proveniente da

clivagem de proteínas bacterianas, com a formação de diversos peptídeos como “metionil-“ e “formil-“ e pela proteólise da fibrina e outros componentes da matriz. Tanto os neutrófilos como os monócitos são recrutados do sangue circulante, em resposta às mudanças moleculares na superfície das células endoteliais dos capilares alinhados no local da ferida. Inicialmente, membros da restrita família das moléculas de adesão são rapidamente expressos para auxiliar na fraca adesão dessas células, então os leucócitos podem ser reconhecidos e arrastados rapidamente da circulação sanguínea; forte adesão e captura, mediada pelas integrinas da classe $\beta 2$, leva a diapedese, enquanto os leucócitos ativados movem-se para fora entre as células endoteliais em direção ao espaço extracelular. A infiltração dos neutrófilos cessa após poucos dias, e os neutrófilos em excesso são fagocitados por macrófagos teciduais. Os macrófagos continuam a se acumular no local da ferida por recrutamento dos monócitos sanguíneos e são essenciais para a efetiva cicatrização da ferida; se ocorrer prevenção da infiltração dos macrófagos, a cicatrização é severamente prejudicada. Entre as tarefas dos macrófagos, estão incluídas as fagocitoses de qualquer organismo remanescente e de outras células, bem como debris de matriz. Uma vez ativados, os macrófagos também liberam uma bateria de fatores de crescimento e citosinas no local da ferida, amplificando desta forma a sinalização inicial promovida pela degranulação das plaquetas e presença dos neutrófilos [54].

Na pele íntegra, queratinócitos basais estão fixados na lâmina basal (ou membrana basal). O contato primário de ligação dos queratinócitos é proveniente dos hemidesmossomos, que se ligam à laminina da lâmina basal pela via da integrina $\alpha 6\beta 4$, e possuem conexão intracelular com a rede de queratina citoesquelética. No início do reparo, quando ocorre uma ferida, a ligação do hemidesmossomo deve ser dissolvida e os queratinócitos das bordas são estimulados a expressar novas integrinas, primariamente a $\alpha 5\beta 1$ e receptores fibronectina/tenascina $\alpha v\beta 6$ e receptores vitronectina $\alpha v\beta 4$, e a relocação dos receptores de colágeno $\alpha 2\beta 1$, tendo como seqüência a contração e migração, sob o coágulo da ferida e na derme subjacente. Em síntese, a locomoção envolve a contração dos filamentos de actinmiosina intracelular que inserem novos complexos de adesão [54].

Os queratinócitos remanescentes nas bordas têm a função de penetração através do coágulo de fibronectina por meio da interface entre o coágulo e a derme sadia, dissolvendo a barreira de fibrina acima deles. A principal enzima fibrinolítica é a plasmina, que é derivada do plasminogênio do próprio coágulo e pode ser ativado tanto pelo ativador plasminogênico tipo – tecidual (tPA) ou ativador plasminogênico tipo – uroquinase (uPA). Ambos ativadores e receptores para uPA são regulados pela migração dos queratinócitos. Vários membros da família da matriz – metaloproteinase (MMP), as quais clivam um sítio subespecífico de proteínas da matriz, são também regulados pelos queratinócitos da borda da ferida. A gelatinase B (MMP-9) pode clivar o colágeno da lâmina basal (tipo IV) e o colágeno das fibrilas de ancoragem (tipo VII), e é através deste mecanismo que ocorre a liberação dos queratinócitos de sua “amarra” da lâmina basal [54].

Uma vez recoberta a superfície desnuda da ferida por uma monocamada de queratinócitos, a migração epidérmica cessa e uma nova epiderme estratificada sobre uma linha de membrana basal é restabelecida, das margens da ferida para o centro [54].

O trabalho de reepitelização da ferida é realizado sobre uma margem de tecido conectivo contrátil que diminui pela aproximação das bordas. Como uma resposta rápida à injúria, fibroblastos dérmicos residentes na vizinhança da ferida começam a proliferar e, após 3 ou 4 dias, estes iniciam sua migração para o interior da matriz provisória de coágulo, onde podem permanecer e produzir sua própria matriz de colágeno [54].

Aproximadamente após uma semana do ferimento, o coágulo da ferida estará completamente invadido e substituída por fibroblastos ativados, que são estimulados pelo TGF- α 1 (fator de crescimento transformador) e outros fatores de crescimento, para sintetizar e remodelar a nova matriz de colágeno. Neste estágio, uma parte destes fibroblastos transforma-se em miofibroblastos, que expressam a α -actina do músculo liso e assemelham-se às células do músculo liso na sua capacidade de gerar forças de contração. Esta conversão é disparada pelos fatores de crescimento como o TGF- β 1 [54].

A granulação do tecido conectivo de uma ferida ocorre pelo aparecimento de numerosos capilares que invadem a neoderme da ferida. O FGF2 (fator de crescimento de fibroblastos) e os fatores de crescimento endotelial

vascular (VEGF), liberados no local da ferida, promovem a angiogênese. O FGF2, é liberado no local da ferida pelo dano nas células endoteliais e pelos macrófagos. O VEGF, também chamado de fator de permeabilidade vascular, induz a migração dos queratinócitos da borda da ferida e os macrófagos, possivelmente em resposta ao KGF (fator de crescimento de queratinócitos) e ao TGF- α ; simultaneamente, um de seus receptores, o flt-1, é regulado pelas células endoteliais no lugar da injúria, para estimular a neovascularização [54].

3. Cultura de queratinócitos *in vitro*

A cultura de queratinócitos *in vitro* é uma prática de aplicação clínica aceita pela comunidade médica para tratamentos cutâneos que necessitam de enxerto [45]. Para realização destes enxertos, a biópsia de pele é fornecida ao laboratório e técnicos especializados[13, 23, 45], que por meio de métodos padronizados, tem a capacidade de isolar as células e propiciar a sua multiplicação. Resumidamente, as etapas que compõe este processamento consistem em: retirada da pele, separação das células da epiderme, seleção das células com subseqüentes passagens para sua amplificação.

A retirada da pele ocorre pela interação de cirurgiões plásticos e o laboratório, após o esclarecimento e aceite do doador. As peles proveniente de cirurgias tais como redução de mama, circuncisões, correção plástica, etc, são fontes de obtenção de células, geralmente utilizadas para pesquisa e desenvolvimento de novos materiais, de cosméticos e fármacos. O material é colhido de forma estéril com meio de cultura sem soro [68] e levado rapidamente para o laboratório, onde a biópsia de pele é processada para remoção de resíduos de sangue [68].

A separação das células da pele pode ser realizada por duas maneiras: separação por migração física, explante, ou por separação enzimática utilizando solução de dispase ou tripsina. Em todas as metodologias de separação das células, existe a “contaminação” da cultura com outras células como melanócitos e fibroblastos, sendo a contaminação por fibroblastos de maior preocupação, pois estes requerem menor tempo de replicação em comparação aos queratinócitos, fazendo com que toda a cultura se perca por competição do espaço na placa de cultura. Para inibir o crescimento dos fibroblastos a partir da cultura da biópsia de pele, é realizada a seleção celular por meio de condições específicas de cultivo.

As células provenientes da biópsia são colocadas em recipientes especiais para cultura de células aderidas, que podem ser obtidos no mercado (Corning, Nunc, Fishbender, entre outros fabricantes). As técnicas amplamente utilizadas para seleção dos queratinócitos consistem na utilização de queratinócitos semeados em alta densidade com meio essencial, soro fetal bovino e baixa concentração de cálcio [36] ou meio MCDB 153 sem soro e baixa quantidade de cálcio [11], ou ainda em baixa densidade, sobre uma camada de fibroblastos de camundongo 3T3 irradiados como camada de sustentação [76], sendo que os meios de cultura podem ser adicionados de hormônios e fatores de crescimento, tanto para estimular o crescimento e migração dos queratinócitos, quanto para inibir o crescimento de outros tipos celulares [68, 76]. A escolha da metodologia para seleção dos queratinócitos dependerá das facilidades do laboratório e aplicação final da cultura [68].

Para selecionar uma linha celular epitelial, torna-se necessário o desenvolvimento de critérios específicos para sua identificação. O método de maior escolha é o seu acompanhamento morfológico, pois as células epiteliais em cultura possuem a característica de crescer com a aparência de um pavimento compacto com células se multiplicando em círculos [3].

Os queratinócitos cultivados *in vitro* possuem a capacidade de se multiplicar a partir de uma única célula, a qual formará uma colônia, que dependendo das condições de cultivo, apresentará uma morfologia diferente. De acordo com o crescimento, das colônias, as células originais podem ser classificadas em holoclones, paraclones e meroclones [3, 56, 82].

Os holoclones formam colônias grandes, com perímetro uniforme. Tais colônias possuem uma área de 10 a 30 mm², que contêm 2 a 5 x 10⁴ células. Seu perímetro é aproximadamente circular e contém essencialmente células pequenas [3].

Os paraclones formam colônias pequenas, altamente irregulares e terminais. A área das colônias é menor que 5 mm² e seu perímetro é irregular. Após aproximadamente 15 ciclos celulares, cessa toda a proliferação, as células são grandes e achatadas, incluindo as células periféricas. Estas células contêm involucrina, a proteína característica de células terminais diferenciadas. Estas células quando amplificadas, não formam mais colônias [3].

Os meroclones formam colônias enrugadas, que crescem progressivamente a tamanhos macroscópicos, mas não atingem o mesmo tamanho das colônias geradas pelos holoclones. O seu perímetro enrugado sugere algum tipo de heterogeneidade da colônia, sendo intermediários entre os holoclones e os paraclones [3].

Os holoclones tem o maior potencial de crescimento, ao contrário, os paraclones podem inicialmente crescer rápido, porém seu ciclo de divisão não passa de 15 gerações. As meroclones são clones de composição mista e sua tendência é passar a paraclones ao longo do tempo. A transição de holoclones para meroclones e para paraclones é unidirecional e como resultado, verifica-se uma diminuição do potencial de crescimento das células *in vitro* [3].

4. Intervenções no reparo e cicatrização da pele

Uma ferida aberta é um estado anormal onde interações celulares empenham-se em fechá-la pela regeneração tecidual natural e crescimento celular. O leito da ferida é um sistema aberto ameaçado por proliferação bacteriana proveniente do meio ambiente e marcado para a morte devido a dessecação ou anoxia por falta de vasos sanguíneos que provêem oxigênio e as trocas gasosas. Uma cobertura sobre a ferida é então requerida para promover uma barreira contra a invasão bacteriana e auxiliar sua hidratação e cura, acelerando a migração de queratinócitos e o fechamento natural [103].

Os cuidados mínimos realizados pelos médicos frente a uma ferida compreendem: desbridamento, descontaminação, decisão quanto a necessidade do fechamento ou não da ferida e, se necessário, qual é a alternativa ideal [103].

A cicatrização de feridas requer um material auxiliar na restauração da função de barreira da epiderme. Curativos oclusivos são materiais eficientes para esta função, pois criam uma melhora no ambiente de regeneração da epiderme, por promover uma barreira contra infecções e controlar a perda de água [45, 103].

Uma quantidade significativa de substitutos de pele está em desenvolvimento ou tem sido introduzido no mercado [45]. Alguns desses foram projetados especificamente como materiais adequados para procedimentos após excisão de tecidos desvitalizados, como por exemplo em tratamento de queimaduras e feridas crônicas [45].

Jones et al [45] realizaram um guia médico dos tipos de recobrimento biológico de feridas, disponíveis no mercado e com relativo uso rotineiro. Neste guia, são abordadas suas vantagens, desvantagens e em que situações são mais eficientes. Estes recobrimentos são descritos a seguir [45]:

Pele de banco de tecidos

As feridas podem ser fechadas por aloenxertos *post-mortem* cadavéricos [45] ou de doadores de múltiplos órgãos de morte encefálica [38]. São utilizados conceitualmente como substitutos cutâneos, sendo eventualmente rejeitados. A imunossupressão patológica presente nos estágios iniciais de uma queimadura severa retarda a rejeição do aloenxerto durante este período. Uma cuidadosa triagem do doador do material auxilia a reduzir o risco de transmissão de agentes infecciosos, porém este risco pode não ser eliminado. Esses materiais tem sido processados e distribuídos por bancos de tecidos estritamente regulados na Europa, América do Norte e muitos outros países. Este potencial de transmissão de doenças tais como hepatite e HIV [13, 45] é um estímulo significativo para o desenvolvimento de substitutos de pele em laboratório.

Substitutos de pele para recobrimento de feridas

Biobrane[®] (Dow Hickman/Bertek Pharmaceuticals, Sugar Land, TX, USA)

O Biobrane[®] é uma membrana bilaminada consistindo de uma malha de fibras de nylon ligadas a uma fina camada de silicone. A malha de nylon é recoberta com peptídeos derivados de colágeno tipo I de porco, na intenção de auxiliar na aderência do leito da ferida e do crescimento fibrovascular. O silicone é semi-permeável. Conforme a ferida cicatriza, o Biobrane[®] é liberado, e pode ser facilmente removido da superfície. Ele é recomendado para uso em sítios doadores e queimaduras superficiais parcialmente profundas com até 6 horas de ferimento. O Biobrane[®] tem sido usado como cobertura temporária em excisões recentes de feridas profundas. A aderência, o acúmulo de fluidos e integração nas feridas tratadas com Biobrane[®] foi similar as feridas tratadas com aloenxertos.

Transcyte[®] - formalmente Dermagraft – TC[®] (Advanced Tissue Sciences Inc, La Jolla, CA, USA):

No Transcyte[®], a rede de nylon recoberta com colágeno da Biobrane[®] é semeada com fibroblastos neonatais com a intenção de melhorar suas propriedades de cicatrização. Como o nylon não é biodegradável, este material não age como substituto dérmico. Os fibroblastos neonatais introduzidos na camada biológica do Transcyte[®] são cultivados por aproximadamente 17 dias, neste período produzem fibronectina, colágeno tipo I, proteoglicanas e fatores de crescimento. O material é congelado a –70 °C para estocagem, um processo que não mantém a atividade metabólica dos fibroblastos. O material é então estocado a –20 °C em cartuchos especiais.

Atualmente o Transcyte[®] tem sido mais utilizado em queimaduras parcialmente espessas; aderindo rapidamente à superfície viável da ferida e estimulando assim a epitelização. Este material foi utilizado para cicatrização de queimaduras faciais parcialmente espessas, sendo observada uma melhora significativa na condução e na velocidade de cicatrização, quando comparado com as técnicas padrão de uso de medicação tópica.

Queratinócitos alogênicos cultivados

Em situações clínicas, não existe reação aguda de rejeição seguida da aplicação de lâminas alogênicas de queratinócitos; entretanto, testes de cromossomo Y e DNA têm mostrado que as células alogênicas sobrevivem menos de uma semana quando enxertadas em feridas de excisão de tatuagem ou úlceras. Tal sobrevivência parece estar relacionada ao leito da ferida, pela presença de derme. A melhora observada depois da aplicação dos queratinócitos alogênicos é atribuída à secreção de fatores de crescimento e citocinas pelas células. Queratinócitos alogênicos cultivados são reconhecidos como material para cobertura de ferida e, dependendo da utilização, podem apresentar sobrevida até 30 meses.

Apligraf[®] (Graftskin[®]) – (Organogenesis Inc, Canton, MA, USA e Novartis Pharmaceuticals Corporation, East Hanover, NJ, USA)

O Apligraf[®] é derivado da combinação de um gel de colágeno bovino tipo I com fibroblastos alogênicos neonatais vivos, com uma camada epidérmica

corneificada de queratinócitos neonatais alogênicos. Consistindo de dois tipos celulares diferentes, este “compósito” é considerado o mais sofisticado produto comercialmente disponível desenvolvido por engenharia de tecidos. Sua função primária é o tratamento de úlceras crônicas, o qual parece acelerar a cura.

Dermagraft® (Advanced Tissue Science Inc, La Jolla, CA, USA)

O Dermagraft® é uma estrutura dérmica viva criopreservada, preparada pelo cultivo de fibroblastos alogênicos neonatais em um suporte polimérico (ácido poliglicólico – Dexon; ou Poliglactina – 910 Vicryl). Os fibroblastos tornam-se confluentes com a malha polimérica, secretando fatores de crescimento e proteínas da matriz dérmica (colágenos e glicosaminoglicanas, entre outras), e criando então uma estrutura dérmica viva.

O Dermagraft® facilita a cicatrização por estimular o crescimento de tecido fibrovascular no leito da ferida e a reepitelização a partir das bordas da mesma. Este não fecha definitivamente a ferida, tem sido indicado mais para situações em que se objetiva estimular o fechamento espontâneo de lesões crônicas tais como úlceras em pés diabéticos, do que em casos de queimaduras. Tem como principal desvantagem ser um dos mais caros recobrimentos [45]

Substitutos de pele para fechamento de feridas

Alloderm® (lifeCell, Woodlands, TX, USA)

Alloderm® é constituído de pele cadavérica humana processada, da qual a epiderme foi removida e os componentes celulares da derme foram retirados antes da criopreservação, com a intenção de evitar resposta imunológica específica. No leito da ferida, ele é repopulado pelas células do receptor, revascularizado e incorporado ao tecido, funcionando como um substituto para regeneração dérmica.

Integra® (Integra Life Science Corporation, Plainsboro, NJ, USA)

O Integra® é atualmente o substituto mais utilizado desenvolvido para o uso de pacientes queimados, foi originariamente descrito por Yannas e Burke [107]. O Integra® tem uma estrutura bilaminar, consistindo de colágeno bovino reticulado e glicosaminoglicanas, cobertos em uma face por uma membrana de

silicone que fornece a função epidérmica. O tamanho do poro tem sido projetado de 70 a 100 µm para facilitar a migração de fibroblastos e células endoteliais do próprio paciente. Poros pequenos atrasam, ou não promovem biointegração, enquanto que poros maiores promovem uma insuficiente área de adesão para invasão das células do paciente. A camada de colágeno é biointegrada com a ferida para formar neoderme vascularizada, um processo que leva aproximadamente 3 a 6 semanas. Uma vez atingido este estágio, a camada de silicone pode ser removida e aplicado um enxerto fino de pele.

Em 1994 [92] foi publicado um relatório sobre 10 anos de uso do Integra[®], em que 80% dos enxertos aplicados obtiveram sucesso. Não foi observada severa formação de cicatriz hipertrófica. Todos os pacientes obtiveram excelente funcionamento das junções envolvidas. Áreas enxertadas, em crianças, com a pele artificial foram capazes de crescer conjuntamente com as mesmas. A opinião geral dos pacientes foi que as áreas enxertadas com a pele artificial foram cosmeticamente superiores àqueles em que foi usado apenas autoenxerto. Histologicamente, por um acompanhamento de 2 anos, observou-se que os componentes da derme foram se modelando gradualmente durante o primeiro mês, semelhante à derme papilar e reticular, porém sem sulcos.

O uso do Integra[®] requer dois estágios de procedimento, com um intervalo mínimo de 3 semanas entre a aplicação do Integra[®] e do enxerto fino de pele, para auxiliar a formação de neoderme. Em alguns momentos, isto pode aumentar o tempo necessário para cicatrização da ferida. Se o Integra[®] pode ser usado em combinação com autoenxerto de epiderme cultivada, então 3 semanas de atraso pode ser uma vantagem, pois facilita a expansão *in vitro* da biópsia de pele para a formação das lâminas.

Existem algumas desvantagens no uso deste produto. Ele é caro quando comparado com pele alogênica de banco de tecidos, e a curva de estudo possui uma alta taxa de falência inicial. As vantagens são: melhora da elasticidade e a cosmética quando comparado com enxertos ultra finos; menor morbidade da área doadora comparado com os enxertos padrão pela sua cicatrização mais rápida com pouca cicatriz; diminuição do risco de infecção cruzada inerente aos aloenxertos; e finalmente, está disponível imediatamente e

não há limite de tempo para realização da autoenxertia. O Integra® permite a oclusão imediata da ferida com pouca área doadora.

Queratinócitos autólogos cultivados

Lâminas de queratinócitos confluentes podem ser cultivadas *in vitro* e então aplicada em feridas, tais como queimaduras, úlceras crônicas, nevus gigante, epidermólise bolhosa e necrose escarpelar neonatal. Assim como os enxertos de fenda de pele, a fixação do autoenxerto de células epiteliais cultivadas depende do leito da ferida, e deve estar próximo do tecido de granulação ou da fascia muscular; de preferência ao tecido de granulação crônica.

As lâminas de queratinócitos cultivados estão disponíveis comercialmente por algumas companhias, por exemplo, o Epicel® (Genzyme Tissue Repair Corporation, Cambridge, MA, USA), e também em equipados laboratórios universitários ou hospitalares. Entretanto, eles são relativamente caros e requerem um alto grau de trabalho laboratorial e controle de qualidade. Leva-se de 3 a 5 semanas para produzir 1,8 m² de lâmina de células confluentes a partir de uma biópsia de 2 cm². Para a utilização de autoenxerto de lâminas de epitélio cultivado, requer-se um alto grau de coordenação entre o tratamento do queimado e o laboratório. Para contornar esta limitação, queratinócitos cultivados podem ser estocados congelados, tanto como suspensão ou enxerto de epitélio cultivado.

Autoenxerto de epitélio cultivado são lâminas frágeis. Eles requerem separação do substrato de tecido cultivado usando uma enzima proteolítica antes de serem aplicados no leito da ferida. Este processo causa contração e subsequente restrição na proliferação. O epitélio resultante é instável, levando a um aumento de bolhas espontâneas alguns meses após a enxertia, aumentando a susceptibilidade de infecções e contrações. Em volta das bordas do enxerto que foi bem fixado, existe uma zona de cicatrização de ferida marcante. Histologicamente, a fragilidade do autoenxerto das lâminas de epitélio cultivado pode estar relacionada à imaturidade da junção dermo-epidérmica, levando a uma inadequada ancoragem. No momento do transplante, os queratinócitos estão indiferenciados e carecem das camadas corneificadas e granulares. Em 6 dias eles se diferenciam em todas as camadas normais, mas faltam as bordas. Em 3

semanas há a lamina basal com os hemidesmossomos. Fibrilas de ancoragem (colágeno VII) estão esparsas e imaturas nos primeiros 6 a 12 meses, embora a presença da organização vascular seja normal. A expressão de elastina pode levar de 4 a 5 anos.

Sistemas transportadores de queratinócitos

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de facilitar o transporte de queratinócitos. Os mais significativos são:

- 1 - Gel de fibrina: os queratinócitos são fixados à ferida pela fibrina e uma completa cicatrização tem sido observada com 14 a 21 dias. O transporte pode ser realizado em uma lâmina de cola de fibrina com os queratinócitos cultivados sobre ela, os quais atingem a confluência após 10 dias, ou as células podem ser transportadas em suspensão e adicionadas à cola de fibrina, diretamente no paciente.
- 2 - Sistema de membrana transportadora invertida: a mais inovadora membrana com esta função é a Laserskin[®] (Fidia Advanced Biopolymers, Aban Terme, Italy), uma membrana preparada à laser, derivada da esterificação do ácido hialurônico. O mesmo material tem sido comercializado como Vivoderm[®] (ER Squibb and Sons Inc, Princeton, NJ, USA). Os queratinócitos são semeados *in vitro* sobre as membranas, que ocuparão os poros perfurados à laser. As colônias celulares crescerão acima e abaixo da membrana, que pode ser retirado da placa de Petri sem digestão enzimática. As vantagens propostas nesta membrana são que ela não requer inversão e subsequente reorientação celular para aplicação no leito da ferida, e que a presença do ácido hialurônico pode promover a migração e proliferação celular, e angiogênese. Tem sido usado no tratamento do vitiligo, bem como recobrimento do Integra.
- 3 - Pulverização de suspensão celular: neste caso, as células são suspendidas no seu meio de cultura e pulverizadas diretamente sobre a ferida, sem o uso de fibrina.

Pela fragilidade das lâminas de queratinócitos autólogos para enxerto, sua eficiência pode ser melhorada utilizando-se a combinação de queratinócitos com alguma forma de matriz dérmica como, por exemplo, pelo crescimento sobre derme alógena [37] ou um biomaterial. Se a camada epidérmica receber

adequada nutrição e o biomaterial puder ser ligado à ferida, então se pode restaurar a função vital da barreira epidérmica.

O crescimento de queratinócitos em derme alógena pode ser realizado em pele preservada em glicerol, proveniente de banco de tecidos, cuja derme sofre descelularização, podendo ser utilizada como base para o cultivo dos queratinócitos [37, 39].

Lopergolo [50] relaciona os curativos não biológicos, os quais são classificados como curativos de primeira, segunda e terceira geração. A principal característica dos curativos de primeira geração é sua impermeabilidade, sendo preparados a partir de polietileno, polipropileno poliéster ou poli(cloreto de vinila). Os curativos de segunda geração são fabricados a partir de filmes de poliuretanas, tais como OpSite[®], Tergaderm[®], Bioclusive[®], MP2080[®], Uniflex[®], Opraflex[®], Ensure-It[®], Thin Film Wound Dressing[®] e Blister Film[®], sendo que alguns deles ainda são encontrados no mercado [77] e a partir dos anos 80, teve início o aparecimento dos hidrocolóides como curativos para feridas, tais como: Duoderm[®], Granuflex[®], Comfeel[®], Biofilm[®], Dermiflex[®], Adaptic[®] e Ulcer Dressing[®]. Por fim, os curativos de terceira geração, que compreendem membranas de hidrogéis, como Aquagel[®]; NuGel[®] e nos meados dos anos 90, iniciou-se a preparação do Band-Gel, com apoio da IAEA e do inventor da membrana Dr. Janusz Rosiak [84]. O desenvolvimento do produto para o mercado brasileiro foi realizado com a parceria do IPEN/CNEN-SP e da Biolab. Atualmente, este produto se encontra em fase de realização dos testes clínicos requeridos pela legislação brasileira.

5. Engenharia de tecidos

Esta área de conhecimento vem apresentando rápido desenvolvimento desde os anos 90 e se caracteriza por ser um campo de ação interdisciplinar que aplica princípios de engenharia e ciências da vida, rumo ao desenvolvimento de substitutos biológicos que restauram, mantêm e melhoram a função do tecido ou órgão danificado. Isto se deve aos avanços na medicina, biologia e ciências exatas [18, 95, 106].

Várias tecnologias têm sido aplicadas para fabricação e processamento de materiais biodegradáveis e bioreabsorvíveis de alta porosidade e de suportes

para áreas superficiais. Entretanto, a formação de um suporte tridimensional com desenho variado de camadas para mimetizar a microestrutura de um tecido vivo requer novas tecnologias. Gravações tridimensionais, obtidas da análise computacional de imagens de tomografia computacional ou ressonância magnética, têm sido usadas para construção da seqüência das camadas do órgão ou tecido em estudo [67, 106].

Novos desenvolvimentos no entendimento de sinalizações celulares têm permitido pesquisas para mimetizar a matriz extracelular mais eficientemente e induzir a migração celular, portanto as matrizes desempenham o principal papel em engenharia de tecidos. As matrizes são utilizadas para levar as células aos sítios desejados do organismo e guiam os processos de desenvolvimento dos biomateriais, definidos na engenharia de tecidos [106].

A “European Society for Biomaterials”, na reunião realizada de 3 a 5 de Março de 1986 em Chester, Reino Unido definiu os termos relacionados a biomateriais e os publicou no “Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials”, o termo “biomaterial” foi definido como sendo “qualquer substância (diferente de uma droga) ou combinação de substâncias de origem sintética ou natural, que pode ser usado por um período de tempo indeterminado, como um todo ou como uma parte de um sistema que trata, melhora ou substitui qualquer tecido, órgão ou função do organismo” [104].

A matriz ideal deve promover a função celular específica e a interação direta célula – célula. A função das matrizes em engenharia de tecidos como matriz extracelular sintética, e projetos apropriados dessas matrizes podem lhes permitir mimetizar toda a extensão das funções mecânicas e biológicas da matriz extracelular nativa [18, 67, 95, 106].

Matrizes poliméricas podem ser usadas para realizar o transporte de células em alta quantidade e com eficiência para os sítios específicos. Estas matrizes também promovem sustentação mecânica contrária às forças de compressão e tensão, deste modo mantêm a forma e integridade do suporte, em resposta ao ambiente agressivo do corpo. O suporte pode funcionar como uma barreira aos componentes do sistema imunológico do hospedeiro ou atua como uma matriz condutora do tecido em regeneração, dependendo do projeto. Polímeros biomiméticos sintéticos armados com peptídeos de adesão celular

podem ser sintetizados como implantes para tecidos de regeneração ou transplante celular para realização deste propósito [106].

Os polímeros biodegradáveis têm larga aplicação em engenharia de tecidos, pois os artefatos desenvolvidos com estes polímeros geralmente requerem um tempo curto de duração e não é necessária uma cirurgia para sua retirada [48]. Estes polímeros geralmente são degradados por enzimas do organismo, ou sofrem degradação por hidrólise [48], devido a grande quantidade de água (correspondente a dois terços do peso total corpóreo) [55].

Os desenvolvimentos de polímeros para sustentação possuem mudanças significativas com relação à sua composição inicial. O crescimento tecidual é predominantemente influenciado pela composição, arquitetura, porosidade, propriedade superficial e ambiente tri-dimensional do suporte de sustentação, assim como a aplicação de tensões sobre o mesmo. Para a reposição funcional deste tecido é necessário o desenvolvimento de substitutos sintéticos, ou naturais, que imitem a bioquímica superficial do tecido em estudo [106].

Os projetos e desenvolvimentos de produtos por engenharia de tecidos têm se beneficiado, por muitos anos, de polímeros biodegradáveis para utilização clínica. Recentes desenvolvimentos de polímeros biodegradáveis e novas modificações dos polímeros previamente desenvolvidos têm proporcionado novas ferramentas para criação e aplicação de tecidos de importância clínica. O aumento da demanda de biomateriais para novos implantes médicos sofisticados tem sido o maior contribuinte para o desenvolvimento da pesquisa de novos polímeros sintéticos de aplicação médica [67, 106].

A seleção do biomaterial desempenha a função chave no projeto e desenvolvimento de um produto obtido por engenharia de tecido. Apesar do clássico critério de seleção por um implante seguro, estável e inerte, têm se verificado que o mais importante é a resposta celular. Portanto, é amplamente aceito que o biomaterial deve interagir com o tecido em reparo, caso contrário, este agiria como um simples substituto inerte. Sendo assim, o mesmo deve ser mais que biocompatível deve promover a resposta celular desejada. Conseqüentemente, o maior foco dos biomateriais, para aplicação em engenharia de tecidos, está baseado no controle da sua interação com as células [18, 67, 106].

Desenvolvendo um substituto dermo-epidérmico

Um substituto dermo-epidérmico corresponde ao desenvolvimento de uma membrana tridimensional que possua características próximas do órgão original, no caso a pele, e mantenha suas propriedades físicas e biológicas [107].

Propriedades físico-químicas, bioquímicas e mecânicas devem ser levadas em consideração para o desenvolvimento de um substituto dermo-epidérmico. Estas propriedades devem ser devidamente padronizadas e caracterizadas antes dos estudos em animais de laboratório (camundongos ou porcos da Índia) e humanos.

As propriedades para o desenvolvimento do substituto não podem ser consideradas independentes, pois a modificação em um parâmetro interfere nas outras propriedades. Por exemplo, durante a confecção do Integra® [23], observou-se que o tamanho dos poros da membrana poderiam ser variados por diferentes metodologias de processamento dos componentes químicos relacionados (princípio físico-químico). O tamanho do poro mostrou ser importante por influenciar na velocidade de migração das células para o interior da membrana, bem como sua degradação (propriedades bioquímicas). Para melhorar a velocidade de migração das células (fibroblastos e células endoteliais), poros “grandes” foram formados na maior parte da membrana, levando a um comprometimento de sua resistência ao rasgo e compressão (propriedades mecânicas). Ao final, para atender, da melhor maneira, todas as propriedades simultaneamente, foi determinado que o tamanho Ideal dos poros para este substituto deveria variar de 70 a 100µm [21].

Por meio da inter-relação das propriedades físico-químicas, bioquímicas e mecânicas, são relacionadas características básicas para desenvolvimento de um substituto dermo-epidérmico [12, 13, 15, 107], sendo elas:

- ✓ Possibilidade de manuseio - A membrana deve possibilitar seu manuseio durante uma cirurgia, não devendo rasgar, além de ser facilmente fixada no leito da ferida.
- ✓ Moldar-se completamente ao leito da ferida - A membrana, quando colocada no leito da ferida, não deve formar bolsas de ar, que se tornarão locais favoráveis para infecções bacterianas; possuir deformação suficiente para

completa adesão; ser resistente às forças que provocam cisalhamento ou liberação; possuir fluxo controlado de perda de vapor (água), não devendo ser muito rápido, provocando desidratação, contração e deformação da membrana; ou muito lento, provocando edema. A FIG. 2-3 exemplifica estes efeitos.

FIGURA 2-3. Representação esquemática dos defeitos de propriedades físico-químicas e mecânicas no desenvolvimento efetivo de um curativo de ferida. a) formação de bolhas de ar; b) deformidade insuficiente para total acomodação na ferida; c) deformação por cisalhamento; d) deformação por liberação; e) excessiva perda de fluido; f) velocidade lenta de fluidez de vapor [107].

- ✓ Controle dos componentes - Os componentes utilizados para confecção da membrana devem ser atóxicos, antigênicos, propiciar biodegradação controlada, interação com as células da pele facilitando, ou mesmo não dificultando, seu crescimento sobre (queratinócitos) e dentro (fibroblastos, células endoteliais e do sistema imunológicos) da mesma.
- ✓ Controle no processo de preparação – A espessura e tamanho dos poros para eficiente penetração das células endoteliais formando novos vasos sanguíneos, irrigando a membrana e fornecendo os nutrientes necessários para manutenção das outras células (queratinócitos e fibroblastos); eficiente migração e instalação dos fibroblastos na rede da membrana, promovendo sua atividade para síntese de novo colágeno.

- ✓ Outras considerações não menos importantes - O custo da membrana; a eficiente diminuição do tempo de permanência do paciente no hospital; a diminuição da formação de cicatriz e aceitação do paciente ao tratamento, faz desta uma das considerações cruciais para colocação do produto no mercado.

Com a satisfação das características referidas para a membrana desenvolvida, ao final de sua aplicação, ela deverá apresentar morfologia histopatológica semelhante à pele normal.

6. Hidrogéis

Os hidrogéis são estruturas reticuladas com a capacidade de absorver uma quantidade finita de água (intumescimento) em sua rede, sem se dissolver, pois correspondem a uma rede porosa e o tamanho dos poros pode ser controlado. Possuem forma tridimensional e podem ser formados por ligações iônicas ou covalentes e pontes de hidrogênio. Frequentemente forças fracas tais como van der Waals, podem servir como reticulante [72]

Os hidrogéis poliméricos podem ser de origem natural ou sintética, sendo amplamente utilizados na saúde, por exemplo, como curativos para feridas. Os polímeros utilizados para esta aplicação geralmente são solúveis em água, sendo este o meio de reação. Para reticulação das cadeias podem ser utilizados agentes multifuncionais que condensam as cadeias, como por exemplo, os aldeídos (formaldeído, acetaldeído e glutaraldeído), porém, para aplicações biomédicas, a radiação ionizante é a mais comum por não deixar resíduos tóxicos, além de proporcionar a possibilidade de esterilização final do produto.

Os polímeros sintéticos mais utilizados para formação de hidrogéis, onde a sua reticulação é facilmente realizada pelo uso da radiação ionizante, são poli (álcool vinílico) (PVA), poli (vinil-pirrolidona) (PVP), poli (óxido de etileno) (PEO), poli (acrilamida) (PAAm), poli (ácido acrílico) (PAA) e poli (éter metil vinílico) (PVME) [86].

Estes hidrogéis, podem ter as suas propriedades incrementadas com a adição de outros polímeros, como no caso de membranas de PVP [84] irradiadas com poli(etileno glicol) (PEG), o qual melhorando a elongação das cadeias de PVP após a reticulação [57], e ágar, que proporciona resistência mecânica à membrana antes da irradiação [1].

6.1 PVA ℓ

O PVA ℓ é comercialmente produzido pela hidrólise do poli (acetato de vinila), pois o monômero álcool vinílico não existe no estado livre. Devido ao processo de hidrólise ser incompleto, traços de poli (acetato de vinila) são detectados em preparações utilizando PVA ℓ [53].

As resinas preparadas com PVA ℓ apresentam excelentes propriedades físicas e químicas, tornando-o amplamente utilizável na indústria. Os filmes preparados com PVA ℓ possuem alta elongação e resistência à abrasão, além de ser um excelente adesivo [53].

Na área biomédica, o PVA ℓ é classificado como polímero iônico, devido a presença de grupos –OH ligados lateralmente a sua cadeia [70]. Suas aplicações são relacionadas ao desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de drogas [71], como prótese para disco intervertebral [25], como parte de membranas para curativo de feridas [87], etc.

6.2 PVP

Obtido pela polimerização do monômero 2-poli-1-vinilpirrolidona, também conhecido como polivinilamida, polivinilimida ou povidine, possui uma combinação de propriedades como solubilidade em água e solventes orgânicos, baixa toxicidade, boas características para formação de filmes e habilidade de aderência a vários substratos [2].

Na área biomédica, é classificado como polímero neutro, tendo uma infinidade de aplicações, sendo as mais usuais como preservante dos compostos do sangue, protetor de drogas, carreador de drogas em forma de complexos (por exemplo, PVP-iodo), na composição de lentes de contato e aplicações odontológicas [2]. Na forma de membrana é amplamente utilizado como curativo de feridas [40, 84].

7. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são polímeros de carboidratos de ocorrência natural, no qual resíduos de monossacarídeos são ligados diretamente através de ligações glicosídicas. Eles são encontrados em plantas, animais, e

microorganismos como fonte de armazenamento de energia ou parte estrutural [28].

Os polissacarídeos podem ser degradados por hidrólise quando em solução, ou mesmo por hidrólise enzimática. A velocidade de degradação irá depender do meio em que este estará dissolvido ou de sua interação com a enzima em questão [27].

Os polissacarídeos possuem ampla aplicação em cosméticos, alimentos e biomateriais, os mais comuns são: amido, celulose, hemicelulose, arabinogalactonas (gomas), pectina, alginato, ágar, porfiram, carragena, quitina/quitosana, sulfato de condroitina, sulfato de dermatina, sulfato de heparina, heparina, ácido hialurônico, sulfato de queratina.

Alguns destes polissacarídeos podem ser destacados como suporte para crescimento de células, como é o caso do alginato [88], quitina/quitosana [8, 9, 20, 108], ácido hialurônico [34, 69, 82], além de misturas dos polissacarídeos com colágeno, como no caso de colágeno / quitosana / sulfato de condroitina [26, 27], colágeno / sulfato de condroitina [65, 66].

7.1 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo biossintético derivado da desacetilação da quitina. A quitina é um polissacarídeo de ocorrência natural que pode ser extraído do exoesqueleto de crustáceos ou gerado por processo de fermentação de fungos. A quitosana possui ligações poliméricas do tipo β - (1 $\rightarrow$ 4) do sacarídeo 2 – amino – 2 – deoxi – d – glicose; promovendo cargas positivas provenientes de grupos amino [67].

A quitosana é um polímero solúvel em soluções ácidas, tais como, de ácido clorídrico, ácido acético, ácido fórmico, sendo sua solubilidade dependente da força iônica do meio, do pH, do grau de acetilação da quitosana e do seu peso molecular médio [4, 47, 59, 62, 78, 79, 80], portanto, devem ser determinadas estas características para o seu uso como biomaterial [4, 47]. Estas características influenciam também a sua capacidade de biodegradação [6, 8, 64, 98], preferencialmente por hidrólise [64, 80].

A quitosana, por se tratar de um polissacarídeo, sofre degradação quando em solução [55, 80], quebrando as ligações do complexo polimérico e os componentes da água (H e OH) se incorporam aos fragmentos resultantes.

Outra via de degradação da quitosana no organismo ocorre pela ação da lisozima [98], que é uma enzima que auxilia o sistema imunológico, pois dissolve a parede mucopolissacarídea de bactérias pela hidrólise das ligações $\beta - (1 \rightarrow 4)$ [6]. Esta enzima é encontrada livremente dissolvida em grande parte dos tecidos, porém sua concentração tecidual aumenta numa reação inflamatória, pois esta é sintetizada pelos macrófagos, que secretam os lisossomos, auxiliando na remoção de restos celulares e bacterianos do local da infecção [55].

O grau de acetilação da quitosana pode ser determinado por análise espectroscópica na região do infravermelho, onde são analisadas as bandas de absorção nos números de onda de 1655 cm^{-1} , correspondente à amida-I, e da banda de absorção de 3450 cm^{-1} , correspondente à hidroxila [58, 94]. O peso molecular médio pode ser determinado pela associação das análises de espalhamento de luz e viscosimetria [7,30, 59, 60, 78, 99, 102]. A solubilidade da quitosana em diferentes valores de pH pode ser acompanhada pela formação de precipitado na solução [78].

A quitosana tem sido utilizada para a formação de membranas e matrizes apropriadas para inúmeras aplicações em engenharia de tecidos. A manipulação de matrizes de quitosana pode ser executada usando as propriedades eletrostáticas inerentes da molécula [67]. Estas matrizes têm sido empregadas como suporte para encapsulamento de células [46, 107]. Pela variação dos processos de preparação, podem ser formados suportes porosos [43, 51] e membranas para cultivo de células epiteliais [8, 9, 20], ou ainda formar associação com outras moléculas ativas como colágeno [15, 89, 91, 96] ou ácido hialurônico [34].

8. Radiação ionizante

Radiação ionizante corresponde a uma intensidade de energia capaz de produzir uma excitação ou ionização em um átomo ou molécula. A excitação ocorre quando um elétron absorve energia e muda de nível energético sem que ocorra sua ejeção. A ionização ocorre quando a intensidade de energia absorvida é suficiente para ejetar um ou mais elétrons do átomo [35, 44].

As radiações ionizantes podem ser emitidas naturalmente por elementos com núcleos atômicos instáveis ou produzidas artificialmente como em

equipamentos conhecidos como aceleradores de elétrons, e são classificadas em radiação corpuscular e radiação ondulatória.

As radiações ondulatórias ionizantes são constituídas de campos elétricos e magnéticos oscilantes, de pequeno comprimento de onda (menores de 100 nm). São altamente penetrantes. As radiações eletromagnéticas ionizantes são conhecidas como radiação γ e radiação X [35].

Os raios γ provenientes do elemento atômico ^{60}Co possuem energia igual a 1,332 e 1,173 MeV e nessa faixa de energia a interação da radiação com a matéria ocorre, principalmente, pelo efeito Compton.

O efeito Compton é a interação da onda eletromagnética com um elétron orbital onde parte da energia da onda eletromagnética incidente é transferida como energia cinética para o elétron e o restante é cedida para o fóton espalhado, levando-se em consideração também a energia de ligação do elétron. O fóton espalhado terá uma energia menor e uma direção diferente da incidente [44].

As radiações de partículas compreendem as radiações formadas por partículas, tais como: os feixes de partículas leves carregadas negativamente como β^- ; os feixes de partículas leves carregadas positivamente como β^+ ; e as partículas pesadas, como prótons ou partículas alfa, de carga positiva; os fragmentos de fissão (leves e pesados); as partículas sem carga como nêutrons e o neutrino.

8.1 Efeito da radiação ionizante em macromoléculas

A radiação de alta energia pode ser considerada um agente que inicia reações químicas via radicais livres. As etapas envolvidas são: iniciação, quando ocorre a excitação ou ionização das moléculas; propagação, onde ocorre a transferência do radical livre de uma molécula à outra, ocorrendo assim, o “crescimento” da molécula; e terminação, que compreendem a combinação de dois macroradicais, ou transferência de cadeia do radical livre, ou transferência do radical livre para o solvente [52].

O efeito direto ocorre quando a radiação eletromagnética atinge um átomo da macromolécula promovendo a retirada de um elétron, formando moléculas excitadas ou ionizadas.

A radiação ionizante interage com a água forma espécies altamente reativas como $H^\bullet$, $OH^\bullet$, e^-_{aq} , H_2 , H_2O_2 , e H_3O^+ . Estas espécies reagem rapidamente com a macromolécula dissolvida, formando novos macrorradicais livres, os quais sofrem sucessivas reações [87].

Quando polímeros, no lugar de monômeros, são submetidos à radiação ionizante, observam-se efeitos químicos, tais como ligações cruzadas e cisão na cadeia principal. Este processo causa a formação de um gel insolúvel, se as ligações cruzadas predominarem sobre a cisão [83, 85, 87].

Neste processo a razão de iniciação é diretamente proporcional a taxa de dose (D), e a razão constante desta reação depende do rendimento de formação de radicais do monômero, efeito direto, e do solvente (água), efeito indireto, provocada pela radiação [87]:

$$KD = G_M[M] + G_S[S]$$

Onde: K = constante de proporcionalidade; $[M]$ = concentração do monômero; D = dose; $[S]$ = concentração do solvente; G_M e G_S = rendimento de formação de radicais do monômero e do solvente provocada pela radiação (resultado da absorção de $1,6 \times 10^{-17} J = 100 eV$, pelo sistema) [83].

O mecanismo geral onde o polímero genérico PH e o solvente genérico SH sofrem o efeito da radiação seguem as etapas abaixo relacionadas [72]:

a) Ativação (por ionização ou excitação)

b) Formação de radical livre

c) Formação de gás

d) Recombinação

e) Transferência de energia

f) Transferência de radical

g) Ligação cruzada

h) Cisão

9. Caracterização física e química

9.1 Intumescimento

Materiais reticulados sofrem aumento do tamanho de suas cadeias e as ligações entre as mesmas são preferencialmente ligações cruzadas. Este tipo de ligação dificulta a análise por técnicas convencionais, tais como, cromatografia por exclusão de tamanho ou viscosimetria, pois, estas prevêem a dissolução desses materiais [32].

As redes poliméricas intumescem pela sua imersão em solvente apropriado. Mudanças dimensionais, ou aumento no peso das redes intumescidas, podem ser comparadas ao material não intumescido para determinação do grau de reticulação [32, 71].

A determinação do grau de intumescimento é realizada pela relação:

$$I\% = \frac{m_f - m_i}{m_f} \times 100$$

Onde: $I\%$ é o grau de intumescimento em porcentagem, m_f é a massa final em gramas e m_i é a massa inicial em gramas.

9.2 Análise sol-gel

Uma das ferramentas básicas para avaliação da reticulação de soluções poliméricas pela radiação é a análise sol-gel, que se baseia na determinação gravimétrica das frações sol e gel após a irradiação. A fração sol corresponde à fração solúvel da solução, que não sofreu reticulação, enquanto a fração gel, corresponde à fração não solúvel da solução, onde ocorrerem reações cruzadas, formando um gel reticulado. A análise sol-gel permite determinar o rendimento químico da reação de reticulação e cisão de cadeias (degradação) [63, 83].

A rede polimérica ou estrutura de gel é completamente diferente em relação ao comportamento das moléculas originais ou parcialmente reticuladas. A dose requerida para atingir o ponto de gel é D_g e a densidade de reticulação devido a qualquer alta dose D é geralmente expressa em termos de um coeficiente de reticulação δ relacionado a D e D_g ; $\delta = D/D_g$. A radiação aumenta a fração do polímero inicial ligado à rede ou gel (*fração gel* – g), enquanto a fração solúvel s remanescente diminui; $s + g = 1$. A relação entre a fração solúvel s e a dose D depende da massa molecular média inicial e da distribuição desta massa molecular. A teoria da interação da radiação com a matéria, assume que essas reticulações ocorrem randomicamente e são proporcionais à dose [19].

Quando os polímeros são submetidos à radiação ionizante, geralmente são observadas reticulação e cisão da cadeia principal. O processo, em última análise, causa formação de um gel insolúvel, caso a reticulação predomine sobre a cisão. Charlesby e Pinner [19] obtiveram primeiro uma simples expressão relativa a fração sol, s para dose absorvida D :

$$s + \sqrt{s} = \frac{p_0}{q_0} + \frac{2}{q_0 u_{2,0}} D$$

Onde p_0 é a densidade de degradação; q_0 a densidade de reticulação; e $u_{2,0}$ é o grau médio inicial de polimerização.

Contanto que a distribuição inicial da massa molecular seja provavelmente do tipo $M_{w,0} = 2M_{n,0}$, existe uma relação linear entre $s + \sqrt{s}$ e o recíproco da dose D (em kGy). Sendo assim, a equação anterior pode também ser escrita como:

$$s + \sqrt{s} = \frac{G_s}{2G_c} + \frac{9,6 \times 10^6}{M_{w,0} G_c D}$$

ou,

$$s + \sqrt{s} = 0,5\lambda + 0,5(4 - \lambda) \frac{D_g}{D}$$

Onde D e D_g são a dose absorvida e dose gel em kGy, respectivamente; G_s e G_c são o rendimento de cisão e reticulação em 1/100eV ($\lambda = G_s / G_c = 2p_0/q_0$).

Por meio da representação gráfica (FIG. 2-4) da dependência de $s + \sqrt{s}$ em $1/D$ ou D_g/D é possível obter a relação $G_S / 2G_C$ por extrapolação da ordenada para estabelecer a dose onde ocorre somente a reticulação no polímero. Em situações experimentais, observaram-se desvios nas curvas sol/dose da linha reta proposta pela fórmula de Charlesby-Pinner, que não são associadas aos efeitos estruturais do polímero, mas à distribuição da massa molecular de início e de massa molecular média randômica. Para correção destas observações, Olejnik et al [63] propuseram uma nova fórmula geral, que sempre possibilita a representação gráfica de uma reta entre a fração sol e a dose:

$$s + \sqrt{s} = \frac{p_0}{q_0} + \left(2 - \frac{p_0}{q_0}\right) \left(\frac{D_V + D_G}{D_V + D} \right)$$

Ou alternativamente;

$$s + \sqrt{s} = 0,5\lambda + 0,5(4 - \lambda) \left(\frac{D_V + D_G}{D_V + D} \right)$$

Onde D_V é uma dose virtual.

FIGURA 2-4: Representação gráfica da dose gel e a relação do G (cisão) – G_C e G (reticulação) – G_R para um polímeros irradiado. S é a fração solúvel [57].

A dose virtual é uma dose imaginária para adequação da equação de Charlesby – Pinner e têm a função de linearizar os pontos da curva experimental. [63, 83].

9.3 Microscopia

9.3.1 Microscopia óptica

A microscopia óptica caracteriza-se pelo uso de uma lâmpada incandescente que, por meio de um conjunto de lentes côncavas e convexas, ligadas a uma binocular, tem a finalidade de aumentar o tamanho do objeto em estudo. O aumento do objeto é realizado pelo uso de uma objetiva [81].

9.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Por meio de análises microscópicas pode-se determinar os aspectos topológicos e a organização molecular de polímeros. Neste sentido, a microscopia eletrônica de varredura é uma ferramenta de singular análise.

Na microscopia eletrônica de varredura (MEV), um feixe de elétrons é utilizado como fonte de luminescência no lugar de uma lâmpada, como no caso de microscópios ópticos comuns. O feixe de elétrons é corrido (ou varrido) pela amostra com padrão constante. Elétrons secundários, emitidos desta superfície, são coletados e cintilados. O produto do detector de cintilação é alimentado a um tubo de raios catódicos sincronizados com a varredura do feixe de elétrons, que são depois processados por análise computacional, obtendo-se assim a imagem topográfica da mostra. Geralmente as amostras são recobertas com uma fina camada condutora para possibilitar a execução das análises [32].

9.4 Espalhamento de luz (light scattering)

Podem ser obtidas informações das propriedades intramoleculares e intermoleculares de um composto, quando este é analisado por espalhamento de luz em soluções diluídas. Destas informações, a de maior aplicação é a determinação da massa molecular ponderal média $\overline{M}_w$ [5]

Nesta técnica, quando um feixe de luz de intensidade conhecida atravessa a amostra em análise em um dado ângulo, a luz é espalhada e sua intensidade de espalhamento está relacionada com a concentração e tamanho das moléculas.

Para determinação de $\overline{M}_w$ usa-se a análise proposta por Zimm (“Zimm plot”). Esta determinação é obtida por meio da medição do espalhamento em

vários ângulos e em várias concentrações e os resultados são expressos como uma função de $\sin^2(\theta/2) + kc$, onde k é uma constante arbitrária [17].

9.5 Viscosimetria

Esta metodologia é relativamente simples e utiliza uma variação seriada de concentrações da mesma amostra. Por esta técnica podem-se avaliar mudanças na massa molecular das cadeias poliméricas. A viscosidade das soluções contendo a amostra é medida por um capilar onde é determinada a velocidade de escoamento da solução analisada, com temperatura e concentrações cuidadosamente controladas.

A viscosidade relativa (η_r) é uma quantificação dimensional representando uma razão de viscosidade solução / solvente.

$$\eta_r = \frac{t}{t_0}$$

Onde t é o tempo de escoamento da solução e t_0 o tempo de escoamento do solvente puro.

A viscosidade específica (η_{sp}) é o aumento da fração da viscosidade entre a solução e o solvente. A viscosidade específica é definida como:

$$\eta_{sp} = \frac{t - t_0}{t_0} = \eta_r - 1$$

Em relação à viscosidade relativa e a massa molecular, o valor da redução ou viscosidade inerente é extrapolado à concentração zero. Este parâmetro é chamado de viscosidade intrínseca $[\eta]$.

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp} = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{inh}$$

Este valor é obtido pela extrapolação do gráfico η_{sp}/c ou η_{inh} vs c para o zero no intercepto da concentração, conforme FIG. 2-5. A viscosidade intrínseca é geralmente expressa como o inverso da concentração em unidades de dL/g.

FIGURA 2-5. Gráfico genérico η_{sp}/c vs c para determinação da viscosidade intrínseca – $[\eta]$

A relação entre viscosidade intrínseca e a massa molecular é expressa pela equação de Mark-Houwink:

$$[\eta] = K \overline{M}_v^\alpha$$

Onde: K e α são constantes válidas para um determinado intervalo de peso molecular, a uma temperatura específica, com um solvente específico [32].

9.6 Espectroscopia

A espectroscopia baseia-se na verificação do comportamento de uma substância quando exposta a diferentes níveis de energia, obtidos pela incidência de ondas eletromagnéticas de regiões específicas do espectro. Por exemplo, na região do infravermelho, ocorre maior absorção de energia entre os átomos que compõem uma substância, ou seja, é possível verificar quais tipos de ligação existem na molécula analisada (C-C, C-H, C=C); já na região do ultravioleta ou do visível, é possível identificar e quantificar uma molécula em solução, pela presença de um grupo cromóforo, ou um grupo funcional pré-conhecido [93].

9.6.1 Região do infravermelho

A radiação infravermelha corresponde à parte do espectro eletromagnético situado entre as regiões do visível e das microondas. A porção de maior utilidade está situada entre 4000 e 666 cm^{-1} [93]. A absorção destas

energias corresponde à transição entre estágios de energia rotacional (ou vibracional) elevando a padrões característicos de grupos funcionais [29].

Quando a luz infravermelha, de mesma frequência de vibração de uma ligação, incide em uma molécula, ocorre absorção de energia e aumento da amplitude daquela vibração, passando a um estado excitado. Os dois modos fundamentais de vibração das moléculas são: o estiramento, onde a distância entre os dois átomos aumenta ou diminui, permanecendo no mesmo eixo de ligação, e a deformação angular, onde a posição do átomo muda em relação ao eixo original da ligação. Quando a molécula volta ao estado fundamental, a energia absorvida é liberada, e esta energia liberada, é característica de ligações de grupos funcionais presentes no material e suas modificações são indícios de modificações ocorridas no material analisado [29].

9.6.2 Região do Ultravioleta

A região do espectro eletromagnética entre os comprimentos de onda de 200 a 380 nm corresponde à região denominada de ultravioleta. A absorção de energia na região do ultravioleta produz modificação da energia eletrônica da molécula em consequência de transições dos elétrons de valência [93].

A energia absorvida depende da diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Quanto menor for a diferença, maior será o comprimento de onda de absorção [93].

As características principais de uma banda de absorção são a sua posição e a intensidade. A posição da absorção corresponde ao comprimento de onda da radiação cuja energia é igual à necessária para que ocorra a transição eletrônica. Já a intensidade de absorção depende de dois fatores: a probabilidade de interação entre a energia radiante e o sistema eletrônico [93].

A intensidade de uma absorção pode ser expressa em transmitância (T) definida como [90, 93]:

$$T = \frac{I}{I_0}$$

Onde: I_0 é a intensidade de energia radiante que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra.

Uma expressão mais conveniente para a intensidade de absorção é obtida da Lei de Lambert-Beer que estabelece uma relação entre a transmitância, a espessura da amostra e a concentração das espécies que absorvem. A relação é:

$$\log_{10}\left(\frac{I_0}{I}\right) = kcb = A$$

Onde: k = constante característica do soluto, c = concentração do soluto, b = comprimento do caminho óptico através da amostra, A = absorvância.

Quando c é expresso em moles por litro e o comprimento do caminho óptico (b), em centímetros, a expressão acima se torna:

$$A = \epsilon cb$$

O termo ϵ é conhecido como absorvidade molar, ou coeficiente de extinção molar.

9.7 Cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC

As moléculas podem ser separadas de acordo com suas propriedades físicas e químicas, tais como tamanho, formato, cargas, hidrofobicidade e afinidade por outras moléculas. O termo cromatografia líquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography) descreve a separação de moléculas sob alta pressão em uma coluna metálica preenchida com uma matriz [61]. Nesta análise, realiza-se o isolamento e purificação de seus componentes.

A separação dos componentes ocorre quando estes estão distribuídos em duas fases, uma que é estacionária (fase estacionária) enquanto a outra (fase móvel) percola através dela em uma direção definida. O processo ocorre como resultado de repetidas sorções/desorções, que atuam durante o movimento dos componentes da amostra ao longo do leito estacionário, onde a separação ocorre pela diferença na constante de eluição individual dos componentes da amostra [74].

A escolha do tipo de coluna dependerá da característica da amostra que se quer analisar, por exemplo, existem colunas de exclusão molecular, que separam os componentes da amostra por tamanho; colunas de fase normal, que

separam rapidamente compostos hidrofóbicos; colunas de fase reversa, que separam rapidamente compostos hidrofílicos; e colunas de troca iônica, que separam os componentes de acordo com sua interação iônica com a solução da fase móvel utilizada, que geralmente é um gradiente de diferentes valores de pH [100].

3 MATERIAIS E MÉTODOS

FLUXOGRAMA DE TRABALHO

3 MATERIAIS E MÉTODOS

1. Preparação de membranas

1.1. Reticulação pela radiação

1.1.1. Sem quitosana

Foram preparadas soluções de PVP 90K ou PVA $\bar{L}$ 72K + PEG 600 + ágar + água destilada q.s.p. 100% (m/v) em diferentes proporções, como mostrado no Quadro I em apêndice A (membranas de 1 a 5, 9 e 12). As soluções foram vertidas em placas de Petri com 85 mm de diâmetro, após a adição de um filme de poliestireno sobre a mesma. As placas foram embaladas e irradiadas em uma fonte de ^{60}Co tipo Gamma Cell 200, nas doses de 10 a 25 kGy.

Após irradiação, algumas membranas sofreram tratamento térmico em autoclave (121 °C por 20 minutos), sendo então submetidas aos testes juntamente com as outras membranas, como mostrado no Quadro I em apêndice A (membranas de 6 a 8 e 13 do Quadro I, apêndice A).

Outras membranas, após irradiação, foram liofilizadas de acordo com o seguinte procedimento: abrir a embalagem da membrana, cobrir com papel alumínio, fazer orifícios no papel e colocar no congelador -20 °C por 2 horas. Estas membranas foram levadas ao congelador -75 °C e após 24 horas acondicionada no liofilizador, sendo mantidas por, pelo menos, 48 horas (membrana 21 do Quadro I, apêndice A).

1.1.2. Com quitosana

Seguindo a técnica de preparação das membranas de PVP e PVA $\bar{L}$, foram preparadas soluções de quitosana (Polymar – Ceará) a 3% (m/v) em solução tampão ácido acético - acetato de sódio 0,6 mol/L pH 5,0. Deixando-se em agitação por três dias. Adicionou-se PVA $\bar{L}$ e PVP para concentração final na solução de 8% (m/v). Estes polímeros foram diluídos com a solução de quitosana e deixados na mesa agitadora por uma noite. Deixou-se descansar por 1 dia para eliminação das macro bolhas e irradiadas, seguindo o mesmo procedimento

descrito na preparação da membrana de PVP, como mostrado no Quadro I (apêndice A) (membranas 22 e 23).

A membrana de PVA ℓ previamente liofilizada foi mergulhada em solução de quitosana para intumescimento (membrana 21 do Quadro I, apêndice A)

As membranas de PVA ℓ e PVP, foram mergulhadas em solução de quitosana para intumescimento, como mostrado no Quadro I (apêndice A) (membranas 14 a 18 e 20)

1.1.3. Só quitosana

Foram também preparadas, conforme a literatura [46], membranas compostas somente por quitosana a partir de solução 3% (m/v) de quitosana em ácido acético 0,6 mol/L e vertidas sobre placas de Petri. Estas soluções seguiram o mesmo procedimento descrito na preparação da membrana de PVP ou PVA ℓ no item 1.1.2, como mostrado no Quadro I em apêndice A (membrana 24).

1.2. Reticulação por aquecimento ou química pelo glutaraldeído

As membranas preparadas por aquecimento seguiram o mesmo procedimento abaixo, porém não foi adicionado glutaraldeído (membranas 25, 26, 27, 35, 36, 40, 43, 46 e 9 do Quadro I, apêndice A).

Foram preparadas soluções de quitosana de 1 a 3% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L. Em um recipiente foram colocados 15 mL desta solução, mais 5 mL de solução de glutaraldeído nas concentrações de 0,3 mmol a 100 mmol em água. As misturas foram homogeneizadas e vertidas em placas de Petri de 85 mm de diâmetro, que foram levadas à estufa ventilada a 35 ± 5 °C. No Quadro I (apêndice A) estão discriminadas as variações correspondentes (membranas 28, 29, 31, 33, 34, 37, 38, 39, 41, 42, 44, 45, 47, 48, 50, 51, 52 e 54 no Quadro I, apêndice A).

2. Testes qualitativos de resistência física para escolha das membranas

2.1. Após a preparação

Após a preparação da formulação da membrana, foi avaliada a sua capacidade de formação de gel, tornando-se insolúvel em água ou manutenção da solução, sendo possível observar mudança de fase.

2.2. Durante a desembalagem

Após verificação da formação de membrana, o próximo critério de reprovação foi:

- Na retirada com auxílio de pinças: rasgo durante a retirada da placa de Petri.

2.3. Na manipulação

Depois da retirada da membrana da embalagem, a mesma foi avaliada quanto a sua aderência à pele íntegra. Para esta análise, as membranas foram acomodadas nas mãos, nas articulações metacarpo-falangeanas proximais.

Para realização da cultura de queratinócitos sobre as membranas, as mesmas foram colocadas em placas de cultura estéreis, sendo que o critério de aprovação foi, a resistência à intensa manipulação com pinça e tesoura.

3. Cultura *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos

Para este trabalho foram utilizadas as técnicas de separação das células por método enzimático, utilizando tripsina-EDTA, e a cultura dos queratinócitos de acordo com o procedimento de Rheinwald e Green [76], onde os queratinócitos humanos foram semeados em uma camada de sustentação de fibroblastos irradiados, como descrito a seguir, seu crescimento foi acompanhado por microscópio óptico tipo invertido e quando necessário os registros foram efetuados com câmera fotográfica acoplada ao mesmo.

3.1. Fibroblastos

Os fibroblastos CCL92 utilizados provenientes de camundongo, foram cultivados com meio composto por Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), contendo 10% (v/v) de soro bovino, glutamina 4 mM e solução antibiótico/antimicótico de penicilina 100 UI/mL – estreptomicina 100 µg/mL – anfotericina 0,025 µg/mL.

Ao atingirem sua sub-confluência na garrafa de cultura, estes foram submetidos a tratamento enzimático com solução de tripsina 0,05% (m/v) / EDTA 0,01% (m/v), sendo separados em suspensão e, conforme a necessidade, foram semeados em garrafas apropriadas para culturas aderidas e deixados em uma incubadora úmida a 37 °C em 95% de ar e 5% de CO₂, amplificando sua quantidade, ou parte destes fibroblastos foram levados à fonte Gamma Cell com atenuador de 90%, para irradiação na dose de 60 Gy para utilização como camada de sustentação (“feeder layer”) na cultura dos queratinócitos.

3.2. Queratinócitos

3.2.1 Obtenção das células isoladas

A biópsia de pele utilizada para este trabalho foi cedida e processada no Laboratório de Microcirurgia Plástica – Faculdade de Medicina da USP, com consentimento do doador.

Dados do doador:

Paciente: HFK 179, sexo feminino, 24 anos, data da cirurgia: 15/10/2001, tipo de cirurgia: redução de mama, características do fragmento: 10 cm², pele branca com fragmento areolar.

A biópsia de pele foi lavada com solução fisiológica (cloreto de sódio 0,9% (m/v)) e transferida para um bequer contendo álcool na concentração de 70% (v/v) por 25 segundos e lavado novamente com solução fisiológica. Em uma das partes de uma placa de Petri estéril, retirou-se o máximo de derme com o auxílio de pinças e tesouras de ponta curva, colocou-se solução tripsina 0,05% (m/v) / EDTA 0,02% (m/v) e este foi picotado em pedaços com tamanhos de 0,1 a 0,2 mm de diâmetro. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur com a ponta grossa, os fragmentos foram colocados em um frasco de vidro - tripsinizador (possuindo uma

haste magnética no interior da tampa) e se adicionou solução de tripsina/EDTA até volume final de 10 mL. O frasco foi colocado em uma estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ sobre um agitador magnético por 30 minutos. O sobrenadante foi coletado em um tubo de centrífuga ao qual foi adicionado meio de cultura para queratinócitos no mesmo volume retirado do frasco de tripsinização, para neutralização da tripsina, sendo então centrifugado a 1000 rpm / 5 min. Após a centrifugação, o meio de cultura foi aspirado e o precipitado resultante foi suspenso em meio de cultura suficiente para homogeneização e contagem em câmara hemocitométrica (câmara de Neubauer).

Os fragmentos da pele sofreram sucessivos tratamentos com a solução de tripsina/EDTA, até diminuição na contagem total de células após cada 30 minutos. Todo o conteúdo celular foi colocado em um único tubo, formando uma suspensão de células.

3.2.2 Manutenção das culturas

Os queratinócitos separados em suspensão foram semeados (2×10^6 células/garrafa de 75 cm^2) em uma camada de sustentação (“feeder layer”) de fibroblastos CCL92, irradiados a 60 Gy com meio de cultura MCQ (meio de cultura para queratinócitos) sem EGF (fator de crescimento epidérmico) e deixados em uma incubadora úmida a 37°C em 95% de ar e 5% de CO_2 . Após 24 horas, a troca do meio de cultura foi realizada por MCQ completo. O MCQ é constituído de Dulbecco’s Modified Eagle Medium e F12 Ham na proporção 2:1, contendo 10% (v/v) de soro fetal bovino, glutamina 4 mmol/L, solução antibiótico/antimicótico de penicilina 100 UI/mL – estreptomicina 100 $\mu\text{g/mL}$ – anfotericina 0,025 $\mu\text{g/mL}$, adenina 0,18 mM, insulina 5 $\mu\text{g/mL}$, hidrocortisona 0,4 $\mu\text{g/mL}$, toxina colérica 0,1 nmol/L, triiodotironina 20 pM e EGF 10 ng/mL – “epidermal growth factor”.

A manutenção das células foi realizada trocando-se o meio de cultura de 2 em 2 dias até as mesmas atingirem a sub-confluência (um dia antes das colônias ocuparem todo o fundo da placa de cultura). As culturas de queratinócitos sub-confluentes foram tripsinizadas e semeadas novamente,

sempre sobre uma camada uniforme de CCL92 irradiados a 60 Gy, na quantidade correspondente às dimensões das garrafas ou placas de cultura utilizadas.

4. Cultura dos queratinócitos sobre as membranas

Para utilização na cultura dos queratinócitos, as membranas foram expostas à lâmpada germicida ultravioleta do fluxo laminar por 30 minutos cada lado. As membranas foram deixadas intumescendo com água purificada esterilizada, dentro de uma placa de 35 mm de diâmetro, por uma noite.

As membranas foram lavadas 5 vezes com água purificada estéril e foram cortadas de maneira a ocuparem a maior parte do fundo de uma placa de 35 mm de diâmetro. Em cada uma delas, foi colocado um anel de aço inoxidável estéril de 16 mm de diâmetro interno, que recebeu uma leve pressão para fixação na membrana, sem rasgá-la. Foi colocado 1 mL de meio de cultura com 1×10^5 de CCL92 irradiadas a 60 Gy no dia anterior à semeadura dos queratinócitos. No dia seguinte, este meio de cultura foi retirado e $1,5 \times 10^5$ queratinócitos foram semeados em 1 mL de meio MCQ sem EGF. Após 24 horas, o anel foi retirado da membrana e realizada a troca do MCQ com EGF. As trocas do meio de cultura subsequentes foram realizadas de 2 em 2 dias até finalização do experimento.

4.1 Avaliação da morfologia dos queratinócitos sobre as membranas

A morfologia das células semeadas foi acompanhada e descrita conforme Barrandon et al [3], onde foram padronizados valores de interação e associados, em escala crescente, como:

- nenhuma célula aderida observada
- + queratinócitos aderidos, mas com morfologia não característica
- ++ queratinócitos aderidos, mas com morfologia de diferenciação sem formação de colônia.
- +++ queratinócitos aderidos, formação de colônias de células diferenciadas.
- ++++ queratinócitos aderidos, com formação de colônias de células basais.

As membranas com interação de – até ++ foram consideradas reprovadas. As membranas com interação $\geq+++$, foram consideradas aprovadas para continuidade dos estudos.

5. Análise das membranas e seus componentes

5.1. Determinação do intumescimento

Esta análise foi realizada tanto para a determinação da fração sol/gel do PVA ζ , quanto para a caracterização de todas as membranas aprovadas após a cultura com os queratinócitos. As membranas foram cortadas em 4 pedaços, os quais foram pesados separadamente em balança analítica e colocados em um becker com excesso de água purificada. As amostras das membranas foram deixadas em uma sala com temperatura controlada em 22 °C e em intervalos de tempos, foram pesadas e a água foi trocada.

O intumescimento foi determinado pela relação:

$$I\% = \frac{m_f - m_i}{m_i} \times 100$$

Onde: I% é o grau de intumescimento em porcentagem, m_f é a massa final em gramas e m_i é a massa inicial em gramas.

A análise foi encerrada, após não se observar mais alteração da massa.

As membranas utilizadas nesta determinação foram: 11, 12, 21, 29, 42, 52, 53, 54 (Quadro I, apêndice A).

5.2. Caracterização dos componentes das membranas

5.2.1. Caracterização do PVA ζ

5.2.1.1. Determinação da fração sol/gel

Para a determinação da fração sol/gel, foi preparada uma solução de PVA ζ 8% (m/v) em água ultrapurificada q.s.p. 100%. Foram vertidos 15 mL desta solução em placas de Petri de diâmetro de 85 mm e colocado um filme de poliestireno na superfície. As placas foram então empacotadas e irradiadas na fonte Gamma Cell 200. Para cada dose foi preparada uma placa. As doses utilizadas variaram de 3 a 10 kGy.

Após irradiação das membranas, para todas as doses de irradiação, foi determinado o grau de intumescimento conforme o item 5.1 e atingido o equilíbrio até peso constante. As amostras foram lavadas com água purificada em extrator de Soxhlet por 8 horas, em seguida as membranas foram congeladas e secas por liofilização durante 2 dias. As amostras secas foram pesadas e assim determinada a fração gel das membranas. A fração sol foi determinada pela relação:

$$\text{fração sol} = 1 - \text{fração gel}$$

Os resultados obtidos da determinação da fração sol/gel, foram analisados empregando-se o programa “Gel/Sol Analyze”, obtido livremente pelo endereço www.mitr.p.lodz.pl./biomat, para determinação da dose gel (D_g)

5.2.2.Caracterização da quitosana

5.2.2.1. Determinação das constantes de Mark-Houwink

Para esta determinação, foram necessárias duas técnicas de análise (viscosimetria e espalhamento de luz), que foram gentilmente realizadas no Institute of Applied Radiation Chemistry – Division of Biomaterials, Lodz, Polônia.

As amostras para determinação das constantes foram preparadas conforme Ulanski [99], a saber: a quitosana foi utilizada conforme adquirida do fabricante e seca por 24 horas a 50 °C em estufa a vácuo. Para todas as análises, foi preparada uma solução estoque de quitosana 0,5% (m/v), a qual foi utilizada simultaneamente nas duas técnicas de análise, em solução de ácido fórmico 8,5% (v/v) com formiato de sódio 0,5 M. A partir desta solução, foram preparadas diluições seriadas com o mesmo solvente.

Para esta análise, foi utilizada a radiação gama de uma fonte de ^{60}Co , onde amostras do mesmo pó puderam ser fracionadas e expostas a diferentes doses (5, 10, 20 e 35 kGy), obtendo-se, a partir da mesma amostra inicial, diferentes pesos moleculares.

Após preparação das amostras, elas foram analisadas por viscosimetria e espalhamento de luz (light scattering).

5.2.2.1.1. Análise viscosimétrica

Nesta análise, foi utilizado o viscosímetro capilar, tipo Ubbelohde, este sendo preenchido com 15 mL da amostra e sua temperatura equilibrada e mantida a $25,0 \pm 0,1$ °C em um banho termostatizado. O tempo de escoamento da solução foi determinado eletronicamente [99].

5.2.2.1.2. Análise por espalhamento de luz

O solvente e as soluções foram filtradas com filtros de poro 0,22 µm e 0,45 µm respectivamente para retirada de partículas em suspensão. A intensidade da luz espalhada foi medida entre 30 a 120° por BIC Dynamic Light Scattering photometer no comprimento de onda de 514 nm a $25,0 \pm 0,1$ °C. A massa molecular média ponderal ($\overline{M}_w$) foi calculada pelo BIC software (BIC Zimm Plot Software, version 2.12 for Windows), que utiliza determinação gráfica de Zimm. A variação do índice de refração com a concentração (dn/dc), das soluções de quitosana neste solvente utilizado para os cálculos foi de 0,1740 mL/g [99].

5.2.2.2. Determinação do grau de acetilação

Esta análise foi realizada no Centro de Biologia Molecular – Laboratório de proteínas, IPEN/CNEN-SP.

Neste ensaio foram utilizadas diferentes quitosanas. A saber:

(P) quitosana padrão: Polymar – Ceará, proveniente de camarão.

(M) quitosana de média massa molecular: Aldrich 448867 – proveniente de caranguejo

(A) quitosana de alta massa molecular: Aldrich 419419 flakes (Coarse ground) – proveniente de caranguejo.

(FCF) quitosana Polymar gentilmente desacetilada pelo Dr. Bronislaw Polakiewicz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

O grau de acetilação das diferentes quitosanas foi determinado por espectroscopia de absorção no infravermelho. A quitosana em pó foi previamente seca em uma estufa a 40 °C por uma semana, sendo então misturadas com KBr para confecção de pastilhas. Cada pastilha foi preparada pela mistura de 100 mg

de KBr e 4 mg de quitosana, em um almofariz. O pó misturado foi colocado em um suporte especial para confecção de pastilhas. O suporte foi colocado em uma prensa hidráulica até 9000 Torr e então foi aplicado vácuo ao sistema por 30 minutos. A pastilha foi analisada em um espectrômetro Bomem MB –100 FTIR, onde foram lidas as absorvâncias nos números de onda de 1655 e 3450 cm^{-1} . O grau de acetilação foi determinado pela fórmula:

$$DA\% = \left(\frac{A_{1655} \text{cm}^{-1}}{A_{3450} \text{cm}^{-1}} \times 100 \right) \div 1,33$$

Onde: DA é o grau de acetilação em porcentagem, A_{1655} é o valor da absorvância no número de onda de 1655 cm^{-1} , A_{3450} é o valor da absorvância no número de onda de 3450 cm^{-1} , e 1,33 é uma constante [94].

5.2.2.3. Determinação da dissolução em diferentes valores de pH

A dissolução em diferentes valores de pH foi acompanhada por espectroscopia na região do ultravioleta. Primeiro foi realizada a determinação do comprimento de onda ideal para a determinação da quitosana. Para esta finalidade, foi preparada uma solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L. Os comprimentos de onda analisados variaram de 280 a 380 nm e lidos em um espectrofotômetro (Pharmacia Biotech modelo Ultrospec III)

Foram preparadas várias soluções com diferentes valores de pH, utilizando-se misturas de solução de ácido acético 0,6 mol/L com acetato de sódio 0,6 mol/L. O pH variou de 2,78 a 8,58. Para cada pH foi preparada uma solução de quitosana 2% (m/v), as quais foram deixadas por dois dias a temperatura ambiente para total dissolução. Nas amostras onde foram observadas formação de uma suspensão, o sobrenadante foi coletado nas cubetas próprias para espectrofotômetro e estas colocadas na centrífuga a 1000 rpm por 10 minutos. Após este tratamento, as absorvâncias das amostras foram lidas no comprimento de onda ideal.

5.3. Membranas como composto dérmico

5.3.1. Membrana de PVA/ liofilizada pela radiação e liofilizada

5.3.1.1. Cinética de intumescimento da membrana de PVA/ liofilizada, com solução de quitosana

Utilizando a membrana 21 do Quadro I (apêndice A), preparada como segue: uma membrana de PVA/ liofilizada foi cortada em 6 pedaços e cada pedaço foi pesado e colocado separadamente em recipientes com 30 mL de uma solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L. A mudança do peso das membranas foi acompanhada utilizando a balança analítica até peso constante. Para este experimento, as membranas foram deixadas a $22,0 \pm 0,1$ °C.

A determinação do grau de intumescimento foi realizada utilizando-se a relação descrita no item 5.1 deste capítulo.

5.3.1.2. Avaliação da degradação da membrana *in vitro*

A membrana de PVA/ liofilizada e a mesma intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L seca foram cortadas de maneira a não ultrapassar 35 mm de diâmetro após intumescimento. Cada pedaço foi pesado para determinação do peso seco inicial e colocado em uma placa de 35 mm de diâmetro.

Foram adicionados em cada placa 5 mL de solução tampão de fosfato (NaCl 0,136 mol/L; KCl 0,0042 mol/L; Na₂HPO₄ 0,0081 mol/L, KH₂PO₄ 0,00146 mol/L) nos valores de pH de 5,7 e 7,4 para verificação da degradação por hidrólise da quitosana. A mesma solução foi utilizada para realização da degradação enzimática pela lisozima, onde foi preparada solução de concentração de 4 mg/mL [98] com cada uma das soluções utilizadas. Em ambos os casos as amostras da membrana foram colocadas em um banho termostático a $37,0 \pm 0,1$ °C, retiradas em intervalos de tempo definidos, lavadas em água purificada e colocados na estufa a 35 ± 5 °C para secagem. As membranas depois de secas foram pesadas em balança analítica e o percentual de degradação calculado, pela seguinte relação:

$$D\% = \frac{m_i - m_f}{m_i} \times 100$$

Onde: D% é o percentual de perda de peso, m_f é a massa final em gramas e m_i é a massa inicial em gramas.

5.3.1.3. Avaliação do tamanho dos poros por microscopia eletrônica de varredura

Para esta análise foi utilizada uma membrana de PVA ℓ irradiada a 10 kGy, e liofilizada. Estas membranas foram fixadas com cola de prata sobre um suporte de alumínio, e recobertas com ouro na forma de plasma em um pulverizador (“sputtering”) com corrente de 28 mA por 3 minutos. Após recobrimento com ouro, as amostras foram levadas ao microscópio eletrônico de varredura, onde foi verificada sua superfície, a qual foi fotografada.

A análise estereológica [42] das fotomicrografias foram realizadas com o programa UTHSCSA ImageTool versão 3.0 [104].

5.3.2. Membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído

A membrana 42 do Quadro I (apêndice A) foi preparada com uma solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L. Em um recipiente foram colocados 15 mL desta solução, mais 5 mL de solução de glutaraldeído 0,125% (v/v) em água. A mistura foi homogeneizada e derramada em uma placa de Petri de 85 mm de diâmetro, que foi levada à estufa ventilada a 35 ± 5 °C. Após secagem, foi realizada a determinação dos resíduos de glutaraldeído e do tempo de intumescimento destas membranas com água purificada.

5.3.2.1. Determinação de resíduos de glutaraldeído na água de lavagem das membranas

Esta análise foi gentilmente realizada no Centro de Biologia Molecular – Grupo de hormônios.

As membranas foram lavadas a cada 3 dias com água purificada e esta água foi recolhida, por 1, 2 e 3 semanas. As amostras foram deixadas em

temperatura ambiente. As águas de lavagem das membranas foram analisadas para determinação de possíveis resíduos de glutaraldeído.

A curva de calibração foi preparada utilizando-se três pontos com diferentes concentrações de glutaraldeído em solução. Para o preparo desses pontos foi utilizada uma solução de glutaraldeído 25% (v/v). Essa foi diluída a 5% (v/v) para obtenção do primeiro ponto de análise e os demais pontos foram obtidos por uma diluição decimal seriada dessa, chegando assim às concentrações de 0,5% (v/v) e de 0,05% (v/v).

A análise foi efetuada injetando-se uma solução composta de 990 µL de solução de acetonitrila + 10 µL de solução-mãe de DNPH (2,4 – dinitrofenilhidrazona) + 10 µL de ácido perclórico 1mol/L + 10 µL da amostra a ser analisada em um HPLC com as seguintes configurações: detetor SP-10AV, bombas LC-10AD, controlador SCL-10^A e injetor Rheodyne. A coluna utilizada foi uma Suprapac Sephasil C18, 5 µm de 4 x 250 mm (Pharmacia-Biotech), o fluxo utilizado durante toda a análise foi de 0,7 mL/minuto e o comprimento de onda empregado foi de 254 nm. A temperatura durante os ensaios foi de 25 °C [49].

5.3.2.2 Cinética de intumescimento destas membranas com água purificada

A cinética de intumescimento destas membranas foi efetuada conforme item 5.1 deste capítulo

5.3.3. União das membranas de PVA/ liofilizada e intumescida com solução de quitosana e a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído

Para realização deste procedimento, foram utilizadas membranas de PVA/ preparadas conforme o item 5.3.1. (membrana número 21) como base e variações da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído conforme o item 1.2, mantendo-se as características da membrana 42.

5.3.3.1. Preparação com secagem completa das membranas

A membrana de PVA/ reticulada pela radiação, liofilizada e intumescida com quitosana, foi acomodada em uma placa de vidro. Sobre ela, foram vertidos

10 mL da solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L com solução de glutaraldeído 0,125% (v/v), na proporção de 15 mL da solução de quitosana com 5 mL da solução de glutaraldeído. O sistema todo foi colocado estufa na ventilada a $35,0 \pm 0,5$ °C, até secagem completa.

5.3.3.2. Preparação sem secagem da membrana de PVA $\bar{\iota}$ intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L.

A membrana de PVA $\bar{\iota}$ intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L estava inicialmente seca e foi processada conforme o item 4.

Foram preparadas soluções de glutaraldeído nas concentrações de 0,5% (v/v) e 2,5% (v/v) em água. Estas soluções foram filtradas em um fluxo laminar e em condições estéreis com filtros de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro de 0,22 μ m.

A cada 2 mL da solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L foram adicionados 168 μ L de solução de glutaraldeído. A mistura foi homogeneizada e utilizados 0,5 mL para recobrimento da membrana cortada em circunferência de diâmetro de 35 mm e acomodadas em uma placa de cultura estéril. Estas membranas foram deixadas na incubadora a 37 °C por 2 horas e, após este tempo, lavadas duas vezes com água purificada estéril e fixado o anel de cultura. A água foi completamente retirada e adicionado DMEM dentro e fora do anel. As membranas foram deixadas na incubadora por, pelo menos, uma noite e as células foram semeadas para verificação do seu crescimento.

5.3.3.3 Verificação da adesão e do crescimento celular

As membranas preparadas segundo os itens 5.3.3.1 e 5.3.3.2, foram acompanhadas durante 15 dias com observação diária ao microscópio invertido e fotografadas.

6. Comparação do comportamento dos queratinócitos sobre membranas preparadas a partir de diferentes quitosanas.

Para este estudo, foram preparadas membranas com diferentes quitosanas, conforme o procedimento realizado para a membrana número 42 do Quadro I (apêndice A).

Foram preparadas soluções de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L com solução de glutaraldeído 0,125% (v/v), na proporção de 15 mL da solução de quitosana com 5 mL da solução de glutaraldeído. Esta mistura foi homogeneizada e vertida em uma placa de Petri e colocada em estufa ventilada a $35,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, até secagem completa.

As quitosanas utilizadas neste estudo foram:

- ✓ quitosana padrão (P): Polymar – Ceará – proveniente de camarão
- ✓ quitosana de média massa molecular (M): Aldrich 448867 – proveniente de caranguejo
- ✓ quitosana de alta massa molecular (A): Aldrich 419419 flakes (Coarse ground) – proveniente de caranguejo
- ✓ quitosana (FCF): Polymar-Ceará – proveniente de camarão, gentilmente desacetilada pelo Dr. Bronislaw Polakiewicz da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

7. Estimativa de custos do composto dermo-epidérmico

Foi realizada a estimativa de custos da membrana, considerando-se que a porção dérmica e a porção epidérmica são processos de preparação diferentes. A seqüência dos cálculos pode ser visualizada no apêndice B.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

1. Preparação de membranas

No total foram preparadas 54 membranas descritas no Quadro I, apêndice A, sendo:

8 compostas de PVP (1 a 8)

7 compostas de PVA ℓ (9 a 13, 19 e 33)

8 compostas de PVP e quitosana (14 a 16, 22, 25, 36, 28 e 39)

20 compostas de PVA ℓ e quitosana (17, 18, 20, 21, 23, 26, 35, 43, 46, 49, 29 a 31, 38, 44, 45, 47, 48, 50 e 51)

11 compostas de quitosana (24, 27, 40, 32, 34, 37, 41, 42 e 52 a 54)

1.1. Reticulação pela radiação

Destas 54 membranas, 24 foram reticuladas pela radiação, sendo:

1.1.1. Sem quitosana: 14 membranas

8 compostas de PVP (1 a 8)

6 compostas de PVA ℓ (9 a 13, 19)

1.1.2. Com quitosana: 9 membranas

4 compostas de PVP e quitosana (14-16, 22)

5 compostas de PVA ℓ e quitosana (17, 18, 20, 21, 23)

1.1.3. Só quitosana: 1 membrana composta só de quitosana (24)

1.2. Reticulação por aquecimento ou química pelo glutaraldeído

Na reticulação por aquecimento, foram preparadas 9 membranas; e na reticulação química pelo glutaraldeído, foram realizadas 21 membranas, sendo:

1.2.1. Reticulação por aquecimento: 9 membranas

2 compostas de PVP e quitosana (25, 36)

5 compostas de PVA ℓ e quitosana (26, 35, 43, 46, 49)

2 compostas de quitosana (27, 40)

1.2.2. Reticulação química com glutaraldeído: 21 membranas

1 composta de PVA ℓ (33)

2 compostas de PVP e quitosana (28 e 39)

10 compostas de PVA ℓ e quitosana (29 a 31, 38, 44, 45, 47, 48, 50 e 51)

8 compostas de quitosana (32, 34, 37, 41, 42 e 52 a 54)

2. Testes qualitativos de resistência física para escolha das membranas

2.1. Após a preparação

O critério de avaliação das membranas, nesta fase, foi a formação de gel (FIG. 4-1 B) sendo que apenas a membrana 24 permaneceu em solução como mostra a FIG. 4-1 A).

A

B

FIGURA 4-1. Exemplos da formação ou não de gel após sua preparação. **A)** membrana líquida sem formação de gel, a seta mostra a solução escorrida. **B)** gel na forma de membrana.

2.2. Durante a desembalagem

As membranas que foram aprovadas no item 2.1, foram avaliadas quanto à formação de rasgo quando retiradas da placa (FIG. 4-2 A). As membranas que rasgaram na retirada da placa foram as 22 e 23.

As membranas que se mantiveram íntegras (FIG. 4-2 B), passaram para o próximo teste.

A

B

FIGURA 4-2. Exemplos da desembalagem da membrana. **A)** membrana rasgada, a seta indica a posição do rasgo; **B)** membrana íntegra, a seta indica a membrana íntegra.

2.3. Na manipulação

As membranas aprovadas no item 2.2 foram avaliadas quanto a sua manipulação com pinça após o intumescimento (FIG. 4-3 A) e aderência à pele íntegra (FIG. 4-3 B). Nesta etapa, as membranas que não apresentaram condições de manipulação com a pinça foram as membranas 5, 13, 25, 26, e 27

A

B

FIGURA 4-3. Exemplos da manipulação da membrana. **A)** membrana rasgada; **B)** membrana íntegra, com perfeita adesão às articulações da mão.

As membranas que passaram nos testes qualitativos de resistência física, foram utilizadas como suporte (FIG. 4-4) para a cultura dos queratinócitos.

FIGURA 4-4. Exemplo da membrana em condições físicas para serem testadas como suporte para cultura de queratinócitos.

Na FIG. 4-4 pode-se observar a aderência do anel delimitador da cultura.

3. Cultura *in vitro* de queratinócitos e fibroblastos

3.1. Fibroblastos

Os fibroblastos utilizados funcionam como camada de sustentação e alimentação para os queratinócitos. Para esta função, foi utilizada uma linhagem de fibroblastos de camundongo (ATCC – cód. CCL-92). Estes fibroblastos foram irradiados a 60 Gy, que é a dose requerida para mantê-los vivos, porém com sua capacidade de divisão celular inibida.

3.2. Queratinócitos

3.2.1. Obtenção das células isoladas

A biópsia de pele apresentou um rendimento total de células de $2,76 \times 10^6$ por cm^2 , estas células totais correspondem, em sua maioria a queratinócitos, porém puderam ser observados melanócitos e fibroblastos, os quais foram reduzidos nas passagens subseqüentes pela seleção com o meio de cultura.

3.2.2. Manutenção das culturas

Os queratinócitos HK179 foram cultivados, da primeira à terceira amplificação, até a sub-confluência (FIG. 4-5), antes de serem utilizados nos experimentos sobre as membranas.

FIGURA 4–5. Fotografia da cultura de queratinócitos na sub-confluência. Aumento de 100X, filtro azul. (A) colônia de queratinócitos; (B) fibroblastos CCL-92 irradiados a 60 Gy.

Na FIG. 4-5 observam-se os queratinócitos, células pequenas de aspecto circular e unidas umas às outras, crescendo em colônias circulares que estão se unindo. Entre estas colônias, pode-se observar as células CCL-92 sendo descoladas da placa (aglomerado de células claras).

4. Cultura dos queratinócitos sobre as membranas

4.1 Avaliação da morfologia dos queratinócitos sobre as membranas

Das 54 preparações iniciais, após avaliação qualitativa de resistência física, foi possível verificar a interação dos queratinócitos com 46 membranas.

A TAB. 4-1 mostra o critério de atribuição de valores na avaliação da membrana quando em cultura com os queratinócitos.

TABELA 4-1. Padronização dos valores aplicados às membranas quando em cultura com os queratinócitos. Fotografias após 4 dias de cultivo sobre as membranas, aumento de 100 X, com filtro azul

Valor	Descrição	Aspecto
-	nenhuma célula aderida observada
+	queratinócitos aderidos, mas com morfologia não característica
++	queratinócitos aderidos, mas com morfologia de diferenciação sem formação de colônia.
+++	queratinócitos aderidos, formação de colônias de células diferenciadas.
++++	queratinócitos aderidos, com formação de colônias de células basais.

A TAB. 4-2 apresenta as quantificações das membranas com o valor atribuído durante o tempo de cultura.

TABELA 4-2. Atribuição do valor de cultura às membranas

Valor	Número de membranas com este valor	Número da membrana no Quadro I, apêndice A
-	27	1, 4, 9, 10, 14, 15, 16, 17, 18, 28, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51.
+	6	2, 3, 19, 31, 32, 41,
++	4	7, 8, 20, 30,
+++	5	6, 11, 12, 21, 29
++++	4	42, 52, 53, 54

Nesta fase, as membranas que obtiveram valores de +++ e +++, foram consideradas aprovadas com potencial para serem um composto dermo-epidérmico.

5. Análise das membranas e seus componentes

As análises das membranas e de seus componentes foram realizadas após a avaliação da interação das membranas com os queratinócitos.

5.1. Determinação do intumescimento

As determinações do intumescimento em água foram realizadas nas membranas aprovadas na sua interação com os queratinócitos e os resultados são mostrados na TAB. 4-3.

TABELA 4-3. Determinação do grau de intumescimento na situação de equilíbrio

Número da membrana no Quadro I	Componentes principais	Valor do grau de intumescimento no equilíbrio (%)
11	PVAL com aditivos	11,33
12	PVAL	10,92
21	PVAL liofilizado	2566,02
29	PVAL, quitosana e glutaraldeído	458,61
42	Quitosana P com glutaraldeído	165,05
52	Quitosana M com glutaraldeído	205,93
53	Quitosana A com glutaraldeído	216,12
54	Quitosana FCF com glutaraldeído	66,43

5.2. Caracterização dos componentes das membranas

As membranas estudadas são compostas basicamente por PVA ℓ e quitosana, os quais foram caracterizados quanto a: PVA ℓ – análise sol/gel; quitosana – viscosidade e espalhamento de luz para determinação das constantes de Mark-Houwink, determinação do grau de acetilação e dissolução em diferentes valores de pH.

5.2.1. Caracterização do PVA ℓ

Na FIG. 4-6 é mostrada a variação do grau de intumescimento em função da dose de irradiação.

FIGURA 4-6. Gráfico do intumescimento para análise sol/gel do PVA ℓ . Grau de intumescimento das membranas de PVA ℓ irradiadas em diferentes doses ($\blacklozenge$ 5, $\blacksquare$ 6, $\blacktriangle$ 7, $\times$ 8, $\ast$ 9 e $\bullet$ 10 kGy).

Na FIG. 4-6 observa-se que no tempo de 150 horas, todas as membranas já atingiram o equilíbrio de intumescimento. Quando atingido o equilíbrio, observa-se que não existe diferença nos valores de intumescimento nas doses de 8, 9 e 10 kGy; já para 5, 6 e 7 kGy, observa-se que quanto menor a

dose, maior o valor no intumescimento. Para a dose de 3 kGy não foi observada a formação de gel.

5.2.1.1. Determinação da fração sol/gel

A FIG. 4-7 apresenta os resultados analisados pelo programa *Gel/Sol Analyze*.

Os gráficos e os parâmetros obtidos por esta análise são mostrados na FIG. 4-7 e na TAB. 4-4, respectivamente.

FIGURA 4-7. Gráficos obtidos através do programa *Gel/Sol Analyze*. (A) $s \times D$; (B) $s+s^{0.5} \times 1/D$; (C) $s+s^{0.5} \times (D_v + D_g)/(D_v+D)$; (D) $s+s^{0.5} \times D_g/D$. Onde: D = dose absorvida; s = porção sol; D_v = dose virtual; D_g = dose gel. Linhas em azuis: equação de Charlesby; linhas em preto: equação de Charlesby-Rosiak. Doses analisadas: 6, 7, 8, 9 e 10 kGy.

TABELA 4-4. Parâmetros obtidos pela análise do programa Sol/Gel Analyze.

Equação	Charlesby-Pinner	Charlesby-Rosiak
p_0/q_0	1,3	0
Correlação	0,93	0,98
D_g (kGy)	3,7	2,4
D_v (kGy)	-	22,1

5.2.2. Caracterização da quitosana

5.2.2.1. Determinação das constantes de Mark-Houwink

As constantes de Mark-Houwink foram determinadas pela relação dos resultados obtidos pela análise viscosimétrica e espalhamento de luz.

5.2.2.1.1. Análise viscosimétrica

$$y = 0,0308x + 0,2626 \quad R^2 = 0,9968$$

5kGy

$$y = 0,0234x + 0,2197 \quad R^2 = 0,9909$$

10kGy

$$y = 0,0149x + 0,1615 \quad R^2 = 0,97$$

20kGy

$$y = 0,0089x + 0,121 \quad R^2 = 0,9949$$

35kGy

FIGURA 4-8. Gráficos $c \times \eta_{sp}/c$ capilar de soluções de quitosana irradiada pela exposição a uma fonte de ^{60}Co nas doses de 5, 10, 20 e 35 kGy, obtidos por viscosímetro capilar tipo Ubbelohde.

Com as equações obtidas na FIG. 4-8, pode-se determinar a viscosidade intrínseca da quitosana em relação à dose de irradiação recebida, conforme TAB. 4-5.

TABELA 4-5. Viscosidade intrínseca $[\eta]$ da quitosana nas diferentes doses.

Dose (kGy)	$[\eta]$ (cm ³ /g)
5	262,6
10	219,7
20	161,5
35	121,0

5.2.2.1.2. Análise por espalhamento de luz

FIGURA 4-9. Gráficos de Zimm para determinação da massa molecular média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) da quitosana irradiada nas doses de 5, 10, 20 e 35kGy. Intensidade de luz de 30 a 120°, comprimento de onda de 514 nm a 25,0 ± 0,1°C. $dn/dc = 0,1740$ ml/g

A partir da análise destes gráficos (FIG. 4-9), foi determinada a massa molecular média viscosimétrica ($\overline{M}_v$), calculada pelo BIC software (BIC Zimm Plot

Software, version 2.12 for Windows), como descrito em Materiais e Métodos item 5.2.2.1.2. Os resultados desta análise estão apresentados na TAB. 4-6.

TABELA 4-6. Massa molecular média viscosimétrica ($\overline{M}_v$) da quitosana nas diferentes doses.

Dose (kGy)	$\overline{M}_v$ (kD)
5	291
10	258
20	187
35	125

5.2.2.1.3. Cálculos para determinação das constantes de Mark-Houwink

Por meio dos resultados obtidos nas análises de viscosimetria (TAB. 4-5) e espalhamento de luz (TAB. 4-6), construí-se um gráfico $\log [\eta] \times \log \overline{M}_v$ como mostrado na FIG. 4-10.

FIGURA 4-10. Gráfico de $\log [\eta] \times \log \overline{M}_v$.

Deste gráfico, obtém-se a seguinte equação da reta:

$$y = 0,8972 x + 0,1895, \text{ com } R^2 = 0,9845.$$

Sabendo-se que:

$$\log [\eta] = \log K + \alpha$$

então a equação pode ser escrita como:

$$\log [\alpha] = \log 0,8972 + 0,1895$$

Desta relação temos que $\alpha = 0,8972$ e $K = 1,547035 \text{ cm}^3\cdot\text{g}^{-1}$, então a equação de Mark-Houwink para esta quitosana do estudo pode ser escrita como:

$$[\eta] = 1,547035 \times \bar{M}_v^{0,8972}$$

5.2.2.1.4. Cálculo da massa molecular média viscosimétrica da quitosana

Determinando a viscosidade intrínseca da quitosana não irradiada ($283,70 \text{ cm}^3/\text{g}$) e substituindo na fórmula acima obtida, obtivemos o valor da massa molecular média viscosimétrica de $330 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$.

5.2.2.2. Determinação da dissolução de quitosana em diferentes valores de pH

A dissolução foi analisada pela técnica de espectroscopia na região do ultravioleta, onde inicialmente determinou-se o comprimento de onda no qual se pudesse avaliar a concentração da quitosana dissolvida, sem a necessidade da realização de diluições prévias para a leitura. Este comprimento de onda foi fixado em 301 nm. A curva de calibração é mostrada na FIG. 4-11.

FIGURA 4-11. Curva de calibração da absorbância vs concentração de quitosana no comprimento de onda de 301 nm. Equação da reta: $0,0738x - 0,016$, $R^2 = 0,9996$

Utilizando-se a curva de calibração da FIG. 4-11, foram determinadas as concentrações de quitosana em diferentes pH, sendo que todas as amostras

partiram de uma mesma concentração inicial, portanto uma diminuição de concentração, equivale à diminuição da mesma em permanecer em solução no referido pH.

FIGURA 4-12. Gráfico da determinação da concentração de quitosana dissolvida em diferentes valores de pH.

Nesta FIG. 4-12 observa-se a diminuição da concentração de quitosana solúvel em valores de pH maiores que 5.

5.2.2.3. Determinação do grau de acetilação

A TAB. 4-7 mostra os valores do grau de acetilação e seu correspondente grau de desacetilação de diferentes quitosanas, obtidos pela análise em espectroscopia na região do infravermelho. As especificações das diferentes quitosanas estão descritas no item 5.2.2 de Materiais e Métodos.

TABELA 4-7. Determinação do grau de acetilação e desacetilação de diferentes quitosanas

quitosana	DA%	DD%	sd
P	53,65	46,35	0,41
M	60,74	39,26	6,77
A	48,02	51,98	1,81
FCF	28,47	71,53	0,53

5.3. Membranas como composto dérmico

5.3.1. Membrana de PVA γ reticulada pela radiação e liofilizada

A membrana analisada foi preparada a partir de uma solução de PVA γ 8% v/v em água, vertidos 15 mL em uma placa de 85 mm de diâmetro, colocado um filme de poliestireno na superfície, lacrada e irradiada na dose de 10 kGy. Após a irradiação, esta membrana foi liofilizada. Esta membrana foi então intumescida com uma solução de quitosana na concentração de 2% (m/v) em ácido acético 0,6 mol/L. A seguir, apresentamos a sua cinética de intumescimento com a solução de quitosana, a cinética do reintumescimento do conjunto, a degradação *in vitro*, e a determinação do tamanho do poro desta membrana.

5.3.1.1. Cinética de intumescimento da membrana de PVA γ liofilizada, com solução de quitosana

FIGURA 4-13. Intumescimento de membrana de PVA γ liofilizada com solução de quitosana na concentração de 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.

Nestas condições experimentais, observou-se que o tempo que a membrana de PVA γ levou para atingir o equilíbrio de intumescimento com a solução de quitosana foi de 120 horas, atingindo o máximo valor de 1730%. Análises matemáticas foram aplicadas aos resultados obtidos e uma informação adicional relevante obtida é que a razão de proporção de PVA γ /quitosana na membrana seca é de 2,9.

As mesmas amostras usadas para determinação do intumescimento da solução de quitosana foram secadas a $35 \pm 5^{\circ}\text{C}$ até completa desidratação, e realizado o intumescimento com água purificada, como mostrado na FIG. 4-14.

FIGURA 4-14. Intumescimento da membrana de PVA/líofilizada com solução de quitosana e secas, com água purificada.

Na FIG. 4-14, observa-se que o intumescimento máximo das membranas com água ocorreu em menos de 24 horas.

5.3.1.2. Avaliação da degradação da membrana *in vitro*

A FIG. 4-15 mostra a perda de massa da membrana quando esta foi deixada em diferentes valores de pH, com e sem lisozima, verificando-se sua degradação *in vitro*.

FIGURA 4-15. Avaliação da degradação *in vitro* da membrana de PVA/líiofilizada e intumescida com quitosana. (*)PVA/líiofilizada sem quitosana nos valores de pH 5,7 e 7,4 com e sem lisozima; (▲)PVA/líiofilizada com quitosana no valor de pH 5,7 com lisozima; (■)PVA/líiofilizada com quitosana no valor de pH 7,4 com lisozima; (◆)PVA/líiofilizada com quitosana no valor de pH 5,7 sem lisozima; (×) PVA/líiofilizada com quitosana no valor de pH 7,4 sem lisozima.

Na FIG. 4-15, observa-se que o PVA/líiofilizada não sofre hidrólise no período de análise (15 dias). As membranas com quitosana apresentam perda de peso, sendo mais acentuada em pH 5,7.

5.3.1.3. Avaliação do tamanho do poro por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Na FIG. 4-16 é mostrada a micrografia eletrônica obtida por MEV, a qual foi utilizada para determinação do tamanho do poro por análise estereológica.

FIGURA 4-16. Micrografia obtida por MEV da superfície da membrana de PVA/ irradiada na dose de 10 kGy e liofilizada. Aumento de 1000 X. **A)** Micrografia original. **B)** Micrografia de A com as marcações dos poros e distâncias dos poros utilizadas para determinação de suas dimensões.

Os poros maiores da FIG. 4-16 apresentam, em média, 84,5 µm, variando de 73,4 a 95,6 µm. Os poros menores apresentam tamanho médio de 27,8 µm, variando de 21,2 a 33,8 µm. Sendo que os poros maiores são os mais representativos da membrana.

5.3.2. Membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído

5.3.2.1. Determinação de resíduos de glutaraldeído na água de lavagem das membranas

A FIG. 4-17 mostra a identificação de prováveis resíduos de glutaraldeído na membrana 42 do Quadro I, apêndice A, (FIG. 4-17 C, D, e E), juntamente com uma amostra padrão com uma quantidade conhecida do mesmo (FIG. 4-17 A) e em uma amostra isenta do mesmo (FIG. 4-17 B).

FIGURA 4-17 Cromatograma da identificação de glutaraldeído em água por HPLC. **A)** controle de glutaraldeído na concentração de 1:1000; **B)** controle sem glutaraldeído; **C)** 1 semana de recolhimento da água de lavagem da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído; **D)** 2 semanas de recolhimento da água de lavagem da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído; **E)** 3 semanas de recolhimento da água de lavagem da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído.

Na FIG. 4-17 (**A** a **E**) observa-se a ocorrência de um pico de absorção em 4,14, que corresponde ao tempo de retenção da DNPH em excesso e que não se ligou ao glutaraldeído da amostra. A presença de um pico de retenção em $14,444 \pm 0,229$ minutos (FIG. 4-17 **A**), corresponde ao tempo de retenção do DNPH ligado ao glutaraldeído, o qual não foi observado nas amostras analisadas (FIG. 4-17 **C**, **D** e **E**).

5.3.2.2 Cinética de intumescimento destas membranas com água purificada

A FIG. 4-18 mostra a cinética de intumescimento da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído.

FIGURA 4-18. Gráfico da cinética de intumescimento da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído.

Nesta FIG. 4-18 observa-se que o equilíbrio do intumescimento da membrana ocorreu em menos de 15 minutos e o máximo de seu intumescimento foi de 160%.

5.3.3. União das membranas de PVA/ liofilizada e intumescida com solução de quitosana e a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído

Os procedimentos a seguir foram realizados para obtenção de uma membrana com a soma das características verificadas separadamente das membranas 21 e 42 do Quadro I, apêndice A.

5.3.3.1. Preparação com secagem completa das membranas

Após a união das membranas pela secagem completa, verificou-se que quando intumescidas com água, apresentavam fissuras em sua superfície.

5.3.3.2. Preparação sem secagem da membrana de PVA/ intumescida com solução de quitosana 2% (p/v) em ácido acético 0,6M.

A união das membranas preparada sem secagem completa da membrana apresentou sua superfície homogênea.

5.3.3.3 Verificação da adesão e do crescimento celular

Os queratinócitos foram semeados nas membranas preparadas nos itens 5.3.3.1 e 5.3.3.2. O acompanhamento da interação dos queratinócitos nestas membranas é mostrado na FIG. 4-19 e FIG. 4-20,

A FIG. 4-19 mostra o crescimento dos queratinócitos nas membranas preparadas por secagem completa da membrana

FIGURA 4-19. Fotografias ao microscópio óptico do acompanhamento das culturas de queratinócitos na membrana formada pela união das membranas 21 e 42 do Quadro I, apêndice A, por secagem completa. Aumento de 100 X com filtro azul. **A e B)** 7 dias de cultivo; **C e D)** 14 dias de cultivo. **MS** membrana superior (quitosana com glutaraldeído), **MI** membrana inferior (PVA γ irradiado, liofilizado e intumescido com solução de quitosana) e **Q** queratinócitos.

Na FIG. 4-19 observa-se a fissura da membrana superior, e nas partes integras da mesma, observam-se queratinócitos multiplicando-se para formação de epitélio estratificado (FIG. 4-19 **A e B**), e migrando pela superfície da membrana (FIG. 4-19 **D**). Na região da membrana em que a membrana inferior ficou exposta, observam-se células aderidas com grande diferenciação.

A FIG. 4-20 mostra o crescimento dos queratinócitos nas membranas preparadas sem secagem completa da membrana.

FIGURA 4-20. Fotografias ao microscópio óptico do acompanhamento das culturas de queratinócitos na membrana formada pela união das membranas 21 e 42 do Quadro I, apêndice A, por secagem completa. Aumento de 100 X com filtro azul. **A)** 4 dias de cultivo; **B)** 9 dias de cultivo; **C)** 12 dias de cultivo

A FIG. 4-20 mostra o crescimento dos queratinócitos nas membranas preparadas sem secagem completa. Nesta FIG. 4-20 observa-se que os queratinócitos aderiram na superfície da membrana, porém não se multiplicaram, formando colônias de células diferenciadas.

6. Comparação do comportamento dos queratinócitos sobre membranas preparadas a partir de diferentes quitosanas.

As FIG. de 4-21 a 4-24 mostram o comportamento dos queratinócitos sobre as membranas preparadas a partir de diferentes quitosanas reticuladas com glutaraldeído.

FIGURA 4-21. Fotografias ao microscópio óptico dos queratinócitos cultivados sobre membranas de quitosana - P reticulada pelo glutaraldeído. Aumento de 100 X com filtro azul. **A)** 2 dias de cultivo; **B)** 4 dias de cultivo; **C)** 9 dias de cultivo; **D)** 14 dias de cultivo.

Na FIG. 4-21 observa-se que os queratinócitos aderem à membrana em grupos (FIG. 4-21 **A**) e conforme segue o tempo de cultivo, queratinócitos morfológicamente basais aparecem na membrana, por migração (FIG. 4 21 **B** e **C**), até formarem uma camada homogenia de células, que recobre toda a superfície da membrana.

FIGURA 4-22. Fotografias ao microscópio óptico dos queratinócitos cultivados sobre membranas de quitosana - M reticulada pelo glutaraldeído. Aumento de 100 X com filtro azul. **A)** 2 dias de cultivo; **B)** 4 dias de cultivo; **C)** 9 dias de cultivo; **D)** 14 dias de cultivo.

Na FIG. 4-22 observam-se que os queratinócitos aderem à membrana composta com quitosana M em grupos (FIG. 4-22 **A**) como na membrana preparada com quitosana P (FIG. 4-21 **A**). Nestas membranas os queratinócitos apresentam-se com morfologia diferenciada por mais tempo que nas membranas preparadas com a quitosana P (FIG. 4-23 **B** e **C**), retardando a identificação de queratinócitos com morfologia basal em sua superfície (FIG. 4-22 **D**).

FIGURA 4-23. Fotografias ao microscópio óptico dos queratinócitos cultivados sobre membranas de quitosana - A reticulada pelo glutaraldeído. Aumento de 100 X com filtro azul. **A)** 2 dias de cultivo; **B)** 4 dias de cultivo; **C)** 9 dias de cultivo; **D)** 14 dias de cultivo.

Na FIG. 4-23 observam-se os queratinócitos aderidos à membrana composta com quitosana A com morfologia menos diferenciada (FIG. 4-23 **A**), que nas membranas compostas com quitosana P (FIG. 4-21 **A**) e M (FIG. 4-22 **A**), e o tempo requerido para crescer sobre toda a membrana foi menor que para as outras membranas, com 9 dias de cultivo a superfície da membrana estava recoberta por queratinócitos cultivados (FIG. 4-23 **C**).

FIGURA 4-24. Fotografias ao microscópio óptico dos queratinócitos cultivados sobre membranas de quitosana - FCF reticulada pelo glutaraldeído. Aumento de 100 X com filtro azul. **A)** 2 dias de cultivo; **B)** 4 dias de cultivo; **C)** 9 dias de cultivo; **D)** 14 dias de cultivo.

Na FIG. 4-24 observam-se os queratinócitos aderidos à membrana composta com quitosana FCF, com morfologia semelhante às células sobre a membrana preparada com quitosana A (FIG. 4-23 **A**).

7. Estimativa de custos do composto dermo-epidérmico

Na TAB. 4-8 encontra-se a estimativa do custo do composto dermo-epidérmico, onde estão separadas as porções dérmica e epidérmica. Os itens utilizados para a composição da estimativa do custo estão apresentados no apêndice B.

TABELA 4-8. Estimativa do custo da porção dérmica e da porção epidérmica do composto.

Porção	Valor em Reais	*Valor em Dólar Americano	Participação nos custos
Dérmica	R\$ 1,54	U\$ 0,51	0,04 %
Epidérmica	R\$ 4.879,15	U\$ 1.626,38	99,96 %
Total	R\$ 4.880,69	U\$ 1.626,89	

* Cotação do dólar americano em junho de 2004: U\$ 1,00 = R\$ 3,00.

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O composto dermo-epidérmico foi idealizado a partir do conceito de “Engenharia de Tecidos”, com base nos critérios de elaboração conforme Yannas [107], Burke [16] e Boyce [12, 13]. O planejamento foi elaborado com a utilização de uma porção polimérica na forma de membrana, onde queratinócitos cultivados inicialmente *in vitro* fossem semeados em sua superfície e crescessem formando um epitélio normal, caracterizando assim, a formação de um composto dermo-epidérmico.

Polímeros de origem sintética formadores de hidrogel foram escolhidos para a formação da porção dérmica, os quais atendem as características de manuseio e moldagem ao leito da ferida, e já são empregados na área médica com ampla aceitação e caracterização biológica [72].

Um polímero de origem natural, que possuísse capacidade de degradação pelos fluídos biológicos, foi incorporado para estimular a interação da membrana ao organismo. Para atender a esta característica, foi escolhido utilizar um polissacarídeo, em específico a quitosana, pois pela literatura este polímero tem a capacidade de ser degradado pelo organismo [64, 67, 98].

O composto dermo-epidérmico proposto possui formato de membrana e sua composição está baseada em duas partes. Uma parte inferior basicamente polimérica, composta por PVA ℓ ou PVP e quitosana; e outra parte superior basicamente biológica, formada por queratinócitos.

Na preparação da porção dérmica, foram realizadas várias misturas e meios de reticulação: por radiação γ proveniente de uma fonte de ^{60}Co ; por reticulação física, por meio da secagem da membrana em estufa; e por utilização de um composto químico, o glutaraldeído. O Quadro I (apêndice A) discrimina todas as composições e procedimentos de preparação, sendo que as mesmas se encontram resumidas no item 1 de RESULTADOS.

Na realização dos testes qualitativos de resistência física, foi avaliado o primeiro item das características básicas para desenvolvimento de um composto dermo-epidérmico, a possibilidade de manuseio [12, 13, 15, 107]. A sua efetiva

formação de gel (FIG. 4-1) e sua desembalagem (FIG. 4-2), representaram avaliações rápidas para consideração de modificações nos processos de preparação das membranas.

A radiação ionizante mostrou ser eficiente na reticulação dos polímeros formadores de hidrogel como o PVA ℓ e o PVP (FIG. 4-1 B), porém para a quitosana, observou-se a ocorrência de degradação da mesma, que pôde ser constatada pela diminuição de sua viscosidade após a irradiação. O mesmo ocorreu quando esta foi irradiada misturada com o PVA ℓ e o PVP (FIG. 4-1 A).

Durante a desembalagem foram descartadas 2 membranas (22 e 23) por terem rasgado ao serem retiradas da placa, conforme FIG. 4-2 A.

A efetiva avaliação da manipulação da membrana, representa a avaliação qualitativa física mais significativa. Desta avaliação constatou-se que as membranas de PVA ℓ possuem extrema flexibilidade e moldagem à pele (FIG. 4-3 B). Na cobertura da pele íntegra, verificou-se que estas membranas cobriam os sulcos naturais e não se observava a formação de bolhas durante sua aplicação. Estas membranas satisfizeram uma das características básica para o desenvolvimento de um composto dermo-epidémico, quanto a se moldarem completamente ao leito da ferida, como mostrado na FIG. 4-3 B. Verificou-se ainda, que estas membranas possuem boa capacidade de interação com a quitosana (membranas 17, 18, 20, 21, 23, 29, 31, 38, 44, 45, 47, 48, 50 e 51).

Por outro lado, as membranas preparadas somente com quitosana reticulada com glutaraldeído, são delicadas no seu manuseio (FIG. 4-3 A), foram inicialmente aprovadas, pois puderam ser manuseadas até instalação na placa de cultura. Após o período de cultivo das células sobre as mesmas, quando se torna necessária a sua retirada da placa de cultura, as membranas foram de difícil manipulação, geralmente rasgando - se, porém estas membranas foram as que melhor apresentaram interação com os queratinócitos, como discutido a seguir.

As membranas formadas foram montadas conforme a FIG. 4-4, para serem avaliadas quanto a sua interação com os queratinócitos e, para realização desta análise, foi necessário estabelecer a cultura dos queratinócitos utilizados para os ensaios. Decidiu-se pela utilização de células provenientes de apenas um paciente, pois se verificou na literatura que células de diferentes pacientes podem apresentar respostas diferentes [41], e como este trabalho estava iniciando a escolha da membrana, a utilização de diferentes paciente poderia levar a

resultados não conclusivos. A FIG. 4-5 mostra as características morfológicas das células utilizadas neste trabalho.

Em uma segunda avaliação as membranas sofreram nova seleção conforme a interação dos queratinócitos sobre elas. As membranas interagiram diferentemente com os queratinócitos, e por isso, foi necessário realizar a padronização da avaliação deles nas membranas. A TAB. 4-1 mostra o critério de avaliação utilizado para atribuição de valores à interação das membranas com os queratinócitos.

A TAB. 4-2 mostra que as membranas com valor atribuído de +++ e ++++ são de número reduzido (5 para os valores +++ e 4 para os valores ++++). Analisando-se o Quadro I (apêndice A), verifica-se que a composição das membranas com estes valores são, em sua maioria, compostas de PVA ℓ e quitosana (11, 12, 21 e 29), ou só quitosana (42, 52, 53 e 54), sendo que somente a membrana 6 é composta de PVP.

A partir dos dados obtidos até então, foram escolhidos dois tipos de membranas para a continuidade do trabalho: 1) PVA ℓ reticulado por radiação ionizante, liofilizado ou não e intumescido ou não com solução de quitosana; 2) quitosana reticulada com glutaraldeído. Os componentes das membranas foram caracterizados, bem como as mesmas. Estas membranas aprovadas foram analisadas quanto ao grau de intumescimento, como mostrado na TAB. 4-3.

As membranas de PVA ℓ foram inicialmente preparadas em água, que após a irradiação, permanecem “presas” na rede polimérica [19, 71, 72, 85, 86, 87]. Pelo intumescimento determina-se a quantidade de água que esta membrana consegue absorver a mais em sua rede (membranas 11 e 12 do Quadro I, apêndice A). A membrana de PVA ℓ liofilizada (membrana 21 do Quadro I, apêndice A) apresentou o maior valor de intumescimento, pois durante o processo de preparação, toda a água contida na sua rede polimérica foi retirada, restando apenas o polímero reticulado.

As membranas preparadas com quitosana e glutaraldeído (membranas 42, 52, 53, 54 do Quadro I, apêndice A) foram preparadas nas mesmas condições e a diferença entre uma e outra foi a especificação da quitosana utilizada na preparação.

Neste sistema o grau de intumescimento está relacionado com a hidrofilicidade/hidrofobicidade da membrana. Na TAB. 4-3 observa-se que a quitosana FCF forma membranas menos hidrofílicas que as membranas P, M e A.

A porção dérmica composta por PVA ℓ deve possuir uma rede porosa, com poros maiores que 70 μm [23]. O tamanho dos poros das membranas pode ser regulado pela dose de irradiação (itens 6 e 9.1 de CONSIDERAÇÕES GERAIS) [32, 71], porém, existe uma dose de irradiação mínima para a formação da membrana (item 8 de CONSIDERAÇÕES GERAIS) [19]. A determinação desta dose mínima foi realizada pela análise sol/gel. Para esta análise, foi realizada a determinação do intumescimento de membranas preparadas nas mesmas condições de preparação da membrana dérmica com doses variando de 3 a 10 kGy. A determinação do intumescimento até o tempo de equilíbrio é mostrado na FIG. 4-6.

Na FIG. 4-6 observa-se que o equilíbrio do intumescimento ocorre em 150 horas para todas as membranas. Na dose de 3 kGy não foi observada formação de gel. Os dados obtidos nesta análise foram utilizados no programa *Gel/Sol Analyse*. A FIG. 4-7 apresenta a análise destes resultados e na TAB. 4-4 os parâmetros calculados pelo programa.

Os cálculos estão baseados na equação de Charlesby-Pinner [19], a qual sofreu modificações por não se adequar a todos os modelos experimentais, sendo utilizada também a equação Charlesby-Rosiak [83].

Os valores obtidos por ambas equações são significativamente próximos. Os valores $p_0/q_0 \geq 0$, significam que a reação predominante é de reticulação. Os valores de D_g estão um pouco abaixo da dose de irradiação mais baixa aplicada, isto significa que realmente houve formação de gel na dose de 5 kGy e não para a dose de 3 kGy. Pela equação de Charlesby-Rosiak, a dose de formação de gel é 2,4 kGy.

A quitosana, como um polímero de origem natural, possui variações de suas características devido à fonte de obtenção (caranguejo, camarão e outros) e de processamento [47]. A quitosana utilizada originalmente foi comprada da Empresa Polymar Ceará em quantidade suficiente para o desenvolvimento deste trabalho, e realizou-se sua caracterização pela determinação das constantes de

Mark-Houwink (que fornece a massa molecular média viscosimétrica), sua solubilidade em diferentes valores de pH e seu grau de acetilação.

A determinação das constantes de Mark-Houwink foi realizada pela associação das técnicas de viscosidade e de espalhamento de luz. A variação de sua massa molecular média viscosimétrica foi realizada pela exposição, da quitosana em pó, à radiação γ em diferentes doses.

Os resultados obtidos da análise viscosimétrica são apresentados na FIG. 4-8 e os valores de variação da viscosidade intrínseca $[\eta]$ relacionados com a dose de irradiação encontram-se na TAB. 4-5.

A análise por espalhamento de luz forneceu gráficos de “Zimm”, mostrados na FIG. 4-9 analisados pelo programa computacional BIC Zimm Plot Software, version 2.12 for Windows, cujos resultados de determinação da massa molecular média ponderal, em relação à dose de irradiação, são mostrados na TAB. 4-6.

Os resultados das TAB. 4-5 e 4-6 foram relacionados (FIG. 4-10) para a construção do gráfico $\log \overline{M}_w$, obtido por espalhamento de luz, “versus” $\log [\eta]$, obtido por viscosimetria. Com estes resultados foi possível a determinação dos parâmetros da equação de Mark-Houwink $\alpha = 0,8972$ e $K = 1,547035 \text{ cm}^3 \cdot \text{g}^{-1}$, determinando-se assim a equação geral como:

$$[\eta] = 1,547035 M^{0,8972}$$

Determinando o valor da viscosidade intrínseca da quitosana não irradiada e substituindo este valor na fórmula acima, chegou-se à massa molecular viscosimétrica média de $330 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$.

A quitosana é um polissacarídeo insolúvel na água, porém solúvel em soluções ácidas, portanto, uma de suas características é a dissolução em soluções de diferentes valores de pH [78]. Para avaliar a quantidade de quitosana solúvel nos diferentes valores de pH, realizou-se uma curva de calibração em um espectrofotômetro utilizando luz ultravioleta (FIG. 4-11). O comprimento de onda de 301 nm foi determinado pela verificação de leitura na concentração máxima de quitosana utilizada (20 g/L).

A FIG. 4-12 mostra a variação da concentração de quitosana solúvel em função do pH, determinada por espectrofotometria. Nesta FIG. 4-12 observa-se que a região de transição da solubilidade da quitosana ocorre no intervalo de

pH 4 a 6, sendo neste último, observado que a quitosana é praticamente insolúvel.

Visualmente, a transição de solubilidade pôde ser acompanhada pelo aparecimento de precipitado de quitosana, este ocorrendo em pH 5,1. Aqui se observou claramente que a quitosana precipita em valores de pH acima de 5, isto tornou-se um incômodo para a cultura dos queratinócitos, pois o pH do meio de cultura é 7,4.

O grau de aceitação da quitosana foi determinado por espectroscopia na região do infravermelho. Após a determinação do grau de acetilação da quitosana original (Polymar) e tendo-se em conta que este grau foi maior que 50%, foram incluídas mais três tipos de quitosana, as quais foram usadas para comparação do comportamento dos queratinócitos sobre estas membranas. Estas quitosanas incluíram tanto diferentes massas moleculares de diferentes fabricantes (Aldrich), quanto a própria quitosana original desacetilada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas. A TAB. 4-7 mostra os valores de acetilação, com o correspondente valor de desacetilação, das diferentes quitosanas, apresentando: graus e acetilação maiores (60,74% para a M) que o da membrana original (53,65% para a P); graus de acetilação menores (48,02% para a A) e graus de acetilação com valores próximos da metade (28,47% para a FCF) da quitosana original.

O grau de acetilação determina a razão de radicais amida e acetil ao longo da cadeia de quitosana [4]. Quanto menor o grau de acetilação, maior o número de radicais amida expostos na cadeia. O grau de acetilação influencia diretamente a hidrofiliabilidade dos materiais preparados por quitosana, quanto menor o grau de acetilação, menor sua hidrofiliabilidade [4]. Esta constatação pôde ser comprovada pelo intumescimento das membranas preparadas com estas quitosanas, como mostrado na TAB. 4-3 (membranas número 42, 52, 53 e 54 do Quadro I, apêndice A). As membranas preparadas com a quitosana FCF apresentaram o menor valor de intumescimento, sendo menos hidrofílicas que as membranas preparadas pelas outras quitosanas. Em contraste, a membrana preparada com a quitosana M, apresentou maior valor de intumescimento e maior valor de acetilação sendo, entre as membranas de quitosana em estudo, a mais hidrofílica.

Seguindo a idéia inicial para a preparação da membrana, segundo a qual além da presença de um polímero biocompatível para manutenção da matriz dérmica, esta membrana deveria conter um polímero biodegradável para auxiliar na vascularização, e verificando que estes polímeros seriam respectivamente o PVA ℓ e a quitosana, as membranas 21 e 42 do Quadro I (apêndice A), foram caracterizadas como compostos dérmicos de escolha. Na membrana 21 composta de PVA ℓ foi determinada a cinética de intumescimento com solução de quitosana, o reintumescimento com água, avaliação de sua degradação *in vitro* e avaliação do tamanho do poro. Na membrana 42 composta por quitosana e glutaraldeído, verificou-se a presença de glutaraldeído em sua água de lavagem e sua cinética de intumescimento.

O equilíbrio de intumescimento da membrana de PVA ℓ irradiada e liofilizada com solução de quitosana foi atingido em 120 horas e o valor máximo foi de 1730% como mostra o gráfico FIG. 4-13. Ao se aplicar análises matemáticas, foi determinado que a razão PVA ℓ / quitosana na membrana é de 2,9. Isto significa que a membrana seca é predominantemente composta de PVA ℓ .

A utilização destas amostras para a determinação do reintumescimento em água foi necessária, pois a membrana para ser utilizada na cultura dos queratinócitos deve ser exposta à lâmpada germicida ultravioleta do fluxo laminar e para que a descontaminação seja mais eficiente, esta membrana deve estar seca. A FIG. 4-14 mostra esta cinética de intumescimento, em que o equilíbrio ocorre em menos de 24 horas e após este tempo as membranas podem ser usadas na cultura celular, sendo este reintumescimento de 6780%.

O aumento do valor de intumescimento da membrana de PVA ℓ irradiada, intumescida com solução de quitosana e seca, indica que esta é uma membrana nova.

A membrana de PVA ℓ irradiada e intumescida com quitosana foi preparada para ser usada como composto dérmico, portanto sofrerá ação dos fluidos do organismo, principalmente da água e enzimática pela lisozima [55]. Esta ação foi acompanhada pela perda de peso da membrana, quando incubada em solução com e sem enzima.

Dois valores de pH foram escolhidos para a realização deste ensaio, o pH 7,4, por ser o pH fisiológico do organismo em geral [55]; e o pH 5,7, por ser o

pH fisiológico específico da epiderme [73]. A FIG. 4-15 mostra o acompanhamento desta ação por 15 dias.

O ensaio da degradação *in vitro* foi realizado conforme Tomihata e Ykada [98]. Neste artigo, os autores somente realizaram o ensaio de degradação na presença da enzima e apenas no pH 7,4. O ensaio de degradação realizado neste trabalho levou em consideração a possibilidade da quitosana sofrer degradação pela solução tampão. O gráfico da FIG. 4-15 sugere que, neste modelo experimental, a presença de lisozima não aumenta a degradação da quitosana *in vitro*. O valor de pH tem influência na degradação da quitosana; em pH 5,7 verifica-se que a degradação é mais acentuada que no pH 7,4.

Durante a realização experimental do ensaio de degradação no pH 7,4, constatou-se que a quitosana precipitava no interior da membrana, fato esperado devido a determinação da solubilidade da quitosana como mostrado no gráfico da FIG. 4-12. Na precipitação da quitosana, ocorre diminuição da quitosana solúvel disponível, podendo ser atribuídos os menores valores de degradação.

A membrana de PVA ℓ foi projetada como composto dérmico e para avaliar a sua aplicabilidade *in vivo*, esta membrana deve possuir porosidade que não prejudique a neovascularização. Foram feitos estudos de correlação de tamanho de poro com a neovascularização [24], sendo uma das características que originou o produto Integra ® , que possui tamanho de poros de 70 a 100 μm [21]. Seguindo esta medida, a metodologia utilizada para a determinação do tamanho do poro foi baseada na realização de micrografia por MEV, como mostrado na FIG. 4-16.

No desenvolvimento do Integra ® o processo de liofilização faz parte da reticulação da rede de colágeno e sua estrutura morfológica não varia no produto final [21]. Na membrana preparada para este trabalho, a liofilização corresponde a uma forma de retirada da água da mesma, a qual foi preparada em solução aquosa, para penetração da solução de quitosana na membrana sem alteração da sua concentração pela presença de solvente. Durante a liofilização, a membrana encolhe em 30% do seu tamanho original e este encolhimento prejudica a visualização da amostra por MEV. Apesar destes contratempos, o tamanho do poro pode ser estimado variando de 73,4 a 95,6 μm para os poros

maiores, e de 21,2 a 33,8 μm para os poros menores, indicando que esta membrana quando implantada em um organismo pode sofrer invasão de células endoteliais, para formação de novos vasos, e fibroblastos, que promoverão a síntese de colágeno.

A membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído (número 42 do Quadro I, apêndice A) também foi caracterizada como parte do composto dérmico. Nesta membrana foi verificada a provável presença de resíduos de glutaraldeído, pois este componente é tóxico para as células [31]. A verificação de resíduos de glutaraldeído não ligados à membrana foi realizada por HPLC e os cromatogramas são mostrados na FIG. 4-17. Nas membranas analisadas, em que foi recolhida a água de lavagem total das membranas, quando preparada para cultura com os queratinócitos, não foi detectada a presença de glutaraldeído nos tempos de lavagem de 1, 2 e 3 semanas (FIG. 4-17 C, D e E).

A cinética de intumescimento foi determinada para estas membranas como mostrado no gráfico da FIG. 4-18. Neste gráfico verifica-se que o intumescimento foi em média de 160% e o equilíbrio foi atingido em 15 minutos.

Neste valor de intumescimento, não foram observadas alterações de dimensões da membrana e por atingir o valor de equilíbrio em 15 minutos, pode ser uma vantagem sobre a membrana de PVA ℓ , pois pode ser manipulada com maior rapidez.

As membranas de PVA ℓ reticuladas pela radiação e intumescidas com quitosana (membrana 21 do Quadro I, apêndice A) apresentam características de manipulação adequadas como composto dérmico, porém os queratinócitos apresentaram a sua multiplicação prejudicada, mudando sua morfologia para queratinócitos diferenciados. Em contrapartida, a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído (membrana 42 do Quadro I, apêndice A) apresentou pouca resistência ao rasgo, porém os queratinócitos interagiram conforme esperado sobre estas membranas. Neste ponto do trabalho, foram obtidas duas membranas que sozinhas atendem parcialmente os requisitos para um composto dermo-epidérmico:

- ✓ Possibilidade de manuseio – As membranas de PVA ℓ são adequadas ao manuseio com pinça e tesoura. A membrana de quitosana reticulada com

glutaraldeído já requer maior atenção ao manuseio e mesmo assim, rasga com facilidade.

- ✓ Moldar-se ao leito da ferida – A membrana de PVA/ mostrou ser extremamente maleável, indicando que pode ser colocada adequadamente no leito da ferida (FIG. 4-3 B). A membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído não consegue moldar-se com tamanha flexibilidade, deixando “bolsas” de ar entre a pele e a membrana.
- ✓ Controle dos componentes – Os componentes das duas membranas são atóxicos e antigênicos. A membrana de PVA/ com quitosana mostrou que pode ter sua degradação controlada; parece favorecer a penetração de vasos sanguíneos e fibroblastos; porém não interage eficientemente com os queratinócitos para formação de epitélio em sua superfície. Em contrapartida, a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído possui uma interação favorável para o cultivo dos queratinócitos.

O composto dermo-epidérmico idealizado deveria conter as características obtidas nas duas membranas separadas, então, para atingir este objetivo, o passo seguinte foi unir as duas membranas. A porção voltada para derme seria composta pela membrana de PVA/ reticulada pela radiação, liofilizada e intumescida com solução de quitosana; e a porção voltada para a epiderme seria composta com a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído, na qual poderiam ser cultivados os queratinócitos em sua superfície.

A união das membranas procedeu-se de duas maneiras: 1) a solução de quitosana com glutaraldeído foi vertida sobre a membrana de PVA/ intumescida com quitosana e levada à estufa para secagem de todo o sistema; 2) uma fina camada de solução de quitosana com menor volume de solução de glutaraldeído, mas mantendo-se a proporção da membrana 21, foi vertida sobre a membrana de PVA/ intumescida com quitosana e levada à estufa por duas horas para reticulação da membrana de quitosana com glutaraldeído.

Nas membranas preparadas por secagem completa, verificou-se que estas possuíam fissuras da membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído. As células semeadas sobre estas membranas apresentaram crescimento com migração sobre a superfície recoberta com quitosana (FIG. 4-19) e nas regiões onde as membranas de PVA/ com quitosana ficaram expostas, não se observa a

multiplicação dos queratinócitos. As fissuras na membrana superior podem ter ocorrido pela diferença de intumescimento das membranas, pois enquanto a membrana de PVA/ intumescida com solução de quitosana possui um grau de intumescimento em água de 6900%, e para absorção desta água a membrana aumenta suas dimensões, a membrana de quitosana reticulada com glutaraldeído possui um grau de intumescimento de 160%, sem variar suas dimensões, portanto, ocorre o rasgo da membrana superior pelo aumento das dimensões da membrana inferior. Porém constatou-se, que apesar desse fato, as duas membranas se mantiveram unidas como pode ser observado na FIG. 4-19.

As membranas preparadas sem secagem apresentaram sua superfície íntegra e foi possível observar queratinócitos aderidos em sua superfície, porém estas células não se multiplicaram (FIG. 4-20). Neste processo de união das membranas, parece que a concentração de glutaraldeído usada não foi suficiente para a adequada reticulação.

Chatelet et al [20] realizaram um estudo da adesão e proliferação de queratinócitos utilizando membranas de quitosana com diferentes graus de acetilação. Nesse trabalho eles variaram o grau de acetilação de 2,5 a 47% , observando que o grau de acetilação é importante para cada tipo celular, ou seja, para os fibroblastos, quanto maior o grau de acetilação, maior o número de células encontradas, já para os queratinócitos, quanto maior o grau de acetilação, menor o número de células encontradas.

Sendo assim, após a determinação do grau de acetilação da nossa quitosana original, e outras quitosanas do mercado, realizou-se a comparação do comportamento dos queratinócitos sobre as membranas de diferentes quitosanas reticuladas nas mesmas condições da membrana 42 do Quadro I (apêndice A). Estas novas membranas correspondem às membranas 52, 53, e 54 do Quadro I (apêndice A).

Neste ensaio foi possível avaliar se a fonte animal, a massa molecular média e o grau de acetilação influenciam na interação dos queratinócitos. A membrana 42 do Quadro I (apêndice A) foi preparada com a quitosana Polymar – Ceará (quitosana P), que foi exaustivamente caracterizada neste trabalho. A membrana 52 foi preparada com a quitosana Aldrich, classificada pelo fabricante como quitosana de média massa molecular (de 100 a 500 g.mol⁻¹) (quitosana M). A membrana 53 foi preparada com outra quitosana Aldrich, classificada pelo

fabricante como quitosana de alta massa molecular ($> 500 \text{ g.mol}^{-1}$) (quitosana A). Ambas são provenientes de caranguejo. A membrana 54 foi preparada com a quitosana Polymar desacetilada pelo prof. Dr. Bronislaw Polakiewick da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (quitosana FCF).

As membranas preparadas com quitosana P apresentam interação com os queratinócitos levando-os a se multiplicar e cobrir a membrana por volta de 14 dias de cultivo. As células que iniciam a “saída” do aglomerado apresentam morfologia basal e verifica-se que estas células procuram cobrir toda a superfície até encontrar a borda de outra colônia, para assim iniciar a estratificação da camada epidérmica, como mostrado na FIG. 4-21.

As membranas preparadas com quitosana M apresentaram interação favorável para o crescimento dos queratinócitos em sua superfície (FIG. 4-22). Quando comparado o tempo de crescimento das células nestas membranas com as membranas preparadas com quitosana P, pode-se notar retardo no aparecimento de células basais em sua superfície, a morfologia das células nas membranas foi semelhante quando a membrana de quitosana P possuía 4 dias de cultivo e a membrana M com 9 dias de cultivo (FIG. 4-21 B e FIG. 4-22 C)

As membranas preparadas com quitosana A apresentaram melhor interação com os queratinócitos quando comparadas com as membranas preparadas com quitosana P e quitosana M (FIG. 4-21, 4-22 e 4-23). Os queratinócitos quando semeados nestas membranas, apresentam morfologia próxima do basal, e por este motivo, a rápida ocupação da superfície da membrana ocorre em menor tempo.

As membranas preparadas com quitosana FCF apresentaram interação com os queratinócitos (FIG. 4-24) semelhante à membrana preparada com quitosana A (FIG. 4-23) e melhores quando comparadas com as membranas preparadas com quitosana P (FIG. 4-21) e quitosana M (FIG. 4-22). O tempo de cobrimento da membrana foi semelhante ao da membrana preparada com quitosana A.

Os queratinócitos interagiram com todas estas membranas preparadas com as diferentes quitosanas, e estas podem ser relacionadas da seguinte maneira:

A quitosana M com a quitosana P podem ser comparadas em relação à fonte animal da qual foi obtida. A quitosana P é proveniente da casca de camarão

e a quitosana M da casca de caranguejo. Estas quitosanas possuem massa molecular semelhante, segundo o fabricante Aldrich, a quitosana M possui massa molecular média no intervalo de 100 a 500 g.mol⁻¹; para a quitosana P, a massa molecular média determinada foi de 330 g.mol⁻¹. O grau de acetilação determinado para as duas quitosanas foi próximo, 53,65% para a quitosana P e 60,74% para a quitosana M.

Na avaliação da interação das membranas com estas quitosanas, verificou-se que a morfologia das células era semelhante (FIG. 4-21 e 4-22), as células aderem agrupadas com aparência diferenciada, e após 4 dias para a membrana composta de quitosana P (FIG. 4-21 B) e 9 dias para a membrana composta de quitosana M (FIG. 4-22 C), observou-se a presença de células basais epidérmicas provenientes destes grupamentos celulares. Isto indica que a fonte de obtenção da quitosana não deve interferir na sua interação com a membrana. A diferença no período de verificação das células basais pode estar relacionada à pequena variação do grau de acetilação.

Esta observação pode ser estendida para as quitosanas M e A, provenientes do mesmo fabricante, possuem massa molecular diferente, mas a análise deste parâmetro torna-se de difícil conclusão, pois o grau de acetilação delas também é diferente, 48,02% para a quitosana A e 53,65% para a quitosana M.

As membranas compostas com quitosana P e quitosana FCF, permitem avaliar a influência do grau de acetilação na interação dos queratinócitos com a superfície das membranas, pois a quitosana FCF foi preparada a partir da quitosana P. O grau de acetilação determinado para as duas quitosanas foi de 53,65% para a quitosana P e 28,47% para a quitosana FCF. As FIG. 4-21 e 4-23 mostram a diferença da interação dos queratinócitos nas membranas.

Os queratinócitos apresentaram maior interação com as membranas compostas com quitosana FCF. Resultados semelhantes foram encontrados por Chatelet et al [20] onde se verifica que quanto menor o grau de acetilação da quitosana, melhor a interação com os queratinócitos.

Finalmente, foi realizada a estimativa do custo do composto dermo-epidérmico, como parte dos atributos relacionados a compostos para aplicação como substituto cutâneo. A TAB. 4-8 apresenta os valores estimados e os itens para elaboração destes custos estão descritos no apêndice B. Verifica-se que a

porção epidérmica corresponde ao maior custo para confecção do composto, sendo a porção dérmica, composta pelos polímeros propostos, quase inexpressiva no valor do produto final (0,04% para a porção dérmica contra 99,96% para a porção epidérmica), cabendo assim, uma parceria com os profissionais médicos para avaliação da sua aplicação terapêutica. Porém, antes da realização de sua aplicação terapêutica, ainda são necessários: realização de maior número de experimentos, para a confirmação *in vitro* da união das duas membranas como constituintes de um único composto dérmico; avaliação dos diferentes tipos de quitosana para composição deste composto; e finalmente, verificação do comportamento desta membrana em modelo animal, já que as características necessárias como tamanho dos poros, degradação controlada e crescimento dos queratinócitos em sua superfície, foram atingidas.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Foi determinada uma composição, de baixo custo, para a formação da membrana a ser utilizada como composto cutâneo, sendo esta composta por PVA ℓ e quitosana.

A membrana obtida é o resultado da união de duas outras membranas, uma inferior e outra superior, esta última que ficará em contato direto com os queratinócitos.

O processo de preparação da membrana inferior compreende a reticulação do PVA ℓ em solução por meio da radiação ionizante, liofilização desta membrana e incorporação por intumescimento da quitosana nesta rede polimérica.

A membrana superior é diretamente preparada sobre a inferior, adicionando-se quitosana reticulada com glutaraldeído.

A fase inferior desta membrana mostrou boas propriedades de manipulação, resistindo ao rasgo durante os trabalhos e a fase superior mostrou alta interação com os queratinócitos, permitindo sua multiplicação e cobertura na membrana.

A fase da membrana constituída de quitosana pôde ser degradada *in vitro* em condições fisiológicas.

Não foram detectados resíduos de glutaraldeído que poderiam desfavorecer a utilização desta membrana.

A fase da membrana constituída de PVA ℓ apresentou porosidade compatível com aquela necessária para penetração celular.

A interação dos queratinócitos com a fase superior da membrana depende do grau de acetilação da quitosana utilizada e da massa molecular média ponderal, sendo este o parâmetro principal na escolha dos reagentes para a preparação das membranas.

APÊNDICE

APÊNDICE A. Avaliações experimentais dos componentes poliméricos no processo de preparação.

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT (%)			
01	8,0	-	-	PEG 1,5%(m/v) Ágar 1%(m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
02	8,0	-	-	PEG 1,5%(m/v) Ágar 0,4%(m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+
03	8,0	-	-	PEG 1,5%(m/v) Ágar 0,7%(m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+
04	8,0	-	-	PEG 3,0%(m/v) Ágar 0,7%(m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
05	8,0	-	-	Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Reprovada – rasgou com o manuseio da pinça	Não se aplica
06	8,0	-	-	PEG 1,5% (m/v) Ágar 1% (m/v) Tratamento térmico em autoclave (121°C por 20 minutos), após irradiação a 25kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+++
07	8,0	-	-	PEG 1,5%(m/v) Ágar 0,4%(m/v) Tratamento térmico em autoclave (121°C por 20 minutos), após irradiação a 25kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	++

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT (%)			
08	8,0	-	-	PEG 1,5%(m/v) Ágar 0,7%(m/v) Tratamento térmico em autoclave (121°C por 20 minutos), após irradiação a 25kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	++
09	-	8,0	-	PEG 1,5%(m/v) Ágar 0,8% (m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
10	-	8,0	-	PEG 0,7 %(m/v) Ágar 0,8%(m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
11	-	8,0	-	Ágar 0,8% (m/v) Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+++
12		8,0		Irradiada a 25 kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+++
13	-	8,0	-	Tratamento térmico em autoclave (121°C por 20 minutos) após irradiação a 25kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação; Reprovada – não se mantinha esticada, com tendência a enrolar sobre si mesma.	Não se aplica
14	6,0	-	Sol.†	Irradiada a 25 kGy. Intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
15	8,0	-	Sol.†	Irradiada a 15kGy. Intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
16	8,0	-	Sol.†	Irradiada a 10kGy. Intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT (%)			
17	-	10,0	Sol.†	Irradiada a 15kGy. Intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
18	-	10,0	Sol.†	Irradiada a 10kGy Intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
19	-	10,0	-	Irradiada a 15kGy.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+
20	-	8,0	Sol.†	Irradiada a 10kGy Intumescida com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	++
21	-	8,0	Sol.†	Irradiada a 10kGy, Liofilizada antes do intumescimento com solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 0,6mol/L.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+++
22	8,0	-	3,0	Irradiada a 25 kGy em solução.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Reprovada – rasgou durante a retirada da embalagem Na manipulação: não se aplica	Não se aplica
23		8,0	3,0	Irradiada a 25 kGy em solução.	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Reprovada – rasgou durante a retirada da embalagem Na manipulação: não se aplica	Não se aplica
24	-	-	3,0	Irradiada a 25 kGy em solução.	Após preparação: Reprovada – observou-se a degradação da quitosana pela diminuição da viscosidade inicial da solução Durante a desembalagem: não se aplica Na manipulação: não se aplica	Não se aplica

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT (%)			
25	8,0	-	3,0	Seca na estufa a 35±5°C e irradiadas a 25 kGy	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Reprovada – durante o intumescimento, torna-se quebradiça.	Não se aplica
26		8,0	3,0	Seca na estufa a 35±5°C e irradiadas a 25kGy	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Reprovada – durante o intumescimento, torna-se quebradiça.	Não se aplica
27	-	-	3,0	Seca na estufa a 35±5°C e irradiadas a 25kGy	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Reprovada – durante o intumescimento, torna-se quebradiça.	Não se aplica
28	2,7	-	2,0	Glutaraldeído 0,3 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
29	-	3,3	2,0	Glutaraldeído 0,3 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+++
30	-	3,3	2,0	Glutaraldeído 0,6 mmol/membrana Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	++
31	-	3,3	2,0	Glutaraldeído 0,9 mmol/membrana Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+
32	-	-	2,0	Glutaraldeído 0,3 mmol/membrana Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT (%)			
33	-	3,3	-	Glutaraldeído 0,3mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
34	-	-	1,8	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
35	-	2,0	1,8	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
36	1,6	-	1,8	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
37	-	-	1,8	Glutaraldeído 100,0 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
38	-	2,0	1,8	Glutaraldeído 100,0 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
39	1,6	-	1,8	Glutaraldeído 100,0 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
40	-	-	2,0	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
41	-	-	2,0	Glutaraldeído 2,5 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	+

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT (%)			
42	-	-	2,0	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	++++
43	-	1,0	2,0	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
44	-	1,0	2,0	Glutaraldeído 2,5 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
45	-	1,0	2,0	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
46	-	2,0	2,0	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
47	-	2,0	2,0	Glutaraldeído 2,5 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
48	-	2,0	2,0	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
49	-	3,0	2,0	Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
50	-	3,0	2,0	Glutaraldeído 2,5 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-

No. da membrana	Polímeros base			Aditivos e condições de processo	Avaliação física qualitativa	Interação com as células
	PVP (%)	PVAI (%)	QUIT [*] (%)			
51	-	3,0	2,0	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Após preparação: Aprovada Durante a desembalagem: Aprovada Na manipulação: Aprovada	-
52	-	-	2,0*	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Não se aplica	++++
53	-	-	2,0*	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Não se aplica	++++
54	-	-	2,0 ⁺	Glutaraldeído 6,2 mmol/membrana. Seca na estufa a 35±5°C	Não se aplica	++++

* QUITOSANA

Legenda da adesão dos queratinócitos:

- Não se aplica: quando a membrana foi reprovada na análise física qualitativa
- nenhuma célula aderida.
- + queratinócitos aderidos, mas com morfologia não característica.
- ++ queratinócitos aderidos, mas com morfologia de diferenciação sem formação de colônia.
- +++ queratinócitos aderidos, formação de colônias de células diferenciadas.
- ++++ queratinócitos aderidos, com formação de colônias de células basais.

† Solução de Quitosa para intumescimento

* Quitosana Aldrich média massa molecular (M)

* Quitosana Aldrich alta massa molecular (A)

⁺ Quitosana Polymar – Ceará desacetilada pelo Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz (FCF)

APÊNDICE B. Relatório da estimativa do custo da membrana como composto dermo-epidérmico

Colaboração: Jorge Alberto Rego

Departamento de Apoio Logístico – A
Assessoria Comercial – AC

Este trabalho tem por finalidade a apuração e descrição, em linhas gerais, do processo de formação dos custos referentes à preparação de um lote de membranas como composto dermo-epidérmico.

Descrição das etapas operacionais do processo

A preparação da membrana como componente dermo-epidérmico possui duas fases distintas, sendo estas a fase de preparação da porção dérmica e a fase de preparação da porção epidérmica. Entende-se que a ocorrência destas fases não ocorre no mesmo espaço físico, e que as mesmas não possuem sincronia na sua utilização. Portanto, foi realizada a estimativa do custo para cada uma delas separadamente.

Planilhas de custo

Os custos foram classificados quanto:

- Custos diretos: mão de obra envolvida e material de consumo utilizado no processo de preparação do composto.
- Custos indiretos: depreciação dos equipamentos, depreciação predial e serviço de terceiros.
- Despesas administrativas / financeiras / desenvolvimento tecnológico: representa a infraestrutura básica de apoio, que não são identificadas com o serviço.

1. Porção dérmica

Esta parte da membrana corresponde à porção que mimetiza a derme da pele, que pode ser estocada ao final de sua preparação até necessidade de uso com a porção epidérmica.

Para realização dos cálculos, foi considerada a preparação da membrana no tamanho 10 x 10 cm, sendo a limitação do processo o volume de irradiação em uma fonte de raios gama comercial, considerado como um lote de membranas. Cada lote corresponde à quantidade de 5000 membranas.

As etapas de confecção da membrana compreendem:

- Preparação da solução:
 - Pesagem da matéria prima realizada no dia anterior, tomando aproximadamente 1 hora de trabalho.
 - Mistura e autoclavação, tomando aproximadamente 4 horas de trabalho.
- Embalagem:
 - Alimentação da máquina dosadora / seladora, tomando aproximadamente 2 horas de trabalho.
- Irradiação: serviço terceirizado
- Liofilização:
 - Colocação das membranas no congelador vertical a -20°C por duas, tomando aproximadamente 4 horas de trabalho.
 - Colocação das membranas no congelador a -80°C por uma noite, tomando aproximadamente 4 horas de trabalho.
 - Colocação das membranas congeladas no liofilizador de bandeja por 48 horas, tomando aproximadamente 2 horas trabalho.

- Intumescimento:
 - Preparação da solução de quitosana no dia anterior, tomando aproximadamente 1 hora de trabalho.
 - Colocação das membranas liofilizadas na solução de quitosana, tomando aproximadamente 3 horas de trabalho.
- Secagem:
 - Acomodação das membranas em uma estufa ventilada por 24 horas, tomando aproximadamente 4 horas de trabalho.

Planilhas de custo em Reais (R\$):

MATERIAL DE CONSUMO:

Descrição	Qtd	Valor unitário	Valor total	Custo/membrana
ácido acético	1 L	28,88	28,88	0,006
glutaraldeído	1 kg	165,00	165,00	0,033
PVA	7,1 kg	180,00	1278,00	0,256
QUITOSANA	2 kg	300,00	600,00	0,120

Custo unitário por membrana: R\$ 0,41

DEPRECIAÇÃO DE EQUIPAMENTOS:

Equipamentos	Valor	Tempo (anos)	Depreciação mensal	Depreciação/membrana
Autoclave	4500,00	10	18,75	0,0038
Balança	862,00	10	3,59	0,0007
Congelador –20°C	2000,00	5	16,67	0,0033
Congelador –80°C	39000,00	10	162,50	0,0325
Dosadora/seladora	600,00	10	2,50	0,0005
Estufa ventilada	3705,30	10	15,44	0,0031
Liofilizador	48000,00	10	200,00	0,0400
Purificador de água	25000,00	1	2083,33	0,4167

Custo unitário por membrana: R\$ 0,50

DEPRECIÇÃO PREDIAL:

Instalações	Valor	Tempo (anos)	Depreciação mensal	Depreciação/membrana
Bancadas	5000	10	20,83	0,0042
Mobiliário	8000	10	33,33	0,0067
Sala de congelamento 25m ²	30000	20	62,50	0,0125
Sala de preparo 25m ²	30000	20	62,50	0,0125

Custo unitário por membrana: R\$ 0,04

MÃO DE OBRA DIRETA:

Efetivo necessário	*Base salarial	Encargos sociais	Salário c/ encargos	Tempo horas	Custo/hora
1 Nível superior sênior	2.400,00	1.800,00	4.200,00	176	23,86
2 Nível auxiliar	1.600,00	1200,00	2.800,00	352	15,90

* Valores baseados nos custos de mão de obra direta elaborados pela Cnen/Gecom

Distribuição do custo da mão de obra direta:

Efetivo necessário	Tempo utilizado (horas)	Custo/membrana
1 Nível superior sênior	25	0,12
2 Nível auxiliar	25	0,08

Custo unitário por membrana: R\$ 0,20

PLANILHA DE APURAÇÃO DO CUSTO DA PORÇÃO DÉRMICA

Total de membranas em um lote: 5000

Custo unitário da membrana: R\$ 1,54

CUSTOS DIRETOS	Total (R\$)	Participação
Mão de obra de nível superior	0,12	7,04 %
Mão de obra de nível técnico	0,08	4,70 %
Material de consumo	0,41	24,46 %
TOTAL	0,61	36,21 %
CUSTOS INDIRETOS	Total (R\$)	Participação
Depreciação de equipamentos	0,50	29,55 %
Depreciação de predial	0,04	2,12 %
Irradiação	0,036	2,13 %
TOTAL	0,57	33,79 %
DESPESAS ADMINISTRATIVAS/FINANCEIRAS	Total (R\$)	Participação
Despesas diversas	0,36	30 %
TOTAL	0,36	30 %

2. Porção epidérmica

Esta porção da membrana constitui-se de células da epiderme cultivada *in vitro*, que após obtenção do número suficiente de células, são semeadas nas membranas preparadas como porção dérmica. Este conjunto deverá ser cultivado por alguns dias em laboratório, para certeza de fixação dos queratinócitos em sua superfície.

As etapas compreendidas na preparação da cultura dos queratinócitos são:

- Preparação dos meios de cultura.
- Coleta da biópsia de pele no centro cirúrgico.
- Desinfecção da biópsia no laboratório de cultura.
- Processamento da biópsia para separação das células por método enzimático
- Semeadura e incubação
- Manutenção das células em cultura

Planilhas de custo em Reais (R\$):

MATERIAL DE CONSUMO

Descrição	Quantidade	Valor unit	Valor total
Garrafa T25	3	3,75	11,25
Meio de cultura	150 mL	89,85	89,85
Pipeta de 1 mL	10	0,60	6,00
Pipeta de 10 mL	5	1,13	5,63
Pipeta de 2 mL	5	0,81	4,05
Pipeta de 5 mL	5	1,05	5,25
Tubo de centrifuga 15 mL	10	0,90	9,00
Tubo de centrifuga 50 mL	1	1,50	1,50
Tubo para microcentrifuga	6	0,33	1,98
Unidade filtrante	1	16,25	16,25

Custo da cultura: R\$ 150,75

DEPRECIACÃO DE EQUIPAMENTOS:

Equipamentos	Valor	Tempo (anos)	Depreciação mensal	*Depreciação 10% de uso
Banho termostatizado	1.650,00	10	13,75	1,38
Bomba de vácuo	1.500,00	10	12,50	1,25
Camara de Neubauer	810,00	10	6,75	0,68
Centrífuga	2.100,00	10	17,50	1,75
Congelador	700,00	10	5,83	0,58
Fluxo Laminar	22.500,00	10	187,50	18,75
Geladeira	666,67	10	5,56	0,56
Incubadora de CO2	15.000,00	10	125,00	12,50
Microscópio óptico invertido	22.500,00	10	187,50	18,75

*base do cálculo por se localizar em laboratórios multi-usuários

Custo da depreciação dos equipamentos: R\$ 59,19

DEPRECIACÃO PREDIAL:

Instalações	Valor	Tempo (anos)	Depreciação mensal	*Depreciação 10% de uso
Ante-sala 20 m ²	30.000	20	125,00	12,50
Bancadas	3.000	20	12,50	1,25
Mobiliário	5.000	20	20,83	2,08
Sala de lavagem 20 m ²	30.000	20	125,00	12,50
Sala estéril 20 m ²	30.000	20	125,00	12,50

*base do cálculo por se localizar em laboratórios multiusuários

Custo da depreciação predial: R\$ 40,83

DISTRIBUIÇÃO DO CUSTO DA MÃO DE OBRA DIRETA:

Efetivo necessário	Tempo utilizado (horas)	Custo/membrana
1 Nível superior sênior	120	2.863,64
1 Nível auxiliar	120	954,55

Custo unitário por membrana: R\$ 3.818,18

PLANILHA DE APURAÇÃO DO CUSTO DA PORÇÃO EPIDÉRMICA

Para uma membrana tamanho 10 x 10 cm

Custo unitário da membrana: R\$ 4.879,15

CUSTOS DIRETOS	Total (R\$)	Participação
Mão de obra de nível superior	2.863,64	56,34 %
Mão de obra de nível técnico	954,55	18,78 %
Material de consumo	150,75	2,97 %
TOTAL	3.968,94	78,09 %
 CUSTOS INDIRETOS	 Total (R\$)	 Participação
Depreciação de equipamentos	56,19	1,11 %
Depreciação de predial	40,83	0,80 %
TOTAL	97,02	1,91 %
 DESPESAS ADMINISTRATIVAS/FINANCEIRAS	 Total (R\$)	 Participação
Despesas diversas	813,19	20 %
TOTAL	813,19	20 %

ESTIMATIVA DO CUSTO DO COMPOSTO DERMO-EPIDÉRMICO

Porção	Valor	Participação
Dérmica	R\$ 1,54	0,04 %
Epidérmica	R\$ 4.879,15	99,96 %
Total	R\$ 4.880,69	

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BACCARO, S.; PAJEWSKI, L.A.; SCOCCIA, G.; VOLPE, R.; ROSIAK, J.M. Mechanical properties of polyvinylpyrrolidone (PVP) hydrogels undergoing radiation. ***Nuclear Instruments and Methods in Physics Research***, 1995, v. B105, p. 100-102.
- 2 BARABAS, E.S. N- vinyl amide polymers. In. MARK; BIKALES, OVERBERGER; MENGES. ***Encyclopedia of polymers science and engineering***. New York, NY: Wiley – Interscience, 1989; v. 17, p. 19-42.
- 3 BARRANDON, Y.; GREEN, H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, 1987, v. 84, p. 2302-2306.
- 4 BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, 2004, v. 57, p. 19-34.
- 5 BERRY, G.C. Light scattering. In. MARK; BIKALES, OVERBERGER; MENGES. ***Encyclopedia of polymers science and engineering***. New York, NY: Wiley – Interscience, 1989; v. 8, p 721-794.
- 6 BERSCHT, P.C.; NIES, B.; LIEBENDORFER, A., KREUTER, J. *In vitro* evaluation of biocompatibility of different wound dressing materials. ***Journal of Materials Science: Materials in Medicine***, 1995, v.6, p. 201-205.
- 7 BERTH, G.; DAUTZENBERG, H.; PETER, M.G. Physico-chemical characterization of chitosans varying in degree of acetylation. ***Carbohydrate Polymers***, 1998, v. 36, p.205-216.
- 8 BIAGINI, G.; BERTANI, A.; MUZZARELLI, R.; DAMADEI, A.; Di BENEDETTO, G.; BELLIGOLLI, A.; RICCOTTI, G.; ZUCCHINI, C.; RIZZOLI, C. Wound management with N-carboxybutyl chitosan. ***Biomaterials***, 1991, v.12, p. 281-286.
- 9 BIAGINI, G.; PUGNALONI, A.; DAMADEI, A.; BERTANI, A.; BELLIGOLLI, A.; BICCHIEGA, V.; MUZZARELLI, R. Morphological study of the capsular organization around tissue expanders coated with N-carboxybutyl chitosan. ***Biomaterials***, 1991, v.12, p. 287-291.
- 10 BOWDOWN, P.E. Keratins and other epidermal proteins. In: PRIESTLEY, G.C. ***Molecular aspects of dermatology***. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1993. p. 19-54.

- 11 BOYCE S.T.; HAM, R.G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. **J. Invest. Dermatol (Suppl)**, 1983, v.81, p.33s-40s.
- 12 BOYCE, S.T. Design principles for composition and performance of culture skin substitutes. **Burns**, 2001, v. 27, p. 523-533.
- 13 BOYCE, S.T.; WARDEN, G.D. Principles and practices for treatment of cutaneous wounds with cultured skin substitutes. **The American Journal of Surgery**, 2002, v. 183, p. 445-456.
- 14 BUDAVARI, S (Ed.) **The Merck Index**. Rahway, N.J: Merck &Co, Inc, 1989, 11th edition.
- 15 BURKE, J.F. Observations on the development of an artificial skin: presidential address, 1982 American burn Association Meeting **The Journal of Trauma**, 1982, v. 23, n. 7, p. 543-551.
- 16 BURKE, J.F.; YANNAS, Y.V.; QUINBY, Jr, W.C.; BRONDOC, C.C.; JUNG, W.K. Successful use of physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury. **Ann Surg.**, 1981, v.194, n.4, p. 413-428.
- 17 CANEVAROLO Jr, S.V. Ciência dos polímeros. São Paulo: Artliber, 2002, p. 108-109.
- 18 CHAIGNAUD, B.E.; LANGER, R.; VACANTI, J.P. The history of tissue engineering using synthetic biodegradable polymer scaffolds and cells. In: ATAIA, A.; MOONEY, D. (Ed.) **Synthetic biodegradable polymers scaffolds**. Boston: Birkhauser, 1997. p.1-14.
- 19 CHARLESBY, A. **Atomic radiation and polymers**. Oxford: Pergamon, 1960.
- 20 CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, 2001, v. 22, p. 261-268.
- 21 COMPTON, C.C.; BUTLER C.E.; YANNAS, I.V.; WARLAND, G.; ORGILL, D.P. Organized skin structure is regenerated in vivo from collagen-GAG matrices seeded with autologous keratinocytes. **J Invest Dermatol**, 1998, v. 110, s. 6, p. 908-916.
- 22 COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L.; KUMAR, V. **Robbins – Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Saunders, 1994. p 51-92.
- 23 COULOMB, B.; DUBERTRET, L. Skin cell culture and wound healing. **Wound Repair and Regeneration**, 2002, v.10, n. 2, p.109-112.

- 24 DAGALAKIS, N.; FLINK, J.; STASIKELIS, P.; BURKE, J.F.; YANNAS, I.V. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. ***Journal of Biomedical Materials Research***, 1980, v. 14, p. 511-528.
- 25 DARWIS, D.; STASICA, P.; RAZZAK, M.T.; ROSIAK, J.M. Characterization of poly(vinyl alcohol) hydrogel for prosthetic intervertebral disc nucleus. ***Radiation Physics and Chemistry***, 2002, v. 63, p. 539-542.
- 26 DENUZIERE, A.; FERRIER, D. DAMOUR, O.; DOMARD, A. Chitosan chondroitin - sulphate and chitosan hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties. ***Biomaterials***, 1998, v. 19, p. 1275–1285.
- 27 DENUZIERE, A.; FERRIER, D.; DOMARD, A. Chitosan – chondroitin sulfate and chitosan – hyaluronate polyelectrolyte complexes. Physico – chemical aspects. ***Carbohydrate Polymers***, 1996, v.29, p. 317-323.
- 28 DUTTON, G.G.S. Polysaccharides. In. MARK; BIKALES, OVERBERGER; MENGES. ***Encyclopedia of polymers science and engineering***. New York, NY: Wiley – Interscience, 1989, v. 13, p. 87-147.
- 29 DYER, J.R. ***Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos***. Edgard Bllücher, Brasil, 1969.
- 30 ERRINGTON, N.; HARDING, S.E.; VARUM, K.M.; ILLUM, L. Hydrodynamic characterization of chitosans varying in degree of acetylation. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 1993, v. 15, p. 113-117.
- 31 EYBL, E.; GRIESMACHER, A.; GRIMM, M.; WOLNER, E.; Toxic effect of aldehydes releases from fixed pericardium on bovine aortic endothelial cells. ***Journal of Biomedical Materials Research***, 1989, v. 23, p. 1355-1365.
- 32 FREEMAN, W.J. Characterization of polymers. In. MARK; BIKALES, OVERBERGER; MENGES. ***Encyclopedia of polymers science and engineering***. New York, NY: Wiley – Interscience, 1989; v. 3, p. 290-327.
- 33 FRESHNEY, R.I. Introduction. In: FRESHNEY, R.I. (Ed) ***Culture of epithelial cells***. New York: Wiley-Liss, 1992, p. 1-23.
- 34 GALASSI, G.; BRUN, P.; RADICE, M.; CORTIVO, R.; ZANON, G.F.; GENOVESE, P.; ABATANGELO, G. In vitro reconstructed dermis implanted in human wounds: degradation studies of the Ha-based supporting scaffold. ***Biomaterials***, 2000, v. 21, p. 2183-2191.
- 35 HALL, E.J. (Ed) ***Radiobiology for the radiologist***. Philadelphia: JB Lippincott, 1994.

- 36 HENNINGS, M.; MICHAEL, D.; CHENG, C.; STEINERT, P.; HOLBROOK, K.; YUSPA, S.H. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. **Cell**, 1980, v.19, p. 245-254.
- 37 HERSON, M.R. **Estudo da composição in vitro de substituto cutâneo dermo-epidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena**. São Paulo: 1999, Tese de doutorado, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- 38 HERSON, M.R. Bancos de pele. In: LIMA JR, E.M.; SERRA, M.C.V.F. (Ed.) **Tratado de Queimaduras**. São Paulo: Atheneu, 2004 capítulo 83, p. 605-624.
- 39 HERSON, M.R.; MATHOR, M.B.; ALTRAN, S.; CAPELOZZI, V.L.; FERREIRA, M.C. In vitro construction of a potential skin substitute through direct human keratinocyte plating onto decellularized glycerol-preserved allodermis. **Artificial Organs**, 2001, v. 25, p. 901-906.
- 40 HIGA, O.Z.; ROGERO, S.O.; MACHADO, L.D.B.; MATHOR, M.B.; LUGÃO, A.B. Biocompatibility study for PVP wound dressing obtained in different conditions. **Radiation Physics and Chemistry**, 1999, v. 55, 705-707.
- 41 HOUWLING, G.I.; DETTMAR, P.W.; GODDARD, P.A.; HAMPSON, F.C.; DORNISH, M.; WOOD, E.J. The effect of chitin and chitosan on the proliferation of human skin fibroblasts and keratinocytes in vitro. **Biomaterials**, 2001, v. 22, p. 2959-2966
- 42 HUSS, J.C. **Practical stereology**. New York: Plenum, 1986. 185 p.100
- 43 JIANBIAO, M.; HONGJUN, W.; BINGLIN, H.; JIATONG, C. A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal dermal fibroblasts. **Biomaterials**, 2001, v. 22, p. 331-336.
- 44 JOHNS, H.E.; CUNNINGHAM, J.R. **The physics of radiology**. Springfield, Ill: 1974, 3ª edição, 800 p.
- 45 JONES, I.; CURRIE, L.; MARTÍN, R. A guide to biological skin substitutes. **British Journal of Plastic Surgery**, 2002, v. 55, p. 185-193.
- 46 KAWASE, M.; MICHIBAYASHI, N.; NAKASHIMA, Y.; KURIKAWA, N.; YAGI, K.; MIZAGUCHI, T. Application of glutaraldehyde-crosslinked chitosan as a scaffold for hepatocyte attachment. **Biol Pharm Bull**, 1997, v.17, p. 708-710.

- 47 KNAPCZYK, J.; KROWCZYNSKI, L.; KRZEK, J.; BRZESKI, M.; NURNBERG, E.; SCHENK, D.; STRUSZCZYK, H. Requeriments of chitosan for pharmaceutical and biomedical application. In: SKJAK-BRAEK, G.; ANTHONSEN, T.; SANDFORD, P. (Eds) ***Chitin and chitosan: sources, chemistry, biochemistry, Physical properties and applications***. London: Elsevier Applied Science, 1989, p. 657-670.
- 48 KOHN, J.; LANGER, R. Bioresorbable and biocompatible materials. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. ***Biomaterilas science***. California: Academic, 1996. p. 64-73.
- 49 LIPARI, F.; SWARIN, S.J. Determination of formaldehyde and other aldehydes in automobile exhaust with an improved 2,4 dinitrophenylhydrazine method. ***J. Chromatography***, 1982, v. 247, n. 2, p. 297-306.
- 50 LOPERGOLO, L.C. ***Estudo da estrutura e dos parâmetros de reticulação de membranas hidrófilas à base de poli(N-vinil-2-pirrolidona) induzidas por radiação***. São Paulo: 2002, Tese de doutorado, IPEN/CNEN-SP.
- 51 MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. ***Biomaterials***, 1999, v.20, p. 1133-1142.
- 52 MANO, E.B.; MENDES, L.C. (Ed.) ***Introdução a polímeros***. São Paulo: Edgard Blücher, 1999, 191 p. 83.
- 53 MARTEN, F.L. Vinyl alcohol polymers. In. MARK; BIKALES, OVERBERGER; MENGES. ***Encyclopedia of polymers science and engineering***. New York, NY: Wilei – Interscience, 1989; v. 17, p. 167-198.
- 54 MARTIN, P. Wound healing – aiming for perfect skin regeneration. ***Science***, 1997, v. 276, p. 75 – 81.
- 55 MARTINI, F.H. (Ed) ***Fundamentals of anatomy and physiology***. New Jersey: A Simon & Schuster Company, 1995, 3ª edição, 1144 p. 28.
- 56 MATHOR, M.B.; FERRARI, G.; DELLAMBRA, E.; CILLI, M.; MAVILIO, F.; CANCEDDA, R.; DE LUCA M. Clonal analysis of stably transduced human epidermal steam cells in culture. ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, 1996, v.93, p. 10371-10376.
- 57 MIRANDA, L.F. ***Estudo de parâmetros de processo para a síntese de membranas hidrófilas à base de poli(N-vinil-2-pirrolidona)***. São Paulo: 1999, Tese de doutorado, IPEN/CNEN-SP.

- 58 MONTEIRO Jr, O.A.C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan – glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 1999, v. 26, p. 119-128.
- 59 MUZZARELLI, R.; WECKX, M.; FILLIPINI, O.; LOUGH, C. Characteristic properties of *N*- carboxybutyl chitosan. ***Carbohydrate Polymers***, 1989, v. 11, p. 307-320.
- 60 MUZZARELLI, R.A.A.; LOGH, C.; EMANUELLI, M. The molecular weight of chitosan studied by laser light-scattering. ***Carbohydrate Research***, 1987, v. 164, p. 433-442.
- 61 Natural Toxins Research Center at Texas A&M University – Kingsville – Perez home page <http://www.ntri.tamuk.edu/hplc/hplc.html> . Acesso em 15 Abr. 2004.
- 62 OKUYAMA, K.; NOGUCHI, K.; KANENARI, M.; EGAWA, T.; OSAWA, K.; OGAWA, K. Structural diversity of chitosan and its complexes. ***Carbohydrate Polymers***, 2000, v. 41, p. 237-247.
- 63 OLEJNIZAK, J.; ROSIAK, J.; CHARLESBY, A. Gel/Dose curves for polymers undergoing simultaneous crosslinking and scission. ***Radiation Physics and Chemistry***, 1991, v. 37, n. 3, p. 499-504.
- 64 ONISHI, H.; MACHIDA, Y. Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. ***Biomaterials***, 1999, v.20, p. 175-182.
- 65 OSBORNE, C.S.; BARBENEL, J.C.; SMITH, D.; SAVAKIS, M.; GRANT, M.H.; Investigation into the tensile properties of collagen/chondroitin-6-sulphate gels: the effect of crosslinking agents and diamines. ***Medical and Biological Engineering and Computing***, 1998, v. 36, s.1, p.129-134.
- 66 OSBORNE, C.S.; REID, W.H.; GRANT, M.H. Investigation into the biological stability of collagen/chondroitin-6-sulphate gels and their contraction by fibroblasts and keratinocytes: the effect of crosslinking agents and diamines. ***Biomaterials***, 1999, v.20, p. 283-290.
- 67 PANCHENCE, J.M.; KOHN, J. Biodegradable polymers. In: Lanza, R.P.; LANGER, R.; VACANTI, J. (Ed.) ***Principles of tissue engineering***. San Diego: Academic Press, 2000. p. 263-277.
- 68 PARKINSON, E.K.; YEUDALL, W.A. The epidermis. In: FRESHNEY, R.I. (Ed) ***Culture of epithelial cells***. New York: Wiley-Liss, 1992, p. 59-80.
- 69 PELLEGRINI, G.; RANNO, R.; STRACUZZI, G.; BONDANZA, S.; GUERRA, L.; ZAMBRUNO, G.; MICALI, G.; DE LUCA, M. The control of epidermal stem cells (holoclones) in the treatment of massive full-thickness burns with

- autologous keratinocytes cultured on fibrin. **Transplantation**, 1999, v. 68, p. 868-879.
- 70 PEPPAS, N.A. Hydrogels of poly(vinyl alcohol) and its copolymers. In: PEPPAS, N.A. **Hydrogels in medicine and pharmacy**. Boca Raton, Florida: CRC, 1987. Volume II: polymers, p. 1-48. 40.
 - 71 PEPPAS, N.A.; BARR-HOWELL, B.D. Characterization of the cross-linked structure of hydrogels. In: PEPPAS, N.A. **Hydrogels in medicine and pharmacy**. Boca Raton, Florida: CRC, 1986. Volume I: fundamentals, p. 27-56.
 - 72 PEPPAS, N.A.; MIKOS, A.G. Preparation methods and structure of hydrogels. In: PEPPAS, N.A. **Hydrogels in medicine and pharmacy**. Boca Raton, Florida: CRC, 1986. Volume I: fundamentals, p. 1-26.
 - 73 PEYREFITE, G. Estrutura e fisiologia da pele. In: PEYREFITE, G; MARTINI, M.C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998. parte 3, p. 329-477.
 - 74 POOLE, C.F.; POOLE, S. **Chromatography today**. Amsterdam: Elsevier Science, 1991, 1026 p. 98.
 - 75 PRIESTLEY, G.C. An introduction to the skin and its diseases. In: PRIESTLEY, G.C. **Molecular aspects of dermatology**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 1993. p. 1-17.
 - 76 RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. **Cell**, 1975, v. 6, p. 331-344.
 - 77 RIMED Produtos para saúde. Disponível em < [http\\www.rimed.com.br](http://www.rimed.com.br)>. Acesso em 15 abr. 2004. 22.
 - 78 RINAUDO, M.; PAVLOV, G.; DESBRIÈRES, J. Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan, **Polymer**, 1999, v. 40, p. 7029-7032.
 - 79 RIUNAUDO, M.; MILAS, M.; DUNG, P.L. Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1993, v. 15, p. 281-285.
 - 80 ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. Hong Kong: The Macmillan, 1992, 350 p.

- 81 ROCHOW, T.G. Light microscopy. In. MARK; BIKALES, OVERBERGER; MENGES. **Encyclopedia of polymers science and engineering**. New York, NY: Wiley – Interscience, 1989; v. 8, p. 698-721.
- 82 RONFARD, V.; RIVES, J.M.; NEVEUX, Y.; CARSIN, H.; BARRANDON, Y. Long-term regeneration of human epidermis on third degree burns transplanted with autologous cultured epithelium grown on a fibrin matrix. **Transplantation**, 2000, v.70, n. 11, p. 1588-1598.
- 83 ROSIAK, J.; OLEJNIZAK, J.; CHARLESBY, A. Determination of the radiation yield of hydrogels crosslinking. **Radiat. Phys. Chem.**, 1988, v.32, n. 5, p. 691-694.
- 84 ROSIAK, J.; RUCI SKA-RYBUS, Method of manufacturing hydrogel dressings. US Patent 4,871,490, Oct. 3, 1989.
- 85 ROSIAK, J.M.; OLEJNICZAK, J. Medical applications of radiation formed hydrogels. **Radiation Physics and Chemistry**, 1993, v. 42, p. 903-906.
- 86 ROSIAK, J.M.; ULANSKI, P. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. **Radiation Physics and Chemistry**, 1999, v. 55, p. 139-151.
- 87 ROSIAK, J.M.; ULANSKI, P.; PAJEWSKI, L.A.; YOSHII, F.; MAKUUCHI, K. Radiation formation of hydrogels for biomedical purposes. Some remarks and comments. **Radiat. Phys. Chem.**, 1995, v. 46, n. 2, p. 161-168.
- 88 ROWLEY, J.A.; MADLAMBAYAN, G.; MOONEY, D.J. Alginate hydrogels as a synthetic extracellular matrix materials. **Biomaterials**, 1999, v.20, p.45-53.
- 89 SAINTIGNY, G.; BONNARD, M.; DAMOUR, O.; COLLOMBEL, C. Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts. **Acta Derm Venerol**, 1993, v.73, p. 175-180.
- 90 SEGEL, I.H. **Bioquímica – teoria e problemas**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1979, p.393-398.
- 91 SHAHABEDDIN, L.; DAMOUR, O.; BERTHOD, F.; ROUSSELLE, P.; SAINTIGNY, G.; COLLOMBEL, C. Reconstructed skin from co-cultured human keratinocytes and fibroblasts on a chitosan cross-linked collagen-GAG matrix. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, 1991, v.2, p. 222-226.
- 92 SHERIDAM, R.L.; HEGARTY, M.; TOMPKINS, R.G; BURKE, J.F. Artificial skin in massive burns – results to ten years. **Eur. J. Plast. Surg.**, 1994, v.17, p. 91-93.

- 93 SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara dois., 1979. p.299.
- 94 STRUSZCZYK, H. Microcristalline chitosan. I. Preparaton and properties of microcrystalline chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, 1987, v.33, p.177-189.
- 95 TABATA, Y. Recent progress in tissue engineering. **Drug Delivery Today**, 2001, v. 6, n.1, p. 483-487.
- 96 TARAVEL, M.N.; DOMAND, A. Collagen and its interactions with chitosan. III. Some biological and mechanical propertied. **Biomaterials**, 1996, v.17, p. 451-455.
- 97 TIDMAN, M.J. T he epidermal basement membrane. In: PRIESTLEY, G.C. **Molecular aspects of dermatology**. Chichester: John Wiley & Sons, 1993. p. 75-88.
- 98 TOMIHATA, K.; IKADA, Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, 1997, v.18, p. 567-575.
- 99 ULANSKI, P.; ROSIAK, J.M. Radiation-induced degradation of chitosan. In: KARNICKI,Z.S.; BRZESKI, M.M.; BYKOWSKI, P.; WOJTASZ-PJAK, A. (Ed). **Chitin world**. Wirtschattsverlang: Wissennschaft GmbH, 1994, p. 575-582.
- 100 University of Kentucky - Analytical Spectroscopy Research Group
<http://www.pharm.uky.edu/ASRG/HPLC/hplcmytry.html> Acesso em 15 Abr. 2004.
- 101 VILELA, A.L.M. <http://www.afh.bio.br/img/Tegume1.jpg>. Acesso em 5 Jun. 2004.
- 102 WANG, W.; XU, D. Viscosity and flow properties of concentrated solutions of chitosan with different degrees of deacetylation.. **International Journal of Biological Macromolecules**, 1994, v. 16, p. 149-152.
- 103 WIDRA, A. Skin , synthetic. **Encyclopedia of polymers science and engineering**. New York, NY: Wilei – Interscience, 1989; v.15, p. 335-345.
- 104 WILCOX, C.D.; DOVE, S.B.; MCDAVID, W.D.; GREER D.B.
<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>. Acesso em 27 Abr. 2004.
- 105 WILLIAMS, D.F. **Definitions in biomaterials**. Amestardam: Elsevier Science, 1987, p.1-72.

- 106 WONG, W.H.; MOONEY, D.J. Synthesis and properties of biodegradable polymers used as synthetic matrices for tissue engineering. In: ATAIA, A.; MOONEY, D. (Ed.) ***Synthetic biodegradable polymers scaffolds***. Boston: Birkhauser, 1997. p. 51-82.
- 107 YANNAS, Y.; BURKE, J.F. Desing of an artificial skin. I. Basic design principles. ***Journal of biomaterials Research***, 1980, v.14, p. 65-81.
- 108 ZIELINSKI, B.A.; AEBISCHER, P. Chitosan as a matrix for mammalian cell encapsulation. ***Biomaterials***, 1994, v.15, p. 1049-1056.*

* ABNT – NBR6023/DIDC01/2001 – Normas extraídas da Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, NRB 6023 edição 2000, adaptadas para o Guia para elaboração de dissertações e teses do Ipen.