INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA COMPOSTA DE PVAI
E QUITOSANA COMPATÍVEL COM O SISTEMA
DERMO – EPIDÉRMICO**

TIAGO LUIZ DE ALMEIDA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do grau
de mestre em ciências na área de
tecnologia nuclear - materiais

Orientador:

Dra. Monica Beatriz Mathor

Março de 2009

Dedicatória

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

A Priscila Caproni por ser uma pessoa perfeita em todos os aspectos, que sempre me acompanhou em todos os momentos de minha vida.

*Qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim
Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo
(Chico Xavier)*

Agradecimentos

- Aos responsáveis do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), em especial do Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) e do Centro de Biotecnologia (CB) os quais me deram oportunidade para realização do mestrado, utilizando as instalações e equipamentos para o bom andamento das minhas pesquisas e experimentos.
- À minha prezada amiga e orientadora, Dra. Monica Beatriz Mathor que com muita paciência e profissionalismo soube direcionar o andamento do meu trabalho, incentivando cada vez mais meu interesse pela pesquisa científica.
- À minha prezada amiga Fátima Klingbeil, com quem sempre pude contar.
- À Comissão Nacional de Energia Nuclear (CNEN) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.
- Aos integrantes da Comissão de Pós Graduação do IPEN, pelo empenho e dedicação para oferecer todas as condições necessárias aos alunos pós-graduandos.
- Aos meus queridos pais, irmãos e avó, de quem eu muito me orgulho que me deram muita força para vencer cada novo desafio que apareceu na minha vida. Pessoas que entenderam com paciência a minha ausência. Uma família maravilhosa que realmente vale a pena qualquer esforço e que amo muito.
- Especial agradecimento à Priscila Caproni por todo o carinho, compreensão, companheirismo e amor. Uma pessoa a qual admiro muito, não conseguindo passar pelos momentos mais difíceis sem sua presença.
- Aos meus amigos de faculdade, especialmente a Jennifer Liu e Suzana Rie.

- Aos meus amigos que durante minha vida toda trilharam uma amizade que sempre será lembrada. Um agradecimento especial aos amigos Gustavo Costa, Rafael Tartaroti, Fernando Hokama e Frederico Ribeiro. E aos novos amigos conquistados pela minha vida.
- À Kely Cristina Bispo, da Faculdade de Medicina da USP pelos cortes histológicos, mas principalmente pela amizade.
- Ao Johnny e Zé Maria pela realização da liofilização das amostras de PVAI.
- Ao Dr. Bronislaw Polakiewicz e Karine Gargione, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela constante ajuda com assuntos relacionados à quitosana.
- Aos engenheiros Elizabeth Somessari e Carlos Gaia da Silveira, pela irradiação das amostras de PVAI e também pela grande amizade.
- Aos meus companheiros de laboratório: Karina Corleto, Jéssica Mirco, Fernanda Calvo, Thiago Malpighi, Kelly Nunes, Natália Malavasi, Daniele Borim, Rosa Chura-Chambi, Stefany Santin, Alberto Alves, Murilo Casare, Marcos Xunior.
- A Daniele Yoshito, por ser uma das pessoas mais presentes durante a realização dos experimentos além de uma ótima amiga para todas as horas.
- À Rute Batista, Arlete Correia, José Longino, Genivelda e Junqueira pela constante ajuda.
- Ao Eduardo de Moura pelas análises de infravermelho e companheirismo.
- A Dra. Olga Zazuco Higa, por permitir a utilização dos laboratórios e equipamentos.

- A Silvana Altran, pelo auxílio na obtenção das culturas primárias de queratinócitos.
- A Dra. Luci Brocardo Machado pelas dicas e sugestões na dissertação. E em conjunto com Yasko Kodama pela realização da análise de viscosidade.
- A Janaína Baptista e Andrés Galisteo, pela amizade e ajuda nos momentos difíceis. Também pelo auxílio com idéias na dissertação.
- À Renata Damiani pelas longas conversas. Uma grande amiga para todas as horas.
- Ao Antonio Carlos Martinho Junior, pela grande amizade conquistada durante o mestrado e ótimas conversas, além de sempre estar disposto a ajudar.
- À Dra. Andrea Cecília Dórion Rodas, pelas sugestões oferecidas ao longo do desenvolvimento deste trabalho.
- À Dra. Ivana Cosentino, do Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares - IPEN, pela realização das análises de intrusão por mercúrio.
- À Dra. Telma M. Kaneko e Maria Inês pela realização das análises de determinação do grau de acetilação pela Ressonância Magnética Nuclear.
- Ao Dr. Ademar B. Lugão, pelas sugestões e auxílio nos assuntos referentes aos polímeros.
- Ao Dr. Sergio Campana e Dr. Ismail Zainon, pelas informações pessoais mais detalhadas auxiliando o desenvolvimento desse trabalho.

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA COMPOSTA DE PVAI E QUITOSANA COMPATÍVEL COM O SISTEMA DERMO – EPIDÉRMICO

Tiago Luiz de Almeida

RESUMO

Devido à grande incidência de pessoas com lesões de pele como queimaduras e úlceras e à baixa disponibilidade de doadores, houve a necessidade de desenvolvimento de biomateriais com a capacidade de mimetizar a pele. Para o desenvolvimento desses biomateriais, polímeros são utilizados na tentativa de alcançar características mais próximas as do órgão alvo. Neste sentido, nosso grupo vem desenvolvendo, há alguns anos, substitutos dermo-epidérmicos, particularmente membranas biodegradáveis e biocompatíveis constituídas de PVAI e quitosana. O PVAI, polímero sintético, foi utilizado para mimetizar a porção dérmica humana e a quitosana, polímero de origem natural, foi utilizada neste estudo para favorecer o crescimento e manutenção da porção epidérmica. Devido às variações destes polímeros obtidos comercialmente, o objetivo deste estudo foi caracterizar as suas propriedades físico-químicas, comparando-as com a membrana anteriormente obtida pelo nosso grupo, com o intuito de confirmar hipóteses de interferências ressaltadas nesse estudo. As membranas de PVAI em estudo (PVAI MP) que obtiveram características morfológicas mais semelhantes ao padrão, foram as irradiadas a 13 e 15 kGy, sendo esta última escolhida por atingir a dose mínima necessária para se obter um material estéril. Estas membranas também foram as que apresentaram maior porcentagem de poros entre 70 e 100 μm^2 . Quanto à quitosana, as principais características estudadas foram o grau de acetilação (DA) e a massa molecular média, ambos os resultados indicaram características diferentes daquelas indicadas comercialmente. Diversos protocolos de preparações de membranas foram feitos a partir de solução de quitosana (2%). A membrana composta de solução de quitosana homogeneizada com glicerol (20%) e seca a temperatura ambiente, apresentou a melhor interação com os queratinócitos. Para a finalização do trabalho esta solução de quitosana foi vertida sobre a membrana de PVAI, liofilizada e intumescida com solução de quitosana (2%) e o conjunto foi mantido à temperatura ambiente até formação do filme de quitosana na face superior, obtendo-se assim uma membrana composta compatível com o sistema dermo-epidérmico.

Development of a PVAI/chitosan composite membrane compatible with the dermo-epidermic system

Tiago Luiz de Almeida

Abstract

Due to the frequent incidence of people with skin lesions such as burns and ulcers and the lack of available donors, biomaterials with the capacity to mimic skin must be developed. In order to develop these biomaterials, polymers are used in the attempt to achieve characteristics which are closer to the target organ. In this direction, for several years our group has been developing dermo-epidermic substitutes, specifically biodegradable and biocompatible membranes made up of PVAI and chitosan. PVAI, a synthetic polymer, was used to imitate part of the human dermis and chitosan, a polymer of organic origin, was used in this study to stimulate growth and maintenance of the epidermis. Due to the variations of these commercially obtained polymers, the objective of this study was to characterize their physical and chemical properties, comparing them with the membrane previously obtained by our group with the intention of confirming the hypotheses of interferences put forward in this study. The PVAI membranes in the study (PVAI MP) that obtained characteristics most similar to the standard were those irradiated with 13 and 15 kGy; this last was chosen because it was the minimum dose necessary to achieve sterility. These membranes were also those which had the largest percentage of pores between 70 and 100 μm . For chitosan, the principal characteristics studied were the degree of acetylation (DA) and average molecular weight, both results demonstrated different characteristics than commercially indicated. Various membrane preparation protocols were carried out from the chitosan solution (2%). The membrane composed of the solution of chitosan homogenized with glycerol (20%) and dried at room temperature had the best interaction with keratinocytes. To finalize the study, this chitosan solution was poured over a PVAI membrane, lyophilized and impregnated with chitosan (2%) solution and the compound was kept at room temperature until a chitosan film formed on the upper surface, thus obtaining a composite membrane compatible with the dermo-epidermic system.

Sumário

1. Introdução	13
2. Objetivo.....	17
2.1. Objetivos específicos:	17
3. Desenvolvimento	19
3.1. A pele.....	19
3.1.1 Organização estrutural do epitélio.....	19
3.1.2 Função.....	19
3.1.3 Epiderme.....	20
3.1.4 Derme.....	21
3.2. Solução de continuidade cutânea e reparação.....	22
3.2.1 Queimaduras e incidência.....	22
3.2.2 Úlceras	23
3.2.3 Reparação da pele.....	24
3.3. Engenharia de tecidos.....	27
3.3.1 Substitutos de pele.....	27
3.3.2 Substituto de pele ideal	30
3.4. Hidrogéis	31
3.4.1 Poli (álcool vinílico) - PVAI.....	32
3.4.2 Quitina e quitosana	33
3.4.2.1 Histórico.....	34
3.4.2.2 Fontes de quitina e quitosana.....	35
3.4.2.3 Aspectos físico-químicos da quitina e quitosana.....	36
3.4.2.4 Obtenção de quitina e quitosana.....	39
3.4.2.5 Análise da quitina e quitosana.....	39
3.4.2.5.1 Determinação do grau de acetilação por Espectro IV.....	40
3.4.2.5.2 Determinação do grau de acetilação por Ressonância magnética nuclear do hidrogênio – RMN ¹ H.....	42
3.4.2.6 Aplicações da quitina e quitosana.....	42
3.5. Agentes reticulantes e plastificantes.....	44
3.5.1 Glutaraldeído.....	44

3.5.2	Glicerol.....	45
3.6.	Agentes esterilizantes.....	45
3.6.1	Radiação ultravioleta.....	45
3.6.2	Álcool 70%.....	45
4.	Materiais e métodos.....	49
4.1.	Materiais:	49
4.2.	Métodos:	49
4.2.1	Poli (álcool vinílico) – PVAI.....	49
4.2.1.1	Preparo da Solução de PVAI.....	50
4.2.1.2	Preparo da membrana de PVAI.....	50
4.2.1.3	Liofilização da membrana de PVAI.....	50
4.2.1.4	Caracterização da membrana de PVAI.....	50
4.2.1.4.1	Determinação da fração sol/gel das membranas de PVAI.....	51
4.2.1.4.1.1	Determinação do intumescimento para o cálculo da fração sol/gel.....	51
4.2.1.4.1.2	Cálculo da fração sol/gel	51
4.2.1.4.2	Comparação entre curvas de intumescimento das membranas de PVAI MP e PVAI padrão.....	52
4.2.1.4.3	Propriedades mecânicas	52
4.2.1.4.4	Teste de citotoxicidade	52
4.2.1.4.5	Verificação de porosidade média.....	54
4.2.1.4.6.1	Verificação de porosidade por intrusão de mercúrio.....	54
4.2.1.4.6.2	Verificação de porosidade por cortes histológicos em criostato.....	54
4.2.2	Caracterização da Quitosana.....	55
4.2.2.1	Desacetilação da quitosana (Qs).....	55
4.2.2.2	Verificação do grau de impureza das amostras de quitosana.....	55
4.2.2.3	Determinação do grau de acetilação (DA).....	55
4.2.2.3.1	Determinação por Infravermelho.....	56
4.2.2.3.2	Determinação por Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	56
4.2.2.4	Massa molecular média.....	57
4.2.2.5	Preparações das quitosanas.....	58
4.2.2.5.1	Solução de quitosana	58

4.2.2.5.2	Confecção das membranas de quitosana sem agente reticulante.....	58
4.2.2.5.3	Confecção das membranas de quitosana reticulada com glutaraldeído.....	58
4.2.2.5.4	Confecção das membranas de quitosana regeneradas.....	58
4.2.2.5.5	Confecção das membranas de quitosana plastificadas com glicerol.....	59
4.2.2.5.6	Eficácia da diminuição da carga microbiana dos filmes de quitosana.....	59
4.2.3	Cultura de células da epiderme.....	59
4.2.3.1	Preparo dos meios de cultura.....	59
4.2.3.2	Obtenção de queratinócitos.....	60
4.2.3.3	Cultura dos queratinócitos sobre as membranas de quitosana.....	60
4.2.4	Junção da membrana de PVAI MP com a membrana de glicerol.....	60
5.	Resultados	62
5.1	Poli (álcool vinílico) - PVAI.....	62
5.1.1	Determinação da fração sol/gel das membranas de PVAI.....	62
5.1.1.1	Determinação do intumescimento para o cálculo da fração sol/gel.....	62
5.1.1.2	Cálculo da fração sol/gel.....	62
5.1.2	Comparação entre curvas de intumescimento das membranas de PVAI MP e PVAI padrão.....	64
5.1.3	Avaliação das propriedades mecânicas das membranas de PVAI.....	65
5.1.4	Determinação da Citotoxicidade das membranas de PVAI.....	65
5.1.5	Verificação de tamanho médio de poros.....	66
5.1.5.1	Intrusão de mercúrio.....	66
5.1.5.2	Cortes histológicos.....	67
5.2	Quitosana.....	70
5.2.1	Desacetilação da quitosana (Qs).....	70
5.2.2	Verificação do grau de impureza das amostras de quitosana.....	70
5.2.3	Determinação do grau de acetilação (DA).....	70
5.2.3.1	Determinação por infravermelho.....	71
5.2.3.2	Determinação por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹ H).....	71
5.2.4	Determinação da Massa molecular média por viscosidade.....	72
5.2.5	Membranas de quitosana.....	73

5.2.5.1	Manutenção de filme, após intumescimento.....	73
5.2.5.2	Eficácia da descontaminação.....	73
5.3	Cultura de células da epiderme	74
5.3.1	Obtenção dos queratinócitos.....	74
5.3.2	Cultura de queratinócitos sobre as membranas de quitosana.....	75
5.3.2.1	Membranas de quitosana reticuladas com glutaraldeído.....	75
5.3.2.2	Membranas de quitosana regeneradas.....	76
5.3.2.3	Membranas de quitosana plastificadas com glicerol.....	79
5.4	Junção da membrana de PVAI MP com o filme de quitosana.....	81
6.	Discussão.....	83
7.	Conclusão	92
 Apêndice A. Carta do comitê de ética da faculdade de saúde pública de São Paulo.		
		94
 Apêndice B. Processos de preparação das membranas com diferentes quitosanas		
		95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS		97

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A pele recobre a superfície do corpo e é um dos maiores órgãos, atingindo 16% do peso corporal. Desempenha diversas funções como: a de proteção contra perda de água e atrito, receber constantemente informações sobre o ambiente e as enviar ao sistema nervoso central, colaborar para a termorregulação do corpo, proteger o organismo contra os raios ultravioleta, etc. (Junqueira & Carneiro, 2005). Portanto, qualquer lesão nesse tecido pode afetar sua função, assim como, dos tecidos que protege (Geeson & Berg, 1991). Dentre as lesões cutâneas mais comuns, queimadura e úlceras são prevalentes (Rossi et al., 2003).

Quando um paciente é hospitalizado com lesões cutâneas, a primeira medida tomada é administrar grande quantidade de soro, compensando a perda de líquido assim como a administração de antibióticos. Posteriormente, dependendo da gravidade da lesão, são utilizados curativos, ou a realização de procedimentos cirúrgicos como a utilização de enxertos do próprio paciente ou de doadores provenientes de Banco de Tecidos (Juvenal et al., 1992; Stephen, 1990).

Atualmente, devido à crescente necessidade e limitada disponibilidade de doadores, estamos enfrentando uma “crise de transplantes”. A engenharia de tecidos tem o potencial para enfrentar esta crise, fornecendo uma alternativa à oferta de órgãos e tecidos (Nerem, 2006).

Nas últimas décadas, houve aumento da necessidade de desenvolvimento de dispositivos médicos, com alta compatibilidade com o organismo e que possibilitem a integração entre células e membranas sintéticas, para uma variedade de aplicações biomédicas (Chuang et al., 1999). Alguns desses biomateriais vêm sendo desenvolvidos para auxiliar a reconstrução fisiológica da pele e, para isso, algumas de suas propriedades são muito importantes, tais como: biocompatibilidade; não ser citotóxico; biodegradabilidade (Ratner et al., 2004) e biomecânica apropriada, que são as propriedades mecânicas necessárias para sua utilização biológica (Griffith, 2002; Yannas & Burke, 1980).

Dentre estes biomateriais, podemos citar materiais biodegradáveis como quitosana, ou biocompatíveis como hidrogéis de poli (álcool vinílico) - PVAI, que

aparecem como opções na confecção de dispositivos médicos (Biagini et al., 1992; Hyon et al., 1994).

A quitosana é o principal derivado da quitina, sendo obtida a partir de sua desacetilação (Roberts, 1992). Dentre outros aspectos, como a massa molecular média, resíduos de proteínas e material insolúvel, o grau de acetilação é um dos parâmetros mais importante no seu comportamento químico. Quando o grau de acetilação da quitina é menor que 50%, as propriedades do material, como a solubilidade em ácido diluído, são modificadas e se evidenciam as características de quitosana (Roberts, 1992; Rinaudo, 2006).

Este polissacarídeo exibe numerosas propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, e tem diversas aplicações em vários campos (Hirano, 1996), entre as quais, as aplicações biomédicas (Khor & Lim, 2003). Neste campo, sua utilização em engenharia de tecidos, no reparo da pele, osso, cartilagem, etc., se deve, principalmente, a suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade e por serem bioativas, em conjunto com suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento (Chandy & Sharma, 1990; Muzzarelli, 1995; Izume et al., 1992; Aiba, 1992). Apresenta ainda outras características importantes, tais como sua ação antibacteriana e fungicida (Rabea et al., 2003).

A relação entre quitosana e as células do organismo, principalmente com os fibroblastos e queratinócitos, tem sido estudada nos últimos anos. O grau de acetilação parece ser o fator mais importante para que essa interação aconteça de maneira desejável, sendo que, quando em filme, quanto menor o grau de acetilação, melhor a interação com queratinócitos (Chatelet et al., 2001). Já a proliferação dos fibroblastos é favorecida com a quitosana em solução (Howling et al., 2001).

Dentre os materiais biocompatíveis, podemos citar os hidrogéis poliméricos que são estruturas reticuladas com grande capacidade de absorver água em seu interior sem se dissolver, podendo ser de origem natural ou sintética (Peppas, 1987). Entre os polímeros sintéticos mais utilizados para a formação de hidrogéis podemos citar o poli (álcool vinílico) ou PVAI (Peppas, 1987; Rosiak & Ulanski, 1999).

O PVAI é caracterizado como sendo um poli-hidróxido atóxico, solúvel em água e biocompatível, sendo largamente utilizado em aplicações biomédicas. É importante que o biomaterial não apresente resíduos tóxicos, como o poli (acetato de vinila), cuja hidrólise forma o PVAI, que em altas concentrações é tóxico para o organismo (De Merlis & Schoneker, 2003; Bogdanffy & Valentine, 2003).

A reticulação de suas cadeias pela radiação ionizante, por exemplo, é responsável pela formação do hidrogél (Peppas, 1987). Na área biomédica, dentre várias aplicações, sua utilização na engenharia de tecidos tem sido uma ferramenta importante (Lee Mooney, 2001; Lee et al., 2005).

Uma característica importante apresentada pelos hidrogéis e a porosidade, devido a reticulação do PVAI, e esta deve ser ideal para propiciar uma boa migração das células endoteliais e dos fibroblastos além da neovascularização (Jones et al., 2002; Rivron et al., 2008) .

Portanto, devido às características do PVAI quando reticulado, este pode ser utilizado na fabricação de uma membrana com a função de mimetizar a derme. Agregando a esta, as propriedades da quitosana para a confecção de um substituto dermo-epidérmico, podem-se obter características ideais de um substituto de pele. Para isso a caracterização e padronização dos seus componentes, individualmente, são importantes.

Rodas em 2004, desenvolveu uma membrana compatível com o sistema dermo-epidérmico composta por PVAI e quitosana, porém, ainda segundo Rodas, maiores estudos devem ser feitos em relação ao tipo de material a ser utilizado, como por exemplo, a massa molecular média e grau de hidrólise do PVAI e grau de acetilação e massa molecular média da quitosana.

Em nosso trabalho, pretendeu-se verificar esses parâmetros, utilizando a membrana obtida durante a tese de doutorado da Dra. Andrea C.D. Rodas como padrão para comparação de nossos resultados.

OBJETIVO

2. Objetivo

Desenvolver uma membrana composta, com características similares à derme, constituída de PVAI e quitosana, sendo esta última compatível com a formação *in vitro* de camada epidérmica.

2.1. Objetivos específicos:

- Determinar a fração sol/gel na formação das membranas de PVAI com diferentes doses de irradiação
- Preparo das membranas de PVAI por irradiação
- Caracterização físico-química e citotoxicidade das membranas de PVAI
- Determinar o tamanho médio dos poros das membranas de PVAI
- Verificar a pureza das quitosanas
- Caracterizar o grau de acetilação (DA) e peso molecular das amostras de quitosana adquiridas para a realização desse trabalho
- Obter filmes de quitosana compatíveis com o crescimento das células epidérmicas sobre as membranas formadas
- Adição de diferentes quitosanas entre o arcabouço polimérico e sobre o mesmo para a obtenção da membrana composta

DESENVOLVIMENTO

3. Desenvolvimento

3.1. A pele

A pele humana é um órgão composto por células justapostas que reveste todo o corpo, sendo um dos maiores órgãos, podendo atingir até 16% do peso corporal, responsável pela proteção do organismo e interação com o meio exterior, informando as mudanças a sua volta, por meio de terminações nervosas (Junqueira & Carneiro, 2005; Juvenal et al., 1992).

A pele possui propriedades especiais para cumprir sua função, sendo resistente, flexível e relativamente impermeável à água, além de possuir uma notável capacidade de auto-regeneração (Junqueira & Carneiro, 2005).

3.1.1 Organização estrutural do epitélio

A pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Esses dois tecidos celulares são justapostos e intimamente unidos. Abaixo da derme existe a hipoderme, que apesar de possuir a mesma origem embrionária, não faz parte da pele, servindo apenas de suporte e união com os tecidos adjacentes (Junqueira & Carneiro, 2005; Juvenal et al., 1992). A derme representa uma camada com espessura variável de tecido conjuntivo denso. Já a epiderme é formada por um epitélio de revestimento, estratificado, pavimentoso e queratinizado (Junqueira & Carneiro, 2005; Juvenal et al., 1992). O limite entre a epiderme e a derme não é regular. A derme apresenta projeções, as papilas dérmicas, que se encaixam em reentrâncias da epiderme, aumentando a coesão entre as camadas (Junqueira & Carneiro, 2005).

3.1.2 Função

A pele apresenta diversas funções, como a de proteger o organismo contra perda de água por evaporação e contra o atrito, sendo ambas possibilitadas pela presença de uma camada córnea que reveste a epiderme. Existe um controle

da termorregulação também promovido por esse órgão, por meio dos vasos sanguíneos, glândulas, tecido adiposo, e colágeno. Apresenta também uma proteção contra microorganismos patogênicos (Junqueira & Carneiro, 2005; Juvenal et al., 1992). Um pigmento que é produzido e acumulado na epiderme denominado melanina protege o organismo contra a ação da radiação solar (Juvenal et al., 1992).

Sendo um órgão que apresenta plasticidade, fornece ao organismo resistência e ao mesmo tempo flexibilidade. A capacidade que essas células possuem em se manter unidas, se deve ao contato íntimo entre elas, por meio do citoesqueleto, tonofilamentos dos queratinócitos, assim como suas estruturas de ligação com a rede de proteínas fibrosas da derme (Junqueira & Carneiro, 2005).

3.1.3 *Epiderme*

A epiderme é constituída por um epitélio estratificado pavimentoso queratinizado e apresentando, além dos queratinócitos, outros três tipos celulares: os melanócitos, as células de Langerhans e as de Merkel. A espessura da epiderme varia de acordo com a área estudada, sendo mais espessa e complexa na palma da mão e do pé. Nessas regiões atinge a espessura de até 1,5 mm e é constituída, vista da derme para a superfície, das seguintes camadas (Junqueira & Carneiro, 2005; Juvenal et al., 1992):

- Camada basal – constituída por células prismáticas ou cubóides repousando sobre membrana basal que separa epiderme da derme. Essa camada, que contém as células-fonte da epiderme, é também chamada de camada germinativa. Apresenta intensa atividade mitótica, sendo responsável pela constante renovação da epiderme. As células da camada basal contêm filamentos intermediários constituídos de queratinas. À medida que a célula se diferencia e avança para a superfície, o número desses filamentos aumenta.
- Camada espinhosa – constituída por células poligonais cubóides ou ligeiramente achatadas, de núcleo central, com pequenas expansões citoplasmáticas que contêm tonofibrilas partindo de cada uma das células adjacentes. As mesmas se aproximam e se mantêm unidas por desmossomos, o que dá a célula um aspecto

espinhoso. As tonofibrilas e os desmosossomos têm importante função para a coesão das células da epiderme e para sua resistência ao atrito.

- Camada granulosa – caracterizada pela presença de células poligonais achatadas, com o núcleo central, em cujo citoplasma são observados grânulos grosseiros e basófilos que vão contribuir para a constituição do material citoplasmático da camada córnea.
- Camada lúcida – constituída por uma delgada camada de células achatadas, eosinófilas, hialinas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridos por enzimas dos lisossomos e desapareceram.
- Camada córnea – tem espessura muito variável e é constituída por células achatadas, mortas e sem núcleo. O citoplasma apresenta-se repleto de uma escleroproteína filamentosa, a queratina, ricas em ligações dissulfeto (S-S).

A descrição acima da derme corresponde à epiderme na sua maior complexidade, podendo ocorrer, em porções mais finas da pele, a ausência das camadas granulosa e lúcida, apresentando uma camada córnea reduzida (Junqueira & Carneiro, 2005).

3.1.4 *Derme*

É um tecido conjuntivo no qual se apóia a epiderme e une a pele à hipoderme. Apresenta uma espessura variável de acordo com a região em que se encontra, podendo atingir no máximo 3 mm na planta do pé. A sua superfície externa é irregular apresentando saliências chamadas de papilas dérmicas que acompanha as reentrâncias da epiderme.

A derme é constituída de duas camadas, de limites pouco distintos: a papilar (superficial) e a reticular (mais profunda):

- Camada papilar - é delgada, constituída por tecido conjuntivo frouxo que forma as papilas dérmicas e apresenta fibrilas especiais de colágeno que se liga de um lado a membrana basal e pelo outro penetra profundamente na derme, contribuindo para prender a derme à epiderme.

➤ Camada reticular – É mais espessa, constituída por tecido conjuntivo denso. Nessa camada encontram-se vasos sanguíneos, linfáticos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas e glândulas sudoríparas. Ambas as camadas possuem fibras do sistema elástico, responsáveis em parte pela elasticidade da pele (Junqueira & Carneiro, 2005).

3.2. Solução de continuidade cutânea e reparação

Dentre as soluções de continuidade cutâneas existentes, abaixo focamos queimaduras, úlceras e as etapas que envolvem a reparação destas.

3.2.1 Queimaduras e incidência

Queimadura é um quadro resultante da ação de agentes térmicos, elétricos, químicos ou radioativos, sendo que o grau de comprometimento depende da profundidade da lesão. As queimaduras de primeiro grau são aquelas que comprometem apenas a epiderme, induzindo o eritema, sem prejuízo sistêmico além de recuperação sem cicatrizes. No caso das queimaduras de segundo grau, a lesão compromete, além da epiderme, a derme, causando eritema, edema e reparação lenta, podendo deixar seqüelas na pele. Já nas queimaduras de terceiro grau acontecem lesões ainda mais profundas, atingindo outros tecidos além da pele como, por exemplo, o tecido adiposo, muscular e ósseo, havendo, portanto, a necessidade de enxertos para que ocorra a reparação (Vale, 2005). Maiores detalhes sobre os tipos de queimaduras estão dispostos na figura abaixo (FIG. 3.1):

De acordo com os dados da Sociedade Brasileira de Queimados, ocorrem no Brasil cerca de um milhão de queimaduras por ano, sendo que 200 mil são atendidos em serviço de emergências e 40 mil demandam de hospitalização.

Primeiro Grau	Segundo Grau	Terceiro Grau
Compromete apenas a epiderme	Compromete totalmente a epiderme e parcialmente a derme	Destrói todas as camadas da pele, atingindo até o subcutâneo, podendo atingir tendões, ligamentos, músculos e ossos
Apresenta eritema, calor e dor	Apresenta dor, eritema, edema, bolhas, erosão ou ulceração	Causa lesão branca ou marrom, seca, dura, inelástica
Não a formação de bolha	Há regeneração espontânea	É indolor
Evolui com descamação em poucos dias	Ocorre reepitelização a partir dos anexos cutâneos (folículos piloso e glândulas)	Não há regeneração espontânea, necessitando de enxertia
Regride sem deixar cicatrizes	Cicatrização lenta (2-4 semanas)	Eventualmente pode cicatrizar, porém com retração das bordas
Repercussão sistêmica é desprezível	Pode deixar seqüelas; discromia (superficial); cicatriz (profunda)	
Não é considerada na avaliação da área atingida		

FIGURA 3.1 – Quadro comparativo dos graus de lesões causadas por queimaduras (Vale, 2005).

3.2.2 Úlceras

Em dermatologia, o termo utilizado para “feridas crônicas” é “úlceras cutâneas crônicas”. Uma úlcera, por sua vez, é definida como uma lesão por pressão em que a epiderme, ou pelo menos a parte superior da derme, tenham sido destruídos. Uma úlcera cutânea não é uma lesão primária, portanto não se

desenvolve a partir da pele normal intacta. É precedida por outras lesões patológicas iniciais, tais como uma pápula ou uma pústula, evoluindo para uma úlcera (Shai & Maibach, 2005).

Atualmente a classificação de úlceras cutâneas é baseada em sua aparência clínica. Na prática, distinção é feita entre úlceras 'amarela', 'preta' e 'vermelha'. Na maioria dos casos, o método terapêutico a ser utilizado depende do aspecto clínico da úlcera. Até o momento, não há provas de que certo tipo de curativo ou determinado método de desbridamento seja mais benéfico para uma úlcera cutânea de etiologia específica (por exemplo, úlceras venosas ou úlceras diabéticas) (Shai & Maibach, 2005).

3.2.3 Reparação da pele

A reparação é um processo que consiste em uma cascata de eventos celulares e moleculares cujo objetivo é a repavimentação e reconstrução do tecido, devido a uma lesão que pode ser física, química ou biológica. Esse processo de reparação envolve aspectos bioquímicos e fisiológicos muito complexos que agem harmoniosamente para o reparo tecidual (Balbino et al., 2005; Mandelbaum et al., 2003).

Existem diferentes classificações didáticas para separar as etapas da reparação. Alguns autores utilizam 3 etapas que consistem em: inicialmente um estágio inflamatório, seguido por um estágio de proliferação e por último um estágio de remodelação. Entretanto, outros autores a classificam de forma mais completa, que basicamente se divide em: coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação. Essas etapas são separadas de forma didática para facilitar a compreensão, assim, portanto, em determinados momentos elas acontecem simultaneamente, levando ao sucesso da reparação (Balbino et al., 2005; Mandelbaum et al., 2003).

Coagulação - é a primeira fase ocorrendo imediatamente após o surgimento da lesão. Essa fase depende da cascata de coagulação e da atividade das

plaquetas. Logo após ocorre uma liberação de produtos como substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases que sinalizam para outras fases. A formação do coágulo serve para cooptar as bordas da ferida e cruzar a fibronectina, formando assim uma matriz provisória que oferece sustentação aos fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos para adentrar a ferida (Balbino et al., 2005; Mandelbaum et al., 2003).

➤ **Inflamação** - essa fase, que está intimamente ligada a fase anterior, depende de inúmeros sinais químicos das células inflamatórias como 1) os leucócitos polimorfonucleares, que chegam primeiro a lesão, e que são responsáveis pela fagocitose das bactérias e sua permanência varia de três a cinco dias; 2) os macrófagos, que são as células mais importantes dessa fase, os quais são responsáveis pela fagocitose de bactérias e desenvolvimento do tecido de granulação e permanecem do terceiro ao décimo dia; 3) os eosinófilos aparecem no final do processo de reparação e presume-se que estejam relacionados com a produção de fatores de crescimento; 4) os linfócitos, os quais são efetores imunes além de produtores de fatores crescimento, predominando depois do décimo quarto dia (Blotnik et al., 1994).

Além das células inflamatórias descritas acima e dos mediadores químicos, a fibronectina tem um papel fundamental. Sintetizadas por células como os fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais, ela se adere simultaneamente a fibrina, colágeno e outros tipos celulares funcionando como uma cola para consolidar o coágulo de fibrina, as células e os componentes de matriz (Balbino et al., 2005; Mandelbaum et al., 2003).

➤ **Proliferação** - é o fechamento da ferida propriamente dita e é sub dividida em:

- Reepitelização – migração de queratinócitos não danificados das bordas da ferida e dos anexos epiteliais, quando a ferida é de espessura parcial, e apenas das margens, nas feridas de espessura total. Acredita-se que fatores

de crescimento sejam os responsáveis pelo aumento das mitoses e hiperplasia do epitélio.

- Fibroplasia e formação da matriz - importante na formação do tecido de granulação que consiste em coleção de elementos celulares, incluindo fibroblastos, células inflamatórias e componentes neovasculares e da matriz, como a fibronectina, as glicosaminoglicanas e o colágeno. A formação desse tecido depende dos fibroblastos que além de produtor de colágeno tem importância fundamental na produção de elastina, fibronectina, glicosaminoglicana e proteases, estas responsáveis pelo remodelamento fisiológico.
- Angiogênese – é essencial para o suprimento de oxigênio e nutrientes para a reparação. As células endoteliais migram para a área ferida, onde ocorre sua proliferação e acesso para as células responsáveis pelas próximas fases (Balbino et al., 2005; Mandelbaum et al., 2003).

➤ **Contração da Ferida e Remodelação** - é o movimento centrípeto das bordas da ferida. Na última fase acontece a remodelação da ferida que pode durar até meses e é responsável pelo aumento da força de tensão e pela diminuição do tamanho da cicatriz e do eritema.

Dentre estas etapas, os mecanismos que envolvem principalmente a proliferação, a contração da ferida e a remodelação, podem ser afetados pela aplicação de enxertos ou substitutos.

Enxerto é parte de um tecido vivo transplantado de um lugar para outro no mesmo organismo ou em organismos distintos (Andrew et al., 2002). Segundo sua fonte de obtenção, podemos classificá-los também em autólogos, quando doador e receptor são o mesmo indivíduo; alógenos ou homólogos, quando doador e receptor são diferentes, porém da mesma espécie; e heterólogos ou xenoenxertos, quando doador e receptor são de espécies diferentes (Franco & Da Silva, 2002).

Quando existe falta de doadores ou a impossibilidade do próprio paciente de fornecer um enxerto, pode-se utilizar biomateriais, graças ao grande avanço da engenharia de tecidos (Hoffman, 2002).

3.3. Engenharia de tecidos

Engenharia de tecidos, bioengenharia de tecidos ou medicina regenerativa são termos que em geral significam um meio de substituição, reparação e / ou regeneração dos tecidos e órgãos. Essa área tem como objetivo imitar tecidos já existentes para aplicações e tratamentos clínicos (Nerem, 2006). Encontram-se na literatura científica, vários tecidos do corpo, de substitutos de pele a nervos artificiais e tecidos cardíacos, com variados graus de sucesso (Patil et al., 2006).

Para o desenvolvimento de novos produtos, algumas características são importantes tais como: biocompatibilidade, o que significa a habilidade de um dispositivo médico de desempenhar, com uma resposta apropriada do organismo, uma aplicação específica; ser não citotóxico, não causando efeitos tóxicos (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, inibição enzimática, etc.) em nível celular; biodegradabilidade, ou seja, a quebra química das moléculas do material pela ação de um organismo vivo, levando a uma mudança nas propriedades físicas (Ratner et al., 2004) e biomecânica, que são as propriedades mecânicas necessárias para sua utilização biológica (Griffith, 2002; Yannas & Burke, 1980).

O objetivo final da engenharia de tecidos da pele é o de produzir rapidamente um substituto que oferece a completa recuperação funcional da pele, incluindo todos os anexos da pele (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e os órgãos sensoriais) e camadas (epiderme e derme). Além disso, é importante o estabelecimento de redes vasculares funcionais e nervosas livres de cicatriz, oferecendo uma integração com o tecido circundante (Metcalf & Ferguson, 2007).

3.3.1 Substitutos de pele

A pele tem importância fundamental para o organismo em relação à proteção, percepção sensorial e funções regulatórias, porém, sua característica como barreira ao ambiente externo acaba sendo o ponto mais crítico para a sobrevivência (Supp & Boyce, 2005). Os substitutos de pele para curativos têm por objetivo, preferencialmente repor as estruturas e funções da pele original. Infelizmente, nenhum substituto conseguiu mimetizar completamente a complexidade da pele humana. Existem, no mercado, vários tipos de substitutos de pele, podendo

ser temporários, agindo em curativos de ferida, ou permanentes na substituição da pele. A maioria dos substitutos são matrizes sintéticas desenvolvidos para servir de barreira contra perda de fluídos e contaminação microbiana. Alguns substitutos de pele que estão no mercado estão relacionados abaixo (Metcalf & Ferguson, 2007; Jones et al., 2002):

- *Biobrane*[®] – é formado por duas camadas composta de silicone e nylon. A malha de nylon é revestida com peptídeos derivados de colágeno suíno tipo I, a fim de auxiliar a aderência ao leito da ferida e do ingresso e crescimento fibrovascular. Conforme ocorre a reparação da ferida esse substituto é liberado e pode ser retirado facilmente.
- *Transcyte*[®] (*Dermagraft* - *TC*[®]) – fibroblastos neonatais são semeados em uma rede de nylon recoberta com colágeno da *Biobrane*[®], melhorando assim as propriedades da reparação.
- *OrCel*[®] – junção de queratinócitos neonatais humanos alógenos, sobre uma esponja de colágeno bovino, previamente semeados com fibroblastos humanos neonatais alógenos. Proporciona um ambiente favorável à migração celular e proporciona uma fonte de citocinas e fatores de crescimento.
- *Apligraf*[®] (*Graftskin*[®]) – é derivado da combinação de um gel de colágeno bovino tipo I, com fibroblastos neonatais alogênicos vivos com uma camada corneificada de queratinócitos neonatais alogênicos. Por possuir dois tipos celulares é considerado o mais sofisticado e também mais caro.
- *Dermagraft*[®] – é uma estrutura dérmica viva criopreservada, preparada pelo cultivo de fibroblasto neonatal alogênicos sobre um arcabouço polimérico. Os fibroblastos se dividem até a confluência, secretando fatores de crescimento e proteínas da matriz dérmica.

- *Alloderm*[®] – é constituído de pele cadavérica humana processada, o qual a epiderme foi retirada e os componentes celulares da derme foram extraídos antes da criopreservação a fim de evitar resposta imunológica específica.
- *Integra*[®] – inicialmente descrito por Yannas e Burke (1980), é o substituto sintético mais aceito, tendo sido desenvolvido para pacientes com queimaduras. O *Integra*[®] tem estrutura bilaminar, constituído de colágeno bovino reticulado e glicosaminoglicanas, ambos recobertos de um lado por uma membrana de silicone com função epidérmica.
- *Epicel*[®] – cultura de epiderme proveniente de biopsia do próprio paciente que podem ser cultivadas *in vitro* e aplicada em queimaduras e outros tipos de feridas como úlceras crônicas, nevus gigante, epidermólise bolhosa e necrose neonatal
- *Laserskin*[®] – são queratinócitos autólogos cultivados a partir de biópsia cutânea em uma membrana perfurada de ácido hialurônico.
- *Myskin*[®] – são queratinócitos autólogos cultivados em um polímero de polícloreto de vinila (PVC) revestido com uma superfície de plasma-polimerizado. O PVC incentiva a fixação e proliferação dos queratinócitos, proporcionando uma plataforma mais estável.
- *Permaco*[®] – matriz dérmica acelular derivada de suínos. O substituto é processado de forma a retirar todo material celular, exceto o colágeno, tornando-o não imunogênico.
- *Suprathel*[®] – é um curativo, produzido com um co-polímero sintético constituído por DL-lactideo (>70%), trimetilenecarbonato e ϵ -caprolactona.

3.3.2 Substituto de pele ideal

Para que um substituto de pele possa corresponder ao seu objetivo, algumas características são importantes. No caso da pele, o mesmo deve possuir propriedades físico-químicas, bioquímicas e mecânicas compatíveis com seu objetivo, visando a criação de um arcabouço tridimensional que possa agir como o órgão original (Yannas & Burke, 1980). Essas propriedades devem ser padronizadas e caracterizadas *in vitro*, e posteriormente testadas em animais e em humanos.

As propriedades de um substituto de pele são relacionadas, somando-se para alcançar as características finais do produto. Utilizando por exemplo o desenvolvimento do Integra®, percebeu-se que o tamanho dos poros se modificava de acordo com a metodologia empregada no processamento dos componentes químicos, influenciando a aceitação do material pelos fibroblastos e células endoteliais. Poros muito pequenos podem retardar ou até impedir a biointegração, enquanto poros grandes promovem uma área insuficiente de aderência para as células (Dagalakakis et al., 1980). Igualmente para a neovascularização, a porosidade deve permitir uma penetração ideal para capilares (10 a 15 μm) e artérias ou vênulas (80 a 100 μm) de modo a oferecer nutrição adequada ao tecido (Rivron, et al., 2008; Jones et al., 2002).

As características essenciais que um substituto de pele deve apresentar são (Yannas & Burke, 1980; Rivron et al., 2008; Boyce, 2001):

- Possibilidade de manuseio – A membrana deve apresentar boa maleabilidade, possibilitando sua manipulação durante a cirurgia, sem que se rasgue.
- Adaptação ao leito da ferida – o substituto deve se moldar perfeitamente ao leito da ferida, impedindo que haja espaços que acabam sendo favoráveis ao crescimento bacteriano.
- Fluxo de vapor de água – A membrana deve oferecer um fluxo adequado de vapor de água, garantindo que não exista um ressecamento da ferida ou, em contrapartida, um edema pelo acúmulo de líquido.
- Controle dos componentes – os materiais utilizados na sua confecção não devem apresentar toxicidade, podendo inclusive ajudar em sua integração.

- Controle em sua fabricação – o substituto final deve apresentar espessura e tamanho de poros ideais para sua integração ao órgão lesado, agindo com eficiência no processo de penetração de células e aparecimento de novos capilares sanguíneos.

3.4. Hidrogéis

Hidrogéis poliméricos são redes formadas a partir de cadeias poliméricas reticuladas que são capazes de absorver grandes quantidades de água (intumescimento) sem se dissolver. Sua hidrofilicidade se deve a presença de grupos que apresentam grande afinidade com a molécula da água (Kudela, 1989).

A reticulação das cadeias do polímero tem por objetivo a obtenção de materiais com melhores propriedades mecânicas e pode ser realizada utilizando agentes multifuncionais, que condensam as cadeias. Alguns agentes reticulantes utilizados são os aldeídos, como o formaldeído, acetaldeído, e glutaraldeído. Um agente físico bastante utilizado na área biomédica é a radiação ionizante, que além de não deixar resíduos tóxicos pode propiciar a esterilização do produto (Rosiak & Ulanski, 1999; Lugão & Malmonge, 2001).

No caso de polímeros solúveis em água, a utilização de radiação ionizante como agente reticulante origina espécies reativas intermediárias que são responsáveis pela reticulação das macromoléculas e formação dos hidrogéis. Isso pode ser resultado direto da ação da radiação na cadeia polimérica, ou principalmente pelo efeito indireto da ação do radical hidróxido ($\bullet\text{OH}$) gerado pela ionização da água, ou radiólise.

Dentre os polímeros sintéticos, os mais utilizados para formação de hidrogéis são: poli (álcool vinílico) ou PVAI, poli (vinil-pirrolidona) ou PVP, poli (acrilamida) ou PAAm, poli (óxido etileno) ou PEO, poli (ácido acrílico) ou PAA, poli (2-hidroxietil metacrilato) ou poli HEMA (Rosiak & Ulanski, 1999; Hoffman, 2002)

Os hidrogéis podem ter origem natural ou sintética, e são utilizados na área da saúde, na confecção de substitutos de e curativos, pela sua característica hidrofílica e boa compatibilidade com o organismo (Hoffman, 2002).

3.4.1 Poli (álcool vinílico) - PVAI

O Poli (álcool vinílico) também denominado de PVAI é um polímero sintético obtido pela primeira vez em 1924, por Herrman e Haehnel, por meio da hidrólise do poli (acetato de vinila), que é a forma de obtenção comercial utilizada até hoje. Suas características físicas dependem do método de preparação.

O monômero (FIG. 3.2), o álcool vinílico, não existe na forma estável e por isso é produzido através da polimerização do poli (acetato de vinila), também conhecido por PVAc e depois hidrolisado a PVAI. Estudos demonstraram que a toxicidade do PVAI decresce com o aumento do grau de hidrólise devido a ação do aumento da concentração do acetato de vinila que pode ser convertido a ácido acético no organismo causando toxicidade (De Merlis & Schoneker, 2003; Bogdanffy & Valentine, 2003).

FIGURA 3.2 – Unidade repetitiva do álcool vinílico, onde n é número de monômeros que constituem o polímero.

Este produto é geralmente classificado, quanto ao grau de hidrólise, em parcialmente hidrolisados e completamente hidrolisados, sendo que nos parcialmente hidrolisados podem ser encontrados traços do poli (acetato de vinila) (Marten, 1989).

O PVAI é um polímero iônico altamente hidrofílico devido à presença de grupos de hidroxila (-OH) ligados em sua molécula (Peppas, 1987). A sua reticulação por agentes físicos ou químicos se deve a reação desses agentes com a hidroxila, podendo assim se obter redes tridimensionais, obtendo-se hidrogéis (Martens & Anseth, 2000).

Os hidrogéis de PVAI têm sido muito utilizados na confecção de arcabouço, para aplicação na engenharia de tecidos, por sua alta absorção de água

e similaridade ao tecido. Esses materiais têm sido utilizados por ter boa compatibilidade *in vivo* (Hongiger et al., 1995), estabilidade química adequada, boa permeabilidade, serem atóxico e possuírem boa resistência mecânica. Sua alta porosidade permite alto conteúdo de líquido propiciando uma boa troca de nutrientes e resíduos produzidos pelas células. Além disso, os hidrogéis de PVAI possuem elasticidade compatível com os tecidos, por exemplo a pele, ajudando na sua integração ao organismo (Nuttelman et al., 2001). Podemos ainda citar a utilização do PVAI na confecção de arcabouço permanente para cartilagem artificial, pâncreas, osso e válvula aórtica do coração (Lee & Mooney, 2001).

3.4.2 Quitina e quitosana

A quitina (do grego *khitón* = caixa de proteção) é um polissacarídeo de origem natural que por apresentar um grupo acetamido se destaca do ponto de vista químico, e sua desacetilação leva a um novo polissacarídeo, com fórmula química similar, denominado quitosana. Esses polímeros se assemelham quimicamente com a celulose e possuem características físico-químicas interessantes como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade. (Muzzarelli, 1973; Roberts, 1992).

Durante os últimos anos, a quitina e quitosana, vêm despertando interesses na comunidade científica mundial, principalmente devido à ampla aplicação em diversas áreas. No entanto seu reconhecimento científico não apareceu logo após sua descoberta e sim após o conhecimento de suas propriedades (Roberts, 1992; Kurita, 2006).

A confirmação da porção glucosamina na estrutura da molécula, que possui a característica principal um grupo amino no carbono 2, tornaram esse polímero interessante do ponto de vista químico, físico e biológico (Roberts, 1992).

Outras características importantes da quitina e da quitosana são: a) abundância na natureza; b) obtido por síntese natural; c) principal componente da casca de crustáceos que são descartados no processamento industrial; d) biodegradabilidade; e) biocompatibilidade com células e órgãos vegetais e animais; f) atóxico na administração oral e implantes em animais; g) processados em diferentes

formas, como flocos, géis, grãos, membranas, etc.; h) polieletrólitos e podem ser modificados quimicamente (Hirano, 1996).

3.4.2.1 Histórico

A quitina foi isolada de cogumelos, pela primeira vez em 1811, por Braconnot, aproximadamente 30 anos mais cedo do que a celulose, porém, em contraste com esta última, permaneceu como um recurso de biomassa por muito tempo não utilizado. O produto foi nomeado inicialmente como fungina e por meio de análises observou-se parecer possuir impurezas, possivelmente outro polissacarídeo. Em sua opinião se tratava de um composto totalmente diferente da celulose (Roberts, 1992; Knorr, 1991).

Em 1823, Odier isolou um resíduo insolúvel contido em carapaças de insetos, o qual chamou de quitina, obtida pelo seguido tratamento desse resíduo com soluções de KOH. Porém ele falhou em detectar o nitrogênio da molécula, entretanto foi o primeiro a concluir que a quitina se assemelhava com vegetais e com substâncias estruturais encontradas em carapaças de insetos.

Existem dúvidas se Odier tinha conhecimento da substância encontrada por Braconnot, pois em sua referência ele não é citado. Odier também identificou a quitina em carapaças de caranguejo desmineralizado e sugeriu que era o material básico de exoesqueleto em todos os insetos, e possivelmente em aracnídeos. Somente em 1843 Payen detectou a presença do nitrogênio na quitina (Roberts, 1992; Knorr, 1991).

Pesquisadores da época, como Odier e Children, relataram em seus trabalhos que isolaram a quitina com múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado, e, portanto, muito provavelmente tenham obtido quitosana ao invés da quitina. A quitosana foi reconhecida e descrita primeiramente em 1859 por Rouget que demonstrou que o tratamento da quitina com soluções concentradas de KOH originava um produto, uma quitina modificada que era solúvel em soluções diluídas de ácidos orgânicos. Hoppe-Seyler propôs o nome quitosana ao produto que, por surpresa, continha o mesmo conteúdo de nitrogênio que a quitina original (Roberts, 1992).

Devido à similaridade da quitosana e quitina com a celulose, uma enorme confusão se estabeleceu até meados do século XX, quando pesquisas demonstraram se tratar de substâncias diferentes. A celulose, por ser bastante utilizada na indústria da época, passou a contar com intensos investimentos, em contraste com a quitina e quitosana, que ficaram restritas à pesquisa básica. Apesar de ter sido descoberta há dois séculos, seu estudo e aplicação só apresentou significância por volta de 1970 (Roberts, 1992; Knorr, 1991).

Quatro fatores tiveram que ser determinados para obter a estrutura química da quitina, e também da quitosana:

1. O componente monossacarídeo
2. O anel (piranose ou furanose)
3. A posição da ponte glicosídica entre os sucessivos monossacarídeos
4. A estereoquímica das pontes glicosídicas.

A quitosana foi produzida pela primeira vez em 1971 no Japão, e em 1986 o mesmo já possuía quinze indústrias produzindo quitina e quitosana comercialmente (Hirano, 1996). O Japão e EUA são os países que vem se destacando na produção e consumo, assim como na pesquisa desses polissacarídeos (Knorr, 1991; Kurita, 2006).

3.4.2.2 Fontes de quitina e quitosana

A quitina é o mais abundante material orgânico, perdendo somente para a celulose em quantidade de produção anual. É sintetizada na natureza com uma estimativa anual de 100 bilhões de toneladas (Kurita, 2006). Por outro lado, a quitosana não é muito encontrada como um material propriamente dito, ocorrendo de maneira muito dispersa na natureza, em alguns microorganismos. Portanto, devido à baixa ocorrência natural, a quitosana é obtida normalmente por meio da desacetilação da quitina, mas mesmo assim é considerada um polímero natural (Roberts, 1992).

Embora a quitina se distribua extensamente na natureza (fungos, algas, protozoários, cnidários, asquelmintes, endoprocta, briozoa, foronida, braquiopoda, echiurida, anelida, moluscos, onicófora, artropodes, chaetognatha, pogonophora, e

tunicata), cutícula de artrópodes (exoesqueleto) são as fontes mais acessíveis da quitina. No momento, a fonte economicamente mais viável de quitina é o refugo industrial no processamento de crustáceos, destacando-se entre eles os caranguejos, camarões e lagostas (Kurita, 2006). No exoesqueleto desses invertebrados a porcentagem de quitina pode variar de menos de 10 até 80%. Além da quitina, apresentam-se associadas também proteínas e carbonato de cálcio. Pigmentos e outros sais metálicos são minoria (Roberts, 1992; Kurita, 2006; Campana et al., 2007).

A quitina funciona como um material fibroso na estrutura do exoesqueleto, cutícula e parede celular dos organismos no qual ocorre, e, normalmente, está associada a proteínas, formando oligo-proteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros componentes como os taninos fenólicos na cutícula dos insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos (Peter, 1995; Kobelke, 1990).

Nos últimos anos, devido ao aumento na demanda da quitina e quitosana para diferentes utilizações, outras fontes desses polímeros estão sendo avaliados como, por exemplo, a extração de quitina do fungo utilizado na produção de ácido cítrico. Alguns fungos contêm quitosana, formada pela ação de quitina-desacetilases na quitina, sendo que essa pode ser isolada de suas paredes celulares. Esse procedimento para produzir quitosana é mais caro do que o processo convencional de desacetilação química da quitina usado até o momento, tornando-se um processo inviável economicamente. Apesar disso, a quitosana pode ser isolada, sem a necessidade de um tratamento muito danoso com soluções alcalinas e isso pode se tornar importante no futuro (Muzzarelli et al., 1994; McGahren et al., 1984; Kurita, 2006).

3.4.2.3 Aspectos físico-químicos da quitina e quitosana

A quitina é um polímero de cadeia linear formado por unidades poli $[\beta, (1 \rightarrow 4)$ ligação N-acetil-D-glucosamina] ou N-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas (FIG. 3.3) formando um polissacarídeo cristalino com cuja fórmula geral é $[C_8H_{13}O_5N]_n$ (Roberts, 1992).

A similaridade da estrutura da molécula de quitina com a molécula da celulose (grupo hidroxil no carbono 2, no caso da celulose e grupo acetil, no caso da quitina) reflete em uma utilização similar dos dois polímeros na natureza, como materiais estruturais e de defesa (Roberts, 1992).

A quitina tem uma estrutura cristalina bem organizada evidenciada por estudos de difração de raio X. Existem 3 formas polimórficas: quitina α , β e γ que diferem no arranjo das cadeias dentro de regiões cristalinas.

Na quitina α as cadeias são antiparalelas.

Na quitina β elas são paralelas.

E na quitina γ duas cadeias estão voltadas para cima e uma voltada para baixo.

As quitinas α e β são as mais conhecidas, sendo a α mais comum e, portanto, também a mais estudada. Já a quitina γ é pouco conhecida por ser encontrada raramente na natureza (Roberts, 1992).

A quitosana é biodegradável, atóxica e insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos.

A quitosana, poli [β , (1 $\rightarrow$ 4) ligação D-glucosamina] ou N-Glucosamina, é a versão da quitina mais estudada (FIG. 3.3), cuja fórmula geral é $[C_6H_{11}O_4N]_n$.

Quitosana

Quitina

FIGURA 3.3 – Representação estrutural da quitina e quitosana (Hirano, 1999).

A quitosana é obtida convencionalmente pela desacetilação da quitina (FIG. 3.4), podendo ser realizada por fusão alcalina, sendo esse processo o mais severo, ou por tratamento com soluções alcalinas, sendo esse processo mais brando, com uma solução entre 40 e 50%, de hidróxido de sódio, na maioria dos casos. A desacetilação por tratamento alcalino da quitina é rapidamente obtido até 25-15% de acetilação, depois disso o tratamento tem apenas um efeito limitado (Roberts, 1992; Domard et al., 1998).

FIGURA 3.4 – Representação esquemática do processo de desacetilação da quitina, para produção de quitosana.

A quitosana possui no carbono 2 uma amina primária ($-\text{NH}_2$) (Roberts, 1992), o que a difere da quitina, e faz com que ela tenha características físico-químicas consideradas interessantes como, por exemplo, ser um polieletrólito, possuir melhor solubilidade, reatividade, entre outros. (Hirano, 1996). A amina primária da quitosana reage com certa facilidade e é responsável pela obtenção de muitos compostos derivados (Kurita, 2006).

Quitina e quitosana são co-polímeros de unidades β , (1 $\rightarrow$ 4) ligação N-acetil-D-glucosamina e D-glucosamina distribuídas randomicamente ou em blocos por toda a cadeia da molécula. A porcentagem dessas unidades na cadeia da quitina/quitosana é denominada de grau de acetilação, sendo um dos parâmetros mais importantes no seu aspecto químico (Roberts, 1992). As formas totalmente acetiladas ou desacetiladas são de difícil obtenção e não ocorrem na natureza (Belamie et al., 1999).

A distinção entre quitina e quitosana pode ser feita utilizando o critério de solubilidade em solução aquosa de ácido diluído. Quando o polímero possui um alto teor de grupos acetil ($\geq 50\%$) distribuídos pela cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel em soluções de ácidos diluídos, sendo denominado quitina, e quando os

mesmos estão em quantidade menor do que 50%, é então considerado quitosana (Peter, 1995).

A dissolução da quitosana em solução aquosa se deve ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos acetil da quitina e também das propriedades hidrofílicas das unidades glucosaminas (Glc-NH_2), que em pH abaixo de 6 são protonadas, levando a um equilíbrio como apresentado na equação abaixo (Rinaudo & Domard, 1989):

3.4.2.4 Obtenção de quitina e quitosana

Para a utilização da quitina, proveniente de exoesqueleto de crustáceos, é necessária uma purificação, pois está associada intimamente a proteínas, material inorgânico como CaCO_3 , pigmentos e lipídeos. De modo simples, significa a passagens por processos de desproteinização, normalmente utilizando NaOH; desmineralização, utilizando de preferência o HCl e despigmentação com tratamento de etanol, algum ácido ou EDTA. Já a quitosana é obtida pela desacetilação da quitina por meio de soluções concentradas, por exemplo, NaOH, em altas temperaturas (Roberts, 1992).

3.4.2.5 Análise da quitina e quitosana

As características mais freqüentemente avaliadas são: grau de acetilação, peso molecular, resíduo de proteínas, índice de umidade, índices de cinzas, índices de lipídeos, índices de metais pesados e cor, sendo que cada uma dessas características tem uma importância relativa dependente da área de utilização.

A análise do grau de acetilação (DA) pode ser feita por meio de vários métodos (Roberts, 1992) como, por exemplo:

- espectroscopia de absorção no infravermelho (IV);
- técnicas hidrolíticas;

- espectroscopia de absorção no ultravioleta;
- dicroísmo circular;
- espectroscopia RMN;
- titulação ácido-base;
- titulação coloidal.

O método de espectroscopia na região do infravermelho possui um grande número de vantagens como: resultado relativamente rápido, o equipamento utilizado para fazer a análise de IV é facilmente encontrado nos laboratórios e, entre outros motivos, é o método mais utilizado para analisar a quitosana (Roberts, 1992).

O grau de acetilação e o conteúdo de grupos amino livres são inversamente proporcionais, e esse valor pode ser obtido diretamente por determinação da concentração do grupo amida ou indiretamente pela determinação da concentração do grupo amino. A determinação mais aproximada é controlada, em parte, pela abundância relativa dos grupos funcionais e também por algum requerimento especial, assim como a necessidade de solubilidade da amostra

3.4.2.5.1 Determinação do grau de acetilação por Espectro IV

A determinação do grau de acetilação por IV pode ser realizada (1) utilizando a razão A_m/A_r : onde, A_m é a intensidade da banda de prova, a qual é a medida do conteúdo dos grupos acetil ou amino e A_r é a intensidade da banda de referência que não deve mudar de acordo com o grau de acetilação; (2) criando uma curva de calibração com as razões da absorbância de amostras de quitina/quitosana conhecidas versus o DA, onde o DA foi determinado por IV ou uma técnica de referência como a ressonância magnética nuclear; (3) avaliação de várias razões de absorção de bandas por um método estatístico (Kasaai, 2008).

O espectro de IV é geralmente obtido em um intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . As amostras são obtidas na mistura de KBr e quitosana para a formação de pastilhas ou por um filme de quitosana obtido a partir de solução da mesma. Várias razões de

absorbâncias como: A_{1560}/A_{2875} , A_{1655}/A_{2875} , A_{1655}/A_{3450} , A_{1320}/A_{3450} , A_{1655}/A_{1070} , A_{1655}/A_{1030} , A_{1560}/A_{1160} , A_{1560}/A_{897} , e A_{1320}/A_{1420} foram propostas para determinar o grau de acetilação (Kasaai, 2008; Roberts, 1992; Duarte et al., 2002).

Em geral os espectros por infravermelho incluem, para um bom resultado, a escolha de uma banda de medida apropriada, uma banda de referência apropriada e delineamento de uma boa linha de base. Diferentes valores para o grau de acetilação foram encontrados utilizando diferentes linhas de base. Várias bandas de referência e de medida estão relacionadas na FIGURA 3.5 (FIG. 3.5) (Duarte et al., 2002).

FIGURA 3.5 – Bandas de referência utilizadas na determinação do grau de acetilação por infravermelho (Duarte et al., 2002).

A relação A_{1655}/A_{3450} aparece tendo vantagens sobre as outras relações. A banda 3450 cm^{-1} é proeminente (se evidencia) e relativamente isolada. Dois atributos úteis quando utilizado o método da linha de base, visto que o uso da banda 2878 cm^{-1} ou 2867 cm^{-1} como banda de referência, é complicado pela interferência da banda do grupo hidroxil, a qual é muito mais proeminente, centrada a 3450 cm^{-1} . A intensidade da banda de referência interna a 3450 cm^{-1} não depende do nível de acetilação, visto que a absorção da banda em 2878 cm^{-1} ou 2867 cm^{-1} varia com a mudança do grau de acetilação. Assim, o uso de qualquer uma dessas últimas faixas, como referência interna, requer o valor da faixa de absorção para ser calibrada por outra técnica. Em comparação a faixa A_{1655}/A_{3450} não precisa de calibração, sendo um método absoluto. Além disso, a faixa A_{1655}/A_{3450} foi encontrada

como sendo aproximadamente constante em uma escala de quitosanas totalmente acetiladas. Assim, a mesma equação pode ser usada para determinar a extensão em outras reações de acetilação (Kasaai, 2008; Roberts, 1992; Duarte et al., 2002).

Os valores de grau de acetilação obtidos usando essa faixa têm sido comparados com outras técnicas encontrando uma boa correlação.

3.4.2.5.2 Determinação do grau de acetilação por Ressonância magnética nuclear do hidrogênio – RMN ^1H

A maioria das técnicas de obtenção do grau de acetilação necessita de cuidados em relação à eliminação da água, assim como existe a necessidade de verificação da pureza das amostras. Na RMN ^1H não existe a necessidade do conhecimento exato da quantidade de quitosana utilizada, além de não existir a necessidade de purificação das amostras, já que os picos das impurezas não interferem nos picos utilizados para obtenção do grau de acetilação (Lavertu et al., 2003). Para a preparação das amostras apenas algumas miligramas são necessárias e não existe a necessidade de nenhuma curva de calibração.

3.4.2.6 Aplicações da quitina e quitosana

A quitosana exibe diversas propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, e tem várias aplicações em diferentes campos (Hirano, 1996) como, por exemplo, tratamento de água não potável (Dean & Dixon, 1992), agricultura (Yamada et al., 1993), cosméticos (Majeti & Kumar, 2000), processamento de alimentos (Roller & Covill, 1999) e aplicações biomédicas (Khor & Lim, 2003).

Em tratamentos de água, a quitosana age como quelante de remoção de metais pesados e resíduos, podendo remover corantes. Na área de cosméticos a quitosana faz parte de composição de pastas de dente, cremes para mãos e corpo, xampus, protetores solares, etc. (Majeti & Kumar, 2000). Na agricultura, a quitosana é usada como protetor de sementes, potencializador na germinação de sementes e liberação lenta de adubo e nutrientes (Yamada et al., 1993). A quitosana é adicionada à ração de animais, melhorando o funcionamento do intestino, diminuindo o

colesterol total. A quitosana promove a redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos plasmáticos devido à sua capacidade de se ligar aos lipídeos da dieta, interferindo na absorção intestinal dessas gorduras (Koide, 1998).

No campo de aplicações biomédicas, a quitosana é amplamente estudada (Khor & Lim, 2003), por ser biodegradável, biocompatível e bioativa, e em conjunto com suas interações específicas com componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento, tem levado ao aumento de sua utilização em engenharia de tecidos, como no reparo da pele, osso e cartilagem (Drury & Mooney, 2003). Testes clínicos foram realizados a fim de verificar que biomateriais baseados em quitosana não demonstram qualquer inflamação ou reação alérgica seguida de implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano (Khor & Lim, 2003).

A Quitosana é facilmente hidrolisada por várias quitosanases (Izume et al., 1992), as quais são completamente ausentes em mamíferos, porém, dependendo do valor do grau de acetilação, ela pode ser hidrolisada por lisozimas (Pangburn et al., 1982; Ren et al., 2005) fazendo com que possa ser degradado no organismo e, portanto, utilizado como biomaterial biodegradável. A resistência da quitosana pela lisozima pode estar relacionada com a baixa quantidade de grupos acetil. A lisozima tende a degradar as ligações entre os grupos N-acetil D-glucosamina muito mais rápido do que degrada os grupos D-glucosamina. Sua degradação leva a liberação de amino-açúcares que podem ser, incorporado nos caminhos metabólicos de glicosaminoglicanas e glicoproteínas, ou simplesmente excretado pelo organismo (Aiba, 1992). Os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais apresentam propriedades cicatrizantes, antimicrobianas (Prevost et al., 2006).

Além da quitosana ser um polímero bioativo, é um agente homeostático, o qual apresenta propriedades anti-trombogênicas (Khor & Lim, 2003; Hoekstra et al., 1998). Também possui a capacidade de estimular o sistema imune do organismo contra infecções virais e bacterianas (Peluso et al., 1994). Finalmente, possui propriedades de cura de ferida e favorece a regeneração de tecidos moles como a pele, e duros como, por exemplo, o osso (Muzzarelli, 1993; Muzzarelli et al., 1994). Foi observado que os oligossacarídeos têm efeito estimulatório nos macrófagos e,

tanto a quitina como a quitosana são quimiotáticos para neutrófilos, formam tecido granuloso, acelerando a cura de feridas ou a re-epitelização (Ueno et al., 1999; Ishihara et al., 2002). Para a utilização da quitosana em cura de feridas, sua interação com as células presentes na pele é fundamental. Experimentos realizados por Chatelet et al. (2001) demonstraram que, a proliferação dos queratinócitos sobre membranas de quitosana esta relacionada com o grau de acetilação das mesmas, sendo que uma menor acetilação favorece o crescimento dos queratinócitos. No mesmo ano Howling et al. (2001) publicou um artigo em que demonstrou que o crescimento de fibroblastos é favorecido quando o meio de cultura possui quitosana dissolvida, com grau de acetilação por volta de 15%.

3.5. Agentes reticulantes e plastificantes

3.5.1 Glutaraldeído

O glutaraldeído (FIG. 3.6) é uma molécula bi funcional que tem a capacidade de forte interação com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura e em menor intensidade com grupos tiol. Inicialmente foi utilizado como fixador em histoquímica e microscopia eletrônica, posteriormente sendo utilizado como agente bifuncional em estudos com proteínas e macromoléculas agregantes (Hajdu et al., 1975).

FIGURA 3.6 – formula estrutural do glutaraldeído

O glutaraldeído age como um agente formador de ligações cruzadas (*crosslinking*). A interação covalente ocorre entre os grupos aldeídos do glutaraldeído com os grupos aminas livres da quitosana que acredita-se ser por meio de base de Schiff (Monteiro & Airoidi, 1999).

3.5.2 Glicerol

Plastificantes são aditivos utilizados para aumentar a flexibilidade ou plasticidade de polímeros. Diversas teorias foram propostas para explicar a ação dos agentes plastificantes. A teoria da lubrificação postula que esses agentes agem como lubrificantes internos, reduzindo a fricção entre as cadeias poliméricas. A teoria do gel postula que a rigidez do polímero vem da estrutura tridimensional e os agentes plastilizantes quebram essas interações entre as cadeias do polímero (pontes de hidrogênio e força de Van der Waals ou forças iônicas), aumentando a mobilidade das cadeias (Di Gioia & Guilbert, 1999).

Outra teoria, chamada de teoria de volume livre, baseia-se em fundamentos matemáticos e termodinâmicos onde o aquecimento ou adição de pequenas moléculas, proporciona o aumento do volume livre entre e ao redor das macromoléculas, possibilitando seu movimento e favorecendo desse modo a platificação do polímero (Kudela, 1989).

3.6. Agentes esterilizantes

3.6.1 Radiação ultravioleta

A irradiação ultravioleta tem efeito microbicida, se for utilizada com intensidade e tempo de exposição suficiente, encontrando aplicações diversas como na esterilização do ar, superfícies de equipamentos e em embalagens de alimentos. Fontes com comprimentos de ondas inferiores a 200 nm são ineficientes, visto que as ondas são rapidamente absorvidas pelo oxigênio e pela água. As irradiações ultravioletas na faixa de 210 e 330 nm são mais eficientes como germicidas por serem absorvidas pelas proteínas e ácidos nucleicos, provocando o rompimento de cromossomo, mutações genéticas e inativação de enzimas e, conseqüentemente, a morte da célula (Cardoso, 2007).

3.6.2 Álcool 70%

Dentre os agentes esterilizantes de membranas de quitosana, destaca-se a utilização de soluções alcoólicas, entretanto, o álcool possui uma ação desinfetante e não esterilizante. O álcool, apesar de não ser um agente esterilizante propriamente

dito, é considerado um bom desinfetante devido à sua ação desidratante e coaguladora de proteínas. O álcool não somente rompe as membranas pela solubilização de lipídios como também desnatura as proteínas. No entanto, o álcool não tem ação sobre formas de resistência tais como os endosporos de diversas bactérias. Este fato limita seu emprego como esterilizante de superfície (Dos Santos et al., 2002). Porém, vários grupos de pesquisa utilizam este reagente para a descontaminação das membranas de quitosana que entraram em contato direto com culturas celulares (Chatelet et al., 2001; Ma et al., 2001; Chupa et al., 2000; Madihally & Matthew, 1999; Li et al., 1999; Suzuki & Mizushima, 1997).

MATERIAIS E MÉTODOS

Fluxograma de trabalho

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais:

- **Qs** - Quitosana originada de carapaça de camarão com peso molecular de 700 g/mol e grau de acetilação entre 40 e 50%, cedida gentilmente pelo Prof. Dr. Bronislaw Polakiewicz do Departamento de Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica da Faculdade de Farmácia/USP
- **Qs1** - Quitosana originada a partir da quitosana Qs tratada com NaOH 50% por 1 mês a baixas temperaturas.
- **Qs75** - Quitosana originada de carapaça de caranguejo com peso molecular de 190 a 375 g/mol com grau de acetilação de 15 a 25%, adquirida da Aldrich. Catalogo: 448877-50G
- **Qs85** - Quitosana originada de carapaça de caranguejo com peso molecular de 190 a 275 g/mol com grau de acetilação abaixo de 15%, adquirida da Aldrich. Catalogo: 417963-25G
- **PVAI MP** - Poli (álcool vinílico) (PVAI) com 87% de grau de hidrólise e peso molecular de 72.000 adquirido da MP Biomedicals. Catalogo: 151940,
- **PVAI P** - Poli (álcool vinílico) (PVAI) com 88% de grau de hidrólise e peso molecular de 72.000 adquirido da Quell. Não mais comercializado.

Os queratinócitos foram extraídos de biopsias da pele de reconstrução mamária, doadas pelo Banco de Tecidos do Instituto Central do HC - FMUSP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP considerou que não haveria necessidade de apreciação do projeto (Apêndice A).

4.2. Métodos:

4.2.1 Poli (álcool vinílico) - PVAI

Com o intuito de reproduzir a membrana originalmente descrita por Rodas e colaboradores (IPEN, 2004), foram efetuadas as seguintes etapas:

4.2.1.1 Preparo da Solução de PVAI

O PVAI em pó foi pesado e adicionada água destilada de modo a alcançar uma suspensão a 8%. A mistura foi armazenada a temperatura ambiente por 24 horas, elevando a temperatura, após este período, acima de 100 °C em um banho termostaticado para a dissolução do PVAI.

4.2.1.2 Preparo da membrana de PVAI

A solução de PVAI foi vertida em placas de Petri com 85 mm de diâmetro com a adição de um filme de poliestireno sobre a mesma. As placas foram embalada para irradiação em fonte de cobalto (^{60}Co) modelo Gamma Cell 200 localizada no CTR (Centro de Tecnologia das Radiações) do IPEN (Instituto de Pesquisas Energética e Nucleares), com variação de dose de 8 a 50 kGy, dependendo do estudo, para as membranas de PVAI MP e dose única de 10 kGy para a membrana padrão PVAI P.

4.2.1.3 Liofilização da membrana de PVAI

Após a irradiação as membranas de PVAI foram desembaladas e removidas das placas de Petri com o auxílio de pinças. As membranas foram então cortadas no tamanho desejado, depositadas em placa de Petri e acondicionada em um liofilizador tipo Dura Stop MP que congelou a amostra até aproximadamente – 50 °C, sendo então mantidas até a completa secagem da membrana por aproximadamente 16 horas.

4.2.1.4 Caracterização da membrana de PVAI

Para todos os estudos de caracterização foi utilizada a membrana preparada com o PVAI do fornecedor Quell, irradiada a 10 kGy (Rodas, 2004), como padrão de comparação.

4.2.1.4.1 Determinação da fração sol/gel das membranas de PVAI

Para a determinação da fração sol/gel das membranas de PVAI, foi determinado o intumescimento para a realização do cálculo da fração sol/gel.

4.2.1.4.1.1 Determinação do intumescimento para o cálculo da fração sol/gel

Membranas de PVAI foram desembaladas, cortadas em fragmentos e pesadas em balança analítica. As amostras foram acondicionadas em recipiente apropriado e, em seguida, foi adicionada água ultrapura até completar 50 mL. Diariamente as amostras foram retiradas da solução e pesadas até peso constante. O intumescimento foi determinado pela relação:

$$I\% = \left(\frac{mf - mi}{mi} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde: I% é o grau de intumescimento em porcentagem, *mf* é a massa final em gramas e *mi* é a massa inicial em gramas.

4.2.1.4.1.2 Cálculo da fração sol/gel

Esta determinação foi feita em membranas de PVAI MP irradiadas com doses de 10 a 50 kGy. Depois de atingido o equilíbrio de intumescimento determinado pelo peso constante, as amostras foram lavadas, com água purificada, em extrator de Soxhlet por 8 horas e em seguida as amostras foram congeladas e liofilizadas até secagem completa, sendo então pesadas para a determinação matemática da fração *gel* das membranas. A fração *sol* foi determinada pela equação:

$$\text{Fração sol} = 1 - \text{fração gel} \quad (3)$$

Os resultados foram analisados em um programa de computador (gel/sol Analyze) obtido gratuitamente em endereço eletrônico (Janik).

4.2.1.4.2 Comparação entre curvas de intumescimento das membranas de PVAI MP e PVAI padrão

As membranas de PVAI MP foram irradiadas nas doses de 10, 13, 15 kGy. Em seguida foi realizada a determinação do intumescimento de acordo com o item 4.2.1.4.1 e comparadas com o intumescimento da membrana de PVAI P, irradiada a 10 kGy.

4.2.1.4.3 Propriedades mecânicas

Após irradiação com diferentes doses, as membranas foram desembaladas e manipuladas exaustivamente, sendo colocadas em contato com a pele, verificando principalmente sua resistência e aderências. Os resultados foram expressos em valores positivos ou negativos, seguindo a seguinte classificação:

➤ *Positivos:*

- Boas condições de manipulação com pinças: possibilidade de manter a membrana íntegra quando retirada da placa com auxílio de pinças.
- Boa aderência à pele: total acomodação da membrana, quando, amoldada na mão e articulações metacarpo-falangeanas proximais.

➤ *Negativos:*

- Membranas quebradiças: não mantém sua integridade durante a manipulação com pinças.
- Amorfa: não mantém sua forma de membrana quando retiradas da placa.
- Sem adesão a pele ou articulações: deformação insuficiente para total acomodação da membrana às articulações metacarpo-falangeanas proximais.

4.2.1.4.4 Teste de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade da membrana de PVAI, foi seguida a norma ISO – 10993-5 (1992). As células utilizadas para realização do teste foram

células de ovário de Hamster (CHO-k1), e os reagentes empregados para a avaliação da viabilidade celular foram 3-(dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium (MTS) e metassulfato de fenazida (PMS) (Cory et al., 1991); contidos no kit CellTiter96® AQueous Non – Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega Corporation).

As células CHO-k1 foram mantidas em cultura com meio RPMI 1640 suplementado com antibiótico e antimicótico (penicilina 100 unidades/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina 0,025 µg/mL), 2mM de glutamina e 10% de soro fetal bovino em incubadora úmida a 37° C e atmosfera de 5% de CO₂, até atingirem a subconfluência (aproximadamente 90% de utilização da área de cultura) na placa de cultura de onde foram descoladas pela ação da solução de tripsina 0,05%/EDTA 0,02% em solução tampão fosfato pH 7,4.

As membranas compostas de PVAI P e PVAI MP foram expostas a temperatura de 40 °C, em estufa, até a secagem completa. As membranas secas foram cortadas em fragmentos menores para a preparação do extrato na proporção de 0,2g/ mL de meio de cultura RPMI 1640. Como controle negativo foi preparado um extrato de alumina. As amostras foram mantidas na incubadora a 37° C, por 48 horas. Como controle positivo, foi preparado uma solução fenol 0,3% v/v de meio de cultura. Os extratos foram diluídos de 100 a 6,25% v/v de meio de cultura RPMI 1640 para realização do teste de viabilidade celular.

Em uma placa de cultura de 96 poços foram colocados 50µL da suspensão de células CHO-k1, na concentração final de 3000 células por poço, sobre 50µL do extrato em suas diluições, em quadruplicata. A placa foi colocada na incubadora úmida com 5% de CO₂ por 72 horas a 37°C. A viabilidade celular foi determinada pela adição de 20 µL de solução de MTS/PMS (20:1) e incubado por mais 2 horas. A placa foi levada a uma leitora ELISA (espectrofotômetro para placas de 96 poços) com filtro de 495 nm.

A viabilidade celular foi determinada pela relação:

$$VC(\%) = \left(\frac{DO_{amostra}}{DO_{controle}} \right) \times 100 \dots \dots \dots (4)$$

Onde: VC = viabilidade celular (%); $DO_{amostra}$ = densidade óptica da amostra; $DO_{controle}$ = densidade óptica do controle.

O Índice de Citotoxicidade - IC₅₀, concentração do extrato que mata 50% da população de células, foi determinado graficamente.

4.2.1.4.5 Verificação de porosidade média

4.2.1.4.6.1 Verificação de porosidade por intrusão de mercúrio

Porções da membrana de PVAI P foram liofilizadas de acordo com o item 4.2.1.3 e posteriormente realizado o teste de intrusão por mercúrio (Cascone et al., 2004), com pressão variando de 0 a 50 psi e cada ponto de pressão foi equilibrado por 10 segundos. A distribuição dos volumes dos poros foi obtida a partir da derivação da curva de intrusão cumulativa dos poros em função do diâmetro dos mesmos. Esse parâmetro é relacionado com a medição da pressão de acordo com a equação de Washburn:

$$d = \left(\frac{4\gamma \cos \theta}{P} \right) \times 10 \dots \dots \dots (5)$$

Onde d é o diâmetro dos poros, γ é tensão de superfície do líquido de intrusão, θ é o ângulo de contato e P a pressão utilizada.

4.2.1.4.6.2 Verificação de porosidade por cortes histológicos em criostato

Porções das membranas de PVAI irradiadas de 10 a 50 kGy foram intumescidas com água ultrapura conforme o item 4.2.1.4.1 e imersas em meio de congelamento (Killik - Easypath) por aproximadamente 12 horas. As membranas

foram medidas antes e após a imersão no meio de congelamento e calculadas as respectivas porcentagens de diminuição de volume para posterior utilização como fator de correção (Russ, 1986). As amostras foram congeladas até a temperatura final de menos 70 °C e seccionadas longitudinalmente, com uma espessura de quatro micrômetros em um criostato para confecção de lâminas contendo os cortes. A seguir as lâminas foram coradas com solução de hematoxilina-eosina para observação em microscópio óptico.

As imagens de cada membrana foram fotografadas e os cálculos das áreas correspondentes aos poros foram obtidos manualmente a partir de quatro fotografias de cada amostra, demarcando todos os poros encontrados, utilizando o programa UTHSCSA IMAGETOOLS 3.0 (Wilcox).

4.2.2 Caracterização da Quitosana

4.2.2.1 Desacetilação da quitosana (Qs)

A quitosana original (Qs) foi imersa em solução de NaOH a 50% em banho termostatizado a 40 °C por 14 e 30 dias e 80 °C por uma hora. Após este tratamento, as amostras foram lavadas com água destilada até pH neutro (7,0) e então secas em estufa à 30 °C (Roberts, 1992). Os resultados foram analisados por espectrometria na região do Infravermelho.

4.2.2.2 Verificação do grau de impureza das amostras de quitosana

Um grama de quitosana foi diluído em 100 mL de ácido acético 1%, essa solução foi filtrada por uma membrana de nylon com poros de 100 µm (previamente pesada), posteriormente a membrana foi seca e pesada em uma balança analítica.

4.2.2.3 Determinação do grau de acetilação (DA)

O grau de acetilação foi determinado por meio de duas técnicas, infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear do Hidrogênio (RMN ¹H).

4.2.2.3.1 Determinação por Infravermelho

A quitosana em pó foi pesada, dividida em quatro amostras com 4 mg cada e seca por uma semana em estufa a 40 °C. Após a secagem, cada amostra foi misturada em almofariz com 100 mg de KBr, também previamente seco em uma estufa a 100°C, para confecção das pastilhas da seguinte forma: o pó resultante da mistura de quitosana com KBr foi colocado em um suporte para confecção de pastilhas e comprimido em prensa hidráulica até 9000 torr e aplicado vácuo ao sistema por cerca de 15 minutos. As pastilhas foram analisadas em espectrômetro BOMEM MB- 100 IR, com leitura das respectivas absorbâncias em vários comprimentos de onda (1320, 1420, 1560, 2875, 1655 e 3450 cm⁻¹). O grau de acetilação foi determinado pelas formulas:

$$DA = (A_{1655}/A_{3450}) 100/1.33 \quad (6)$$

$$DA = (A_{1655}/A_{3450}) 115 \quad (7)$$

$$A_{1320}/A_{1420} = 0.3822 + 0.03133 DA \quad (8)$$

$$A_{1560}/A_{2875} = 0.0125 DA + 0.2 \quad (9)$$

Onde DA é o grau de acetilação e na relação entre as absorbâncias, o numerador é o comprimento de onda de interesse e o denominador o comprimento de onda escolhido como referência, respeitando as respectivas linhas de base. Os valores constantes em cada fórmula são correspondentes aos declives das curvas lineares utilizadas pelos diferentes autores (razão da absorção pelo DA) (Kasaai, 2008).

4.2.2.3.2 Determinação por Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)

O espectro de RMN ¹H foi obtido em um espectrômetro BRUKER DRX300, onde aproximadamente 10 mg da amostra de quitosana foi solubilizada em 1 mL de HCl/D₂O 1%(v/v), durante 24 horas formando uma solução viscosa. Uma alíquota dessa solução foi colocada em tubos de 5 mm de diâmetro para análise a 70 °C (Lavertu et al., 2003). A determinação de grau médio de acetilação (DA) das

amostras foi feita utilizando a área do pico na região de 2 ppm atribuído aos núcleos de hidrogênio da metila do grupo acetamido (A_{ac}) e a área do pico em 5,2 ppm atribuído ao núcleo de hidrogênio na posição 2 do anel de glicosamino (A_H), seguindo a equação:

$$DA\% = \left(\frac{A_H}{A_H + \frac{A_{ac}}{3}} \right) \times 100 \quad (10)$$

4.2.2.4 Massa molecular média

Para determinar a massa molecular média da quitosana, foi utilizado um viscosímetro capilar tipo Ubbelohde. As amostras de quitosana foram dissolvidas em solução tampão de ácido fórmico (0,2M) e formato de sódio (0,1M) (Ulanski & Rosiak, 1994).

O viscosímetro foi preenchido com a amostra em temperatura equilibrada de $25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$ em um banho termostatzado.

O tempo de escoamento da solução foi determinado por cronômetro. A relação entre viscosidade intrínseca e a massa molecular média é expressa pela equação de Mark-Houwink (Wang et al., 1991):

$$[\eta] = K \bar{M}_v^\alpha \quad (11)$$

Onde η é a viscosidade intrínseca, $\bar{M}$ a massa molecular média, K e α são constantes validas para um determinado intervalo de peso molecular, a uma temperatura especifica, com um solvente especifico.

4.2.2.5 Preparações das quitosanas

4.2.2.5.1 Solução de quitosana

A quitosana em pó foi pesada e misturada em ácido acético 1% em água ultrapura de modo a preparar uma solução a 2% (m/v). Essa mistura foi deixada a temperatura ambiente por 24 horas até a completa dissolução da quitosana.

4.2.2.5.2 Confecção das membranas de quitosana sem agente reticulante

Soluções das diferentes amostras de quitosanas foram preparadas de acordo com o item 4.2.2.5.1 e vertidas em placas de petri de plástico até a secagem completa em estufa ventilada a 35 °C.

4.2.2.5.3 Confecção das membranas de quitosana reticulada com glutaraldeido

Para a reticulação da quitosana de modo a formar membranas, soluções de quitosana preparadas de acordo com o item 4.2.2.5.1, com diferentes graus de acetilação foram homogeneizadas com uma solução de glutaraldeido 0,125% (v/v). Após a completa homogeneização a mistura foi vertida em placa de Petri de plástico e secas em estufa ventilada a 35 °C (Rodas, 2004).

4.2.2.5.4 Confecção das membranas de quitosana regeneradas

Soluções das diferentes amostras de quitosanas foram preparadas de acordo com o item 4.2.2.5.1 e vertidas em placas de petri de plástico até a secagem completa em estufa ventilada a 35°C, logo após, as membranas foram imersas em solução diluída de amônia em metanol (15 ml NH₄OH 33%/35 ml água destilada /500 ml MetOH) por 1 minutos e secas novamente (Chatelet et al., 2001).

4.2.2.5.5 Confeção das membranas de quitosana plastificadas com glicerol

A solução de quitosana com diferentes graus de acetilação preparadas de acordo com o item 4.2.2.5.1, tiveram o pH ajustado para 6,3 com uma solução concentrada de bicarbonato de sódio. Posteriormente as soluções foram homogeneizadas com adição de glicerol de modo a obter a concentração final de 20% e vertidas em placas de petri de plástico permanecendo a temperatura ambiente, até a sua secagem (Zainol et al., no prelo).

4.2.2.5.6 Eficácia da diminuição da carga microbiana dos filmes de quitosana

➤ *Ultravioleta*

As membranas ficaram expostas a radiação ultravioleta (lâmpada germicida) por 30 minutos de cada lado. Após esse procedimento as membranas foram acomodadas em placa de cultura de seis poços, adicionado meio de cultura e mantidas em estufa a 37 °C por 48 horas.

➤ *Álcool 70%*

As membranas foram imersas em solução alcolica (70% de etanol e 30% de água ultrapura estéril) por 24 horas (Chatelet et al., 2001), lavadas exaustivamente com água ultrapura estéril, acomodadas em placa de cultura de seis poços, adicionado meio de cultura e mantidas em estufa a 37 °C por 48 horas.

4.2.3 Cultura de células da epiderme

4.2.3.1 Preparo dos meios de cultura

(K-) - Meio de cultura para queratinócitos: Dulbecco's Modified Eagle Medium e F12 na proporção 2:1, Soro fetal bovino (Fetal Clone III) a 10% (v/v), glutamina (4 mmol/L), solução de antibiótico/antimicótico de penicilina (100 UI/mL)- estreptomicina (100µg/mL)- anfotericina (0,025 µg/mL), Adenina (0,18mM), Insulina (5 µg/mL), Hidrocortizona (0,4 µg/mL), Toxina colérica (0,1nmol/L), triiodotironina (20pM).

(K+) – Idem ao “K-“ com adição de Epidermal growth factor – EGF (10 ng/mL).

4.2.3.2 Obtenção de queratinócitos

Os queratinócitos foram obtidos de biópsia de pele, de doador voluntário, por extração enzimática (Trypsina 0,05%/EDTA 0,02%) e semeados em camada de sustentação (feeder-layer) composta por fibroblastos (CCL-92, ATCC) previamente irradiados a 60 Gy. As células foram mantidas em meio de cultura para queratinócitos inicialmente sem EGF (K-), este sendo adicionado após 48 horas (K+) e efetuadas trocas sucessivas deste meio até atingir um número de células adequado para a realização dos experimentos.

4.2.3.3 Cultura dos queratinócitos sobre as membranas de quitosana

As membranas preparadas por diferentes métodos foram esterilizadas pela exposição com luz ultravioleta por 30 minutos de cada lado. Logo após as membranas foram intumescidas com solução fisiológica por 4 horas e, então, cortadas de modo a cobrir o fundo de uma placa de cultura com 6 poços.

Sobre cada membrana foi colocado um anel de aço inoxidável com 16 milímetros de diâmetro, autoclavado, sendo então levemente pressionado para melhor aderência do mesmo. Em cada anel foram adicionados 150.000 queratinócitos com meio de cultura EGF (K-). Após 24 horas os anéis foram retirados e o meio de cultura trocado por K+ sucessivamente a cada 2 dias. A interação entre as células e as membranas foi acompanhada diariamente utilizando microscópio invertido.

4.2.4 Junção da membrana de PVAI MP com a membrana de glicerol

Solução de quitosana Qs75 a 2% foi homogeneizada com adição de glicerol até obtenção de solução final a 20% (Item 4.2.2.5.5). Essa solução foi vertida sobre membrana de PVAI MP, irradiada a 15 kGy, liofilizada e intumescida com solução de quitosana Qs75 a 2% (Item 4.2.2.5.1). O sistema permaneceu à temperatura ambiente até a secagem da membrana superior.

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Poli (álcool vinílico) - PVAI

5.1.1 Determinação da fração sol/gel das membranas de PVAI

5.1.1.1 Determinação do intumescimento para o cálculo da fração sol/gel

Na FIG. 5.1 pode-se observar a variação do grau de intumescimento das membranas irradiadas com as doses 8, 10, 18, 25 e 50 kGy, cujos valores foram utilizados para a determinação da fração sol/gel

FIGURA 5.1 – Grau de intumescimento em água das membranas de PVAI MP, irradiadas de 8 a 50 kGy, segundo legenda acima.

5.1.1.2 Cálculo da fração sol/gel

Com a determinação da fração sol/gel podemos prever teoricamente qual a dose de irradiação mínima, onde se iniciará a reticulação da solução, para a formação da membrana.

Os dados de intumescimento do item 5.1.1.1 foram utilizados no programa *Gel/sol Analyze*. Os gráficos obtidos pelo programa estão dispostos na figura abaixo (FIG. 5.2).

FIGURA 5.2 – Gráficos obtidos por meio do programa Gel/Sol Analyze. (A) $s \times D$; (B) $s+s^{0.5} \times 1/D$; (C) $s+s^{0.5} \times D_g/D$. 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: 10, 15, 18, 25 e 50 kGy

Na tabela abaixo (TAB. 5.1) estão indicados os parâmetros obtidos pelo programa sol/gel Análise em relação às membranas de PVAI, onde P_0/Q_0 é a relação

entre densidade de degradação e densidade de reticulação, D_g é a dose gel e D_v é a dose virtual.

TABELA 5.1 – Parâmetros de membranas de PVAI obtidos pelo programa sol/gel Analyzer

Equação	Charlesby - Pinner	Charlesby - Rosiak
P_0/Q_0	1,89	1,89
Correlação	0,88	0,88
D_g (kGy)	6	6
D_v (kGy)	-	0

5.1.2 Comparação entre curvas de intumescimento das membranas de PVAI MP e PVAI padrão

Após a obtenção da dose gel, foram preparadas membranas de PVAI MP, irradiadas a 10, 13 e 15 kGy, para a confirmação do valor teórico obtido em 5.1.1.2 e comparação com a membrana padrão PVAI P irradiada a 10 kGy (FIG. 5.3).

FIGURA 5.3 – Comparação do grau de intumescimento em água do PVAI P, irradiado a 10 kGy, com as membranas de PVAI MP, irradiados a 10, 13, 15 kGy, conforme legenda acima.

5.1.3 Avaliação das propriedades mecânicas das membranas de PVAI

Para a avaliação das propriedades mecânicas foram atribuídos valores positivos ou negativos (Item 4.2.1.4.3) às membranas formadas com diferentes doses. Lembrando que P corresponde à membrana padrão (Rodas, 2004) e MP às membranas obtidas com o PVAI em estudo. Na tabela abaixo (TAB. 5.2), podemos verificar a diferença na qualidade das membranas obtidas em diferentes doses.

TABELA 5.2 – Avaliação das propriedades mecânicas das membranas de PVAI

Membrana de PVAI	Dose (kGy)	Atribuição
P	10	+
MP	10	-
MP	13	+
MP	15	+
MP	25	-
MP	50	-

+ boas condições de manipulação com pinças e aderência à pele

- membrana quebradiça, amorfa ou sem adesão à pele ou às articulações

5.1.4 Determinação da Citotoxicidade das membranas de PVAI

Foi verificada a existência ou não de citotoxicidade no PVAI em estudo (MP), comparando os resultados com o PVAI padrão (P). No gráfico da FIG. 5.4 estão representadas as porcentagens de viabilidade das células em contato com as diferentes concentrações dos respectivos extratos, além dos controles positivo e negativo.

FIGURA 5.4 – Gráfico das curvas de citotoxicidade das membranas de PVAI, em contato com células CHO. Onde: C neg – controle negativo; C pos – controle positivo; PVAI P – amostra de PVAI padrão; PVAI MP – amostra de PVAI em estudo.

5.1.5 Verificação de tamanho médio de poros

A verificação do tamanho médio dos poros da membrana de PVAI foi realizada por meio de duas técnicas: Intrusão de mercúrio e cortes histológicos.

5.1.5.1 Intrusão de mercúrio

Pelo método de intrusão de mercúrio é possível, tanto verificar o tamanho médio dos poros de um material, quanto à porcentagem da porosidade. O gráfico abaixo (FIG. 5.5) foi feito a partir dos dados de intrusão por mercúrio na amostra liofilizada da membrana de PVAI – P. A porcentagem de porosidade total do material dada pelo método indicou um valor de 2% em média.

FIGURA 5.5 – Dispersão de poros por quantidade de mercúrio intruso na membrana de PVAI – P

5.1.5.2 Cortes histológicos

Neste método, foram demarcados todos os poros visualizados pela microscopia óptica, após intumescimento das membranas de PVAI irradiadas. Na FIG. 5.6 pode-se verificar a existência de poros em todos os cortes histológicos, variando conforme a dose.

FIGURA 5.6 – Fotografias das lâminas contendo os cortes das membranas de PVAI, irradiadas com diferentes doses, visualizadas em microscópio óptico com aumento de 40 vezes.

No processamento das membranas irradiadas com diferentes doses, logo após estarem imersas em meio de congelamento, observou-se a diminuição das membranas nas seguintes proporções: 34,7% nas doses de 10, 13 e 15 kGy e 18,2% com 25 e 50 kGy. Portanto, estes valores foram utilizados como fator de correção para a determinação final do tamanho dos poros das respectivas membranas.

No gráfico abaixo (FIG. 5.7) pode-se observar as diferenças nas porcentagens de poros quando confrontadas as faixas de tamanho de poros nas membranas irradiadas com diferentes doses.

FIGURA 5.7 – Porcentagem do número de poros por intervalo de tamanho. Membrana padrão (P), membrana de PVAI MP irradiado a 10 kGy (MP 10), a 13 kGy (MP 13), a 15 kGy (MP 15), a 25 kGy (MP 25) e a 50 kGy (MP 50).

A tabela abaixo concentra os dados da dose, intumescimento, tamanho médio dos poros e tamanho mínimo e máximo dos poros encontrados na caracterização de cada membrana analisada.

TABELA 5.3 – Dados do grau de intumescimento, tamanho médio dos poros e porcentagem por faixa de tamanho, das membranas de PVAI MP irradiadas com diferentes doses e PVA P irradiada com 10 kGy

PVAI	Dose (kGy)	Intumescimento (%)	Tamanho médio (μm ²)	10-69* (% de poros)	70-100* (% de poros)
P	10	67	57,71	38	6
MP	10	78	207,51	60	5
MP	13	65	51,03	39	11
MP	15	63	52,49	44	9
MP	25	40	31,18	36	8
MP	50	7	12,48	59	0

* Faixa de tamanho dos poros (μm²)

5.2 Quitosana

5.2.1 Desacetilação da quitosana (Qs)

Foram efetuadas várias tentativas de desacetilação da quitosana Qs, com variação de tempos e temperatura de contato com NaOH a 50% (item 4.2.2.1). Os resultados obtidos pela determinação com infravermelho, utilizando a linha de base BL1/BL4 e relação de absorbâncias A_{1655}/A_{3450} , indicaram graus de acetilação muito semelhantes à quitosana Qs original (47,66%): 44,71%, para a amostra tratada por 14 dias a 40 °C; 44,40%, para a amostra tratada por 30 dias a 40 °C e 42,81%, para a amostra tratada por uma hora a 80 °C.

5.2.2 Verificação do grau de impureza das amostras de quitosana

Após as pesagens dos filtros de nylon contendo o resíduo do material filtrado e descontando o peso dos respectivos filtros, obtivemos valores que relacionados ao peso inicial das quitosanas, nos forneceram as porcentagens de impurezas descritas na tabela abaixo (TAB. 5.4).

TABELA 5.4 – Porcentagem de impureza nas amostras de quitosana

Quitosana	Impureza (%)
Qs	<1%
Qs1	<1%
Qs75	1,12%
Qs85	1,05%

5.2.3 Determinação do grau de acetilação (DA)

O grau de acetilação da quitosana é um parâmetro importante para o preparo do substituto dermo-epidérmico, e na literatura pertinente são encontrados principalmente dois métodos de determinação deste parâmetro (infravermelho e

RMN ^1H). Portanto, optamos pela utilização de ambos para a comparação dos resultados.

5.2.3.1 Determinação por infravermelho

Sendo que na literatura encontramos divergências quanto aos comprimentos de ondas em que devem ser lidas as absorvâncias e as respectivas linhas de bases, na TAB. 5.5 apresentamos os dados referentes ao grau de acetilação de cada amostra de quitosana utilizando diferentes linhas de bases (vide FIG. 3.5 no item 3.4.2.5.1) e diferentes relações de comprimentos de onda:

TABELA 5.5 – Determinação do DA por infravermelho utilizando diferentes relações de comprimentos de ondas, respectivas linhas de base e formula de correção

Relação das absorvâncias	(A_{1655}/A_{3450})		(A_{1655}/A_{3450})		(A_{1320}/A_{1420})		(A_{1560}/A_{2875})	
Linha de base	BL 1/BL 4		BL 3/BL 4		BL 6/BL 9		BL 2/BL 5	
Correção	$(A_x/A_{ref})100/1,33$		$(A_x/A_{ref})x115$		$(A_x/A_{ref} -0,3822)/0,03133$		$(A_x/A_{ref} -0,2)/0,0125$	
	DA(%)	DP*	DA(%)	DP*	DA(%)	DP*	DA(%)	DP*
Qs	47,66	0,78	52,49	2,15	20,67	1,07	62,16	2,80
Qs1	44,40	1,41	53,52	1,89	22,07	0,85	54,67	1,70
Qs75	52,30	1,43	49,13	1,72	20,49	2,32	72,03	1,67
Qs85	53,63	2,05	60,92	1,76	20,51	0,70	73,70	1,45

* Desvio padrão

5.2.3.2 Determinação por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Utilizando a técnica de RMN ^1H foram encontrados os valores para o grau de acetilação descritos abaixo (TAB. 5.6).

TABELA 5.6 – Grau de acetilação das diferentes quitosanas por RMN ^1H

Quitosana	DA(%)	Desvio padrão
Qs	39	1,64
Qs1	1	0,82
Qs75	28	2,18
Qs85	21	2,27

5.2.4 Determinação da Massa molecular média por viscosidade

Utilizamos os valores da viscosidade intrínseca, das amostras das diferentes quitosanas, obtidos pelo experimento de tempo de escoamento em viscosímetro capilar, foi possível encontrar o peso molecular das amostras utilizando a equação abaixo. Para relacionarmos estes valores foram utilizadas as seguintes constantes: $k=1,547035$ e $\alpha=0,8972$ (Rodas, 2004; Rosiak & Ulanski, 1999).

$$[\eta] = K \bar{M}_v^\alpha \quad (10)$$

Os valores da massa molecular média viscosimétrica encontrada para cada amostra estão dispostos na tabela abaixo (TAB. 5.7):

TABELA 5.7 – Massa molecular média($\bar{M}$) das diferentes quitosanas

Quitosana	$\bar{M}$ fornecida (g/mol)	$\bar{M}$ obtida (g/mol)
Qs	700	288
Qs1	-	205
Qs75	190-375	821
Qs85	190-275	435

5.2.5 Membranas de quitosana

5.2.5.1 Manutenção de filme, após intumescimento

As membranas de quitosana, preparadas segundo o apêndice B foram avaliadas pela sua capacidade de manutenção da solução após neutralização (pH 6,3) e manutenção do filme após intumescimento. Na tabela abaixo (TAB. 5.8), estão relacionadas as membranas que mantiveram ou não esta propriedade.

TABELA. 5.8 – Numeração das membranas que mantiveram ou não as características de filme, após neutralização ou intumescimento

Membranas que mantiveram a forma de filme	3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 19
Membrana gelificada	6
Membranas dissolvidas	1, 2, 8, 9, 15, 16

As preparações 1, 2, 6, 8, 9, 15 e 16 foram descartadas, pela sua impossibilidade de uso.

5.2.5.2 Eficácia da descontaminação

Antes de iniciar as culturas sobre as membranas de quitosana, verificamos a eficiência da descontaminação das várias preparações descritas no apêndice B. Abaixo destacamos as membranas que se mantiveram estéreis e as que foram contaminadas (TAB. 5.9):

TABELA 5.9 – Numeração das membranas que mantiveram ou não a carga microbiana em meio de cultura

Membranas não contaminadas	3, 4, 10, 11, 13, 17, 18
Membranas contaminadas	5, 7, 12, 14, 19

As preparações 5, 7, 12, 14 e 19 foram descartadas.

5.3 Cultura de células da epiderme

5.3.1 Obtenção dos queratinócitos

Os queratinócitos retirados da biopsia de pele e semeados sob camada de sustentação cresceram em formato de colônias (FIG. 5.8) levando aproximadamente 7 dias para atingirem a sub-confluência.

FIGURA 5.8 – Foto de cultura de uma colônia de queratinócitos em cultura secundária, observada por microscopia óptica. A) Centro da colônia, após 7 dias. B) Lateral da mesma colônia, após 7 dias. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

5.3.2 Cultura de queratinócitos sobre as membranas de quitosana

Queratinócitos, provenientes de culturas secundárias, foram cultivados em membranas de quitosana preparadas de acordo com o apêndice B. Nesta etapa só foram utilizados os protocolos de preparações que não foram descartados nos itens 5.2.5.1 e 5.2.5.2. A visualização da interação entre os queratinócitos e as diferentes membranas de quitosana com diferentes características estão dispostas nas figuras abaixo.

5.3.2.1 Membranas de quitosana reticuladas com glutaraldeído

Os queratinócitos foram cultivados nas membranas Qs, Qs75 e Qs85, obtidas segundo o item 4.2.2.5.3, obtendo a numeração 3, 10 e 17 respectivamente (Apêndice B), utilizando como controle os queratinócitos cultivados diretamente sobre a placa. Nas FIG. 5.9 e 5.10 podemos visualizar a evolução destas culturas após 1 e 10 dias, respectivamente.

FIGURA 5.9 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 1 dia sobre as membranas obtidas com diferentes quitosanas (Qs, Qs75 e Qs85), reticuladas com glutaraldeído e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.10 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 10 dias sobre as membranas obtidas com diferentes quitosanas (Qs, Qs75 e Qs85), reticuladas com glutaraldeído e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

5.3.2.2 Membranas de quitosana regeneradas

Os queratinócitos foram cultivados nas membranas Qs, Qs75 e Qs85, obtidas segundo o item 4.2.2.5.4, obtendo a numeração 4, 11 e 18 respectivamente (Apêndice B), utilizando como controle os queratinócitos cultivados diretamente sobre a placa. Nas FIG. 5.11 a 5.14 podemos visualizar a evolução destas culturas após 1, 10, 14 e 20 dias, respectivamente.

FIGURA 5.11 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 1 dia sobre as membranas obtidas com diferentes quitosanas (Qs, Qs75 e Qs85), regeneradas e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.12 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 10 dias sobre as membranas obtidas com diferentes quitosanas (Qs, Qs75 e Qs85), regeneradas e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.13 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 14 dias sobre as membranas obtidas com diferentes quitosanas (Qs, Qs75 e Qs85), regeneradas e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.14 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 20 dias sobre as membranas obtidas com diferentes quitosanas (Qs, Qs75 e Qs85), regeneradas e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

5.3.2.3 Membranas de quitosana plastificadas com glicerol

Os queratinócitos foram cultivados na membrana Qs75 obtida segundo o item 4.2.2.5.5, obtendo a numeração 13 (Apêndice B), utilizando como controle os queratinócitos cultivados diretamente sobre a placa. A membrana Qs85 teve um comportamento similar à Qs75 nos experimentos anteriores, portanto não sendo utilizadas neste experimento. Nas FIG. 5.15 a 5.18 podemos visualizar a evolução destas culturas após 1, 10, 14 e 20 dias, respectivamente.

FIGURA 5.15 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 1 dia sobre a membrana de quitosana Qs75 homogeneizada com adição de glicerol (concentração final 20%) e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.16 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 10 dias sobre a membrana de quitosana Qs75 e homogeneizada com adição de glicerol (concentração final 20%) e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.17 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 14 dias sobre a membrana de quitosana Qs75 e homogeneizada com adição de glicerol (concentração final 20%) e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

FIGURA 5.18 – Fotografias de observações ao microscópio óptico dos queratinócitos, cultivados por 20 dias sobre a membrana de quitosana Qs75 e homogeneizada com adição de glicerol (concentração final 20%) e controle cultivado sobre placa de cultura. Aumento de 100 vezes, visualizadas com filtro azul.

5.4 Junção da membrana de PVAI MP com o filme de quitosana

Na figura abaixo (Fig. 5.19) podemos observar a membrana composta com o filme de quitosana (membrana 13, Apêndice B) e a membrana de PVAI MP, irradiada a 15 kGy, liofilizada e re-hidratada com solução de quitosana a 2%.

FIGURA 5.19 – Junção da membrana de PVAI MP, irradiada a 15 kGy, liofilizada e re-hidratada com solução de quitosana a 2% (membrana inferior - MI), com filme de quitosana e glicerol (membrana superior - MS). A) Visão superior, da membrana composta, em tamanho natural. B) Visão da membrana composta com aumento de 100x ao microscópio óptico.

DISCUSSÃO

6. Discussão

Esse trabalho dá continuidade à tese de doutorado da Dra. Andrea C. D. Rodas (Rodas, 2004), a qual idealizou e padronizou algumas características do substituto dermo-epidérmico, ora em estudo. Porém, a empresa fornecedora do PVAI (Qell) utilizado nesse trabalho não fornece mais esse material. Visando solucionar esse problema foi necessária a caracterização de um PVAI com as mesmas especificações, obtido de outro fornecedor (MP Biomedicals). No caso da quitosana, a caracterização, antes do início da sua utilização, é importante por ser um material obtido a partir da quitina de origem animal, existindo, portanto, diferenças naturais em sua composição.

Com o intuito de comparar, o PVAI (MP) em estudo com o PVAI Padrão (P), foi determinada a fração Sol/Gel. Para a execução deste experimento, foi necessário determinar o índice de Intumescimento de membranas de PVA com diferentes doses, variando de 8 a 50 kGy (FIG. 5.1). Os parâmetros obtidos por esse experimento, aplicado ao PVAI MP (FIG. 5.2) mostrou que a dose mínima (Dg) para que ocorresse a formação do gel é de 6 kGy (TAB. 5.1), diferentemente do observado com a amostra de PVAI P cuja dose mínima foi 3 kGy (Rodas, 2004), ou seja, uma diferença de 3 kGy, podendo-se concluir que a membrana de PVAI MP, irradiada a 13 kGy seria a membrana equivalente à membrana de PVAI P, irradiada com 10 kGy (membrana padrão), sendo que esse fato foi confirmado nos experimentos de intumescimento e tamanho médio de poros (TAB. 5.3).

A partir do resultado de dose mínima obtida pelo experimento anterior, foram preparadas membranas PVAI MP com doses de 10, 13, 15 kGy e realizado o teste de intumescimento com a finalidade de comparar os intumescimentos das membranas em estudo com a membrana padrão PVAI P (10 kGy). Todas as membranas utilizadas no teste mostraram-se capazes de absorver água mantendo uma relação entre radiação e a quantidade de absorção (FIG. 5.1 e 5.3). Esta relação seguiu o padrão descrito por Rosiak & Ulanski (1999), onde, quanto maior a dose de irradiação, menor é a capacidade de absorver água, como confirmado adiante na análise de determinação de poros. No experimento do item 5.1.2, também

pudemos observar que tanto PVAI MP irradiado a 13 e 15 kGy tiveram intumescimento semelhantes e comparáveis ao intumescimento do PVAI P irradiado com 10 kGy. O resultado mostra concordância com os resultados obtidos na análise Sol/Gel, indicando uma correspondência entre o PVAI P irradiado a 10 kGy e o PVAI MP irradiado a 13 kGy.

As propriedades mecânicas, de resistência e aderência a pele, das membranas, são fatores importantes na aceitação do biomaterial como um substituto dermo-epidérmico (Yannas & Burke, 1980). De todas as membranas estudadas, somente as membranas de PVAI MP irradiadas a 13 e 15 kGy foram consideradas satisfatórias quando comparadas com a membrana padrão (PVAI P), irradiada com 10 kGy (TAB. 5.2). A membrana de PVAI MP formada com a dose de 10 kGy, mostrou-se de difícil manipulação, pois deformava facilmente. Por sua vez, as membranas formadas com doses de 25 e 50 kGy, pela sua pouca deformação, mostraram-se inadequadas na aderência em porções da pele com superfície irregular ou articulações, além de serem mais friáveis (TAB. 5.2).

Sendo que o PVAI por nós utilizados possui um grau de hidrólise de 88% e na literatura só existem dados de citotoxicidade para este tipo de material com grau de hidrólise acima de 99%, foi necessário comprovar se este material também era atóxico. O teste de citotoxicidade, em células CHO, demonstrou que tanto o PVAI P quanto o PVAI MP são atóxicos (FIG. 5.4).

Na tentativa de caracterização do tamanho médio dos poros das membranas optou-se em utilizar o método de intrusão por mercúrio por ser o teste padrão (Cascone et al., 2004). Contudo, apesar de observar no gráfico (FIG. 5.5) uma curva de intrusão com variação do tamanho dos poros, a detecção da porosidade total do material foi muito baixa (média de 2%), o que pode indicar que a pressão aplicada para a realização do teste pode estar deformando o material antes que a análise seja completada.

Devido à dificuldade de determinação do tamanho médio dos poros das membranas de hidrogél, pelo método padrão de intrusão por mercúrio, desenvolvemos um método alternativo utilizando cortes histológicos em criostato e contagem dos poros observados ao microscópio óptico. Por este método, pode-se

perceber que a morfologia dos poros das membranas depende da quantidade de radiação utilizada (FIG. 5.6) e que a porcentagem dos mesmos é muito superior aos resultados obtidos pelo teste de intrusão por mercúrio. Quanto maior a dose, menores são os poros (FIG. 5.7), variando de $207,51 \mu\text{m}^2$ para as menores doses a $12,48 \mu\text{m}^2$ para as doses mais altas (TAB. 5.3), explicando a menor capacidade em absorção de água como apresentado no experimento de intumescimento (FIG. 5.1 e 5.2). Estes resultados foram corrigidos pelos fatores correspondentes à diminuição das membranas após o contato com o meio de congelamento (Russ, 1986).

Para a utilização dessa membrana como substituto dérmico, além de possuir alta porosidade, o conhecimento do tamanho dos poros é um dado importante (vide item 3.3.1). Existem várias membranas que utilizam diferentes tamanhos de poros em sua composição, sempre buscando uma melhor interação destas com as células com as quais entrarão em contato e com a neovascularização. Em linhas gerais, no que se refere à porcentagem de poros nas respectivas faixas, o PVAI-MP irradiado com dose de 25 kGy é o que mais se assemelha PVAI P, porém segundo Yannas e Burke (fabricantes do Integra®), a faixa de poros interessante para um substituto dérmico é entre 70 e $100 \mu\text{m}^2$. De acordo com o histograma da porcentagem do número de poros por intervalo de tamanho (FIG. 5.7), a membrana de PVAI que possui a maior quantidade de poros nessa faixa é a composta pelo PVAI MP irradiado a 13 kGy, seguido pelo MP 15 e, apesar do MP 25 ser semelhante ao P 10, este se encontra em terceiro lugar nesta faixa de poros, além de possuir uma quantidade de poros menor que $10 \mu\text{m}^2$, muito maior que os outros, o que inviabiliza sua utilização, em conjunto com as propriedades mecânicas inadequadas (TAB. 5.2).

A TAB. 5.3 concentra as características das membranas, as quais podem ser comparadas, principalmente entre a membrana utilizada como padrão (P irradiada a 10 kGy) e a MP irradiada a 13 kGy, com características equivalentes para o intumescimento (67% e 65%, respectivamente), para o tamanho médio dos poros ($57,71 \mu\text{m}^2$ e $51,03 \mu\text{m}^2$, respectivamente), faixa de poros de 10 a $69 \mu\text{m}^2$ (38% e 39%) e somente na faixa de poros de 70 a $100 \mu\text{m}^2$ foi observada uma diferença (6% e 11%, respectivamente), sendo que a membrana MP estaria mais adequada, conforme mencionado no parágrafo anterior. Ainda observando os dados

apresentados nesta tabela, os valores correspondentes à membrana MP 15 também semelhantes aos acima apresentados (intumescimento, 63%; tamanho médio dos poros, $52,5 \mu\text{m}^2$; faixa entre 10 a $69 \mu\text{m}^2$, 44% e entre 70 a $100 \mu\text{m}^2$, 9%), com a vantagem de utilizar a dose mínima para esterilização (ISO 11.137-2: 2006).

Com intuito de obter, pelo menos, três amostras de quitosana com diferentes graus de acetilação para verificar sua influencia no crescimento dos queratinócitos e partindo do pressuposto de que a quitosana (Qs) cedida para o trabalho possuía grau de acetilação entre 40 e 50%, uma amostra da Qs foi tratada com solução de NaOH a 50%. Porém ao observar os resultados do grau de acetilação por infravermelho (TAB. 5.5) com a linha de base BL 1/BL 4 e a relação (A_{1655}/A_{3450}), pode-se concluir que mesmo com um longo tratamento da quitosana Qs (durante 1 mês), a quitosana Qs1 possuía um grau de acetilação ainda alto (44,40%), com relação à quitosana original Qs (47,66%).

Como não foram obtidos resultados satisfatórios, com o processo de desacetilação, optou-se por adquirir duas quitosanas comerciais (Qs75 e Qs85), com graus de acetilação, declarados, mais baixos do que a quitosana original (Qs), obtendo-se assim 3 amostras com graus de acetilação diferentes (item 4.1).

Para que se possa realizar a caracterização da quitosana, é importante que esta seja feita em amostras livres de impurezas, do contrário, o estabelecimento das relações entre características estruturais, propriedades e comportamento poderão ficar comprometidos. De acordo com os resultados (item 5.2.2), observou-se um baixo nível de impurezas em todas as amostras (menor ou igual a 1%), sendo que os menores valores foram da amostra da quitosana Qs e Qs1 (TAB. 5.4). Porém mesmo os valores encontrados nas amostras Qs75 e Qs85 (1,12 e 1,05%, respectivamente) são inferiores aos valores encontrados em outros trabalhos onde as porcentagens de impurezas foram de 5 a 15%, sendo nestes casos, necessária sua purificação (Signini & Campana, 2001).

Na determinação do grau de acetilação, a Ressonância Magnética Nuclear do hidrogênio é o método considerado de referência, porém por ser mais custoso e de difícil preparação da amostra, o método mais comum utilizado é o infravermelho. Nessa etapa, foi realizada a determinação do grau de acetilação por infravermelho

das amostras de quitosana utilizando diferentes relações de comprimentos de ondas com suas respectivas linhas de base (TAB. 5.5). Pode-se perceber, de acordo com os resultados apresentados nesta tabela, que o grau de acetilação pode variar dependendo da aplicação de cada linha de base e utilização de diferentes relações entre comprimento de onda, devendo-se, portanto, decidir quais os parâmetros a serem utilizados.

Devido à discrepância dos resultados obtidos e com o intuito de decidir quais os parâmetros mais adequados nas nossas condições, houve a necessidade de confirmação desses resultados utilizando o método referência RMN ^1H (TAB.5.6). Pode-se verificar que os dados obtidos pela ressonância magnética nuclear do hidrogênio, diferiram de todos os resultados obtidos pelo método de infravermelho.

O valor obtido (47,66%) para a quitosana Qs com a relação A_{1655}/A_{3450} , utilizando a linha de base BL 1/BL 4, foi mais aproximado ao resultado obtido com a RMN (39%), essa diferença pode ser devida a um possível excesso de umidade da amostra, já que a umidade pode afetar o tamanho da banda no comprimento de onda 3450 cm^{-1} . Em relação ao alto valor da quitosana Qs1, pode-se explicar pelo fato que esta relação tem pouca resolução em valores baixos de DA.

Ainda sobre a relação A_{1655}/A_{3450} , as amostras Qs75 e Qs85, que deveriam mostrar resultados muito baixos, segundo o fornecedor, apresentaram valores mais altos, o que pode indicar a presença de algum aditivo, com o objetivo de aumentar a massa molecular média, este aditivo poderia interferir na banda do comprimento de onda 1655 cm^{-1} . Nesse caso foi a relação A_{1320}/A_{1420} e linha de base BL 6/BL 9 que mais se aproximou do valor obtido pela RMN ^1H . A única relação que não se aproximou de nenhum resultado com o método referencia foi a A_{1560}/A_{2875} .

Mesmo na RMN, podemos observar que o grau de acetilação (DA) obtido para as membranas comerciais, são muito próximos entre si (28 e 21%, respectivamente para as Qs75 e Qs85), diferente dos valores declarados comercialmente, que são de 25 a 15% para a Qs75 e menor que 15% para a Qs85.

Para confirmar os dados fornecidos pelo fabricante, foi realizada uma análise para verificar a massa molecular média das amostras. Também neste caso, os dados obtidos foram diferentes dos valores do fornecedor (TAB. 5.7), talvez os

mesmos tenham sido obtidos por uma técnica diferente da usada por nosso grupo, porém este fato não pode ser confirmado, pois o fornecedor não disponibiliza essa informação. A amostra de quitosana Qs85, que de acordo com o fabricante, estaria entre 190 e 275 g/mol, foi encontrada em 435 g/mol; a amostra de quitosana Qs75 que estaria entre 190 e 375,4 g/mol foi encontrada em 821,3 g/mol e a amostra Qs que deveria possuir massa molecular média de 700 g/mol estaria em 288,0 g/mol. Pode-se perceber também que o tratamento realizado na amostra Qs, originando a amostra Qs1, diminuiu em 29,8% do peso original, demonstrando ser um tratamento que reduz drasticamente o tamanho da cadeia da molécula da quitosana, sendo esse o motivo do descarte dessa amostra.

Antes de iniciar os experimentos do cultivo de queratinócitos foi necessária a confirmação da manutenção dos filmes quando imersos em solução (TAB. 5.8). As membranas obtidas apenas pela secagem da solução de quitosana, quando imersas em água se dissolveram, sendo descartadas pela impossibilidade de utilização no cultivo dos queratinócitos. No caso da solução de quitosana Qs, quando ajustada para pH 6,3, verificou-se que esta se transformou em gel, impossibilitando sua homogeneização com o glicerol e portanto a fabricação da membrana com este tipo de protocolo.

A esterilidade das membranas, sendo um fator primordial para o cultivo de células, foi testada a partir de dois métodos, UV e álcool 70% (Apêndice B), com os resultados obtidos, foram eliminados mais cinco processos de preparação de membranas (TAB. 5.9). As membranas que foram descontaminadas com álcool 70% apresentaram contaminação, diferentemente das membranas que ficaram expostas a luz ultravioleta. Portanto as membranas descontaminadas com álcool 70% foram descartadas, ou seja, este tipo de descontaminação não se mostrou eficiente.

Após o descarte das várias preparações, as membranas reticuladas com glutaraldeído, regenerados com amônia e metanol e plastificadas com glicerol, foram descontaminadas sob luz ultravioleta e re-hidratadas com meio de cultura para os testes de interação com queratinócitos.

Os queratinócitos obtidos das biópsias dos doadores e cultivados sobre uma camada de sustentação de fibroblastos irradiados mostraram-se com tamanho

uniforme e pouco diferenciados sendo apropriados para a utilização nos experimentos com as membranas de quitosana (FIG. 5.8).

Com um dia de contato dos queratinócitos com as diferentes membranas de quitosana, não se percebeu diferença significativa, porém com pior aparência que o controle (FIG. 5.9; 5.11 e 5.15). Após 10 dias de cultura, no caso das membranas reticuladas com glutaraldeído, não se observou praticamente nenhuma célula aderida na quitosana Qs e apenas poucas células nas quitosanas Qs75 e Qs85, demonstrando problemas na manutenção da adesão (FIG. 5.9 e 5.10).

As membranas preparadas sem agente reticulante que foram imersas em solução de amônia e metanol, com o objetivo de regenerar os grupos amino livres, mostram uma melhor manutenção da adesão pelos queratinócitos (FIG. 5.11 a 5.14), em relação às membranas reticuladas com glutaraldeído. Porém, pode-se observar uma pior interação entre os queratinócitos e as membranas de quitosana Qs que apresentam grau de acetilação mais alto, em relação às membranas constituídas de quitosana Qs75 e Qs85. Esses resultados estão de acordo com os dados observados por Chatelet et al. (2001) (Item 3.4.2.6). Em relação às membranas Qs75 (DA = 28%) e Qs85 (DA = 21%), não se observou diferenças significativas na interação com os queratinócitos.

Pelo fato de nos experimentos anteriores não terem surgido diferenças significativas entre as amostras Qs75 e Qs85, optou-se por utilizar a Qs75, que possui um DA observado (28%) mais próximo do DA fornecido (25-15%). A alta interação dos queratinócitos com a membrana de quitosana e glicerol (FIG. 5.15 a 5.18), preparada de acordo com a membrana número 13 do apêndice B, demonstrou ser a melhor formulação para o objetivo proposto, sendo que depois de 20 dias de cultura, foi a única em que os queratinócitos se multiplicaram até cobrir a membrana em estudo (FIG. 5.18).

Portando, com o intuito de utilizar as características ideais do PVAI e da quitosana para a confecção de um substituto que responda ao seu objetivo de forma desejável, foi necessário a junção dos mesmos de modo a formar uma membrana composta. A junção da membrana de PVAI MP irradiada a 15 kGy com a membrana de quitosana e glicerol (membrana de número 13 do apêndice B), escolhida por

apresentar a melhor interação com os queratinócitos, se mostrou eficiente para a formação de uma membrana composta compatível com o sistema dermo-epidérmico.

Dando continuidade a este trabalho, sugerimos complementar os estudos da interação dos queratinócitos, provenientes de diferentes doadores, com a membrana composta, confirmando o tempo necessário para a formação total da porção epidérmica. Neste sentido, outro parâmetro que pode ser testado é a utilização de oligo-quitosanas para a formação do filme utilizado para interagir com os queratinócitos. Neste trabalho não foram efetuados os testes de estabilidade da membrana, necessários para sua utilização como produto comercial.

CONCLUSÃO

7. Conclusão

O PVAI MP, quando em forma de membrana, mostrou: a) possuir características biomecânicas compatíveis com sua utilização como substituto dérmico; b) ser atóxico para as células.

É importante a caracterização do PVAI sempre que houver troca de fornecedor, para determinar a dose ideal para a formação da membrana. No nosso estudo a dose mínima para a formação de membrana foi de 6 kGy e a dose ideal para a formação de membrana com as melhores características biomecânicas e de porosidade foi de 15 kGy, dose esta suficiente para esterilizar o material.

Com respeito à quitosana, todas apresentaram baixo índice de impurezas, não necessitando passar pela etapa de purificação. Pode-se perceber diferenças entre dados obtidos e os dados fornecidos pelas empresas, reafirmando a importância da caracterização dos componentes. A metodologia utilizada na tentativa de desacetilação da amostra de quitosana mostrou-se eficiente, porém com grande perda da massa molecular (30%), o que pode vir a causar problemas na sua utilização. A metodologia empregada para a determinação do grau de acetilação deve ser criteriosa, pois também verificaram-se diferenças nos valores encontrados.

A interação entre a quitosana e os queratinócitos depende do grau de acetilação, sendo que foi observado melhor interação com membranas composta de quitosana contendo grau de acetilação mais baixo. Não houve diferença visual de crescimento de queratinócitos entre as membranas Qs75 e Qs85. A membrana composta de quitosana e glicerol (membrana numero 13 do apêndice B) apresentou a melhor interação com os queratinócitos.

Aproveitando as melhores características de cada polímero, foi possível a obtenção de uma membrana composta de PVAI e quitosana, compatível com a formação *in vitro* de camada epidérmica.

APÊNDICE

Apêndice A. Carta do comitê de ética da faculdade de saúde pública de São Paulo.

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP
Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Of.COEP/ 282 / 08

Protocolo	1862
Projeto de Pesquisa	DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANA COMPOSTA DE PVAI E QUITOSANA COMPATÍVEL COM O SISTEMA Dermo-EPIDÉRMICO
Pesquisador(a)	Tiago Luiz de Almeida

24 de OUTUBRO de 2008.

Prezado(a) Orientador(a),

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo - COEP analisou, em sua 9.ª/08 Sessão ORDINÁRIA, realizada em 17/10/2008, de acordo com os requisitos da Resolução CNS/196/96 e suas complementares, o protocolo de pesquisa acima intitulado e considerou que o projeto apresentado não envolve seres humanos como sujeitos de pesquisa e, portanto não há como se manifestar quantos aos aspectos éticos inerentes a resolução supra.

Atenciosamente,

Cláudio Leone
Professor Associado
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa – FSP/COEP

Ilm.ª Sr.ª
Prof.ª Dr.ª Monica Beatriz Mathor
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES - IPEN
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Apêndice B. Processos de preparação das membranas com diferentes quitosanas

	Sol. de Quitosana (2%)	Glutaraldeído (0,125%)	Glicerol (20%)	Temperatura de secagem	Regeneração (NH ₄ OH)/MetOH)	Esterilização
1	Qs			37 °C		UV
2	Qs			20 °C		UV
3	Qs	X		37 °C		UV
4	Qs			37 °C	X	UV
5	Qs			37 °C	X	Álcool
6	Qs		X	20 °C		UV
7	Qs		X	20 °C		Álcool
8	Qs75			37 °C		UV
9	Qs75			20 °C		UV
10	Qs75	X		37 °C		UV
11	Qs75			37 °C	X	UV
12	Qs75			37 °C	X	Álcool
13	Qs75		X	20 °C		UV
14	Qs75		X	20 °C		Álcool
15	Qs85			37 °C		UV
16	Qs85			20 °C		UV
17	Qs85	X		37 °C		UV
18	Qs85			37 °C	X	UV
19	Qs85			37 °C	X	Álcool

Obs. As membranas 6, 7, 13 e 14, ficaram com concentração final de quitosana correspondente a aproximadamente 1,7%

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIBA, S. Studies on chitosan: 4. Lysozymic hydrolysis of partially N-acetylated chitosan. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.14, p. 225–228, 1992.
- ANDREW, B.; LAM, P.K.; LAU, H. Allogenic skin: transplant or dressing?. **Burns**, v. 28, p. 358-366, 2002.
- BALBINO, C.A.; PEREIRA, L.M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.
- BELAMIE, E.; DOMARD, A.; CHANZY, H.; GIRAUD-GUILLE, M.; LANGMUIR, M. Spherulitic Crystallization of Chitosan Oligomers. **Acs. Amer. Chem. Society.**, v. 12, p. 1549-1555, 1999.
- BIAGINI, G.; MUZZARELLI, R.A.A.; GIARDIONO, R.; CASTALDINI C. **Biological material for wound healing**. In: BRINE, C.J.; SANFORD, P.A.; ZIKAKIS, J.P.; editors. *Advances in chitin and chitosan*. London:Elsevier; 1992.
- BLOTNIK, S.; PEOPLES, G.E.; FREEMAN, M.R.E.; EBERLEIN, T.J.; KLAGSBRUN, M.T. lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblast differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 91, p. 2890-2894, 1994.
- BOGDANFFY, M.S.; VALENTINE, R. Differentiating between local cytotoxicity, mitogenesis, and genotoxicity in carcinogen risk assessments: the case of vinyl acetate. **Toxicol. Lett.**, v.140/141, p. 83-98, 2003.
- BOYCE, S.T. Design principles for composition and performance of culture skin substitutes. **Burns**, v. 27, p. 523-533, 2001.
- CAMPANA, S.P.F.; DE BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F.R.; CARDOSO, M.B.; BATTISTI, M.V.; SIM, P.C.; GOY, R.C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R.L. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. **Quim. Nov.**, v. 30, N. 3, p. 644-650, 2007.
- CARDOSO, C.F. **Avaliação da esterilização de filme de polietileno com peróxido de hidrogênio e radiação ultravioleta**. 2007. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

CASCONE, M.G.; LAZZERI, L.L.; SPARVOLI, E.; SCATENA, M.; SERINO, L.P.; DANTI, S. Morphological evaluation of bioartificial hydrogels as potential tissue engineering scaffolds. **J. Mater. Sci.: Mater. Med.**, v. 15, p. 1309 – 1313, 2004.

CHANDY, T.; SHARMA, C.P. Chitosan as a biomaterial. **Biomat. Art. Cells Art. Org.**, v. 18, p. 1-24, 1990.

CHATELET, C.; DAMOUR, O.; DOMARD, A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. **Biomaterials**, v. 22, p. 261-268, 2001.

CHUANG, W.Y.; YOUNG, T.H.; YAO, C.H.; CHIU, W.Y. Properties of the poly(vinyl alcohol)/chitosan blend and its effect on the culture of fibroblast in vitro. **Biomaterials**, v. 20, p. 1479-1487, 1999.

CHUPA, J.M.; FOSTER, A.M.; SUMNER, S.R.; MADIHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Vascular cell responses to polysaccharide materials: in vitro and in vivo evaluations. **Biomaterials**, v. 21, p. 2315-2322, 2000.

CORY, A. H.; OWEN, T.C.; BARLTROP, J. A.; Cory J.G. "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer. Comm.** v. 3, p. 207-212, 1991.

DAGALAKIS, N.; FLINK, J.; STASIKELIS, P.; BURKE, J.F. YANNAS, I.V. Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure. **J. Biomed. Mat. Res.** V. 14, p. 511-528, 1980.

DE MERLIS, C.C.; SCHONEKER, D.R. Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA). **Food Chem. Toxicol.**, v. 41, p. 319–326, 2003.

DEAN, J.R.; DIXON, B.G. Bioabsorbents for wastewater treatment. In: BRINE, C.J.; SANDFORD, P.A.; ZIKAKIS, J.P.; editors. **Advances in chitin and chitosan**. UK: Elsevier Applied Science, p. 648-656, 1992.

DI GIOIA, L.; GUILBERT, S. Amphipilic plasticizers. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 1254-1261, 1999.

DOMARD, A; VARUM, K.M.; ROBERTS, G.A.F. **Advances in chitin science**, vol. II. France: Jacques Andre H press, 1998.

DOS SANTOS, A.A.M.; VEROTTI, M.P.; SANMARTIN, J.A.; MESIANO, E.R.A.B. Importância do álcool no controle de infecções em serviços de saúde. **R.A.S.**, v. 4, n. 16, p. 7-14, 2002.

DRURY, J.L.; MOONEY, D.J. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. **Biomaterials**, v. 24, p. 4337–4351, 2003.

DUARTE, M. L.; FERREIRA, M. C.; MARVÃO, M. R.; ROCHA, J. An optimized method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy. **Int. J. of Biol. Macromol.**, v. 31, p. 1–8, 2002.

FRANCO, D.; DA SILVA, C.S. Enxertos, retalhos e implantes. In: Franco T. **Princípios de cirurgia plástica**. São Paulo: Ateneu. p.87-106, 2002.

GEESON, J.C.; BERG, R.A. Biochemistry of skin, bone and cartilage. In: GLASGOLD, A.I. e SILVER, F.H. **Applications of biomaterials in facial plastic surgery**. CRC Press, Boca Raton, FL, 1991.

GRIFFITH, L.G. Emerging design principles in biomaterials and scaffolds for tissue engineering, **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 961, p. 83–95, 2002.

HAJDU, J.; FRIEDRICH, P. Reaction of glutaraldehyde with NH₂ compounds: A spectrophotometric method for the determination of glutaraldehyde concentration. **Anal. Biochem.**, p. 273-280, 1975.

HIRANO, S. Chitin and chitosan as novel biotechnological materials. **Polym. Int.**, v. 48, p. 732-734, 1999.

HIRANO, S. Chitin biotechnology applications. **Biotechnol. Annu. Ver.**, v. 2, p. 237-258, 1996.

HOEKSTRA A, STRUSZCZYK H, KIVEKAS O. Percutaneous microcrys-talline chitosan application for sealing arterial puncture sites. **Biomaterials**, v. 19, 1467-1471, 1998.

HOFFMAN, A.S. Hydrogels for biomedical applications. **Advan. Drug Deliv. Rev.** v. 43, p. 3–12, 2002.

HONGIGER, H.; BALLADUR, P.; MARIANI, P.; CALMUS, Y.; VAUBOURDOLLE, M.; DELELO, R.; CAPEAU, J.; B. NORDLINGER, B. Permeability and biocompatibility of a new hydrogel used for encapsulation of hepatocytes, **Biomaterials**, v. 16, p 753-757, 1995.

HOWLING, 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**, v. 22, p. 2959-2966, 2001.

HYON, S.H.; CHA, W.I.; IKADA, Y.; KITA, M.; OGURA, Y.; HONDA, Y. Poly(vinyl alcohol) hydrogels as soft contact lens material. **J. Biomater. Sci. Polymer. Edn.**, v. 5, p. 397–406, 1994.

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES. RODAS, A. C. D., MATHOR, M. B., LUGÃO, A. B. **Membrana de hidrogel e processo de preparação da dita membrana**. BR Pat. n.PI0404696-0, 12 Jul. 2004.

ISHIHARA, M.; NAKANISHI, K.; ONO, K.; Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process. **Biomaterials**, v. 23, p. 833-839, 2002.

ISO 10993-5: 1992. International Organization For Standardization, Biological testing of medical and dental materials devices – part 5 Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Switzerland.

ISO 11.137-2: 2006. Sterilization of health care products – Radiation – Part 2: Establishing the sterilization dose. Disponível em: <<http://www.iso.org>>. Acesso em 09 de janeiro de 2008.

IZUME, M.; NAGAE, S.; KAWAGISHI, H.; MITZUTOMI, M.; OHTAKARA, A. Action pattern of Bacillus sp. no. 7-M chitosanase on partially N-acetylated chitosan. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, p. 448-453, 1992.

JANIK, I.; PAJEWSKI, L. <http://www.mitr.p.lodz.pl./biomat>. Acesso em 06 Fev. 2008.

JONES, I.; CURRIE, L.; MARTIN, R. A guide to biological skin substitutes. **Br. J. of Plast. Surg.**, v. 55, p. 185-193, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Biologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2005.

JUVENAL, A.E.; BATISTA, A.P.; GOMES, M.A.M. **Dermatologia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 1992.

KASAAI, M.R. A review of several reported procedures to determine the degree of N-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. **Carbohydr. Polym.**, v. 71, p. 497–508, 2008.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. **Biomaterials**, v. 24, p. 2339–2349, 2003.

KNORR, D. Recovery and utilization of chitin and chitosan in food processing waste management **Food Technol.**, p. 114-120, 1991.

KOBELKE, D.N. By-products from crustacean wastes- chitin production. **Food Aust.**, v. 42, p.18-19, 1990.

KOIDE, S.S. chitin-chitosan: properties, benefits and risks. **Nutr. Res.**, v. 18, p. 1091, 1998.

KUDELA, V. HYDROGELS. In: MARK, H.F.; KROSCWITZ, J.I. **Encyclopedia of polymer science and engineering**. Wiley, New York, v. 7, p. 783-805, 1989.

KURITA, K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. **Mar. Biotech.**, v. 8, p. 203–226, 2006.

LAVERTU, M.; Xia, Z.; SERREQUI, A.N.; BERRADA, M.; RODRIGUES, A.; WANG, D.; BUSCHMANN, M.D.; GUPTA, A. A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **J. Pharmal. Biomed. Anal.**, v. 32, p. 1149-1158, 2003.

LEE, CT.; KUNG, PH.; LEE, YD. Preparation of poly(vinyl alcohol)-chondroitin sulfate hydrogel as matrices in tissue engineering. **Carbohydr. Polym.**, v. 61, p. 348-354, 2005.

LEE, KY.; MOONEY, DJ. Hydrogels for tissue engineering. **Chem. Rev.**, v. 101, p. 1869–1880, 2001.

LI, J.; ZHONG, Y.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Chitosan conduit for peripheral nerve regeneration. **Tsing. Sci. Technol – Dig. Periol.** v.4, n.3, p.1515-1518, 1999.

LUGÃO, A.B.; MALMONGE, S.M. Use of radiation in the production of hydrogels. **Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. B.**, v. 185, p. 37-42, 2001.

MA, J.; WANG, H.; HE, B.; CHEN, J. 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**, v. 22, p. 331-336, 2001.

MADHALLY, S.V.; MATTHEW, H.W.T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, p. 1133-1142, 1999.

MAJETI, N.V.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosan, **React. and Func. Polym.**, v. 46, p. 1-27, 2000.

MANDELBAUM, S.H. Di SANTIS, E.P. MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. **Na. Bras. Dermatol.**, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

MARTEN, F.L. Vinyl alcohol polymers. In. Mark, Bikales, Overberger, Menges. **Encyclopedia of polymers science and engineering**, New York, NY: Wiley – Interscience, v.17, p. 167-198, 1989.

MARTENS, P. ANSETH A.K. Characterization of hydrogel formed from acylate modified poly (vinyl alcohol). **Macrom. Polym.**, v. 41, p. 7715-7722, 2000.

MCGAHREN, W.J.; PERKINSON, G.A.; GROWICH, J.A.; LEESE, R.A.; ELLESTAD, G.A. Chitosan by fermentation. **Process. Biochem.**, v. 19, p. 88-90, 1984.

METCALFE, A.D., FERGUSON, M.W.J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. **J. R. Soc. Interface**, v. 4, p. 413-437, 2007.

MONTEIRO, O.A.C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 26, p. 119-128, 1999.

MUZZARELLI, R. A. A. **Natural Chelating Polymers: Alginic Acid, Chitin and Chitosan.**, Pergamon, New York, 1973.

MUZZARELLI, R.A.A. Biochemical significance of exogenous chitins and chitosans in animals and patients. **Carbohydr. Polym.**, v. 20, p. 7-16, 1993.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitin and the human body. In: First International Conference of the European Chitin Society. **Advances in Chitin Science Brest.** p. 448-461, 1995.

MUZZARELLI, R.A.A.; BELMONTE, M.M.; TIETZ, C.; BIAGINI, R.; FERIOLI, G.; BRUNELLI, M.A.; FINI, M.; GIARDINO, R.; ILARI, P.; BIAGINI, G. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan. **Biomaterials**, v. 15, p. 1075-1081, 1994.

NEREM, R.M. Tissue Engineering: The Hope, the Hype, and the Future. **Tissue Eng.** v. 12, n. 5, 2006.

NUTTELMAN, C.R.; MORTISEN, D.J. HENRY, S.M.; ANSETH, K.S. Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration. **J. Biomed. Mater. Res.**, v. 57, p. 217–223, 2001.

PANGBURN, S.H.; TRESCONY, P.V.; HELLER, J. Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. **Biomaterials**, v. 3, p. 105-108, 1982.

PATIL, S.; LI, Z.; CHAN, C. Cellular to tissue informatics: approaches to optimizing cellular function of engineered tissue. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, v. 102, p. 139-144, 2006.

PELUSO, G.; PETILLO, O.; RANIERI, M.; SANTIN, M.; AMBROSIO, L.; CALABRO, H.D.; AVALLONE, B.; BALSAMO, G. Chitosan-mediated stimulation of macrophage function. **Biomaterials**, v. 15, p. 1215-1220, 1994.

PEPPAS, N.A. **Hydrogels of poly(vinil alcohol) and its copolymers**. In: PEPPAS, N.A. Hydrogels in medicine and pharmacy. Boca Raton, florida: CRC,. Volume II: polymers, p. 1-48. 40, 1987

PETER, M.G. Applications and Environmental Aspects of Chitin and Chitosan. **Pure Appl. Chem.**, v. 4, p. 629-640, 1995.

PREVOST, K., COUTURE, G., SHIPLEY, B., BRZEZINSKI, BEAULIEU, R.C. Effect of chitosan and a biocontrol streptomycete on field and potato tuber bacterial communities. **BioControl**, v. 51, p. 533–546, 2006.

RABEA, E.I.; MOHAMED, E.T.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. **Biomacromol.**, v. 4, n. 6, p. 365-370, 2003.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterial Science**. In: RATNER, B.D. Biological Testing of Biomaterials. Academic press, 355-396, 2004.

REN, D.; YI, H.; WANG, W.; MA, X. The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. **Carbohydr. Res.**, v. 340, p. 2403–2410, 2005.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progr. Polymer. Sci.**, v. 31, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, M.; DOMARD, A. **Chitin and chitosan**, Elsevier, New York, p 71-86, 1989.

RIVRON, N.C.; LIU, J., ROUWKEMA, J.; BOER, J.; BLITTERSWIJK, C.A. Engineering vascularised tissues in vitro. **Eur. Cell. Mater.**, v. 15, p. 27-40, 2008.

ROBERTS, G.A.F. **Chitin chemistry**. Hong Kong: the macmillian, 1992.

RODAS, A.C.D. **Desenvolvimento de membranas como compostos dermo-epidérmicos**. 2004. Tese (Doutorado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo.

ROLLER S, COVILL N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 47, p. 67-77, 1999.

ROSIK, J.M.; ULANSKI, P. Synthesis of hydrogels by irradiation of polymers in aqueous solution. **Radiat. Phys. Chem.**, v. 55, p. 139-151, 1999.

ROSSI, L.A.; FERREIRA, E.; COSTA, E.C.F.B.; BERGAMASCO, E.C.; CAMARGO, C. Prevenção de queimaduras: percepção de pacientes e de seus familiares. **Rev. Latin. Am. Enfermagem**, v. 11, n.1, p. 36-42, 2003.

RUSS, J.C. **Practical stereology**, Plenum Press, New York NY ,1986.

SHAI, S.; MAIBACH, H. I. **Wound Healing and Ulcers of the Skin**. Springer Berlin, Heidelberg, New York, p. 1-16, 2005.

SIGNINI, R.; CAMPANA, S.F. Characteristics and properties of purified chitosan in the neutral, acetate and hydrochloride forms. **Polymer.**, v. 11, n. 2, p. 58-64, 2001.

STEPHEN T. **Semipermeable film dressing**. In: Wound management and dressings. London: The Pharmaceutical Press, p. 25-34, 1990.

SUPP, D.M.; BOYCE, S.T. Engineered skin substitutes: practices and potentials. **Clinic. in Dermatol.**, v. 23, p. 403–412, 2005.

SUZUKI, T.; MIZUSHIMA, Y. Characteristics of silica-chitosan complex membrane and their relationships to the characteristics of growth and adhesiveness of L-929 cells cultured on the biomembrane. **J. Fermen. and Bioengi.**, v. 84, n. 2, p. 128-132, 1997.

UENO, H.; YAMADA, H.; TANAKA, I. Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wounding dogs. **Biomaterials**, v. 20, p. 1407-1412, 1999.

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, p. 575-582, 1994.

VALE, E.C.S. Initial management of burns: approach by dermatologists. **An. Bras. Dermatol.**, v. 80, p. 9-19, 2005.

WANG, W.; BO, S.; LI, S.; QIN, W. Determination of the Mark-Houwink equaton for chitosans with different degrees of deacetylation. **Int. J. Biol. Macromol.**, v, 13, p. 281-285, 1991.

WILCOX, C.D.; DOVE, S.B.; MCDAVID, W.D.; GREER, D.B. <http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>. Acesso em 10 Out. 2008.

YAMADA, A.; SHIBBUYA, N.; KOMADA, O.; AKATSUKA, T. Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by N-acetylchitooligosaccharides, **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 57, p. 405–409, 1993.

YANNAS, Y.; BURKE, J.F. Design of an artificial skin. I. Basic design principles. **J. Biomat. Res.**, v. 14, p. 65-81, 1980.

ZAINOL, I.; HALIM, A.S.; GHANI, S.M.; DERAMAN, M.A.; SALIMAN, M.R.; MOHAMED, M.S.W.; YAHYA, M.F. Preparation and characterization of bilayer chitosan membrane as skin regenerating template. **Malaysian Journal of Microscopy**. Malaysian. no prelo.