

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**FILMES RETICULADOS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO COMO
BIOMATERIAL**

THIAGO BIZERRA FIDÉLES

CAMPINA GRANDE
ABRIL/2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
ENGENHARIA DE MATERIAIS**

**FILMES RETICULADOS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO COMO
BIOMATERIAL**

THIAGO BIZERRA FIDÉLES

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e Engenharia
de Materiais como requisito parcial à
obtenção do título de MESTRE EM
CIÊNCIA E ENGENHARIA DE
MATERIAIS

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

Co-orientadora: Prof^a.Dr^a HELENA MARIA PIRES GASPAR TOMÁS

Agência Financiadora: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
Superior - CAPES

CAMPINA GRANDE

ABRIL/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

F451f
2010

Fidéles, Thiago Bizerra.

Filmes reticulados de quitosana para aplicação com biomaterial /Thiago Bizerra Fidéles. — Campina Grande, 2010.

72 f.: il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinicius Lia Fook.

Referências.

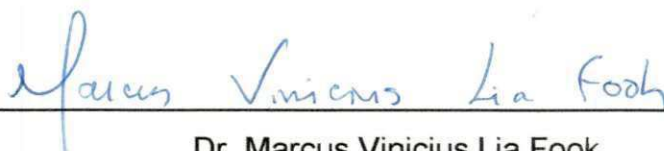
1. Polissacarídeos - Biomaterial. 2. Quitosana - Filmes. 3. Reticulação
Iônica. 4. I. Título.

CDU 577.114.4 (043)

**FILMES RETICULADOS DE QUITOSANA PARA APLICAÇÃO COMO
BIOMATERIAL**

Thiago Bizerra Fidéles

Dissertação Aprovada em 13/04/2010 pela banca examinadora constituída dos
seguintes membros:



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador

UAEMa – UFCG



Dr.ª. Maria Roberta de Oliveira Pinto

Examinadora Externa

CCT/UEPB



Dr. Andrés Vercik

Examinador Externo

USP

Unidade de Investigação/ Research

Unit: FCT - 674

Centro de Química da Madeira
Universidade da Madeira

Membros doutorados/PhD

members:

José Carlos Marques
Paula Castilho
Helena Tomás
João Rodrigues (Head of CQM)
José Mesquita
Pedro Pires
Helena Caldeira
José Câmara
Miguel Fernandes
Yulin Li (Ciência 2008)
César Fernandes
Maria do Céu Costa
Visvaldas Kairys
Viney Lather
Deepti Pandita
Luís Santos
Alireza Nouri
Jorge Pereira

Advisory board:

Martinho Simões (Head of ITQB, Pt)
Maria Bellantone (Springer Ed., UK)
Xiangyang Shi (Donghua University, Shanghai, China)

Áreas de investigação/ Research areas:

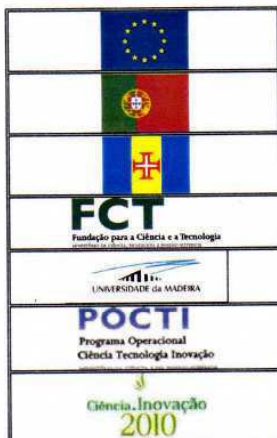
Produtos Naturais

Química Alimentar
Fitonutracêuticos

Materiais

Materiais Moleculares
Nanoquímica

Apoio/Financial support:



Declaração

Para os devidos efeitos, declara-se que Thiago Bizerra Fideles (aluno do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, matrícula 0108016810-9, Universidade Federal de Campina Grande) realizou, no Centro de Química da Madeira, um estágio, sob orientação da Prof. Doutora Helena Tomás, no período de 05/10/2009 a 05/03/2010, por forma a avaliar a citocompatibilidade das membranas à base de quitosano, que são objecto do seu trabalho de mestrado.

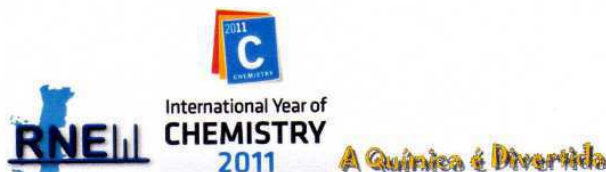
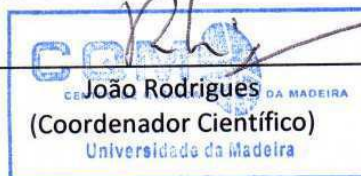
Funchal e Universidade da Madeira, 10 de Março de 2010.

Helena Tomás

(Investigador Senior e Supervisor do Aluno de Pós-Graduação no CQM)

Funchal e Universidade da Madeira, 10 de Março de 2010.

Visto do Coordenador Científico do CQM



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Maria Danilda** e **José Fidéles**, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos de minha vida, me fazendo acreditar que a família é a base de tudo.

À minha namorada, Glória Tamiris, pelo incondicional, compreensão, amizade e apoio em todos os momentos

Thiago Bizerra Fidéles

Nascimento	14 de Março de 1985
Naturalidade	Campina Grande, PB.
Filiação	José Fidéles Filho Maria Danilda Bizerra
2003 - 2007	Graduação em Química Industrial pela Universidade Estadual da Paraíba – UEPB
2008- 2010	Curso de pós-graduação, nível de Mestrado, em Ciência e Engenharia de Materiais pela Universidade Federal de Campina Grande – UFCG.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sempre estar presente em minha vida e de minha família, me cobrindo de bênçãos, pelas forças que me foram dadas para superar os desafios.

Ao Professor Dr. **Marcus Vinicius Lia Fook**, pela orientação dada em todas as fases de execução do trabalho, pela confiança a mim dirigida, por todas as oportunidades dadas, e principalmente, por ter acreditado sempre em mim, em todos os momentos. Agradeço por sua honestidade, sinceridade. Agradeço pelo carinho e confiança depositada.

À Professora Dr^a. Helena Maria Pires Gaspar Tomás, pela co-orientação dada, pela contribuição científica e ajuda nos ensaios realizados.

Ao Centro de Química da Madeira e o Grupo de Pesquisa de Materiais Moleculares (Molecular Materials Research Group), na pessoa do professor Dr. João Rodrigues, pela oportunidade a mim conferida de estágio durante cinco meses na Ilha da Madeira/Portugal, que contribui significativamente para avanços científicos do trabalho.

Ao Instituto de Engenharia Biomédica – INEB, do Porto/Portugal, por ter cedido gentilmente as linhas celulares utilizadas para a realização do trabalho.

Aos queridos amigos **Ana Carolina, Rossemberg Cardoso, Lucina Rocha, Vegner Hizau, Anahí Aparecida, Rayssa Carvalho, Daniel Bezerra, Alireza Nouri e Carina Freitas**, pelo companheirismo, ajuda e imprescindível contribuição, de cada um, em todas as fases do trabalho.

Aos colegas do Grupo de Biomateriais, Vieira, Waldênia, Eva, Rosemary Cunha Lima, Rosemary e João Ponciano, Giovanni, Anna Sylvia por todos esses anos de convivência, conquistas e desafios enfrentados.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Cultura Celular, Alireza Nouri, Neide Freitas, Yulin Li e Deepti Pandita, pelos bons momentos vividos durante minha estada. Em especial a José Luis Santos por toda contribuição, idéias e ensinamentos passados.

A todos os **Docentes** do curso de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande.

À coordenação da Pós-Graduação, na pessoa da Professora Dr^a Suédina Maria de Lima Silva.

A todos os funcionários da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais.

À Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Entre os polímeros biodegradáveis, a quitosana tem sido o foco de extensivas pesquisas recentemente. A quitosana é um polissacarídeo linear composto por ligações do tipo $\beta(1-4)$ D-glucosamina (unidade dacetilada) e N-acetil-D-glucosamina (unidade acetilada), que são distribuídos de forma aleatória. Modificações químicas da quitosana através de reações de reticulações podem produzir materiais com uma grande variedade de propriedades físicas, mecânicas e biológicas. O objetivo do presente trabalho foi obter e caracterizar filmes de quitosana reticulados ionicamente, para aplicação como biomaterial. Os filmes de quitosana foram preparados pelo método de evaporação do solvente e as reticulações foram introduzidas através de reações com ácido sulfúrico. Os filmes reticulados e não reticulados foram caracterizados por Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raios X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDX) e Medidas de Ângulo de Contato. Os testes de citotoxicidade foram efetuados utilizando a linha celular NIH 3T3 em cultura, para avaliar o potencial citotóxico, através da avaliação da atividade metabólica (através do método de redução da resazurina) das células através de diversas diluições dos extratos dos filmes. A adesão celular dos filmes reticulados e não reticulados de quitosana foram efetuados utilizando as linhas celulares NIH 3T3 HFF 1. De acordo com os resultados de FTIR, ocorreu uma efetiva reação entre os íons sulfatos e os filmes de quitosana, com mudanças visíveis no espectro. Uma diminuição no perfil cristalino dos filmes de quitosana, característicos dos materiais reticulados, pôde ser observada pelas análises de DRX. Nenhuma alteração morfológica foi detectada nos filmes reticulados após a visualização por MEV. As medidas de ângulo de contato mostraram um aumento no caráter hidrofílico das amostras comparado com filmes de quitosana puros. Os ensaios biológicos revelaram que os filmes são promissores para aplicações biomédicas.

Palavras chaves: Polissacarídeo, biomaterial, quitosana - filme, reticulação iônica.

ABSTRACT

Among biodegradable polymers, chitosan has been the focus of an extensive research in the recent years. Chitosan is a linear polysaccharide composed of randomly distributed β -(1-4)-linked D-glucosamine (deacetylated unit) and N-acetyl-D-glucosamine (acetylated unit). Chemical modifications of chitosan through crosslinking can produce materials with a wide variety of physical, mechanical and biological properties. The aim of the present work was to obtain and characterize ionic crosslinked chitosan films for biomedical applications such as for wound healing. The chitosan films were prepared by the solvent evaporation technique and crosslinking was introduced by reaction with sulfuric acid. Five different crosslinked films were obtained by using different reaction times. The crosslinked films were characterized by Fourier Transformed Infrared Spectroscopy (FTIR), X-Ray Diffraction (XRD), Scanning Electron Microscopy (SEM), Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy and Contact Angle (CA) measurements. Cytotoxicity tests were carried out using NIH 3T3 cells in culture to evaluate the cytotoxicity potential of ionic crosslinked chitosan films, by evaluating the metabolic activity (through the resazurin reduction assay) of cells subjected to several dilutions of extracts of the films. Cell adhesion studies were performed by direct cell culture over the films surface. Using NIH 3T3 and HFF 1 cell lines. According to FTIR results, an effective reaction between the sulfate ions and chitosan films was achieved with visible changes in the spectra. A decrease in the crystalline profile of chitosan films, characteristic of crosslinked materials, could be seen by XRD analysis. Any morphological changes were detected in the crosslinked films after SEM visualization of the samples. The contact angle measurements showed an increase in the hydrophilicity of the samples compared with pure chitosan films. The biological assays revealed that the films were promising for biomedical applications.

Keywords: Polysaccharide, biomaterial, chitosan - films, ionic crosslinking.

PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. LIMA, R.S.C., FOOK, M. V. L., FIDÉLES, T. B., FOOK, A. C. B. M., OLIVEIRA, S. V., BARBOSA, W. P. F. Characterization of the Snail's Carapace Collected at Coast of Brazilian's State of Paraíba. *Key Engineering Materials.* , v.396, p.141 - 144, 2009.
2. FOOK, A. C. B. M., APARECIDA, A. H., FIDÉLES, T. B., COSTA, R. C., FOOK, M. V. L. Porous Hydroxyapatite scaffolds by polymers sponge method. *Key Engineering Materials.* , v.396, p.703 - 706, 2009.
3. SILVA, J. N., MONTEIRO, G. S., FIDÉLES, T. B., FRANÇA, K. B. APLICAÇÃO DE SOFTWARE INTERATIVO PARA CÁLCULOS DAS PROPRIEDADES DE SISTEMAS QUÍMICOS BINÁRIOS NO EQUILÍBRIO LÍQUIDO/VAPOR – TPX – ELV 1.0. *Enciclopédia Biosfera.* , v.6, p.1 - 4, 2008.
4. FOOK, A. C. B. M., AZEVEDO, V. V. C., BARBOSA, W. P. F., FIDÉLES, T. B., FOOK, M. V. L. Materiais Odontológicos: Cimentos de ionômero de vidro. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos.* , v.3, p.40 - 45, 2008.

ARTIGOS ACEITOS PARA PUBLICAÇÃO

1. FOOK, A. C. B. M., APARECIDA, A. H., FIDÉLES, T. B., COSTA, R. C., FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de Biocerâmicas Porosas para Regeneração Óssea. *Matéria (UFRJ).* , 2008.

TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTOS (RESUMO)

1. FURTADO, G. T. F., FOOK, A. C. B. M., FIDÉLES, T. B., Sousa, L.R., FOOK, M. V. L. Influência da Temperatura de Calcinação na Substituição dos Íons Carbonatos nos Sítios de Fosfato para Obtenção de Apatitas In: Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2009, Guarujá. 2009.
2. FIDÉLES, T. B., FOOK, M. V. L., COSTA, R. C., ARAUJO, A. L., FARIAS, J. M. S., LIMA, M. G., AMORIM, F. A. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE QUITINA E QUITOSANA COMERCIAL In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto, 2008.
3. FOOK, A. C. B. M., BEZERRA, D. C., OLIVEIRA, S. V., COSTA, R. C., FIDÉLES, T. B., APARECIDA, A. H., FOOK, M. V. L. DESENVOLVIMENTO DE BIOCERÂMICAS POROSAS DE FOSFATO DE CÁLCIO In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto, 2008.

4. SOUSA, G. T., FOOK, M. V. L., COSTA, R. C., FIDÉLES, T. B., ALMEIDA, T. F. S., FURTADO, G. T. F., NASCIMENTO, I. S. IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CONDIÇÕES DE USO E ARMAZENAMENTO DOS BIOMATERIAIS NO HUAC In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto, 2008. p.124 - 124

5. OLIVEIRA, F. V., FOOK, M. V. L., BARBOSA, R. C., CASTANHA, E. M., SOUSA, G. T., FIDÉLES, T. B., COSTA, R. C. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO ANATOMO-FUNCIONAL DA ARTICULAÇÃO DO JOELHO PARA SUBSTITUIÇÃO COM BIOMATERIAIS In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto, 2008.

6. OLIVEIRA, F. V., FOOK, M. V. L., BARBOSA, R. C., CASTANHA, E. M., SOUSA, G. T., FIDÉLES, T. B., COSTA, R. C. IMPORTÂNCIA DO ESTUDO ANATOMO-FUNCIONAL DA ARTICULAÇÃO COXOFEMORAL PARA SUBSTITUIÇÃO COM BIOMATERIAIS In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto, 2008.

7. SOUSA, G. T., FOOK, M. V. L., COSTA, R. C., FIDÉLES, T. B., CASTANHA, E. M., OLIVEIRA, F. V. INCIDÊNCIA DE PROCESSOS INFLAMATÓRIOS EM MULHERES QUE USAM UM BIOMATERIAL COM GRAU DE RISCO 2 NO MUNICÍPIO DE CAMPINA GRANDE PB In: 5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 2008, Ouro Preto, 2008.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

1. FIDÉLES, T. B., SANTOS, J. L., TOMÁS, H., FOOK, M. V. L. **NEW IONIC CROSSLINKED CHITOSAN FILMS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**, 2010. (Outra, Apresentação de Trabalho)

2. FIDÉLES, T. B. **BIOMATERIAIS E SUAS APLICAÇÕES**, 2009. (Seminário, Apresentação de Trabalho)

3. BARBOSA, W. P. F., OLIVEIRA, S. V., Lima, R.S.C., FIDÉLES, T. B., FOOK, M. V. L. **M ESTUDO PRELIMINAR DE MATERIAIS CERÂMICOS DO SEMI-ÁRIDO NORDESTINO PARA APLICAÇÃO ODONTOLÓGICA**, 2009. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

4. FIDÉLES, T. B., FOOK, M. V. L., COSTA, R. C., ARAUJO, A. L., FARIAS, J. M. S., LIMA, M. G., AMORIM, F. A. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE QUITINA E QUITOSANA COMERCIAL**, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

5. Lima, R.S.C., FOOK, M. V. L., FIDÉLES, T. B., OLIVEIRA, S. V., BARBOSA, W. P. F. **Characterization of the Snail's Carapace Collected at Coast of Brazilian's State of Paraíba**, 2008. (Simpósio, Apresentação de Trabalho)

6. COSTA, R. C., CIRNE, A.L.C., MELO, E. P., FOOK, M. V. L., FIDÉLES, T. B. **IMPLEMENTAÇÃO DE METODOLOGIA PARA CONDIÇÕES DE USO E ARMAZENAMENTO DOS BIOMATERIAIS NO HUAC**, 2008. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

1. Apresentação Oral no **5th Materials Group Meeting/CQM**, 2010. (Encontro) **NEW IONIC CROSSLINKED CHITOSAN FILMS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS**.

2. Apresentação de Poster / Painel no **5º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, 2008. (Congresso), Caracterização Química de Quitina e Quitosana Comercial.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Variáveis do material que influenciam na biocompatibilidade	10
Tabela 2. Valores dos índices de cristalinidade da quitosana nas formas bruta, neutra e acetilada.	30
Tabela 3. Principais propriedades da quitosana e aplicações biomédicas	32
Tabela 4. Relação entre propriedades biológicas e características físico-químicas da quitina e quitosana	33

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. (a) Monômero e (b) cadeia polimérica de polietileno.	15
Figura 2. (a) reticulação intermolecular (b) reticulação intramolecular.	17
Figura 3. Estrutura química do monômero da quitina.	26
Figura 4. Representação das pontes de hidrogênio (a) α -quitina e (b) β -quitina.	27
Figura 5. Estrutura cristalina para (a) α -quitina e (b) β -quitina.	28
Figura 6. Estrutura química da quitosana.	29
Figura 7. Diferenças estruturais entre (a) celulose; (b) quitina e (c) quitosana.	31
Figura 8. Diversas formas de aplicação da quitosana.	32
Figura 9. Representação da despolimerização da quitosana.	37
Figura 10. Preparação de filmes de quitosana	40
Figura 11. Processo de reticulação dos filmes de quitosana	40
Figura 12. Aparelho de tensão superficial	44
Figura 13. Espectro de infravermelho do filme de quitosana pura	47
Figura 14. Espectro de infravermelho dos filmes de quitosana reticuladas	48
Figura 15. Difratoograma do filme de quitosana pura	49
Figura 16. Difratoograma de filmes de quitosana puro e reticulados	50
Figura 17. Estrutura do filme de quitosana reticulado	50
Figura 18. MEV e EDX dos filmes puros de quitosana: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X	51
Figura 19. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 5 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X	52
Figura 20. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 15 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X	53
Figura 21. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 30 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X	53
Figura 22. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 60 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X	53
Figura 23. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 60 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X	54

minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X

Figura 24. Medidas de ângulo de contato para os filmes de quitosana puro e reticulado 55

Figura 25. Reação de oxiredução da resazurina via metabolismo celular 56

Figura 26. Atividade metabólica celular em contato com os extratos de filmes de quitosana 57

Figura 27. Resultados dos ensaios de adesão celular: (a) 1 hora, (b) 4 horas, (c) 24 horas e (d) 48 horas 58

Figura 28. Resultados dos ensaios de adesão celular: (a) 4 horas, (b) 8 horas, e (c) 24 horas 60

SIMOLOS E ABREVIATURAS

CQM	Centro de Química da Madeira	%	Por cento
DMEM	Dulbecco's Modified Essential Medium	°C	Graus Celcius
Cm	Centímetro	α	Alfa
LBCC	Laboratório de Bioquímica e Cultura Celular	β	Beta
Mol/L	Mol por Litro	θ	Teta
mL	Mililitros	γ	Gama
P.A.	Pureza Analítica	>	Maior
PBS	Phosphate Buffer Saline	μ L	microlitros
Pen/Strep	Penicilina/Estreptomicina	nm	nanometros
UAEMa	Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais	CO ₂	Dióxido de Carbono
UFCG	Universidade Federal de Campina Grande	Cu	Cobre
UMa	Universidade da Madeira	v/v	Volume/volume
		m/v	Massa/volume

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS	iv
SUMÁRIO	v
ÍNDICE DE TABELAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	viii
1 INTRODUÇÃO	1
2 JUSTIFICATIVA	3
3 OBJETIVOS	5
3.1 Geral	5
3.2 Específicos	5
4 REVISÃO DA LITERATURA.	6
4.1 Engenharia de Tecidos	6
4.2 Biomateriais	7
4.2.1 Classificação dos Biomateriais	13
4.2.2 Biomateriais Poliméricos	14
4.2.3 Classificação dos polímeros	17
4.3 Polímeros Biodegradáveis	19
4.3.1 Quitina e Quitosana	23
4.3.2 Identificação	25
4.3.3 Estrutura Química	26
4.3.4 Quitosana como biomaterial	32
4.3.5 Modificação da Quitosana	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Local da Pesquisa	39
5.2 Materiais e Reagentes	39
5.3 Procedimento Experimental	39
5.3.1 Obtenção dos Filmes	39
5.3.2 Reação de Reticulação dos Filmes	40
5.3.3 Avaliação da Citotoxicidade	40
5.3.4 Avaliação da Adesão Celular	41
5.4 Métodos	43
5.4.1 Difração de Raios X (DRX)	42

5.4.2 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	44
5.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	44
5.4.4 Espectrometria por Energia Dispersiva de raios X (EDX)	44
5.4.5 Tensão Superficial (TS)	44
5.4.6 Ensaio de Citotoxicidade	45
5.4.7 Adesão Celular	45
5.4.8 Análise Estatística	46
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
6.1 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)	47
6.2 Difração de Raios X (DRX)	49
6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectrometria de Energia Dispersiva de raios (EDX)	51
6.4 Tensão Superficial (TS)	54
6.5 Testes Biológicos	55
6.5.1 Ensaio de Citotoxicidade	56
6.5.2 Adesão Celular	57
6.5.2.1 <i>Linha celular NIH 3T3</i>	57
6.5.2.2 <i>Linha celular HFF 1</i>	59
7 CONCLUSÃO	62
8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	64
9 REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A incessante busca por um aumento na qualidade de vida da população mundial, com esforços aplicados no desenvolvimento de novas drogas, políticas de saneamento básico, prevenção de doenças sistêmicas entre outras, tem motivado o estudo de novos materiais com o propósito de promover uma melhor interação com organismos vivos. Essa busca tem gerado um significativo aumento na expectativa de vida da população mundial, onde em países considerados desenvolvidos, essa faixa tem alcançando à casa dos oitenta anos (HENCH, 1998; NICHOLSON, 2002; APARECIDA, 2005; FOOK, 2005; FOOK, 2008).

Entretanto, apesar de o aumento da expectativa de vida da população ser considerado um ponto positivo, algumas conseqüências que se originam por esse crescimento não são evitados. À medida que os seres vivos envelhecem, ocorre um processo natural de desgaste e muito embora, que alguns fatores responsáveis por esses desgastes não sejam compreendidos, as conseqüências são bastante evidentes. O maior exemplo é o envelhecimento de órgãos e tecidos, com conseqüente perda de função. Além desses fatores biológicos, existem outros fatores externos que contribuem para a ocorrência de falhas e perda de tecidos, tais como acidentes de trabalhos e automobilísticos, atividades esportivas, ferimento causado por armas de fogo e até mesmo lesões por queimaduras. A cada ano, milhares de pessoas são hospitalizadas com lesões causadas por queimaduras. Para minimizar tais problemas, foram desenvolvidos novos materiais e dispositivos, que irão repor ou substituir função e/ou parte de órgãos defeituosos. Desde a década de 60, o emprego de materiais biomédicos para repor e reparar partes desgastadas/fadigadas ou doentes do corpo tem aumentando de forma exponencial. Desde então, milhões de pacientes desfrutam de alívio de dores, aumento de função e uma qualidade de vida aperfeiçoada pela aplicação desses materiais biomédicos, dispositivos e implantes. Todos esses novos materiais estão inseridos em uma nova classe, os chamados biomateriais (RATNER ET AL., 1996; FOOK, 2005; HENCH, 2005; HENCH, 2006; BOUCARD ET AL., 2007; FOOK, 2008).

Os Biomateriais podem ser considerados como produtos aptos para serem utilizados nos seres humanos com a finalidade de tratamento ou alívio de uma enfermidade ou lesão, e também para a substituição e modificação de sua anatomia ou de um processo fisiológico. Por isso, incluem qualquer produto natural, sintético e/ou natural modificado que pode ser utilizado como um dispositivo médico ou parte dele. Assim, compreendem os materiais empregados em implantes de qualquer tipo até os utilizados na fabricação de instrumentos médicos e cirúrgicos que entram em contato com o organismo. Os materiais sintéticos utilizados para este fim incluem metais, polímeros e cerâmicas e também a combinação destes nos chamados compósitos (APARECIDA, 2005).

Sem dúvida, os biomateriais têm tido o maior impacto na prática da medicina contemporânea e nos cuidados de pacientes, tanto no tratamento quanto no aumento da qualidade de vida de humanos e animais. Órgãos artificiais são utilizados rotineiramente para prolongar a vida e assim manter a qualidade de vida de milhares de pacientes, principalmente quando o transplante de órgão torna-se inviável (DEE et al., 2002; HENCH, 2005).

O desafio do campo dos biomateriais é que todos os dispositivos e implantes substituam tecidos vivos cujas propriedades físicas são resultados de milhões de anos de evolução, e que têm a capacidade de crescimento, regeneração e reparo. Assim todos os biomateriais usados para reparo ou restauração do corpo representam um ajuste de características e propriedades. Os seguidos avanços nas ciências da vida e dos materiais biomédicos possibilitam a criação de vida fora do corpo/sistema biológico e utilizá-los como tecidos de engenharia para reparar ou repor tecidos naturais (HENCH, 2005; HENCH, 2006).

2 JUSTIFICATIVA

Devido à crescente e recente demanda por biomateriais que sejam reabsorvidos pelo sistema biológico, é crescente o número de pesquisas e estudos com materiais biodegradáveis. E entre esses materiais, é de grande destaque a utilização de materiais poliméricos como biomaterial, devido principalmente à grande variedade de propriedades químicas, físicas e mecânicas que os polímeros possuem. Sendo assim, o desenvolvimento de um biomaterial polimérico com propriedades de biodegradação torna-se um dos propósitos desta pesquisa. A quitosana sendo um material de fácil acesso e baixo custo, originada comercialmente de subprodutos da indústria pesqueira, tem apresentado características e propriedades com potencial para ser utilizado. Uma das razões de se utilizar um biomaterial reabsorvível é mimetizar um tecido lesado, promovendo ainda a formação de um novo tecido, além de eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para retirada do implante. Para tanto, faz-se necessário a esse material, apresentar algumas propriedades estruturais, além de possuir uma taxa/razão de biodegradação que ocorra em um período necessário para estabelecer a formação de um novo tecido. Bastante descrita na literatura em aplicações como um biomaterial, a quitosana é um polímero que pode ser reabsorvido pelo sistema biológico, devido à sua hidrólise por via enzimática. Controlando essa taxa/razão de biodegradação, pode-se aperfeiçoar a aplicação da quitosana, de acordo com a aplicação e tempo necessário. Introduzindo reticulações em sua estrutura química, poderemos controlar a razão de biodegradação do biopolímero, ao formar um sistema tridimensional, possibilitando à quitosana a ser empregada nos mais diversos campos da Ciência dos Biomateriais.

Baseado nessas limitações, as tendências atuais focam a regeneração de tecidos, criando uma grande demanda para aqueles especialmente projetados e manufaturados para regeneração de tecidos em uma área de pesquisa interdisciplinar e em contínua expansão, conhecida como *Engenharia de Tecidos*, que se baseia em conhecimentos conjunto das áreas de Ciência e Engenharia de materiais, biológica e médica, que consiste no crescimento de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente,

que são dissociados em células e estas cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc.), para então serem reinseridos no paciente.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Desenvolvimento e caracterização de filmes de quitosana com diferentes agentes de reticulação.

3.2 Específicos

- Empregar diferentes rotas de reticulação para os filmes de quitosana, utilizando um meio químico para introdução de ligações iônicas;
- Desenvolvimento e caracterização físico-química e estrutural de filmes de quitosana reticuladas e não reticuladas;
- Avaliar o efeito das reticulações na molhabilidade dos filmes;
- Estudar o potencial citotóxico dos filmes reticulados e não reticulados;
- Avaliar a adesão celular dos filmes reticulados e não reticulados.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Engenharia de Tecidos

A Engenharia de tecidos tem sido considerada, nos últimos anos, como um dos mais recentes tratamentos médicos para a reconstrução de tecidos defeituosos no campo da engenharia biomédica. Além disso, apresenta um importante suporte para utilização de biomateriais, consistindo em um conjunto de conhecimentos e técnicas utilizadas para a reconstrução de novos órgãos e tecidos e do restabelecimento de suas funções. Este restabelecimento pode ser feito através da utilização de implantes permanentes ou temporários. Por essa razão, tem sido alvo de grandes atenções nos campos da ciência, engenharia, medicina e, particularmente da sociedade (LANZA et al., 2000; BARBANTI et al., 2005; WANG, 2006; HONG et al., 2007; LANZA et al., 2007).

Tem sido notável o desenvolvimento dos Biomateriais utilizados em cirurgia ortopédica, traumatológica e maxilofacial, especialmente dos substitutos ósseos. Estes são definidos como materiais naturais ou sintéticos, que encontram aplicação em um vasto espectro de implantes médicos e dentários e próteses para reparo, aumento ou substituição de tecidos naturais (BONFIELD, 2002; GUTIERRES et al., 2006).

O planejamento e o sucesso da utilização de técnicas como liberação controlada de fármacos, implantes cirúrgicos e órgãos artificiais são extremamente dependentes dos biomateriais. Pesquisadores estão aplicando/utilizando estratégias da engenharia para desenvolver polímeros inspirados para aplicação terapêutica e diagnóstica. O critério de planejamento para esses materiais está baseado em severas limitações funcionais para regular as funções biológicas de maneira controlada e biocompatível. Assim, novos polímeros estão em contínuo desenvolvimento para serem utilizados na adesão tecidual, recriando condições do corpo na superfície do polímero, evitando problemas pós-operatórios. Outra área de interesse é o uso de biomateriais para o planejamento de matrizes artificiais extracelulares que servem como suporte para aplicação na engenharia de tecidos. Estes suportes são projetados em formas tridimensionais complexas e permitem controlar

certos sinais micro-ambientais como interações extracelulares e estímulos biomecânicos em nano, micro e macro-escala (KOHN et al., 2007; BIOMATERIALS & DRUG DELIVERY, 2009)

4.2 Biomateriais

Quando a estrutura biológica de um órgão ou tecido não pode ser reparada, a alternativa viável para o restabelecimento das funções normais do paciente é repô-la com um implante feito de um biomaterial. Durante séculos, grandes lesões teciduais, originadas normalmente de traumas mecânicos ou de doenças degenerativas, trouxeram problemas em função dos poucos recursos terapêuticos disponíveis. A remoção da parte lesada era a prática mais comumente utilizada, acarretando em uma série de limitações aos pacientes. A extração de grandes porções de tecidos ocasiona em um significativo decréscimo da qualidade de vida do paciente e, assim, a substituição e/ou regeneração de regiões corpóreas danificadas tornou-se um objetivo (BARBANTI et al., 2005; SANTOS JR & WADA, 2007).

Recentemente, tem-se destacado o crescimento na aplicação de novos materiais nas áreas biomédicas. Esses materiais fazem fronteira com entidades biológicas e são utilizados para o desenvolvimento de próteses, dispositivos médicos e também com o intuito de repor tecidos naturais. Esses novos materiais são denominados biomateriais. Inicialmente, os biomateriais foram criados/designados para serem quaisquer materiais que fornecesse integridade mecânica e estrutural ao corpo onde esta sendo implantado (DILLOW & LOWMAN, 2002; SHI, 2006; BÁRTOLO & BIDANDA, 2008).

Ao longo dos anos, várias foram as definições formadas sobre o conceito de um biomaterial. A primeira definição foi estabelecida entre as décadas de 60 e 70, no Primeiro Simpósio Internacional de Biomateriais, realizado na Universidade de Clemson, no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos. A palavra *Biomateriais* foi formalmente definida como sendo *um material não viável, utilizado em um dispositivo médico com a intenção de interagir com sistemas biológicos*. Após a Conferência organizada pela Sociedade Européia de Biomateriais, realizada em 1986 na cidade de Chester, localizada na Inglaterra, foi denominada outra definição, onde um biomaterial

pode ser definido como *qualquer substância ou combinação destas que não sejam drogas ou fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usada por qualquer que seja o período de tempo, aumentando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com finalidade de manter e ou melhorar a qualidade de vida do paciente* (WILLIAMS, 1987; NICHOLSON, 2002; PARK, 2007; WONG & BRONZINO 2007).

O campo dos biomateriais se desenvolveu historicamente para se obter uma combinação satisfatória de propriedades físicas próximas àquelas do tecido a ser substituído, com uma resposta tóxica mínima para o hospedeiro. Acompanhando a característica desenvolvida no início do século 21, a pesquisa em biomateriais está presente em um campo interdisciplinar, com intensa colaboração das Ciências Médicas, Ciência dos Materiais, Bioquímica, Engenharia Biomédica e Ciências Clínicas (RATNER et al., 1996; HENCH, 2006; ORÉFICE et al, 2006; SHI, 2006).

Uma série de fatores tem incentivado o desenvolvimento de novos biomateriais para novas aplicações e que apresentem comportamento superior. Dentre esses fatores, destaca-se: o fraco desempenho dos materiais utilizados atualmente, que são projetados para executarem suas funções por um período máximo de 10 anos (com o aumento do tempo de vida médio da população, torna-se necessário o desenvolvimento de biomateriais com propriedades superiores e capazes de cumprir suas atividades por tempos mais prolongados); necessidade de se reduzir o número de cirurgias de revisão, destinadas a substituir implantes danificados; necessidade de se atender a uma crescente demanda interna do produto e de se reduzir o custo dos materiais envolvidos; falta de doadores para transplantes (SILVA JÚNIOR e ORÉFICE, 2001).

Além dos possíveis problemas que um biomaterial pode apresentar, do ponto de vista da Engenharia de Materiais, como fratura, fadiga ou corrosão, e de projeto, como a seleção de material e suas dimensões, associados com a existência de esforços dinâmicos e de resistência à degradação, existe para os biomateriais uma problemática adicional relacionada à biocompatibilidade (ALVES, 2005).

A inserção de um material no corpo induz ao acontecimento de uma série de eventos, fenômenos basicamente observados na interface entre o

material implantado e o tecido, que resulta no reconhecimento do material como um corpo estranho. O grau de resposta fisiológica que ocorrerá depende do local da implantação e da composição química e propriedades mecânicas do material. Como forma de avaliar e reduzir o risco de efeitos inesperados e indesejados, alguns testes de biocompatibilidade são aplicados para avaliar novos biomateriais e dispositivos biomédicos destinados à implantação (PETERS et al., 2009).

O mais importante fator que distingue um biomaterial de qualquer outro material é sua habilidade de existir em contato com tecidos do corpo humano sem causar um grau inaceitável de dano ao corpo. A condição fundamental para qualquer material sintético ser utilizado como biomaterial é não causar processos inflamatórios e, tampouco propiciar qualquer reação indesejável do corpo. Esta propriedade fundamental é conhecida como biocompatibilidade. A biocompatibilidade refere-se à habilidade de um material em proporcionar uma resposta apropriada do hospedeiro, em uma aplicação específica. Entretanto, a biocompatibilidade não é uma propriedade do material por si só. O material necessita induzir uma resposta apropriada, e o quanto essa resposta será adequada, irá depender do sítio de implantação no corpo. Além disso, um material que demonstra excelente biocompatibilidade, por exemplo, quando em contato com o osso, necessariamente não mostraria biocompatibilidade quando aplicado em contato com o sangue. Deste modo, a localização dentro do corpo é uma etapa importante para determinar o quanto o material é biocompatível, assim como a composição química do material (NICHOLSON, 2002; FOOK, 2005; WILLIAMS, 2008a; WILLIAMS, 2008b).

É interessante observar a existência de vários mediadores da biocompatibilidade de um material, diferente das características do material por si só. Também são de grande importância, a natureza e a qualidade das intervenções clínicas e as condições de cada indivíduo, como idade, sexo, qualidade de vida e saúde, considerando que cada paciente é único, do ponto de vista de composição genética e fisiologicamente e bioquimicamente. Algumas características do biomaterial (Tabela 1) também podem influenciar na resposta do hospedeiro e conseqüentemente, na biocompatibilidade, já que a resposta para a implantação é uma função não só do local dentro do corpo,

mas também das formas físicas e químicas do material (NICHOLSON, 2002; WILLIAMS, 2008; WILLIAMS, 2008).

Essas características principais estão relacionadas tanto as propriedades do material como um todo, quanto à superfície do material. A maioria dessas características é evidente, muito embora, algumas englobam uma série de funcionalidades. As constantes elásticas, por exemplo, incluem o módulo de Young e cisalhamento. A cristalinidade, quando relacionada aos polímeros engloba o grau de cristalinidade e a natureza da simetria molecular, ao passo que, nos metais, inclui a estrutura cristalina e o tamanho do grão (WILLIAMS, 2008a; WILLIAMS, 2008b).

Tabela 1. Variáveis do material que influenciam na biocompatibilidade

Composição do material, microestrutura, morfologia.
Cristalinidade
Constantes elásticas
Composição química da superfície, gradiente química, mobilidade molecular.
Topografia da superfície e porosidade.
Teor de água, balanço hidrofóbico-hidrofílico, energia superficial.
Parâmetros de corrosão, perfil de liberação iônica, toxicidade de íons metálicos.
Perfil de degradação polimérica, toxicidade dos produtos de degradação.
Catalisadores, aditivos
Perfil de dissolução cerâmica.

Fonte: WILLIAMS, 2008a; WILLIAMS, 2008b.

Adicionalmente, o conceito de biocompatibilidade inclui mais dois elementos principais. Primeiro, a ausência de efeitos citotóxicos e segundo, o aspecto da funcionalidade. O princípio da citotoxicidade trata principalmente da sobrevivência das células, bem como a manutenção de suas funções específicas sob a influência do material e/ou seus produtos de degradação. O termo citotóxico significa causar efeitos tóxicos a nível celular (morte, alterações na permeabilidade da membrana celular, etc.), ou seja, quando um material libera substância química em quantidade suficiente para matar células, indiretamente ou diretamente. Ou ainda, trata-se de uma avaliação *in vitro* dos

riscos toxicológicos, através de cultura celular. Já a funcionalidade, inclui a integração do biomaterial no sistema biológico (tecido ou órgão). Também assume a ausência na diminuição das funções celulares e requer que as propriedades mecânicas, químicas e físicas do material sejam suficientes para o desempenho celular (HANSON, et al., 1996; NICHOLSON, 2002; ANDERSON, J. et al., 2004; PETERS et al., 2009).

Sendo assim, a biocompatibilidade envolve a aceitação de um implante artificial pelos tecidos circunvizinhos e pelo corpo como um todo. Materiais biocompatíveis não devem causar irritação em estruturas adjacentes do corpo, não provocar uma resposta inflamatória anormal, não incitar reações alérgicas ou imunológicas e não causar câncer. Outras características que são relevantes na função de um biomaterial são adequadas propriedades mecânicas, tais como resistência, dureza e propriedades de fadiga, dependendo da função requerida; propriedades óticas, se o material vai ser aplicado na pele, olhos ou dentes; e densidade apropriada. Esterilidade, ser manufaturável, susceptível a longos períodos de armazenamento sem perder suas características físico-químicas e correto design de engenharia também são considerados. Atualmente, a mais nova exigência é que todas as fábricas e indústrias que produzam biomateriais devem seguir o manual de Boas Práticas de Fabricação, que requer ambientes totalmente isolados e esterilizados e salas limpas na produção de implantes e dispositivos. O produto final geralmente é esterilizado após o processo de embalagem final (PARK & LAKES, 2007; WONG & BRONZINO, 2007).

Somente após ensaios *in vivo* um material demonstra se está realmente capacitado a atender às exigências a ele impostas ou se precisa eventualmente ser removido ou substituído antes do prazo previsto. Neste sentido, se procura simular o comportamento dos materiais *in vitro*, tentando prever probabilisticamente o seu desempenho, muito embora não exista nenhum teste ou combinação de testes que o faça com perfeição. O que se pode tentar fazer, seja com cobaias ou através de cultura de células, é aumentar o grau de confiabilidade dos resultados (ALVES, 2005).

Além da biocompatibilidade, os biomateriais devem ser susceptíveis aos processos de esterilização, de maneira que tal processo não altere as propriedades físico-químicas do biomaterial. Entre as técnicas mais

empregadas, estão inclusas radiação por raios gamma, vapor de gás de óxido de etileno e ou ainda, esterilização a seco, empregando vapor em autoclaves. Alguns polímeros, como por exemplo, o poliacetal, sofre um processo de despolimerização ao ser esterilizado por radiação gamma, formando como subproduto o gás tóxico formaldeído. Por isso, o poliacetal é melhor esterilizado por gás de óxido de etileno (TEOH, 2004).

Adicionalmente, um biomaterial deve resistir/suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração (reação, fratura, abrasão) e, também, não deve alterar o meio biológico nem reagir com o sangue (desnaturação de proteínas), propriedade esta denominada de biofuncionalidade. Portanto, o desempenho e o sucesso de um biomaterial implantado no corpo dependem de fatores como propriedades mecânicas, design e a biocompatibilidade do material utilizado, assim como as condições cirúrgicas e saúde do paciente (FOOK, 2005; WONG & BRONZINO, 2007).

Classicamente, os biomateriais deveriam ser inertes do ponto de vista químico e biológico, possuir resistência à corrosão, ser não tóxico e biocompatível, ou seja, não desenvolver nenhuma interação específica com o hospedeiro. Sendo assim, os estudos se voltaram para a forma de se prevenir ou minimizar as reações teciduais indesejáveis. Entretanto, nenhum material é totalmente inerte quando em contato com o sistema biológico, compreende-se que qualquer material ou dispositivo irá provocar uma resposta celular, seja ela benéfica ou não (PACHENCE & KOHN, 2000; SANTOS JR & WADA, 2007; NAZHAT, 2008).

Atualmente, os novos materiais são concebidos para que haja uma efetiva interação com os tecidos, provocando respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação celular no sítio de implantação, ou seja, os biomateriais atualmente são projetados de forma que interajam com o tecido a ser reparado, não apenas atuar como uma peça de reposição estática (PACHENCE & KOHN, 2000; SANTOS JR & WADA, 2007).

Recentemente, acompanhando o desenvolvimento científico e tecnológico, um biomaterial foi definido como sendo um material interativo, capaz de estabelecer uma interação apropriada com tecidos circunvizinhos sem induzir uma resposta adversa do tecido hospedeiro. Entretanto, a definição de um “biomaterial” pode ser encontrada com diferentes interpretações, tanto no

campo das Ciências dos Materiais quanto na Medicina clínica (SHI, 2006; URAGAMI & TOKURA, 2006).

4.2.1 Classificação dos biomateriais

Os biomateriais podem ser divididos em quatro classes principais de materiais: os polímeros, os metais, as cerâmicas (incluindo carbonos, vitrocerâmicas e vidros), e materiais naturais (incluindo tanto aqueles de origem animal quanto os de origem vegetal). Algumas vezes, duas diferentes classes de materiais são combinadas, formando materiais compósitos. Assim, os materiais compósitos são agregados como a quinta classe dos biomateriais (RATNER et al., 2004).

A grande diversidade e sofisticação dos materiais que geralmente são utilizados na medicina e biotecnologia é testemunha dos significativos avanços científicos e tecnológicos que vem ocorrendo nos últimos 50 anos (RATNER et al., 2004).

Além da classificação entre cinco maiores classes, os biomateriais utilizados podem ser divididos em duas categorias: biológicos e sintéticos. Os materiais biológicos são compostos por polipeptídios (proteínas), polissacarídeos, ácidos nucleicos, poliésteres, hidroxiapatita, ou seus compósitos. Os materiais biológicos possuem vantagens singulares em relação aos sintéticos, como podem ser citadas as excelentes atividades fisiológicas, tais como adesão celular, propriedades mecânicas similares aos tecidos naturais e principalmente, a biodegradabilidade. Entretanto, a biodegradabilidade de um biomaterial pode possuir tanto vantagens como desvantagens, dependendo do tipo de aplicação (IKADA, 2002; TEOH, 2004).

A diversidade das aplicações dos biomateriais, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e resposta do tecido hospedeiro. Nesse contexto, os polímeros se tornaram biomateriais

por que sua interação com o sistema biológico deve continuar por períodos consideráveis (KAWACHI et al., 2000; NICHOLSON, 2002).

4.2.2 Biomateriais poliméricos

Dentre as diversas classes existentes no campo dos biomateriais, uma classe promissora vem despertando grande interesse científico e tecnológico nos últimos anos. São os materiais poliméricos, cujas aplicações nas áreas médicas e biotecnológicas tem apresentado um crescimento significativo. Inserido na vasta área dos materiais poliméricos, estão os biopolímeros, que podem ser de origem natural ou sintética, biodegradável ou não (GRIGOLON, 2001; KHOR & LIM, 2003).

Os materiais poliméricos possuem um campo vasto de aplicações como implantes, devido a sua facilidade de serem moldados nas mais variadas formas, tais como fibras, filmes, tecidos e líquidos viscosos. Além disso, os polímeros ostentam uma semelhança aos componentes teciduais formados por polímeros naturais, como por exemplo, o colágeno (PARK & LAKES, 2007).

A extensa variedade de polímeros naturais relevantes ao campo dos biomateriais inclui materiais de origem vegetal, tais como a celulose, o alginato de sódio e a borracha natural. Materiais de origem animal como colágeno, as glicosaminoglicanos (GAG), heparina, ácido hialurônico e outros materiais como o DNA, material genético de todas as criaturas vivas (RATNER et al, 2004).

Os polímeros possuem diferenças competitivas em relação a outras classes de materiais, tais como metais e cerâmicas, principalmente por seus baixos custos de processamento, baixo peso e propriedades que formam uma combinação única. Muitos polímeros possuem características desejadas, como resistência a tração, módulo de elasticidade, alongamento e resistência ao impacto. Recentemente, novas tecnologias têm emergido, resultando na obtenção de novos polímeros. Além disso, desempenham um papel essencial no mundo moderno. Com aplicações iniciadas no meio do século passado, atualmente, suas aplicações são inúmeras, com tecnologias aplicadas desde objetos simples a construções mais complexas, baseadas nas crescentes

pesquisas com materiais poliméricos (SAWYER et al., 2008; BHATTACHARYA et al., 2009).

Os polímeros apresentam como característica fundamental a formação a partir de unidades elementares, com elevado grau de repetição. Como exemplos do quão são largas as moléculas poliméricas, quando comparadas com outras substâncias de menor peso molecular, como, por exemplo, açúcar (342 g/mol) e água (18 g/mol). Os arranjos dessas unidades repetitivas, os vários tipos de cadeias que podem ser sintetizadas, as formas que essas cadeias podem assumir, resultam numa classe de materiais com uma grande extensão e variedade de propriedades (MARCONI & PIOZZI, 2002; VAN DER VEGT, 2002).

A definição mais comum encontrada na literatura sobre materiais poliméricos é: um sistema formado por uma união de macromoléculas, ou seja, um sistema composto por entidades moleculares de larga dimensão (Figura 1), para as quais são proporcionadas ligações covalentes de um grande número de unidades repetitivas, mais conhecidos como unidades monoméricas ou apenas monômeros. Essas moléculas largas podem estar distribuídas como na forma linear, ramificadas ou ainda fortemente interconectadas. Nesse último caso, a estrutura desenvolve uma ligação tridimensional (NICHOLSON, 1994; GNANOU & FONTANILLE, 2008).

Dependendo de sua origem, os polímeros podem ser materiais orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos. Os polímeros são quimicamente baseados em carbono, hidrogênio, e outros elementos não metálicos (CALLISTER, 2002).

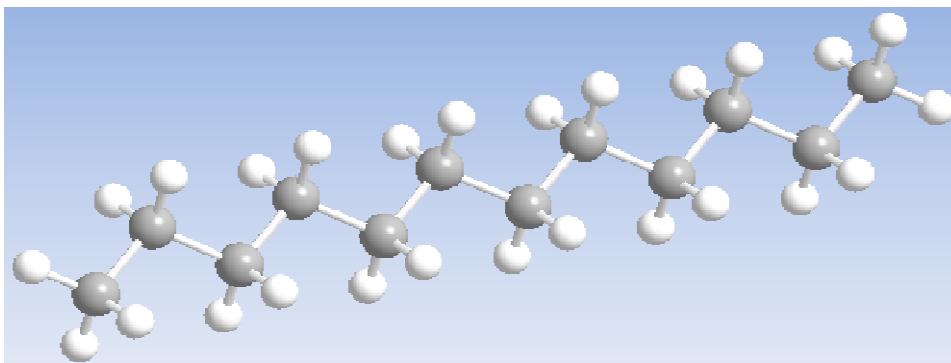


Figura 1. Cadeia polimérica de polietileno.
Fonte: Arquivo próprio.

Várias moléculas de origem biológica, como as proteínas e polissacarídeos, apresentam uma estrutura macromolecular e, dessa forma, podem ser chamadas de polímeros naturais. Polímeros naturais apresentam em geral, características comuns e particulares que os distinguem dos polímeros sintéticos, como por exemplo, a existência de cadeias de mesmo tamanho (monodispersividade) e elevada especificidade e organização molecular (ORÉFICE et al., 2006).

Tradicionalmente, os especialistas do campo médico enxergavam os materiais poliméricos como componentes de dispositivos como inaladores e cateteres, próteses e esparadrapos transdérmicos. Novas drogas, assim como sistemas para liberação controlada de fármaco baseados em polímeros, apresentam potencial para conter várias doenças. Os materiais poliméricos tocam todos os aspectos da vida humana, sabendo ou não, todos os indivíduos recorrem aos polímeros para suprir suas necessidades (BHATTACHARYA et al., 2009).

Assim como todos os materiais, as propriedades dos polímeros podem ser previstas e explicadas através da interpretação da estrutura polimérica, vista nas escalas macroscópica, microscópica e atômica (BATICH & LEAMY, 2003). E a estrutura polimérica está diretamente ligada às forças coesivas que existem nos polímeros. As forças coesivas dependem da intensidade das interações moleculares que existem entre os grupos funcionais. Observadas em sistemas compostos de moléculas simples, essas forças coesivas não são tão fortes, mas quando observadas em sistemas poliméricos, pois com a grande quantidade de grupos funcionais reativos e a forças resultantes da repetição ao longo da macromolécula, são responsáveis por propriedades mecânicas características dos polímeros (GNANOU & FONTANILLE, 2008).

4.2.3 Classificação dos polímeros

Dependendo das características moleculares e estruturais, os polímeros podem ser divididos em duas classes: termoplásticos e termorrígidos. Os termoplásticos são polímeros de cadeias individuais que se agrupam por forças relativamente fracas como Van der Waals e dipolo-dipolo (Keesom, Debye e London), podendo ser dissolvidos em solvente e modelados para a formação

de filmes ou outros dispositivos. Os termorrígidos, geralmente, são constituídos por ligações covalentes, introduzidas entre as cadeiras através de reticulações. Essas reticulações podem ser introduzidas tanto na produção do polímero quanto em polímeros já formados. Entretanto, as reticulações covalentes possuem algumas desvantagens. Uma vez submetido ao processo de reticulação, o polímero não pode ser dissolvido ou moldado. Os fragmentos de polímeros reticulados não podem ser reciclados (BATICH & LEAMY, 2003).

Em adição as reticulações covalentes, que são irreversíveis por natureza, existem também as reticulações temporárias, conhecida como reticulação física. O mecanismo de formação deste tipo de ligação cruzada é semelhante à reação de vulcanização dos elastômeros. Consiste em introduzir fortes ligações secundárias entre as cadeias poliméricas, de modo que o polímero possua propriedades de um material termorrígido, mantendo características de termoplásticos (STEVENS, 1999). Porém, neste caso, as redes tridimensionais formadas possuem um caráter reversível. A ponte entre as cadeias pode ocorrer de duas formas: estabilização de interações moleculares fracas (ligação de van der Waals) ou interações moderadas (pontes de hidrogênio) (Figura 2a) ou ainda, por uma auto união dos polímeros em blocos rígidos (Figura 2b) (GNANOU & FONTANILLE, 2008).

Os polímeros cristalinos se encaixam também nesta categoria, por possuírem fortes ligações secundárias entre as cadeias, resultando em um maior empacotamento das cadeias. Com isso, muitas das propriedades mecânicas e de soluções dos polímeros cristalinos se assemelham aos polímeros reticulados amorfos (STEVENS, 1999).

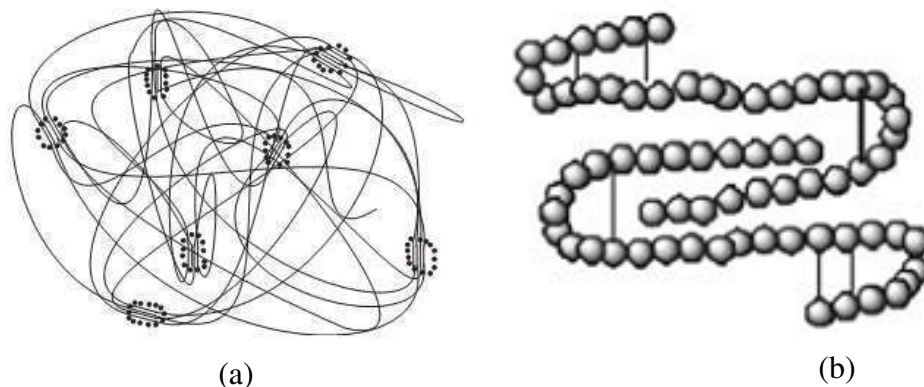


Figura 2. (a) reticulação intermolecular (b) reticulação intramolecular.
Fonte: GNANOU & FONTANILLE, 2008.

A reticulação restringe os movimentos das cadeias poliméricas, gerando elasticidade no polímero amorfo. Faz ainda o polímero mais resistente aos efeitos do calor, luz e outros agentes físicos, resultando em um alto grau de estabilidade dimensional, resistência mecânica, resistência química e à solventes. Os efeitos da reticulação nas propriedades físicas dos polímeros são primariamente influenciados pelo grau de reticulação, regularidade da reticulação formada e a presença ou não de cristalinidade (BHATTACHARYA & RAY, 2009).

Polímeros que são biocompatíveis, isto é, que não são tóxicos ao corpo na implantação podem ser classificados como bioinertes, bioativos ou bioabsorvíveis. De maneira geral, polímeros biocompatíveis com alto peso molecular que não são degradáveis, são classificados como bioinertes. Alguma toxicidade pode ocorrer com polímeros normalmente biocompatíveis devido à lixívia de aditivos e plastificantes de baixo peso molecular. É de suma importância caracterizar o tipo de polímero utilizado. A pureza e a presença de aditivos diferenciam um polímero do outro. Reações de superfície e absorção de proteínas na superfície de polímeros também podem causar problemas. Portanto, a textura da superfície e o formato do implante também são importantes (HENCH & JONES, 2005).

Para um polímero ser degradável, ele tem que ser susceptível a decomposição, através da atividade vital do sistema biológico. A degradação depende de vários fatores físico-químicos, tais como cristalinidade, mobilidade da cadeia, razão de volume, forma, impurezas e porosidade (NICHOLSON, 2002).

4.3 Polímeros biodegradáveis

Os tecidos naturais são reparados de maneira contínua e remodelados de forma que se ajustem às inúmeras mudanças que ocorrem no ambiente fisiológico. Nenhum biomaterial pode mimetizar estas propriedades de maneira 100% efetiva. Um biomaterial ideal para executar a função desejada é aquele que eventualmente desaparece, sendo substituído por tecido natural. Portanto,

polímeros biodegradáveis são de grande interesse para a comunidade da engenharia biomédica (BATICH & LEAMY, 2003).

Por milhares de anos, a humanidade tem utilizado ou tentado utilizar, compostos disponíveis naturalmente para a produção de utensílios e dispositivos, transformando assim, substâncias em materiais. Como resultado, compostos de origem animal e vegetal, bem como os materiais inorgânicos, são explorados como material. Como resultado da evolução científica, foi descoberto como criar novos compostos, que rapidamente se transformaram em materiais. Com o progresso, ligas, cerâmicas e biopolímeros modificados quimicamente apareceram impulsionadas principalmente pelos desenvolvimentos da Química e Ciência dos Materiais (VERT, 2007).

As últimas duas décadas do século XX presenciaram um paradigma, com uma mudança dos biomateriais bioestáveis para biomateriais biodegradáveis (hidroliticamente e enzimaticamente degradáveis), para aplicações médicas. A tendência atual prediz que nos próximos anos, a maioria das próteses permanentes utilizadas em aplicações terapêuticas temporárias serão substituídas por materiais biodegradáveis que possam auxiliar o corpo a reparar e regenerar tecidos danificados (NAIR & LAURENCIN, 2007).

O emprego de polímeros biodegradáveis como biomaterial oferece pelo menos duas vantagens: (i) eliminação da necessidade de um segundo procedimento cirúrgico para remoção da prótese, após ter cumprido a função requerida, e (ii) a possibilidade de provocar e guiar a regeneração tecidual via degradação do material (FAMBRI et al., 2002).

Existem várias maneiras de se classificarem os polímeros biodegradáveis. Eles podem ser separados em categorias de acordo com a composição química, rota de síntese, método de processamento, importância econômica, aplicações, etc. Cada uma dessas classificações fornece diferentes e úteis informações sobre os polímeros. Além das citadas, um meio abrangente de se classificar os polímeros biodegradáveis é através do meio de origem, onde podem ser divididos em duas categorias: polímeros naturais, que são produzidos a partir de meios naturais, e polímeros sintéticos, que são produzidos a partir de fontes fósseis. Polímeros de origem natural incluem os polissacarídeos, proteínas, lipídios, poliésteres produzidos por microorganismos e plantas, poliésteres sintetizados de monômeros

bioderivados além de um grupo de vários polímeros (borracha natural, compósitos). Já os polímeros de origem mineral incluem os poliésteres alifáticos, poliésteres aromáticos ou blendas, PVA, poliolefinas modificadas (CLARINVAL & HALLEUX, 2005).

A busca por materiais que possam ser reabsorvidos pelo sistema biológico, sendo de preferência de origem natural, tem crescido de maneira significativa, tendo em vista que a maioria desses materiais apresenta os requisitos essenciais para a aplicação de um biomaterial. Isso se deve pelo fato de materiais naturais possuírem uma maior biocompatibilidade com o sistema biológico. Biologicamente estáveis, no sentido de não produzirem reações adversas, os materiais bioabsorvíveis e bioativos tem sido estudados, abrangendo uma gama de materiais como polímeros sintéticos e naturais, cerâmicas, vidros e compósitos. Os polímeros são materiais que vem sendo utilizados com vantagens como implantes devido à sua facilidade de produção e manuseio e pelo fato de apresentarem características mecânicas semelhantes a dos materiais biológicos. Os estudos com materiais biodegradáveis são concentrados nos polímeros devido à similaridade da estrutura molecular com a dos componentes teciduais (KELLOMÄKI et al., 2000; BARBANTI et al., 2005; DALLAN, 2005; PARK; LAKES, 2007).

Para uma aplicação com sucesso de um polímero biodegradável como biomaterial, alguns requisitos necessitam ser seguidos (NAIR & LAURENCIN, 2007), como:

- O material não deve provocar reações inflamatórias ou resposta tóxica após a implantação no corpo;
- O material deve possuir um tempo de vida útil aceitável;
- O tempo de degradação do material deve ser igual ao processo de cura ou regeneração do tecido onde foi aplicado;
- O material deve apresentar propriedades mecânicas ideais para a aplicação indicada, e a variação das propriedades mecânicas deve ser compatível com processo de cura ou regeneração;
- Os produtos de degradação não devem oferecer riscos tóxicos, sendo susceptíveis ao metabolismo e expelidos pelo corpo;

- O material deve ter permeabilidade e processabilidade adequada para a aplicação específica.

Muitos são os termos utilizados com relação ao comportamento dos materiais poliméricos em contato com sistemas vivos. Os mais frequentes são biodegradação, bioabsorção e bioreabsorção. De acordo com WILLIAMS (1981), biodegradação é o processo induzido pela atividade vital de um organismo, e não simplesmente a degradação de um material em um meio fisiológico. Alguns anos à frente, FEIJEN (1986) agregou ao conceito todos os processos de degradação de um biomaterial, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (FAMBRI et al., 2002).

De maneira geral, um polímero ou material é biodegradável quando sofre degradação macromolecular, sendo dispersos *in vivo*, mas sem eliminação dos produtos ou subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo. Já os materiais poliméricos bioabsorvíveis são aqueles que podem sofrer dissolução em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou ainda, sem diminuição do peso molecular, como acontece quando implantes solúveis são expostos a fluidos orgânicos, sofrendo dissolução lenta. Um polímero bioabsorvível é designado para degradar-se no sistema biológico após o desempenho de sua função. Materiais benéficos frequentemente degradam para dar produtos metabólicos normais no corpo. Os bioreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que exibem degradação através da diminuição de tamanho de suas cadeias, sendo reabsorvidos *in vivo*; isto é, materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Bioreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molecular) sem efeitos colaterais residuais. A palavra bioreabsorção é aplicada quando a eliminação é total. Um polímero bioabsorvível pode ser bioreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. Os materiais poliméricos bioreabsorvíveis são os compostos de preferência para serem empregados em dispositivos temporários (FAMBRI et

al., 2002; RATNER et al, 2004; BARBANTI et al., 2005; HENCH; JONES, 2005; SANTOS JR & WADA, 2007).

Anteriormente, os polímeros que eram utilizados para aplicações médicas, tinham como critério de escolha, provocar o mínimo possível de reação por parte do tecido hospedeiro. O conceito de biocompatibilidade estava fortemente ligado à idéia de se obter um caráter inerte do biomaterial, observada através da formação de uma fina cápsula fibrosa. A tendência atual e futura é a utilização de polímeros que interajam com entidades biológicas, no sentido de guiar os cursos dos processos inflamatórios imunológico, no intuito de restabelecer a funcionalidade, a morfologia e saúde dos tecidos danificados. Além disso, o requerimento de biocompatibilidade para os polímeros utilizados anteriormente era aplicado levando-se em consideração a presença de plastificantes, resíduos de catalisador e vários outros aditivos (estabilizadores térmicos, lubrificantes externos, corantes, etc.) (FAMBRI et al., 2002; ORÉFICE et al., 2006).

Polímeros biodegradáveis podem ser aplicados na medicina como scaffolds temporários, que são suportes temporários apto para promover regeneração tecidual; barreiras temporárias para prevenção de adesão tecidual; ou ainda, em sistemas de liberação controlada de fármacos, onde esse fármaco pode ser incorporado fisicamente ou através de ligações covalentes, sendo liberado de forma gradual (FAMBRI et al., 2002).

O propósito de se desenvolver materiais poliméricos é a obtenção de suportes temporários, que se degradem no organismo ao mesmo tempo em que um novo tecido é formado, em substituição ao lesado. A razão de degradação é frequentemente afetada pelas propriedades dos componentes do material, fabricação, microestrutura e macroestrutura (FISHER et al., 2007).

Quando um material polimérico sofre o processo de degradação, ele pode ocorrer de duas maneiras: degradação superficial e degradação volumétrica. A degradação de superfície é caracterizada pelo decréscimo gradual nas dimensões do material, sem nenhuma mudança nos atributos mecânicos. Um ponto crítico durante a degradação de superfície é que, tanto as dimensões como as propriedades mecânicas decrescem rapidamente. Degradação volumétrica é caracterizada pela perda de material por toda a

extensão de peça durante a degradação. Deste modo, a resistência mecânica decai durante o processo de degradação e é dependente da razão de degradação (FISHER et al., 2007)

Quando certos polímeros são expostos a líquidos como os fluidos corpóreos, dois eventos podem ser observados: pode ocorrer o intumescimento do polímero ou o mesmo pode ser dissolvido no meio. As pequenas moléculas do líquido podem difundir-se dentro do polímero, empurrando/flexionando as cadeias, aumentando assim o seu volume. Esse aumento de volume pode ocorrer preferencialmente nas ranhuras da superfície, ocasionando um stress elástico local, tendo como consequência o aparecimento de fissuras ou rupturas por stress nos arredores. A dissolução do polímero pode ser vista como sendo um caso extremo do acontecimento acima (HENCH & JONES, 2005).

A degradação por essa rota é reduzida através da introdução de reticulações no polímero, aumento de massa molar, aumento do grau de cristalinidade e por redução de temperatura (HENCH & JONES, 2005).

Polímeros reticulados têm sido extensivamente explorados no campo biomédico devido às suas vantagens físico-químicas únicas e atual aumento da demanda (MISRA et al., 2009).

Para desenvolver polímeros reticulados para aplicações biomédicas e farmacêuticas, é essencial obter esses polímeros com propriedades biomiméticas e físico-químicas de acordo com a aplicação desejada (MISRA et al., 2009).

4.3.1. Quitina e Quitosana

Os polímeros são aplicados, de uma forma geral, em todos os campos da medicina, desde um simples dispositivo extracorpóreo a implantes. Desde que cada aplicação médica tenha seus próprios requisitos especializados, uma grande quantidade de materiais com boa biocompatibilidade, mas com diferentes propriedades químicas e físico-químicas devem ser avaliados (DUMITRIU, 2002).

Os polissacarídeos são componentes importantes no modo de vida. Dispõem de perfeita biocompatibilidade e biodegradabilidade, que são propriedades básicas para os polímeros que são utilizados como biomateriais. Possuem ainda algumas propriedades únicas, não encontradas em outros polímeros naturais. O reconhecimento do potencial de aplicação dos polissacarídeos como biomaterial tem crescido ao passar dos anos devido a vários fatores que contribuíram para tal crescimento, como o recente desenvolvimento de novas técnicas de aperfeiçoamento e pesquisas relacionadas à Engenharia de Tecidos, associado com a necessidade de criação de novos materiais que apresentem um controle de atividade biológica e biodegradabilidade específicas para cada aplicação requerida (DUMITRIU, 2002; MATTHEW, 2002).

Em geral, os polissacarídeos compartilham uma série de características que os tornam uma classe particularmente desejável, desde simples materiais até para uma série de aplicações como biomateriais. Uma das principais características que os polissacarídeos possuem é o fato de possuírem inúmeros grupos hidroxilas presentes em suas moléculas, proporcionando vários sítios reativos que permitem o agarramento de grupos laterais, funcionalidade específica e reconhecimento biológico, além de permitir a modulação das propriedades mecânicas ou biológicas da molécula. Além disso, a natureza polar dos grupos hidroxilas, aliada com a presença de grupos funcionais ionizáveis em algumas espécies, tornam os polissacarídeos intrinsecamente hidrofílicos, fazendo com que grande parte seja solúvel em meio aquoso. As exceções a essa regra tendem a ser compostos que formam estruturas organizadas com alto grau de cristalinidade em seu estado sólido, como é o caso dos polissacarídeos cristalinos celulose e quitina (MATTHEW, 2002).

Dentre os polissacarídeos, destaca-se a quitina, um polímero abundante na natureza, segundo mais abundante, ficando apenas atrás da celulose. É considerado o mais proeminente polímero natural, devido sua multifuncionalidade, com propriedades como biodegradabilidade e baixa toxicidade no corpo animal, além de acelerar a recuperação em lesões de pele. Entretanto, sua pouca utilização é justificada por baixa solubilidade na maioria dos solventes conhecidos. A quitosana que é um polímero derivado do produto

da desacetilação da quitina, mas que também pode ocorrer de forma natural, tem sido mais pesquisada por várias propriedades como biodegradabilidade, baixa toxicidade, aceleração de formação de fibroblastos no corpo animal, aceleração da ação anticoagulante do sangue, atividade antimicrobiana e alta solubilidade na maioria dos solventes orgânicos empregados (URAGAMI & TOKURA, 2006; TAKAHACHI et al., 2007; ZHANG et al., 2008; PEDRO et al., 2009).

4.3.2 Identificação

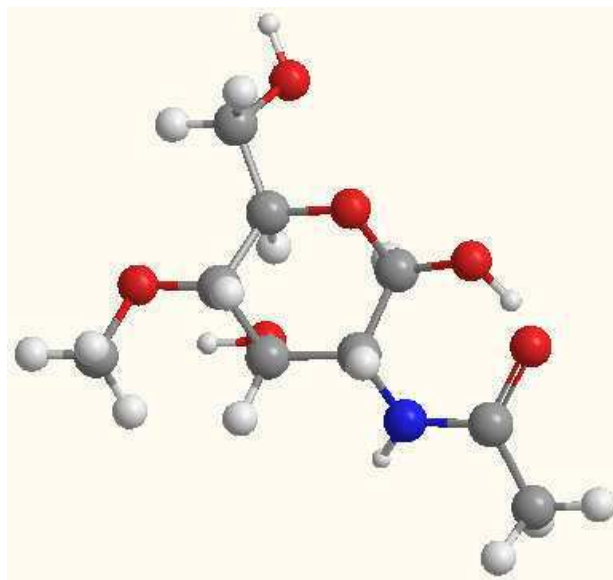
Apesar de ter sua estrutura química e cristalina reconhecida apenas na década de 60, mais de um século de estudos foram necessários para a identificação da quitina. A descoberta da existência da quitina aconteceu no ano de 1811 por Branconnot, através do tratamento de cogumelos com uma solução diluída quente de um álcali, onde se pôde notar a produção de amônia, através de destilação com hidróxido de potássio e produção de ácido acético por degradação com ácido sulfúrico. Esse composto foi então definido por Branconnot como Fungine. O primeiro relatório a respeito da quitina foi publicado por Odier, no ano de 1823, em relação à similaridade entre os compostos que conferem suporte estrutural aos insetos e as plantas, isto é, a celulose. A substância por ele encontrada nos insetos se assemelhava bastante aos estudos de Branconnot e foi nomeada como Quitina (em grego, quitina significa túnica ou envelope). A partir desses estudos iniciais, demorou quase um século e meio para que a quitina fosse reconhecida como um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza. A presença de Nitrogênio na quitina foi descoberta por Payen em 1843 e Ledderhose identificou a presença de glucosamina e ácido acético como produtos da hidrólise da quitina em 1876. Finalmente, em 1956, Purchase e Braun concluíram em seus estudos que a quitina é um polissacarídeo que consiste principalmente de resíduos de glucosamina seguido por várias reações hidrolíticas (KHOR, 2001; URAGAMI & TOKURA, 2006; TOKURA & TAMURA, 2007).

Ao passo que os estudos com a quitina foram sendo aprofundados ao longo dos anos que sucederam sua descoberta, outro composto foi descoberto por Rouget ainda no século XIX, no ano de 1859. Ao tratar quitina com uma

solução quente de hidróxido de potássio, foi observado que após o tratamento alcalino, o composto se tornou solúvel em ácidos orgânicos. No ano de 1894, Hoppe-Seyler nomeou o composto solúvel em ácido orgânico de quitosana (KHOR, 2001; TOKURA & TAMURA, 2007).

4.3.3 Estrutura Química

A estrutura química da quitina foi proposta pela primeira vez por Purchase e Braun baseada na similaridade com a estrutura química da celulose. Trata-se de um polissacarídeo composto por unidades com ligações do tipo β (1 \rightarrow 4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosamina e β (1 \rightarrow 4) 2-amina-2-deoxi-D-glucosamina (Figura 3), dispostas de forma aleatórias ou em bloco através da cadeia principal do biopolímero, dependendo do método de obtenção utilizado para sua produção (KHOR & LIM, 2003; TOKURA & TAMURA, 2007).



● Carbono ● Oxigênio ● Nitrogênio ○ Hidrogênio

Figura 3. Estrutura química do monômero da quitina.
Fonte: Arquivo próprio.

Entretanto, a quitina é conhecida por ser insolúvel nos solventes orgânicos mais comuns, devido principalmente à sua estrutura cristalina rígida, formada por pontes de hidrogênio entre os grupos funcionais acetamida, hidroxila e carbonila, mais precisamente pelas pontes de hidrogênio binárias que existem entre os grupos acetamida e os grupos hidroxilas primários na

posição C6 ou grupos hidroxilas secundários na posição C3 da estrutura química (Figura 4). A quitina também é conhecida por apresentar estruturas cristalinas diferentes, dependentes da função no corpo do animal (TOKURA & TAMURA, 2007; NAGAHAMA, et al., 2008; PILLAI et al., 2009).

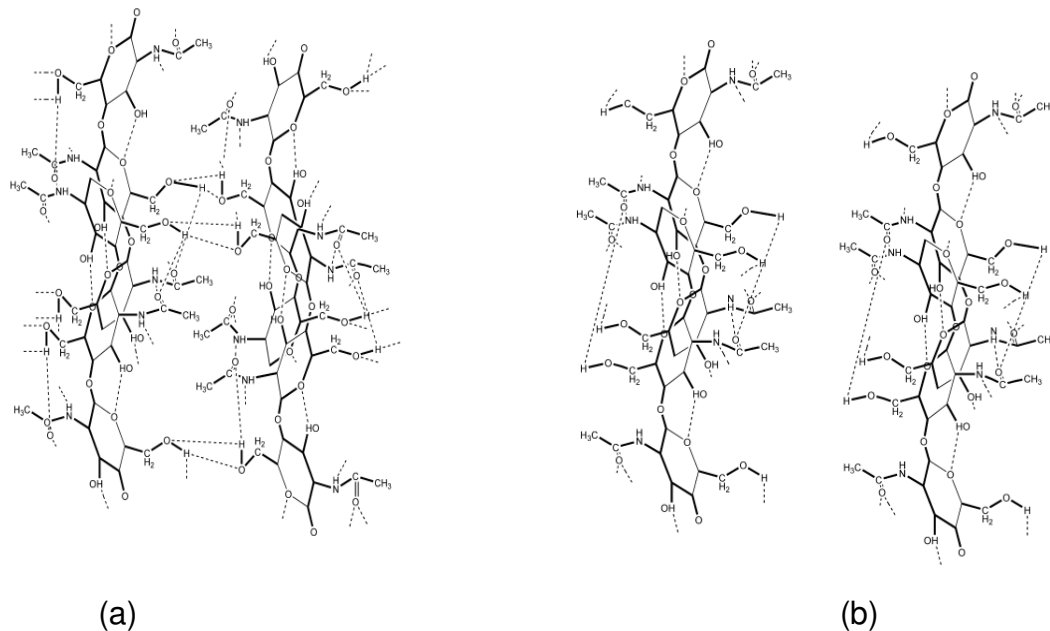
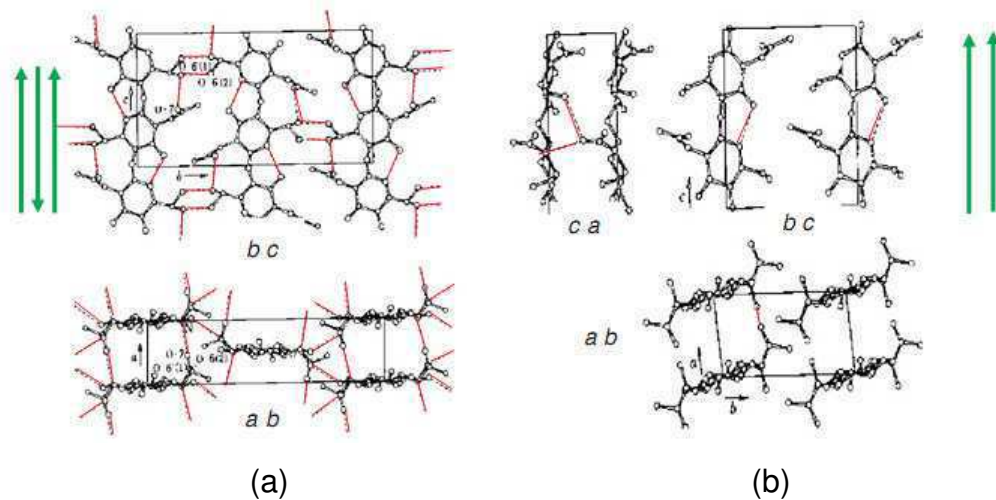


Figura 4. Representação das pontes de hidrogênio (a) α -quitina e (b) β -quitina.
Fonte: PILLAI et al., 2009.

Ao longo dos anos, foram descobertas três estruturas polimórficas para a quitina, denominadas de alfa (α), beta (β) e gama (γ) quitina, sendo que a γ -quitina é considerada como uma variação da α -quitina. A forma α -quitina é a mais abundante e estável existente, podendo ser encontrada em cascas de caranguejos, siris e camarão e na parede celular de leveduras. A forma β -quitina é encontrada principalmente em associação com proteínas em gládios de lulas. As formas polimórficas da quitina diferem uma das outras no empacotamento e na polaridade das cadeias adjacentes. A principal diferença consiste em que a estrutura da α -quitina é composta de arranjos antiparalelos das moléculas da quitina, enquanto a estrutura da β -quitina é composta por arranjos paralelos. Essa diferença entre os arranjos das moléculas propicia a formação de duas células unitárias diferentes para cada forma polimórfica (Figura 5). A α -quitina possui uma célula unitária ortorrômbica e a β -quitina possui uma célula unitária monoclinica (). A α -quitina tem sido proposta a

possuir uma estrutura cristalina muito mais compacta que a estrutura cristalina da forma β -quitina (RINALDO, 2006; TOKURA & TAMURA, 2007; NAGAHAMA, et al., 2008).

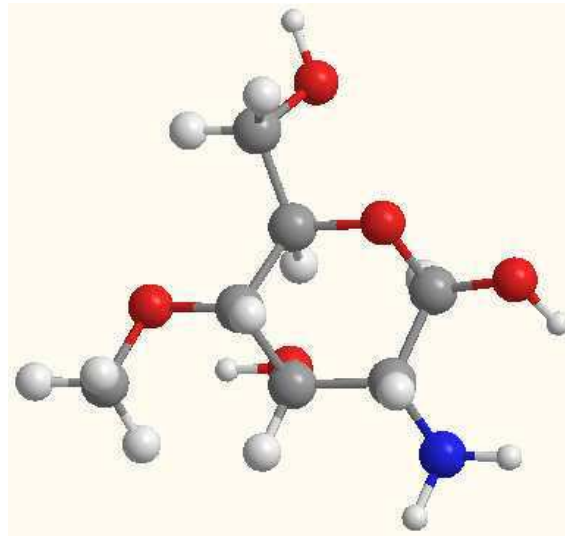


Ortorômbica	$a = 4,74 \text{ \AA}$	Monoclínica	$a = 4.86 \text{ \AA}$
Duas cadeias/célula unitária	$b = 18.86 \text{ \AA}$	Uma cadeia/célula unitária	$B = 9.26 \text{ \AA}$
Antiparalelo	$c = 10.32 \text{ \AA}$	Paralelo	$c = 10.38 \text{ \AA}$

Figura 5. Estrutura cristalina para (a) α -quitina e (b) β -quitina.
Fonte: TOKURA & TAMURA, 2007

Ainda que a estrutura cristalina rígida da quitina seja de fundamental importância para os fungos, insetos e crustáceos, de tal maneira que os mantêm protegidos, a insolubilidade da quitina torna-se um obstáculo para a possibilidade de haver modificações químicas para utilização de seus derivados em aplicações biomédicas (TOKURA & TAMURA, 2007).

A quitosana é um polissacarídeo formado por uma cadeia linear, composto por unidades repetitivas do tipo β (1 \rightarrow 4) 2-amino-2-deoxi-D-glucosamina e β (1 \rightarrow 4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glucosamina (Figura 6). Possui grupos funcionais característicos, que conferem propriedades únicas a esse polímero. O grande interesse de cientistas pela a quitosana como material polimérico, com aplicações nas áreas biomédicas, se dá pelo fato destes polissacarídeos possuírem características tecnológicas e econômicas relevantes, além de apresentarem propriedades biológicas adequadas (CHAVES et al., 2005; DALLAN, 2005; FRAGA et al., 2006; SANTOS et al., 2006; PEDRO et al., 2009; RIVERO et al., 2009).



● Carbono ● Oxigênio ● Nitrogênio ○ Hidrogênio

Figura 6. Estrutura química da quitosana.
Fonte: Arquivo Próprio.

A quitosana é um polímero semicristalino e o seu grau de cristalinidade é uma função do grau de desacetilação. A presença de numerosas pontes de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares nas moléculas de quitosana, contribui para o caráter semicristalino do polímero. Além disso, faz com que a quitosana não apresente nenhum ponto de fusão, sendo solúvel apenas em pH na faixa ácida (RINAUDO, 2006; FAN et al., 2009).

Entretanto, o grau de cristalinidade da quitosana pode variar de acordo com sua origem, grau de desacetilação e presença ou não de modificações químicas. Signini e Campana Filho (2001.), estudaram e compararam diferentes tipos de quitosana, nas formas neutras, acetato e cloridrato, quanto ao índice de cristalinidade. As amostras de quitosana foram analisadas através de medidas de difração de raios X, denominando as amostras estudadas como sendo A_B (quitosana bruta), A_N (quitosana neutra), A_{AP} (Acetato de quitosana). Os resultados obtidos mostraram que as amostras A_B e A_N possuíam perfil cristalino quase idêntico, com um maior alargamento da base do pico. Já em comparação com a amostra A_{AP} , observa-se um sinal mais intenso, sem sofrer deslocamento significativo. Com esses resultados, aplicaram-se as intensidades encontradas ($I_C = 2\theta \cong 20^\circ$ e $I_A = 2\theta \cong 12^\circ$), pode-se concluir que as amostras A_B , A_N e A_{AP} apresentam um índice de cristalinidade semelhante,

sendo os resultados obtidos nas amostras bruta e pura, com valores bem próximos (Tabela 2).

Tabela 2. Valores dos índices de cristalinidade da quitosana nas formas bruta, neutra e acetilada.

Amostra	Índice de Cristalinidade (% I_{CR})
A _B	68,5
A _N	67,7
A _{AP}	64,1

Fonte: SIGNINI & FILHO, 2001.

Seguindo o mesmo propósito, Prashanth e colaboradores (2002) estudaram a estrutura da quitosana, no estado sólido, sob diferentes condições de desacetilação da quitina. O objetivo do estudo foi verificar a influência da variação do grau de desacetilação nas estruturas sólidas do composto, como por exemplo, a cristalinidade. Foram preparadas três amostras diferentes de quitosana, sendo a quitosana (A) originária da desacetilação da quitina provinda de camarões com 40% de hidróxido de sódio a 100 °C, possuindo um grau de desacetilação de 88%, a quitosana (B) preparada realizando o processo de desacetilação da quitina sob atmosfera controlada de nitrogênio, possuindo um grau de desacetilação de 75% e a quitosana (C) foi preparada na presença de uma solução de tiofenol a 1%, empregada durante o processo de desacetilação da quitina, possuindo um grau de desacetilação de 77%. Como resultado, foi observado que a amostra C foi a que apresentou um maior grau de cristalinidade, porém com todas as amostras apresentando um perfil cristalino similar.

A principal diferença entre os biopolímeros quitina e quitosana, se deve à presença de um grupo funcional característico de cada composto polimérico. Enquanto a quitina apresenta em sua estrutura, na posição C2 o grupo acetamido (-NHCOCH₃), a quitosana apresenta em sua estrutura, o grupamento amino (-NH₂) em maiores quantidades e também grupos acetamidos. Além disso, ambos os polímeros apresentam estrutura química similar à celulose, sendo que na posição C2 existe o grupo hidroxila (Figura 6).

Quando o composto apresenta um número 50% maior de grupos acetamidos na cadeia polimérica, denomina-se quitina. Quando possui um teor menor que 50% de grupos acetamidos, o polímero é chamado de quitosana (KHOR & LIM, 2003; PENICHE et al., 2007).

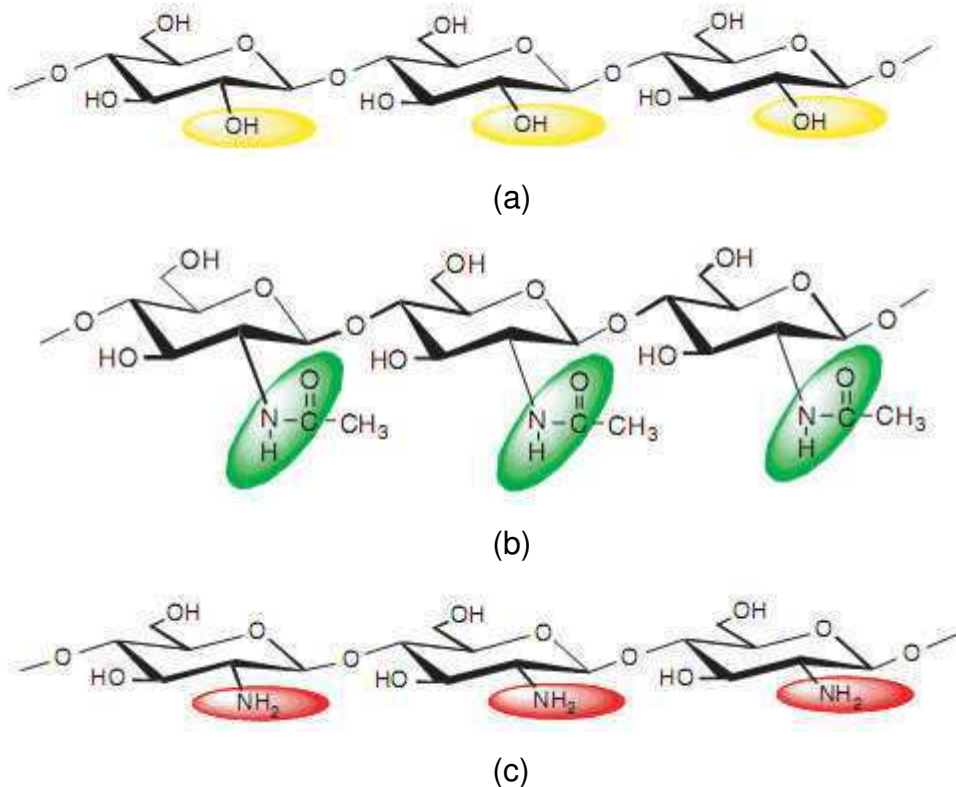


Figura 7. Diferenças estruturais entre (a) celulose; (b) quitina e (c) quitosana.
Fonte: TOKURA & TAMURA, 2007.

A porcentagem de grupos aminos presentes na cadeia polimérica é expressa como sendo o Grau de Desacetilação (GD) da quitosana, que aliado com o peso molecular, tornam-se os parâmetros mais importantes a serem estudados. Essas duas características são de extrema importância para as propriedades físico-químicas da quitosana e conseqüentemente, possui um maior efeito nas propriedades biológicas. O Grau de Desacetilação é um parâmetro fundamental, que exerce influencia nas propriedades e no comportamento dos polímeros. Em comparação com a quitina, a quitosana torna-se mais fácil de ser trabalhada, por conta de sua maior solubilidade em ácidos diluídos, dando assim, uma maior utilização para reações químicas (KHOR & LIM, 2003; HEJAZI & AMIJI, 2003; SANTOS et al., 2006).

4.3.4 Quitosana como biomaterial

A quitosana pertence a uma extensa classe de materiais que tem recebido grande interesse para aplicações médicas e farmacêuticas (Tabela 3). A quitina e a quitosana podem ser empregadas como biomateriais (Figura 8) sob a forma de filmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais ou esponjas, no tratamento de ferimentos ou queimaduras. Na área farmacêutica são bastante utilizados como carreadores de fármacos e na indústria de cosméticos; apresentam várias utilizações na agricultura e na indústria de alimentos (DALLAN, 2005; SILVA, et al., 2006; CARIDADE et al., 2009).

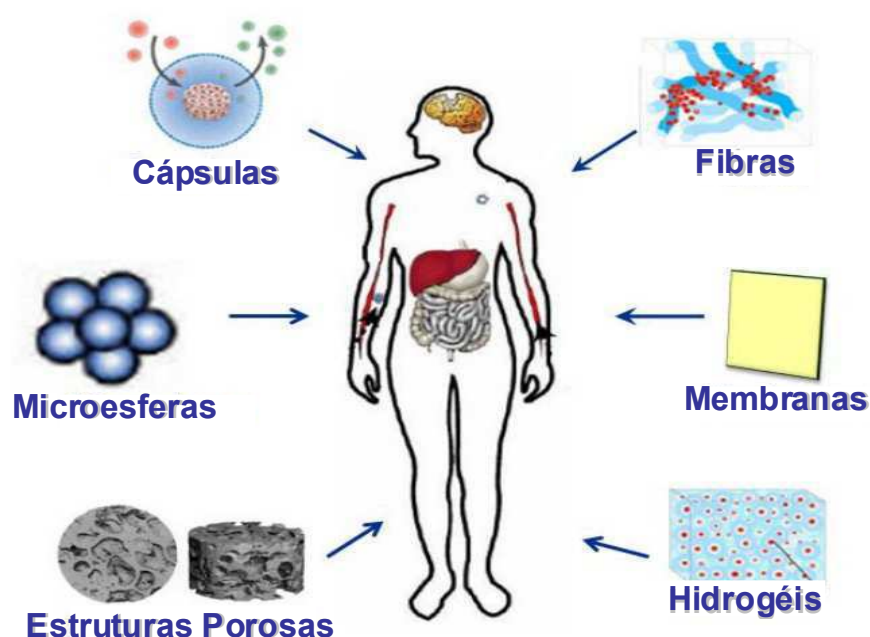


Figura 8. Diversas formas de aplicação da quitosana. Adaptado: OSÓRIO, 2007.

Tabela 3. Principais propriedades da quitosana e aplicações biomédicas.

APLICAÇÕES	PROPRIEDADES
Suturas	Biocompatível
Implantes odontológicos	Biodegradável
Pele artificial	Renovável
Reconstrução óssea	Formação de filme
Lentes de contato	Não tóxico
Liberação controlada de fármaco	Hidrolisável por lisozima
Encapsulamento	Antimicrobiano

Fonte: RINAULDO, 2006.

Tanto quitina como quitosana tem recebido nos últimos anos, grande destaque em aplicações nos campos médico e farmacêutico, motivado principalmente pelo potencial biológico que esses polímeros exibem, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e não tóxico. Além disso, outras propriedades também são bastante descritas na literatura, como analgésico, antitumorgênico, hemostático, antimicrobiana. Entretanto, um profundo conhecimento dos mecanismos dessas propriedades se faz necessário, já que são dependes das características físico-químicas do polímero. Em adição ao grau de desacetilação e o peso molecular, outras propriedades como conformação de cadeia, solubilidade e grau de substituição devem ser consideradas. A relação entre as propriedades biológicas da quitina e quitosana e as características físico-químicas são ilustradas na tabela 3 (ARANAZ et al., 2009).

Tabela 4. Relação entre propriedades biológicas e características físico-químicas da quitina e quitosana.

PROPRIEDADES	CARACTERÍSTICAS
Biodegradação	Grau de Desacetilação, Peso Molecular, Distribuição dos grupos acetil.
Biocompatibilidade	Grau de Desacetilação
Mucoadesão	Grau de Desacetilação e Peso Molecular (apenas quitosana)
Hemostática	Grau de Desacetilação e Peso Molecular
Analgésico	Grau de Desacetilação
Antimicrobiano	Peso Molecular

Fonte: ARANAZ, et al., 2009

O caráter catiônico da quitosana lhe confere características únicas. Suas propriedades filmogênica e atividade biológica atraem cada vez mais novas aplicações. Outra propriedade interessante da quitosana é a atividade antimicrobiana, devido à carga positiva na posição C2, em pH abaixo de 6, fazendo com que a quitosana fique mais estável e possuindo uma melhor

atividade antimicrobiana que a quitina (RABEA et al., 2003; MARTINO et al., 2005). Zheng e Zhu (2003) propuseram dois possíveis mecanismos para a atividade antimicrobiana da quitosana, como sendo: (1) a quitosana na superfície da célula pode formar uma membrana polimérica que impede os nutrientes de chegarem até a célula, causando deficiência celular e morte; (2) a quitosana de baixo peso molecular penetra na célula, causando distúrbios na atividade fisiológica da bactéria e consequente morte.

Outra propriedade que satisfaz o interesse da quitosana para aplicações como biomaterial, sendo também umas das principais, é o fato da quitosana ser biodegradável e bioreabsorvível. Apesar de ser ausente do organismo de todos os mamíferos, a quitosana pode ser degradada *in vitro* por algumas proteases como lisozimas, papaínas e pepsina. A biodegradação da quitosana leva à liberação de oligossacarídeos de variado comprimento, que podem ser incorporados pelas glicosaminoglicanos (GAG) e glicoproteínas, para serem metabolizados no corpo ou excretados (DOMARD & DOMARD, 2001; GEORGE & ABRAHAM, 2006; NAIR & LAURENCIN, 2007; ARANAZ et al., 2009).

Tem sido mostrado também que a biodegradação da quitosana é dependente de alguns fatores, especialmente o grau de desacetilação, o peso molecular, o grau de cristalinidade e também a forma e estado da superfície do material (DOMARD & DOMARD, 2001).

A versatilidade do biopolímero quitosana permite diversas aplicações na área dos biomateriais, nas mais variadas formas. Hong e colaboradores (2007) desenvolveram membranas de quitosana para aplicação em regeneração periodontal guiada. As membranas apresentaram boas propriedades de degradação, mantendo a integridade estrutural por um período de 5 a 6 semanas. Além disso, não apresentaram citotoxicidade, indicando assim que as membranas podem ser aplicadas na regeneração óssea guiada. Mi e colaboradores (2001) desenvolveram uma membrana de quitosana assimétrica para aplicação como curativo de feridas, com as membranas apresentando boa permeabilidade ao oxigênio, nenhuma citotoxicidade e não permitir a penetração bacteriana junto à ferida.

4.3.5 Modificação da Quitosana

Os filmes obtidos de fontes naturais e que são biodegradáveis, tem atraído atenção nos últimos anos, motivado pela preocupação com o meio ambiente.

Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicações em vários campos biomédicos, tais como, regeneração tecidual, dispositivos para liberação controlada de fármacos e sistemas de imobilização de células em gel (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

O aumento do interesse nas aplicações biomédicas da quitosana tem gerado oportunidades de produção de biomateriais especializados, principalmente com novas modificações químicas e físicas, as quais têm promovido novas atividades biológicas para fins específicos (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

Com o propósito de melhorar algumas propriedades da quitosana, algumas modificações químicas são propostas. A quitosana é mais fácil de ser processada que a quitina, porém a estabilidade da quitosana é geralmente mais baixa, devido ao seu caráter mais hidrofílico, especialmente à sensibilidade às mudanças na faixa de pH (RINAULDO, 2006).

Para controlar tanto as propriedades mecânicas quanto químicas da quitosana, várias técnicas de modificação são utilizadas. Modificações químicas na molécula da quitina, em geral, são dificultadas em razão de sua estrutura altamente cristalina, com fortes interações intra e intermoleculares (COSTA SILVA et al., 2006; RINAULDO, 2006).

Modificação de polímeros tem recebido grande atenção, principalmente pela ausência de materiais iniciadores necessários para a síntese de novos monômeros e conseqüente obtenção de novos materiais poliméricos. Uma das mais conhecidas modificações realizadas em polímeros é a reação de reticulação. É um processo pelo qual cada ligação química ocorre entre cadeias de moléculas de polímeros, podendo ser através de introdução de ligações primárias entre as cadeias ou por ligação iônica. Energias elevadas mantêm as cadeias presas e definem uma condição típica de termorrígidos. A atuação de solvente ou temperatura leva a um aumento de mobilidade, mas o

deslocamento é reduzido. Na presença de solvente, há intumescimento e não dissolução completa (ORÉFICE et al., 2006; BHATTACHARYA et al., 2009).

Além disso, as modificações químicas mantêm as características principais da quitosana, tais como as propriedades físico-químicas e bioquímicas, dependendo da natureza química do grupo introduzido (JAYAKUMAR et al., 2007).

Os efeitos da reticulação nas propriedades físicas dos polímeros são primariamente influenciados pelo grau de reticulação, a regularidade da rede formada e pela presença e ausência de cristalinidade no polímero. Para polímeros cristalinos, pode haver uma redução na cristalinidade com um baixo grau de reticulação, impedindo a orientação das cadeias. O polímero se torna mais flexível, mais elástico, tendo um baixo ponto de fusão. A principal vantagem da reticulação é o aumento da estabilidade dimensional quando aplicada uma carga e em temperaturas elevadas (RUDIN, 1999; BHATTACHARYA et al., 2009).

Polímeros naturais são frequentemente fracos em termos de resistência mecânica, mas por meio de reticulação, esses polímeros têm mostrado um aumento na estabilidade estrutural. Membranas de quitosana são frequentemente modificadas pela adição de agentes de reticulação bifuncionais, aumentando a intumescência e aperfeiçoando propriedades mecânicas em dadas aplicações (FISHER et al., 2007). A quitosana contém grupos amina e hidroxilas ativos que podem produzir pontes de hidrogênio com a água, por exemplo. Esses dois grupos funcionais fazem com que a quitosana seja modificada quimicamente. Os polissacarídeos podem ser reticulados através de reações entre os grupos hidroxila e amina da cadeia (TSAI & WANG, 2008).

Os agentes reticulantes são moléculas com pelo menos dois grupos funcionais reativos, que permitem a formação de pontes entre as cadeias poliméricas. Um dos agentes de reticulação mais empregado à quitosana são os dialdeídos, tais como o glioxal e o glutaraldeído. Entretanto, a principal desvantagem desses reagentes é que são considerados tóxicos. Por exemplo, o glutaraldeído é conhecido por ser neurotóxico e o glioxal é conhecido por ser mutagênico (BERGER et al., 2004; BEPPU et al., 2007; MARTINEZ et al., 2007).

Encontra-se vastamente na literatura trabalhos inseridos em modificações químicas de membranas de quitosana, através da inserção de reticulações, sejam elas químicas ou físicas. Vários são os métodos descritos para se obter membranas reticuladas. Porém, essas modificações são propostas para aplicações em células de combustível ou membranas para osmose reversa, para aplicação em tratamento de água residual.

Também se pode obter o polímero quitosana reticulado formando interações diretas entre as cadeias poliméricas, sem a necessidade de agentes reticulantes adicionais. Prashanth & Tharanathan (2006) estudaram esse tipo de interação através da produção de radicais livres de quitosana induzidos por uma reação com persulfato de potássio, despolimerizando a quitosana e produzindo compostos com menor peso molecular, como ilustrado na figura 9.

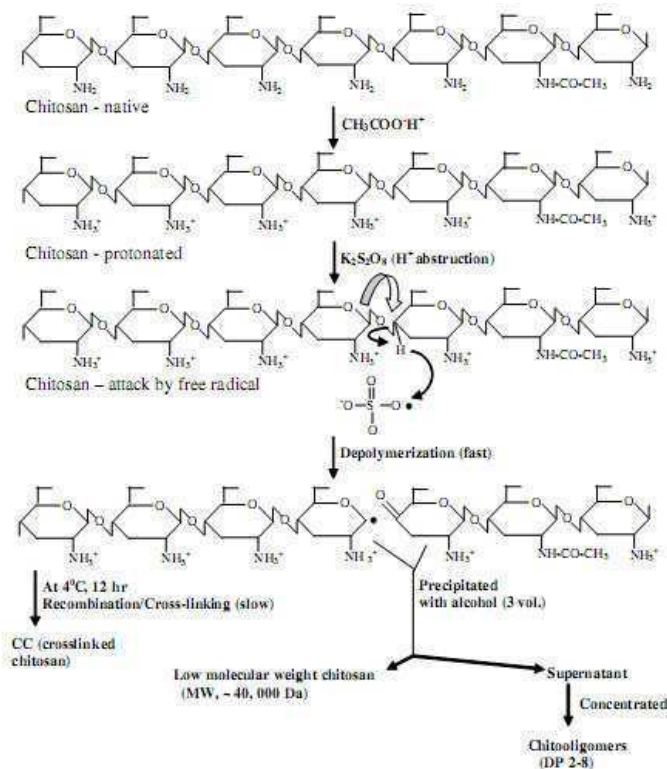


Figura 9. Representação da despolimerização da quitosana.
Fonte: Prashanth & Tharanathan (2006)

A principal limitação da aplicação de agentes reticulantes químicos é a possível presença de alguns traços livres, gerados pela não reação com o polímero, acarretando o risco de formação de produtos tóxicos por reação entre

o substrato e o agente reticulante, durante o processo de biodegradação in vivo. Um método para superar essa desvantagem e permitir as etapas de purificação e verificação antes da administração, é preparar materiais reticulados ionicamente. Assim como as reticulações covalentes requerem moléculas multifuncionais como reticulantes, as reticulações iônicas necessitam de íons multivalentes, para formar pontes entre as cadeias poliméricas (BERGER et al., 2004; CHIONO et al., 2008).

Reticulações iônicas são processos simples e rápidos. Em contraste com as reticulações covalentes, nenhuma molécula auxiliar, como catalisador, são requeridas, o que as torna de grande interesse para aplicações médicas e farmacêuticas. As reticulações iônicas podem ser obtidas pelo método clássico, através da adição do agente reticulante diretamente na solução de quitosana ou ainda, pelo simples mergulho de pedaços de filmes de quitosana na solução reticulante (BERGER, 2004; KARAKEÇILI et al., 2007).

Cui e colaboradores (2008) estudaram as interações iônicas entre membranas de quitosana e ácido sulfúrico, onde foi estabelecido o tempo ótimo para a produção de membranas reticuladas. Karakeçili e colaboradores (2007) estudaram as características de superfície de membranas de quitosana reticuladas ionicamente com ácido sulfúrico. Foi observado que mesmo após o processo de reticulação, não houve mudanças significantes na morfologia das membranas, com a topografia de superfície se tornando mais homogênea e relativamente plana.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Local da Pesquisa

A parte da pesquisa relativa à obtenção e caracterização físico-química os filmes, foi desenvolvida no Laboratório de Biomateriais, localizada no Laboratório de Engenharia de Materiais, na Universidade Federal de Campina Grande – UFCG. Os ensaios relativos aos testes biológicos foram desenvolvidos no Laboratório de Bioquímica e Cultura Celular – LBCC, do Centro de Química da Madeira / CQM, localizada na Universidade da Madeira / Uma, Funchal / Ilha da Madeira / Portugal.

5.2 Materiais e reagentes

Para a obtenção dos filmes de quitosana, foram utilizadas béquer de 500 mL, agitador magnético, funil de buchner, kitassato, bomba de vácuo e estufa de secagem de materiais. Quitosana na forma de pó, com grau de desacetilação 98,15%, foi adquirida da empresa Polymar Indústria, Comércio, Importação e Exportação Ltda. Ácido Acético P.A., Hidróxido de Sódio P.A. e Ácido Sulfúrico P.A. foram todos adquiridos da empresa Vetec Química Fina Ltda. A água destilada foi obtida no Laboratório de Materiais, da Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais/UFCG.

5.3 Procedimento experimental

5.4.1. Obtenção dos filmes

Os filmes de quitosana foram preparados pelo método de evaporação de solvente (Figura 10), através da dissolução do polímero em uma solução de ácido acético (2% v/v), para uma concentração final da solução polimérica 1% (m/v), sob agitação magnética por um período de 24 horas. Em seguida, filtração a vácuo foi aplicada para remoção de substâncias insolúveis. Após a filtração, a solução foi vertida em placas de Petri com diâmetro de 11 cm, com um volume final em cada placa de 30 mL de solução. As Placas Petri foram colocadas em estufa, com uma temperatura constante de 50 °C, por um período de 24 horas para evaporação completa do solvente. Uma solução de Hidróxido de Sódio 1mol/L foi adicionada aos filmes, ainda dentro das placas,

por um período de 2 horas, para completa remoção de resíduos ácidos. Após a reação alcalina, os filmes foram imersos em água destilada (2 Litros por membrana) para eliminação do excesso de base. Após um período de 48 horas imersas em água destilada, os filmes foram submetidos a estiramento e secagem em moldes cerâmicos circulares, a temperatura controlada de 25 °C, por 24 horas.

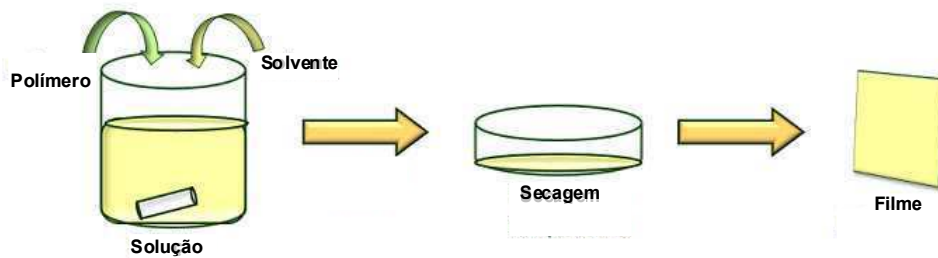


Figura 10. Preparação de filmes de quitosana.
Fonte: Osório, 2007.

5.4.2 Reação de reticulação das membranas

Depois do processo de estiramento e secagem, as membranas foram reticuladas por imersão em solução diluída de ácido sulfúrico 0,01 mol/L. Foram estabelecidos os tempos de 5, 15, 30, 60 e 90 minutos para analisar o comportamento e posteriores caracterizações (Figura 10). Após os tempos de exposição, todas as amostras foram lavadas com água destilada até atingir pH neutro.

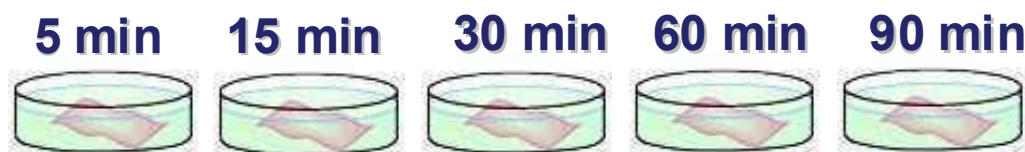


Figura 11. Processo de reticulação dos filmes de quitosana.

5.4.3 Avaliação da citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade representam a fase inicial dos testes de biocompatibilidade de potenciais biomateriais e dispositivos médicos. É proposto para atuar como um método confiável, conveniente e reprodutível para detectar, em uma etapa inicial, morte celular ou danos mais sérios nas

funções celulares. A citotoxicidade é claramente diferente de fatores físicos que afetam a adesão celular (carga de superfície do material, hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, etc.). Os ensaios de citotoxicidade podem ser aplicados de duas maneiras diferentes: teste direto e indireto. Esses ensaios diferem principalmente na maneira que cada material é exposto ao contato celular. Para o teste direto, os materiais são colocados em contato direto com as células, onde geralmente é semeada uma suspensão celular na superfície do material. Já para o teste indireto, são produzidos extratos dos materiais, que são colocados em contato com a monocamada celular. Esse tipo de teste é importante para a detecção de substratos lixiviáveis, que podem exercer efeitos tóxicos para as células (ANDERSON et al., 2004; OSORIO, 2007; KEONG & HALIM; 2009).

Para os ensaios de citotoxicidade, a linha celular NIH 3T3, com passagem 162, cedidas gentilmente pelo Instituto de Engenharia Biomédica - INEB, foram cultivadas com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) com glicose e GLUTAMAX-I, contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO). Para realizar a subcultura das células, uma solução de tripsina foi adicionada na placa de cultura celular. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram cultivadas em uma placa de 96 poços, com uma densidade celular de 10.000 células/poço.

Para os ensaios de citotoxicidade, foi empregado o método de contato indireto, através de preparação de extratos dos filmes de quitosana. Esse procedimento avalia o potencial efeito tóxico que possíveis substâncias liberadas pelos filmes. Foram utilizados filmes de quitosana puro e cinco reticulados com solução de ácido sulfúrico, com diferentes tempos de reação. Foram previamente esterilizados por imersão em etanol 70% por 2 horas, com seguidas lavagens com PBS estéril, para remoção do excesso de etanol nos filmes.

5.4.4 Avaliação da Adesão Celular

Para os ensaios de adesão celular, os filmes de quitosana, puro e reticulados, foram preparados diretamente nas placas de cultura celular de 24

poços. Para os estudos de adesão celular, os filmes de quitosana foram esterilizados com solução de pen/strep (200 μ L/poço).

A linha celular NIH 3T3, com passagem 169, cedidas gentilmente pelo Instituto de Engenharia Biomédica - INEB, foi cultivadas com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) com glicose e GLUTAMAX-I, contendo 10% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO). Para realizar a subcultura das células, uma solução de tripsina foi adicionada na placa de cultura celular.

A linha celular HFF 1, com passagem 6, cedidas gentilmente pelo Instituto de Engenharia Biomédica - INEB, foi cultivadas com DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, GIBCO) com glicose e GLUTAMAX-I, contendo 15% de soro fetal bovino (GIBCO) e 1% de antibiótico/antimicótico (GIBCO). Para realizar a subcultura das células, uma solução de tripsina (0,25%) foi adicionada na placa de cultura celular.

5.5 Métodos

5.5.1 Difração de Raios X (DRX)

Uma das principais características dos materiais reticulados é a mudança do estado cristalino para o estado amorfo. A difração de Raios X foi aplicada para comprovar a efetiva reticulação do polímero, através da mudança do perfil organizacional das moléculas. As amostras foram submetidas à análise por difração de raios X (DRX) em um difratômetro SHIMADZU (modelo XRD 6000) com varredura angular $5^{\circ} < 2\theta < 35^{\circ}$, na montagem de Bragg-Brentano, sistema θ - 2θ , utilizando-se radiação de Cu ($k\alpha_1$) com varredura no passo de 0,02 (2θ), com intervalo de 0,5 segundo para cada amostra. As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG.

5.5.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Com a técnica de espectroscopia de infravermelho, foi observada a interação quitosana/ácido sulfúrico, através de mudanças significativas no espectro dos filmes. As amostras de quitosana foram caracterizadas por espectroscopia na região do infravermelho com Transformada de Fourier realizada em um espectrômetro AVATAR TM 360 ESP Nicolet (UAEMa/CCT/UFCG) e com varredura de 4000 a 400 cm^{-1} , sem a necessidade de preparação de pastilhas de KBr, já que todas as amostras estavam no estado sólido. As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG.

5.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação (até 300.000 X) e resolução. A microscopia eletrônica fornece informação morfológica e topográfica sobre superfícies de sólidos, necessária para se entender o comportamento de superfícies. Os filmes reticulados e não reticulados de quitosana foram caracterizados morfolologicamente por microscopia eletrônica de varredura utilizando um microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI (UAEMa/CCT/UFCG). As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG.

5.5.4 Espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X (EDX)

O EDX é um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica de materiais, no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios-X emitido pela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos ($< 5 \mu\text{m}$), permitindo uma análise quase que pontual. Os filmes reticulados e não reticulados de quitosana

foram caracterizados utilizando um microscópio eletrônico de bancada, modelo TM 1000 HITACHI (UAEMa/CCT/UFCG). As análises foram realizadas no laboratório de Caracterização de Materiais da UFCG.

5.5.5. Tensão Superficial

A energia superficial e o caráter hidrofílico/hidrofóbico foram avaliados pela medida da tensão superficial em equipamento desenvolvido e instalado no laboratório de caracterização da UAEMa/CCT/UFCG (Figura 12). A imagem foi capturada por uma câmara digital e remetida a um microcomputador que através de um software fez a conversão do ângulo da interface líquido-material em unidade de tensão interfacial e essa medida do ângulo de contato foi utilizada para caracterizar a molhabilidade das superfícies.

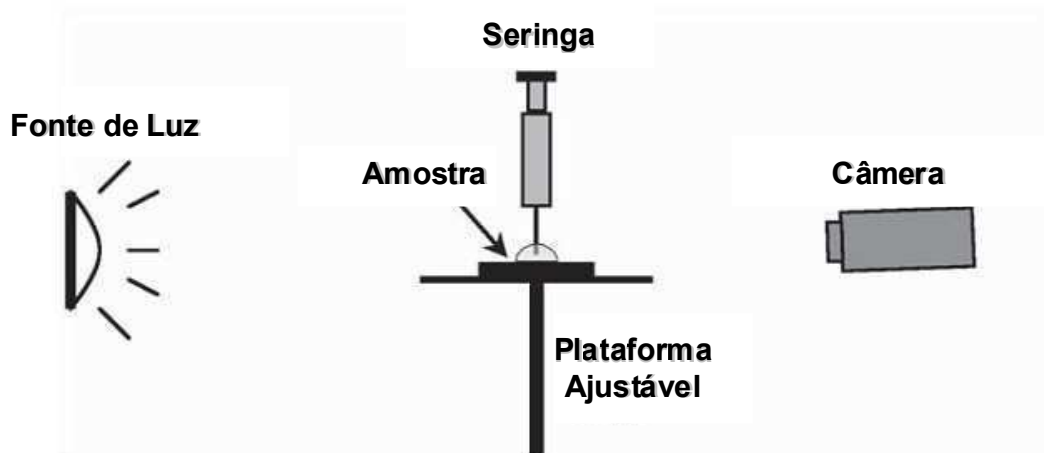


Figura 12. Aparelho de tensão superficial Fonte: CAO et al., 2004.

A medida por ângulo de contato possui um grande potencial de aplicação. Ela pode ser mensurada em um nível macroscópico para caracterizar a molhabilidade média dos materiais (DECKER et al., 1999).

5.5.6. Ensaio de citotoxicidade

Para preparação dos extratos, os filmes foram imersos em PBS estéril (500 μ L / Poço), em placas de cultura celular (n=3 para cada amostra), com incubação por sete dias a 37 °C / 5% CO₂, sem agitação. Após o período de

incubação, os extratos foram recolhidos das placas e vertidos em eppendorfs. Diversas diluições foram realizadas com os extratos dos filmes, puro e reticulados (1:100, 1:20, 1:10, 1:5, 1:2).

A citotoxicidade dos filmes de quitosana foi avaliada através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução da rezasurina, que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura (PERROT et al., 2003; SANTOS, 2009). As células NIH 3T3 foram semeadas em placas de 96 poços, com uma densidade celular de 10.000 células/poço, e cultivadas com 100 µL de meio de cultura, por um período de 24 horas para confluência. Células cultivadas diretamente sobre a superfície da placa de cultura celular foram utilizadas como referência. Após as 24 horas, o meio foi removido e 80 µL de DMEM foram adicionados. 20 µL dos extratos, com todas as diluições, com cinco repetições para cada amostra, foram adicionados nos poço. A cada dois dias, o preparo (meio + extrato) era trocado, até um período final de sete dias para avaliação. Ao final dos sete dias, o meio antigo foi trocado por um novo meio, desta vez contendo 10% de rezasurina, seguido de incubação por 3 horas a 37 °C / 5% CO₂. Após o período de 3 horas, 100 µL do meio foi retirado e a fluorescência da resofurina foi medida em um leitor modelo Victor³ 1420, PerkinElmer.

5.5.7. Adesão celular

Para os ensaios de adesão celular, as células NIH 3T3 foram cultivadas diretamente sobre os filmes em uma placa de 24 poços, com uma densidade celular de 40.000 células/poço, nos seguintes tempos: 1h, 4h, 12h, 24h e 48h. A adesão celular foi avaliada através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução da rezasurina, que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura (PERROT et al., 2003; SANTOS, 2009). Células cultivadas diretamente sobre a superfície da placa de cultura celular foram utilizadas como referência. Seguido de cada tempo de contato, o meio foi removido, seguido de lavagem com PBS estéril, para remoção das células não aderidas à superfície polimérica, e 550 µL de DMEM + resazurina foi

adicionado em cada poço, seguido de incubação por 3 horas a 37 °C / 5% CO₂. Passado o período de 3 horas, 100 µL do meio foi retirado e a fluorescência da resofurina foi medida em um leitor modelo Victor³ 1420, PerkinElmer.

Para os ensaios de adesão celular, as células HFF 1 foram cultivadas diretamente sobre os filmes em uma placa de 48 poços, com uma densidade celular de 25.000 células/poço, nos seguintes tempos: 4h, 8h e 24h. A adesão celular foi avaliada através da determinação da porcentagem da viabilidade celular, utilizando o método da redução da rezasurina, que estabelece uma correlação entre a atividade metabólica celular e o número de células viáveis em cultura (PERROT et al., 2003; SANTOS, 2009). Células cultivadas diretamente sobre a superfície da placa de cultura celular foram utilizadas como referência. Seguido de cada tempo de contato, o meio foi removido, seguido de lavagem com PBS estéril, para remoção das células não aderidas à superfície polimérica, e 550 µL de DMEM + resazurina foi adicionado em cada poço, seguido de incubação por 3 horas a 37 °C / 5% CO₂. Passado o período de 3 horas, 100 µL do meio foi retirado e a fluorescência da resofurina foi medida em um leitor modelo Victor³ 1420, PerkinElmer.

5.5.8 Análise Estatística

Análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad prism 5.0, utilizando ANOVA ($p < 0.05$) com Boferroni Post Hoc test.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os filmes de quitosana foram obtidos através da técnica de evaporação de solvente. As reticulações foram introduzidas nos filmes de quitosana através de imersão dos filmes em soluções de ácido sulfúrico, com cinco diferentes tempos de reação.

A primeira fase foi constituída pela caracterização físico-química dos filmes reticulados, para observar se houve efetiva interação entre o agente reticulante e os filmes poliméricos. Filmes não reticulados foram utilizados como controle, para efeito de comparação.

6.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho obtidos dos filmes de quitosana não reticuladas e reticuladas estão apresentados nas Figuras 13 e 14.

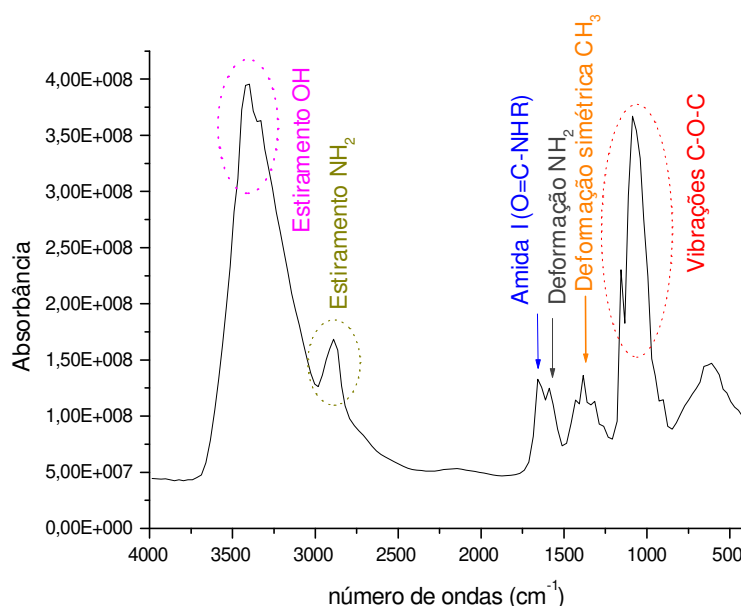


Figura 13. Espectro de infravermelho do filme de quitosana pura

De acordo com o espectro formado, pode-se observar na Figura 13, que a quitosana não é 100% desacetilada, confirmado através da banda encontrada na região de 1658 cm^{-1} , característica de uma amida I ($\text{O}=\text{C}-\text{NHR}$). Ainda exibe uma banda forte e larga na região de 3409 cm^{-1} com o aparecimento de um

ombro em 3340 cm^{-1} , que são atribuídas a uma sobreposição nos estiramentos dos grupos funcionais OH e NH_2 , devido às pontes de hidrogênio formadas na cadeia polimérica (KARAKEŞILI, et al., 2007; TSAI & WANG, 2008; OSTROWSKA-CZUBENKO & GIERSZEWSKA-DRUŻYŃSKA, 2009).

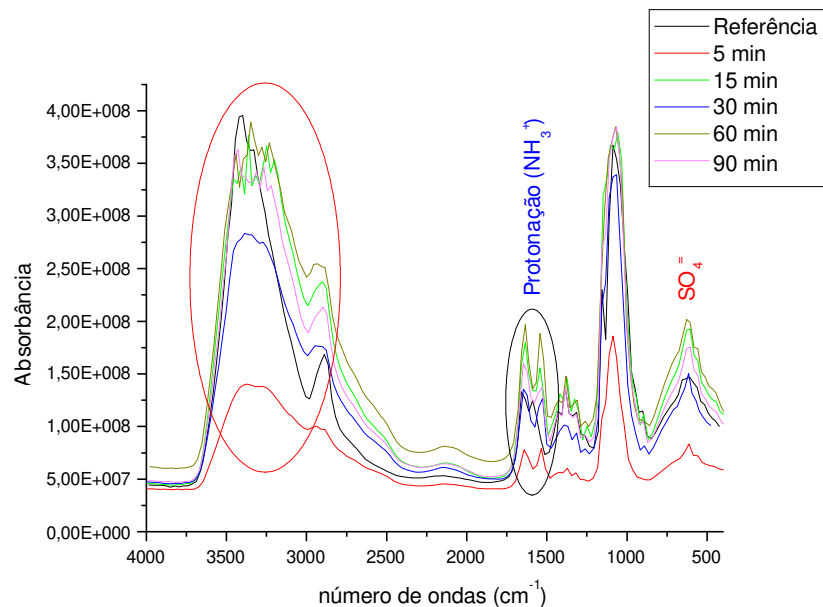


Figura 14. Espectro de infravermelho dos filmes de quitosana reticuladas.

À medida que aumenta o tempo de reação de reticulação nas amostras (Figura 14), alterações podem ser observadas, caracterizando o processo de reticulação em bandas específicas: na região de 1592 cm^{-1} referente à deformação NH_2 , a intensidade da banda começa a enfraquecer, devido à protonação com os íons H^+ liberados pela dissociação do ácido. Comportamento semelhante é observado nas bandas encontradas entre 3000 e 3500 cm^{-1} , com um claro alargamento na base da banda localizada na região de aproximadamente 2900 cm^{-1} . Com esse alargamento, pode-se admitir uma diminuição da intensidade das pontes de hidrogênio, evidenciando assim a formação de reticulações, já que as pontes de hidrogênio contribuem para a formação da estrutura cristalina da quitosana. Finalmente, a presença dos grupos sulfatos ratificou, por absorção na região de 614 cm^{-1} , comprovando assim, a efetiva reação de reticulação dos filmes de quitosana.

6.2 Difração de Raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X obtidos dos filmes de quitosana não reticuladas e reticuladas estão apresentados nas Figuras 15 e 16, respectivamente.

De acordo com o difratograma obtido do filme de quitosana não reticulada (Figura 15), pode-se observar um comportamento típico de polímeros semicristalinos, com picos de base largas que são encontrados em $2\theta = 10^\circ$ e $2\theta = 20^\circ$.

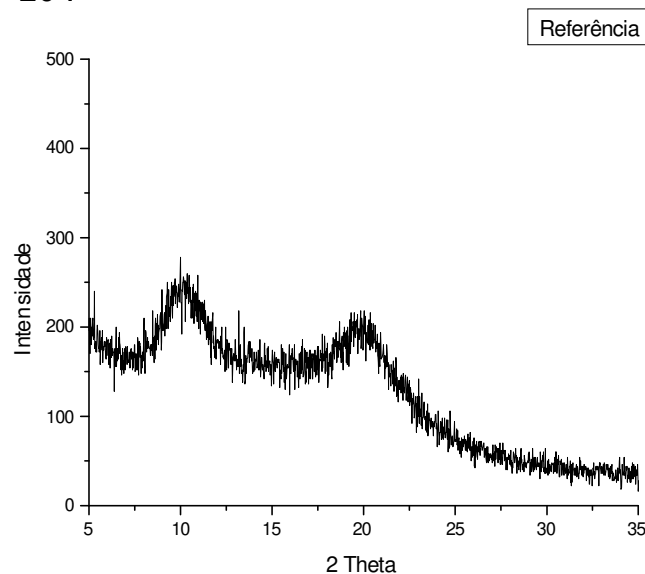


Figura 15. Difratograma do filme de quitosana pura.

A quitosana possui um perfil semicristalino devido às fortes interações intra e intermoleculares, caracterizado pelas pontes de hidrogênio formadas entre os grupos amina, álcool, amida e outros grupos funcionais presentes na molécula de quitosana. Essas fortes interações fornecem certa organização à estrutura cristalina da quitosana (Uragami & Tokura; 2006; Ostrowska-Czubenko & Gierszewska-Drużyńska, 2009).

Assim como mostrado nos gráficos de infravermelho, os difratogramas das amostras reticuladas (Figura 16) comprovam a efetiva reação de reticulação entre o filme de quitosana e ácido sulfúrico, devido à diminuição da intensidade dos picos apresentados do filme não reticulado. Além disso, observando os resultados, nota-se que, para os tempos de 15 e 30 minutos, houve uma maior diminuição do perfil semicristalino dos filmes. Contudo, nos filmes reticulados nos tempos 60 e 90 minutos, ocorreu um discreto aumento

na cristalinidade, conduzindo a um espectro similar à condição pura (figura 16). tal comportamento não foi observado. Estes resultados foram evidenciados na análise por espectroscopia por Energia Dispersiva de raios X. Como as reticulações iônicas são caracterizadas por produzir ligações reversíveis no sistema, e com o aumento de tempo de exposição dos filmes de quitosana à solução de ácido sulfúrico, houve uma saturação de íons H^+ , produzidos pela dissociação do ácido. Essa saturação provocou um deslocamento no sentido do equilíbrio químico da reação, com os íons H^+ capturando os íons SO_4^{2-} .

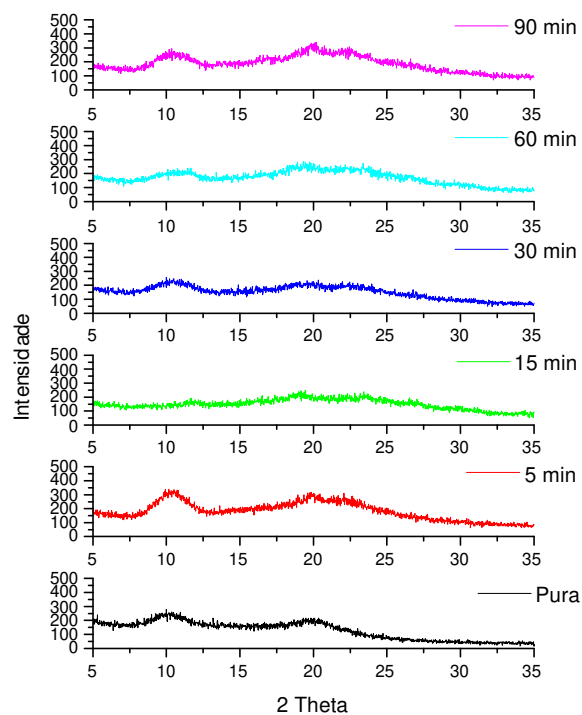


Figura 16. Difratoograma de filmes de quitosana puro e reticulados.

Essa diminuição da intensidade dos picos cristalinos da quitosana se justifica pela incorporação dos íons sulfatos entre as cadeias do polímero. Com isso, o íon sulfato bloqueia a formação de pontes de hidrogênio (Figura 17), traçando assim um perfil de polímeros reticulados, ou seja, polímeros com baixa ou nenhuma cristalinidade.



Figura 17. Estrutura do filme de quitosana reticulado.
Fonte: KARAKEŞILI, et al., 2007

6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

Os espectros de infravermelho obtidos dos filmes de quitosana não reticuladas e reticuladas estão apresentados nas Figuras 18, 19, 20, 21, 22 e 23, respectivamente.

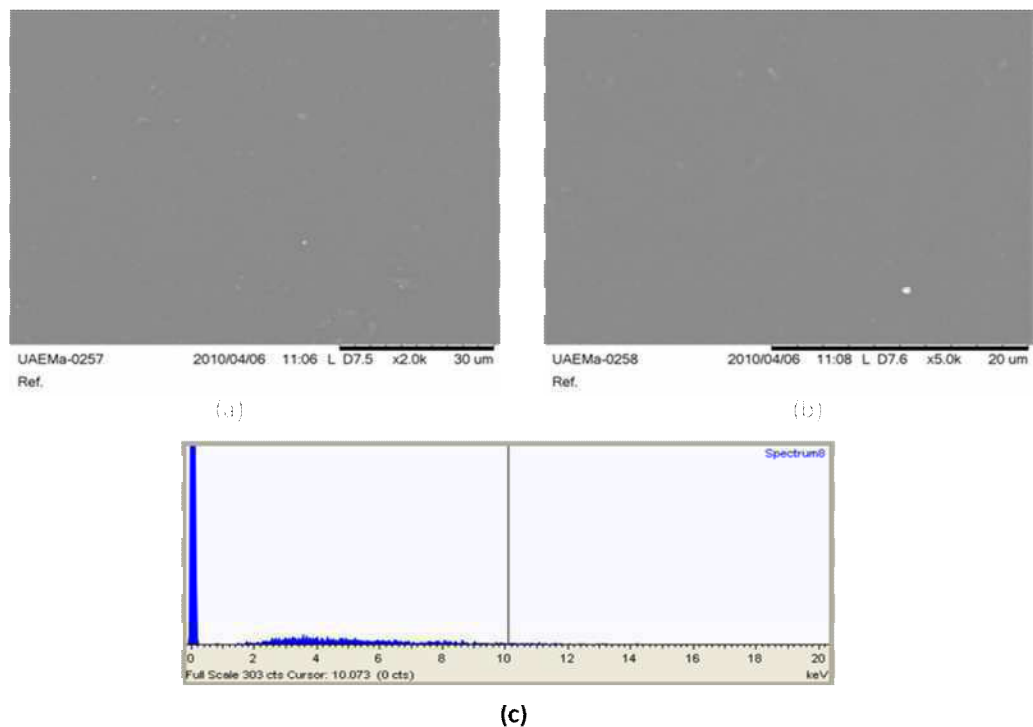


Figura 18. MEV e EDX dos filmes puros de quitosana: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X.

Ao analisar a morfologia do filme de quitosana puro (sem a introdução de reticulações), observa-se uma superfície lisa e plana, sem a presença de poros, caracterizando os filmes como densos. Marreco e colaboradores (2004) e Dallan (2005) também estudaram a morfologia de filmes densos de quitosana e encontraram uma superfície plana e densa.

Ao observar os resultados da espectroscopia dispersiva de raios X para os filmes puros de quitosana, não foi encontrada nenhum material considerado como uma impureza, comprovando ainda que o filme não possui reações de reticulação.

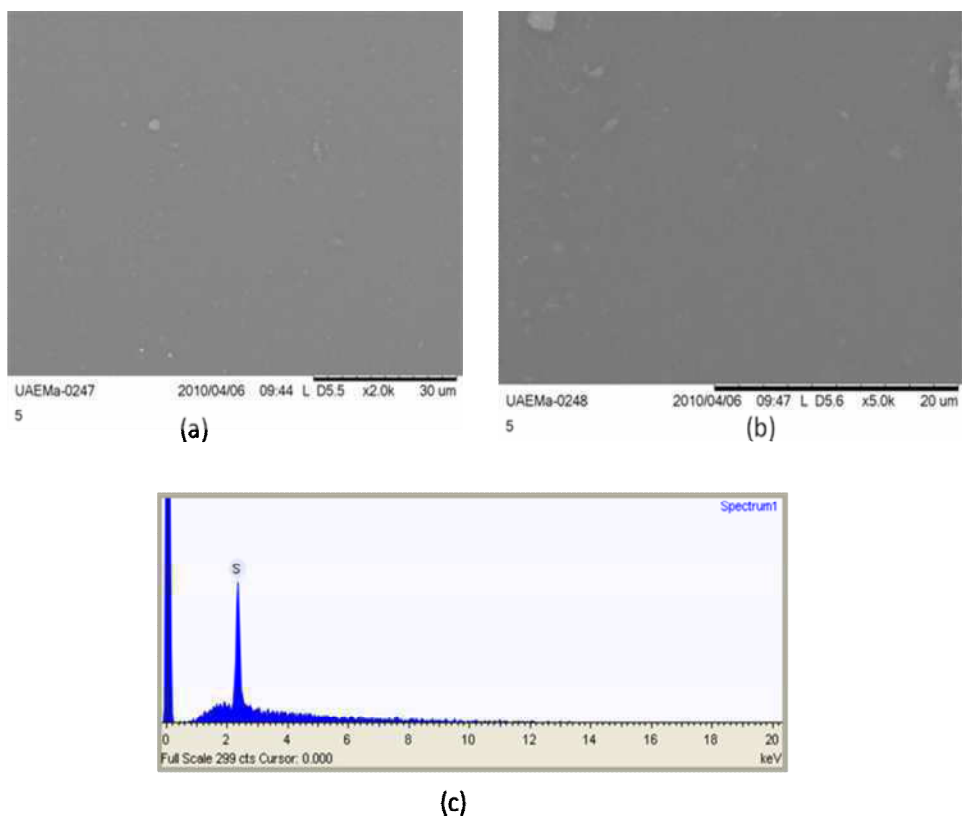


Figura 19. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 5 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X.

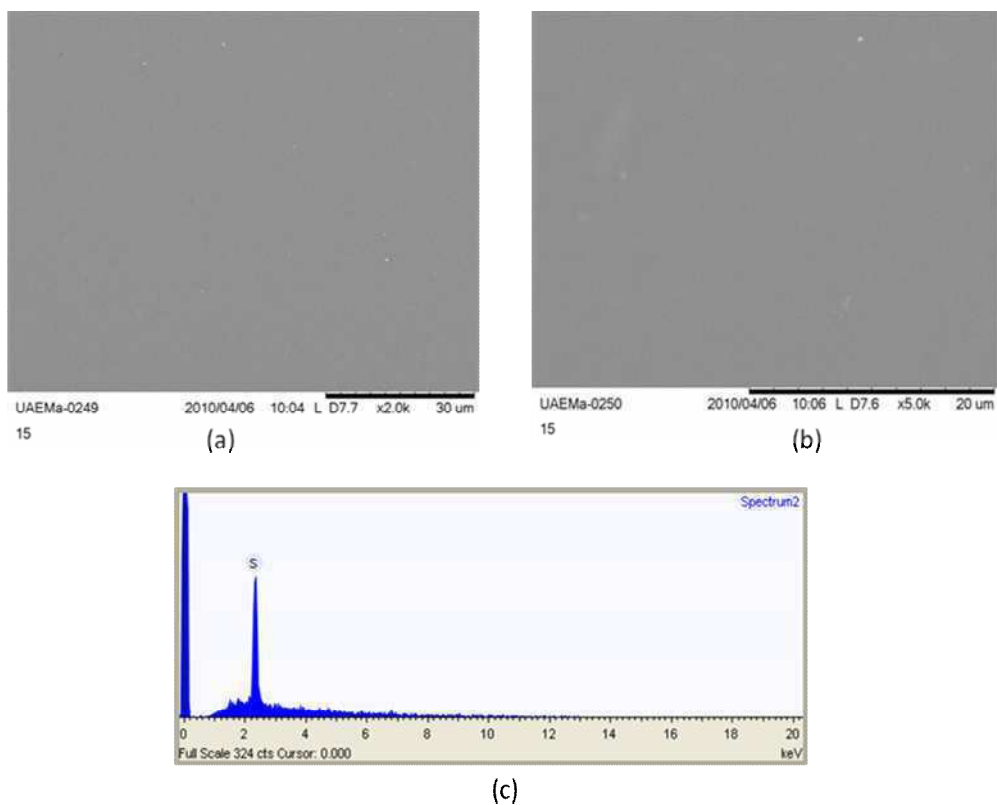


Figura 20. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 15 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X.

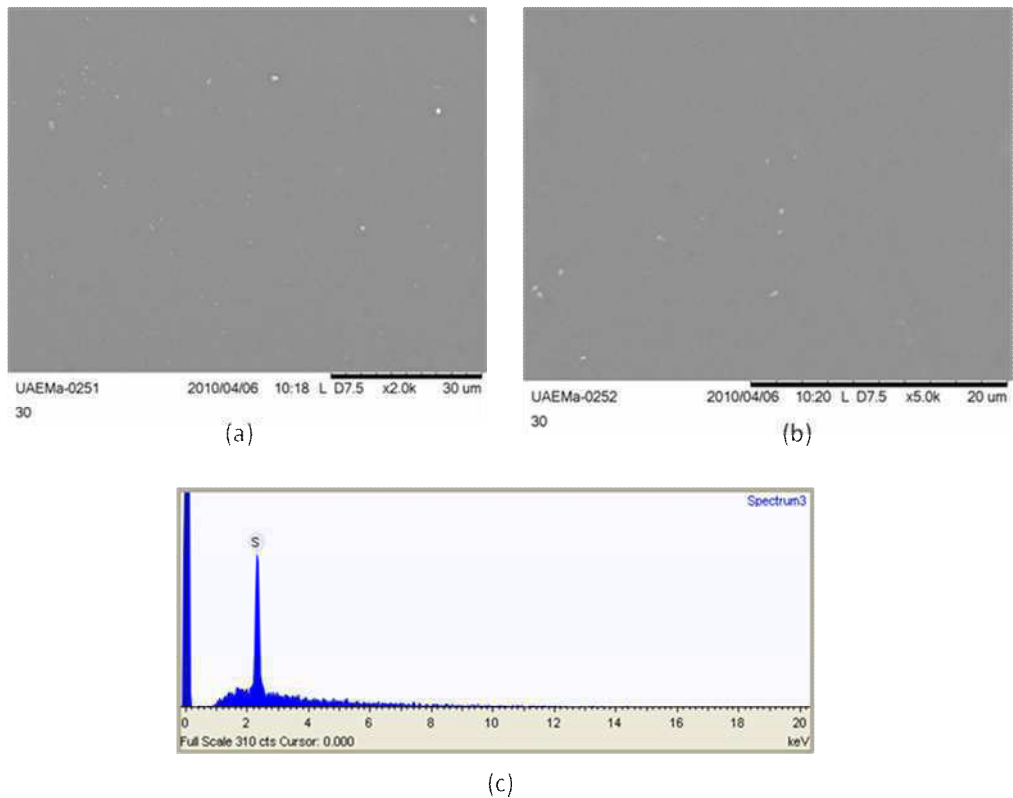


Figura 21. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 30 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X.

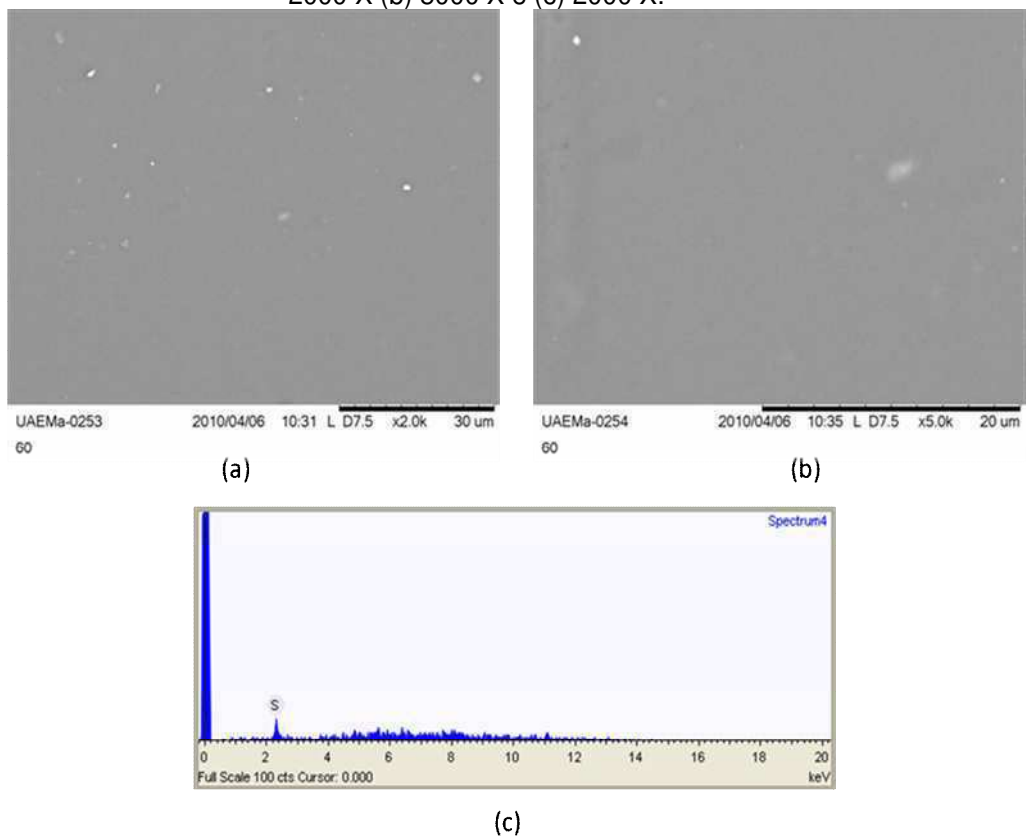


Figura 22. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 60 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X

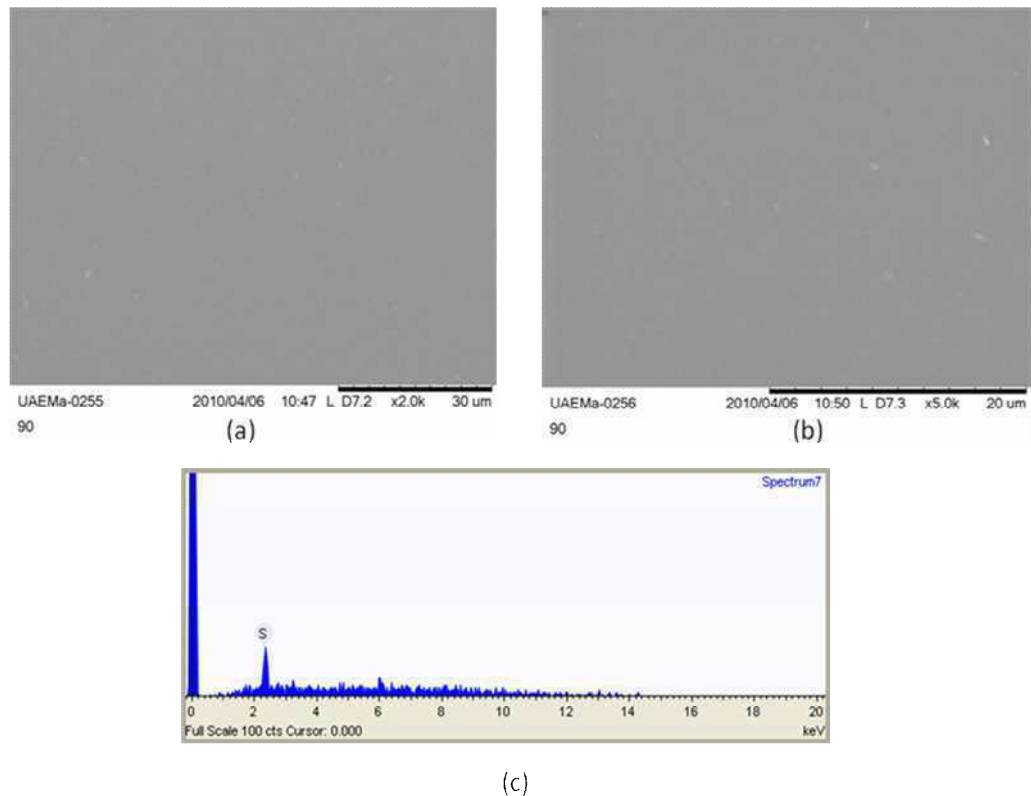


Figura 23. MEV e EDX dos filmes reticulados de quitosana com 90 minutos de reação: (a) 2000 X (b) 5000 X e (c) 2000 X

Mesmo após as reações de reticulações, nenhuma diferença significativa foi observada na microestrutura dos filmes.

Com as análises de espectroscopia dispersiva de raios x para os filmes reticulados ionicamente, nos tempos de 5, 15, 30, 60 e 90 minutos, foram observados a presença do enxofre nos filmes. Contudo, para os tempos de 60 e 90 minutos de reação foram encontrados quantidades de íons enxofre baixas, em relação aos outros tempos de reação, corroborando com os resultados já discutidos de infravermelho e difração de raios X.

6.4 Tensão Superficial

As análises de ângulo de contato foram efetuadas com o gotejamento de água destilada na superfície do filme, com posterior análise das medidas dos ângulos formados pela bolha de água no filme, com software próprio do Grupo de Biomateriais.

Com as análises de ângulo de contato (Figura 24), foi observado que o filme não reticulado de quitosana apresentou uma medida de ângulo de contato

acima de 50°. Ainda, foram observados que com a introdução das reticulações nos filmes de quitosana, houve uma diminuição nos valores de ângulo de contato.

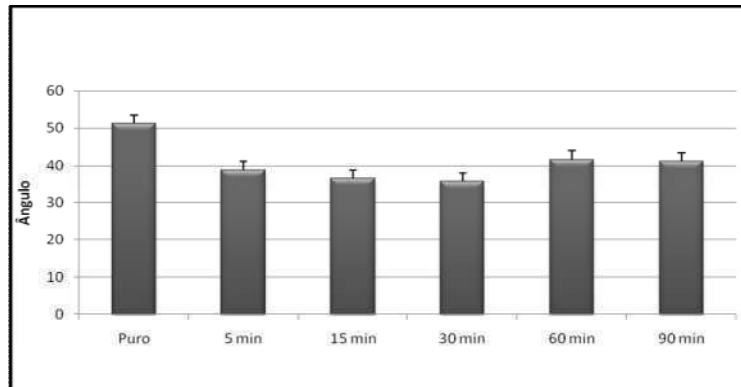


Figura 24. Medidas de ângulo de contato para os filmes de quitosana puro e reticulado.

Um baixo ângulo de contato indica um maior perfil hidrofílico, e esses resultados indicam que o ácido sulfúrico, como agente reticulante, aumentou o perfil hidrofílico dos filmes reticulados, com todos os valores abaixo da medida do filme puro, utilizado como controle. Analisando ainda os resultados, os ângulos de contato mais baixos foram encontrados para as amostras com 15 e 30 minutos de reação, indicando assim uma maior reação de reticulação nesses filmes.

6.5 Testes Biológicos

Os testes de citotoxicidade são um importante aspecto dos biomateriais. Um biomaterial não deve liberar nenhum produto tóxico ou produzir reações adversas, as quais podem ser avaliadas por testes citotóxicos *in vitro* (LI et al., 2009).

Um teste ideal para a determinação da viabilidade celular deve ser simples, rápido, eficaz, segura e de baixo custo. Além de, obviamente, não interferir com o material a ser testado. A resazurina é um corante azul que tem sido empregado como um indicador da viabilidade celular em vários tipos de ensaios citotóxicos e de proliferação celular. A quantificação celular baseada na resazurina possui vantagens, como a rapidez, segurança, confiabilidade e

baixo custo. Quando em contato com as células, o metabolismo celular transforma, através de uma reação de oxiredução (Figura 25), a resazurina (composto de cor azul e que não emite sinal de fluorescência) para a resofurina (composto de cor rosa e que emite sinal de fluorescência). Essa transformação exibe uma forte emissão de sinal de fluorescência, com valores acima de 550 nm. Esse teste tem sido aplicado como um indicador fluorométrico para a determinação da viabilidade celular (WANG et al., 1998; O'BRIEN et al., 2000; PERROT et al., 2003)

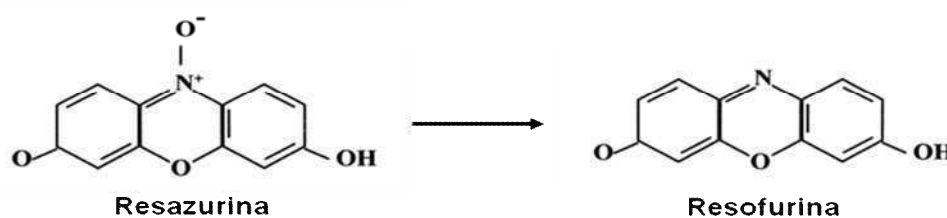


Figura 25. Reação de oxiredução da resazurina via metabolismo celular.

Fonte: O'Brien et al., 2000.

6.5.1 Ensaio de citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade para as diversas diluições dos extratos, preparados a partir dos filmes de quitosana reticulados e não reticulados estão expressos na Figura 26. As amostras foram denominadas de A, B, C, D, E e F para as seis situações (puro, 5, 15, 30, 60 e 90 minutos, respectivamente).

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método da redução da resazurina. Ao observar o gráfico, a atividade metabólica celular para todas as diluições apresentou valores acima de 80%, e que estatisticamente ($p < 0,05$), não houve diferenças significativas. Com isso, pode ser considerado que nenhuma amostra apresentou caráter citotóxico em contato com as células NIH 3T3. Isso permite afirmar que, nenhum dos filmes de quitosana libera produtos que se apresentem tóxicos em contato com as células.

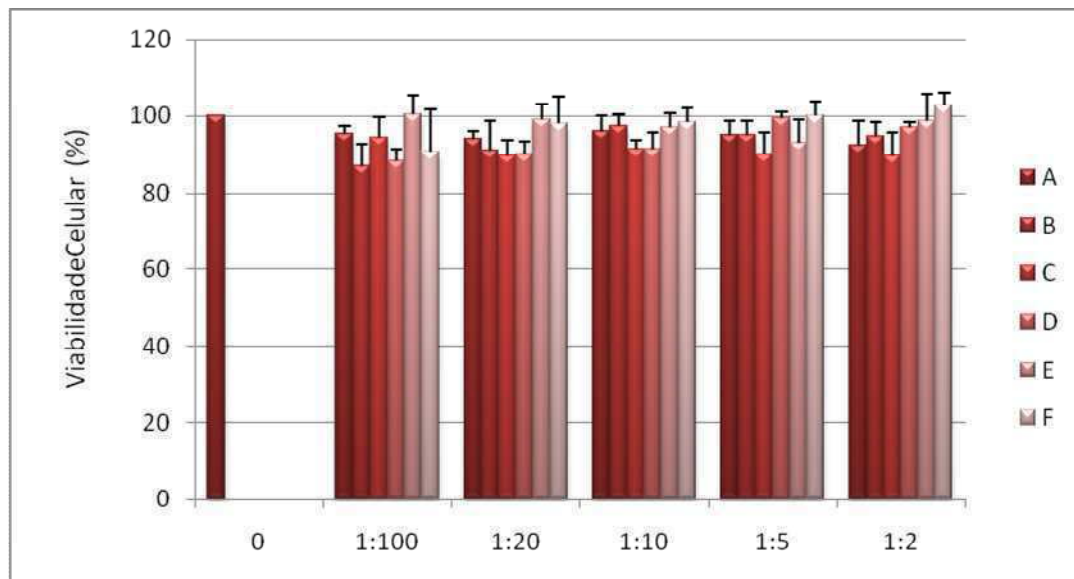


Figura 26. Atividade metabólica celular em contato com os extratos de filmes de quitosana.

6.5.2 Adesão Celular

A interação entre a superfície de um biomaterial e células vivas desempenham um importante papel nos implantes médicos e engenharia de tecidos (TREMEL et al., 2009). O comportamento celular nos materiais é o fator chave de avaliação da citocompatibilidade de um novo biomaterial. Adesão celular, propagação, proliferação e diferenciação são reações seqüenciais que seguem a após a semente das células e são etapas cruciais para estimar a sobrevivência ótima das células em novos biomateriais (BETTINI et al., 2008).

Para a avaliação da adesão celular nos filmes de quitosana, reticulados e não reticulados foram empregados duas linhas celulares fibroblásticas diferentes. A linha celular NIH 3T3, de ratos e a linha celular humana HFF 1.

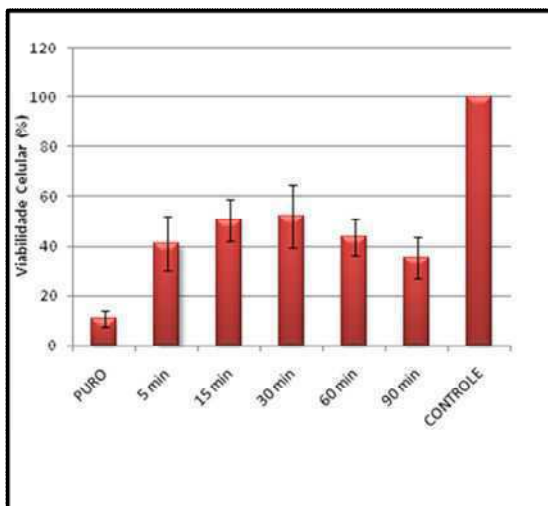
6.5.2.1 Linha celular NIH 3T3

Os resultados dos ensaios de adesão celular com a linha celular NIH 3T3 estão ilustrados na figura 27.

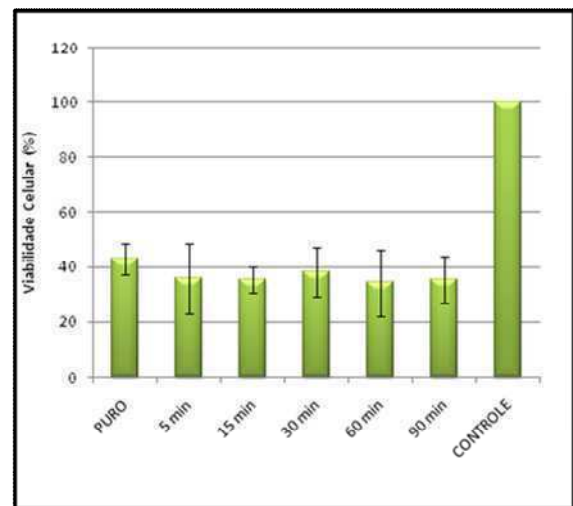
A adesão celular nos filmes de quitosana, puro e reticulados, foi medida através de contato direto entre a superfície dos filmes e a suspensão celular, com tempos de contato estabelecidos em 1, 4, 24 e 48 horas, com a placa de cultura celular sendo utilizada como controle positivo. A adesão celular foi

medida através da medida de viabilidade celular, utilizando o método da redução da resazurina.

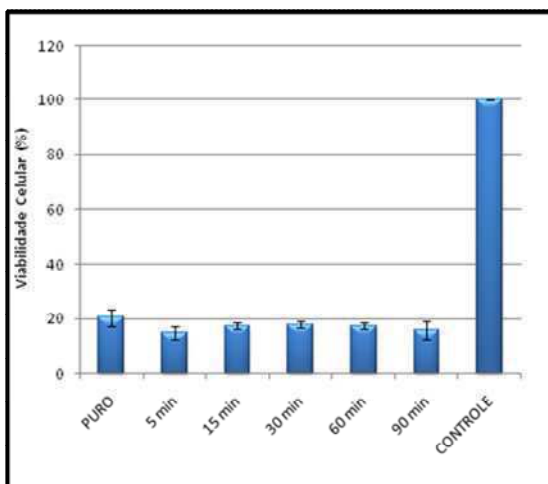
Os resultados apresentaram valores bem abaixo dos valores apresentados pelo controle positivo, com valores estatisticamente menores do que os apresentados pelo controle ($p < 0,05$), para todos os ensaios.



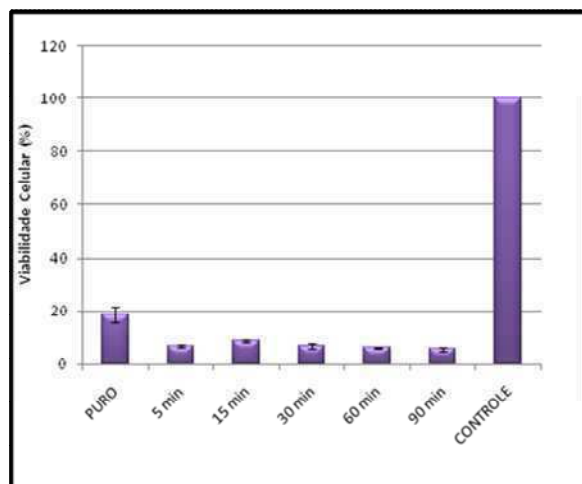
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 27. Resultados dos ensaios de adesão celular: (a) 1 hora, (b) 4 horas, (c) 24 horas e (d) 48 horas.

Para o tempo de contato de 1 hora, os filmes reticulados ionicamente, apresentaram valores de viabilidade celular maiores que o apresentado pelo filme de quitosana puro, com diferenças estatísticas significativas. Já para o tempo de exposição de 4 horas e 24 horas, nenhuma diferença estatística

significativa ($p < 0,05$) foi observada entre os filmes reticulados e o filme puro. Entretanto, para 48 horas, todos os valores de viabilidade foram abaixo do encontrado com o filme puro.

6.5.2.2 *Linha celular HFF 1*

Os resultados dos ensaios de adesão celular com a linha celular HFF 1 estão ilustrados na Figura 28.

A adesão celular nos filmes de quitosana, puro e reticulados, foi medida através de contato direto entre a superfície dos filmes e a suspensão celular, com tempos de contato estabelecidos em 4, 8 e 24 horas, com a placa de cultura celular sendo utilizada como controle positivo. A adesão celular foi medida através da medida de viabilidade celular, utilizando o método da redução da resazurina.

Para o tempo de contato de 4, 8 e 24 horas, os filmes reticulados não apresentaram valores de viabilidade celulares estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) do apresentado pelo filme de quitosana puro.

Enquanto os filmes reticulados ionicamente e o não reticulado, não apresentaram citotoxicidade relevante à exposição dos extratos nas células, os valores de viabilidade celular para adesão celular foram encontrados bem abaixo dos valores do controle positivo. Isso pode ser atribuído ao tipo de linhas celulares aplicados, que falham em aderir e proliferar na superfície do filme, ou ainda, a polaridade da superfície dos filmes que não favoreceram à adesão celular.

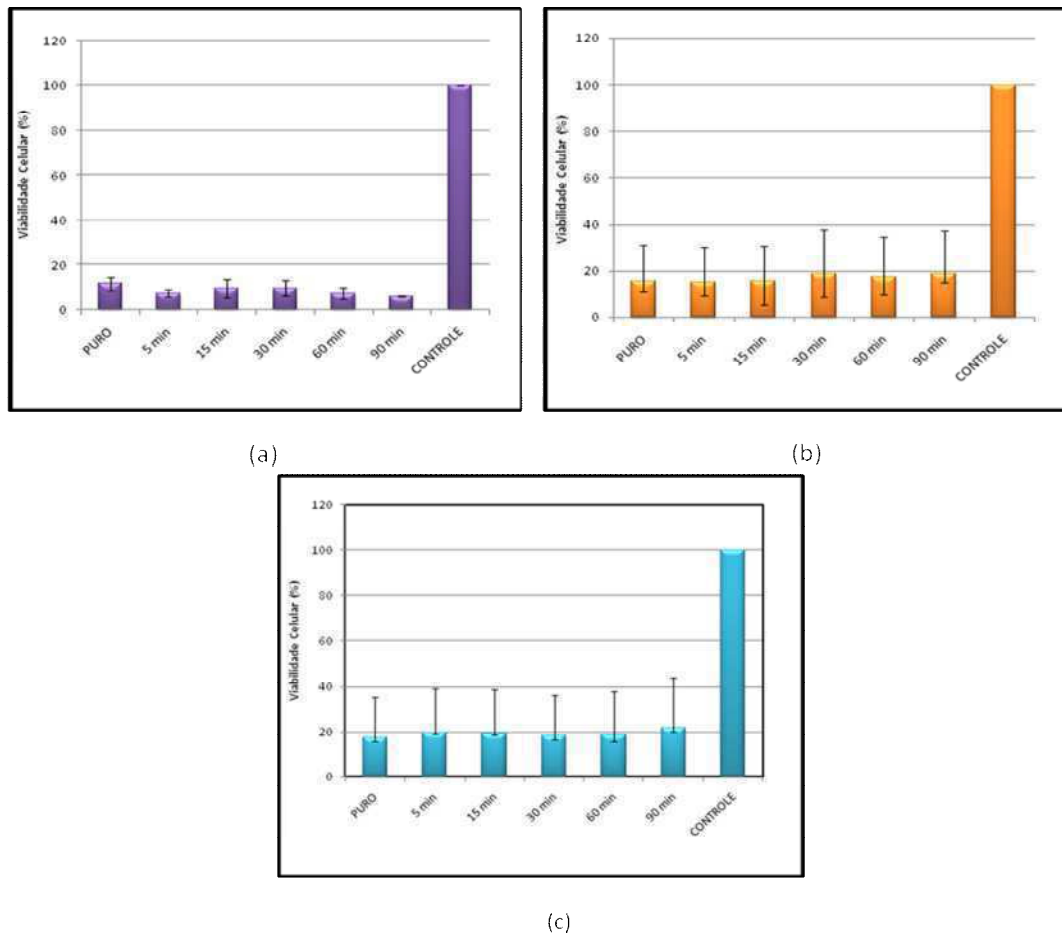


Figura 28. Resultados dos ensaios de adesão celular: (a) 4 horas, (b) 8 horas, e (c) 24 horas.

Existem na literatura diversas pesquisas desenvolvidas com as propriedades de adesão celular dos filmes de quitosana. Porém, os dados encontrados são inconsistentes. Enquanto Mori e colaboradores (1997) não encontraram resultados satisfatórios de adesão celular de filmes de quitosana, Hamilton e colaboradores (2006) estudaram as propriedades de adesão e proliferação celular dos fibroblastos em filmes de quitosana e encontraram resultados positivos.

Além disso, a propriedade de adesão celular é afetada por diversos fatores, entre eles as características da superfície, como a química da superfície, a densidade de carga, a rugosidade e morfologia (CHIONO et al., 2008)

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados apresentados, chegaram-se as seguintes conclusões:

- O ácido sulfúrico demonstrou ser efetivo como agente reticulante para os filmes de quitosana nas condições experimentadas;
- A técnica de espectroscopia na região do infravermelho identificou a inserção dos íons sulfatos nos filmes de quitosana, através de mudanças significativas nas absorções das regiões de 3000 a 3500 cm^{-1} e 1600 a 1700 cm^{-1} , atribuídas aos grupos hidroxila e amino, respectivamente;
- A técnica de difração de raios X demonstrou a redução da cristalinidade dos filmes de quitosana com o aumento do tempo de imersão no meio reticulante;
- A técnica de espectroscopia por energia dispersiva de raios X demonstrou a inserção dos íons sulfatos, na forma de enxofre, em todas as condições de reticulação;
- Com a técnica de microscopia eletrônica de varredura, não foi observado nenhuma mudança microestrutural nas superfícies dos filmes reticulados ionicamente;
- Com as medidas de tensão superficial, foi possível observar um aumento no caráter hidrofílico dos filmes reticulados de quitosana;
- Através das técnicas físico-químicas de caracterização empregadas, foi constatado que o máximo desempenho para reticulação foram os tempos de 15 e 30 minutos.
- Ao aumentar o tempo de exposição ao agente reticulante após os tempos de 15 e 30 minutos a uma indicação do deslocamento do sentido do equilíbrio químico da reação de reticulação;
- A caracterização citotóxica é um ponto importante no desenvolvimento de novos biomateriais, para avaliar a potencialidade de aplicação do mesmo;
- Ao avaliar o potencial citotóxico dos filmes, através de preparação de extratos, foi possível concluir que os filmes reticulados ionicamente de

quitosana não produziram efeitos citotóxicos prejudiciais às células, indicando a potencialidade para aplicação como biomaterial;

- Os testes de adesão celular mostraram valores abaixo de todos os valores utilizados como controle positivo.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a bioatividade dos filmes de quitosana reticulados ionicamente com ácido sulfúrico;
- Avaliar as propriedades de biodegradação dos filmes;
- Avaliar a carga eletrostática da superfície dos filmes;
- Estudar e avaliar a incorporação, na superfície dos filmes de quitosana, fatores de crescimento ou proteínas que melhorem a propriedade de adesão celular.

9. REFERÊNCIAS

ALVES, H.L. *Cimento Ósseo de Fosfato Tricálcio: Síntese e influência de aditivos na sua injetabilidade*. 2005. 106.f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

ANDERSON, J.M.; BIANCO, R.W.; GREHAN, J.F.; GRUBBS, B.C.; HANSON, S.R.; HAUCH, K.D.; LAHTI, M.; MRACHEK, J.P.; NORTHUP, S.J.; RATNER, B.D.; SCHOEN, F.J.; SCHROEDER, E.L.; SCHUMACHER, C.W.; SVENDSEN, C.A. Biological Testing of Biomaterials. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E.; *An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier: Amsterdam, 2ª Ed. 2004.

APARECIDA, A. H. In: *Recobrimento de apatitas empregando-se o método biomimético: estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e HCO_3^- na formação de hidroxiapatita*. 2005. 116 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

ARANAZ, I.; MENGIBAR, M.; HARRIS, R.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, v. 3, p. 203-230, 2009.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, p. 13-21, 2005.

BÁRTOLO, P.; BIDANDA, B. *Biomaterials and Prototyping Applications in Medicine*. Springer: New York, 2008.

BATICH, C.; LEAMY, P. Biopolymers. In: KUTZ, M. *Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design*. McGraw-Hill: New York. 2003.

BEPPU, M.M.; VIEIRA, R.S.; AIMALI, C.G.; SANTANA, C.C. Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: effect on ion permeability and water absorption. *Journal of Membrane Science*, V. 301, p. 126-130, 2007.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J.M.; FELT, O.; PEPPAS, N.A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v.57, p. 19-37, 2004.

BETTINI, R.; ROMANI, A.A.; MORGANTI, M.M.; BORGHETTI, A.F. Physicochemical and cell adhesion properties of chitosan films prepared from sugar and phosphate-containing solutions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 68, p. 74-81, 2008.

BHATTACHARYA, A.; RAWLINS, J.W.; RAY, P. *Polymer Grafting and Crosslinking*. Wiley: New Jersey. 2009.

BHATTACHARYA, A.; RAY, P. Introduction. In: BHATTACHARYA, A.; RAWLINS, J.W.; RAY, P. *Polymer Grafting and Crosslinking*. Wiley: New Jersey. 2009.

BIOMATERIALS & DRUG DELIVERY. *Cornell University Departmentt of Biomedical Engineering*. Disponível em: <http://www.bme.cornell.edu/bme/research/biomaterials.cfm> Acessado em 23 de Abril de 2009).

BONFIELD, W.: *European white book on fundamental research in materials science*. Max-Planck – Institut Für Metallforschung Stuttgart. Cap. 2, p. 72, 2002.

BOUCARD, N.; VITON, C.; AGAY, D.; MARI, E.; ROGER, T.; CHANCERELLE, Y.; DOMARD, A. The use of physical hydrogel of chitosan for skin regeneration following third-degree burns. *Biomaterials*, v. 28, p. 3478-3488, 2007.

CALLISTER, W.D. *Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução*. LTC: Rio de Janeiro, 2002.

CAO, Y.; CROLL, T.J.; COPPER-WHITE, J.J.; O'CONNOR, A.J.; STEVENS, G.W. Production and Surface Modification of Polylactide-Based Polymeric Scaffolds for Soft-Tissue Engineering. In: Hollander, A.P.; Hatton, P.V. (Editors). *Biopolymer Methods in Tissue Engineering*. Human Press: New Jersey, 2004.

CARIDADE, S.G.; SILVA, R.M.P.; REIS, R.L.; MANO, J.F. Effect of solvent-dependent viscoelastic properties of chitosan membranes on the permeation of 2-phenylethanol. *Carbohydrate Polymers*, v.75, p. 651-659, 2009.

CHAVES, E.L., MAGADÁN, J.M.M.; ROA, R.O.; GUZMAN, J.; SALGADO, J.R., CRUZ, J.M. Molecular modeling and simulation of ion-conductivity in chitosan membranes. *Polymers*, v. 45, p. 7519-7527, 2005.

CHIONO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *Journal of Material Science: Mater Méd*, v.19, p. 889-898, 2008.

CLARINVAL, A.M.; HALLEUX, J. Classification of biodegradable polymers. In: SMITH, R. (Ed). *Biodegradable polymers for industrial applications*. CRC Press: Boca Raton. 2005.

CUI, Z.; XIANG, Y.; XIANG, Y.; SI, J.; YANG, M.; ZHANF, Q.; ZHANG, T. Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. *Carbohydrate Polymers*, v. 73, p. 111-116, 2008.

DALLAN, P.R.M. In: *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração da Pele*. 2005. 194p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2005.

DECKER, E.L.; FRANK, B.; SUO, Y.; GAROFF, S. Physics of contact angle measurement. *Colloids and Surfaces*, v. 156, p. 177-189, 1999.

DEE, K.C.; PULEO, D.A.; BIZIOS, R. *An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions*. John Wiley & Sons: New Jersey, 2002.

DILLOW, A.K.; LOWMAN, A.M. *Biomimetic Materials and Design. Biointerfacial Strategies, Tissue Engineering and Target Drug Delivery*. Marcel Dekker New York:, p. 669 2002.

DOMARD, A.; DOMARD, M. Chitosan: Structure-Properties Relationship and Biomedical Applications. In: DUMITRIU, S. Polysaccharides as Biomaterials. In: DUMITRIUS, S. Polymeric Biomaterials. Marcel Dekker: New York, 2001.

DUMITRIU, S. Polysaccharides as Biomaterials. In: DUMITRIUS, S. Polymeric Biomaterials. Marcel Dekker: New York, 2002.

FAMBRI, L. MIGLIARES, C.; KESENCI, K.; PISKINE, E. Biodegradable Polymers. In: BARBUCCI, R. Integrated Biomaterials Science. Kluwer Academic Publishers: New York, 2002.

FAN, M.; HU, Q.; SHEN, K. Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p. 66-71, 2009.

FEIJEN, J. Biodegradable polymers for medical purpose. In: PISKIN, E.; HOFFMAN, A.S. (Ed.). *Polymeric Biomaterials*. Martinus Nijhoff Publishers: Dordrecht. 1986.

FISHER, J.; MIKOS, A.G.; BRONZINO, J.D. *Tissue Engineering*. CRC Press: Boca Raton. 2007.

FOOK, A.C.B.M. In: *Desenvolvimento de biocerâmicas porosas para regeneração óssea*. 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2008.

FOOK, M.V.L. In: *Desenvolvimento de técnica de deposição de hidroxiapatita pelo método biomimético na superfície polietileno de ultra-alto peso molecular para aplicação como biomaterial*. 2005. 96p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, 2005.

FRAGA, A.F.; MARTINS, F.B.; RIGO, E.C.S; BOSCHI, A.O. *Ensaio de membranas de quitosana recobertas com hidroxiapatita: efeito da adição de hidróxido de sódio*. *Anais*. 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais. p. 2715-2725, 2006.

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and Chitosan – A review. *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.

GNANOU, Y.; FONTANILLE, M. *Organic and Physical Chemistry of Polymers*. John Wiley & Sons: New Jersey, 2008.

GRIGOLON, L.B. In: *Modificação de quitina e quitosana por via enzimática*. 2001. 86 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2001.

GUTIERRES, M.; LOPES, M.A.; HUSSAIN, N.S.; CABRAL, A.B.; ALMEIDA, L.; SANTOS, J.D. Substitutos Ósseos: conceitos gerais e estado actual. **ArquiMed** v.19, p. 153-162, 2006.

HAMILTON, V.; YUAN, Y.; RIGNEY, D.A.; PUCKETT, A.D.; ONG, J.L.; YANG, Y.; ELDER, S.H.; BUMGARDNER, J.D. Characterization of chitosan films and effect on fibroblast cell attachment and proliferation. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, v. 17, p. 1373-1381, 2006.

HANSON, S. LALOR, P.A.; NIEMI, S.M.; NORTHUP, S.J.; RATNER, B.D.; SPECTOR, M.; VALE, B.H.; WILLSON, J.E. Testing Biomaterials. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E.; *An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press: San Diego, 1^a Ed. 1996.

HEJAZI, R.; AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. *Journal of Controlled Release*, v. 89, p. 151-165, 2003.

HENCH, L.L. Biomaterials: a forecast for the future. *Biomaterials*, v. 19, p. 1419-1423, 1998.

HENCH, L.L.; JONES, J.R. *Biomaterials, Artificial Organs and Tissue Engineering*. CRC PRESS: Boca Raton, 2005.

HENCH, L.L. Biomateriais: Uma Introdução, 2006. In: Oréfice, R.; Pereira, M.M.; Mansur, H.S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, p. 538, 2006.

HONG, H.; WEI, J.; CHANGSHENG, L. Development of asymmetric gradational-changed porous chitosan membrane for guided periodontal tissue regeneration. *Composites Part B*, v.38, p. 311-316, 2007.

IKADA, Y. Biological Materials. In: Barbucci, R. *Integrated Biomaterials Science*. New York: Kluwer Academics, p. 1-23, 2002.

JAYAKUMAR, R.; NWE, N.; TOKURA, S.; TAMURA, H. Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Journal of Biological Macromolecules*, v. 40, p. 175-181, 2007.

KARAKEÇILI, A.G.; SATRIANO, C.; GÜMÜSDERELIOĞLU, M.; MARLETTA, G. Surface characteristics of ionically crosslinked chitosan membranes. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 106, p. 3884-3888, 2007.

KAWACHI, E.; BERTRAN, C.A. REIS, R.R.; ALVES, O.L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. *Química Nova*, v.23, p. 518-522, 2000.

KELLOMÄKI, M.; NIIRANEN, H.; PUUMANEN, K.; ASHAMMAKHI, N.; WARIS, T.; TÖRMAÄLA, P. Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. *Biomaterials*, v. 21. p. 2445-2505, 2000.

KEONG, L.C.; HALIM, A.S. In Vitro Models in Biocompatibility Assessment for Biomedical – Grade Chitosan Derivatives in Wound Management. *International Journal of Molecular Science*, v. 10, p. 1300-1313, 2009.

KHOR, E. Chitin: Fulfilling a Biomaterials Promise. Elsevier: Amsterdam, 2001.

KHOR, E.; LIM, L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, v.24, p. 2339-2348, 2003.

KOHN, J.; WELSH, W.J.; KNIGHT, D. A new approach to the rationale discovery of polymeric biomaterials. *Biomaterials*, v. 28, p.4171-4177, 2007.

LANZA, R.P.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principle of Tissue Engineering*. San Diego: Academic Press. 2^a ed. 995p, 2000.

LANZA, R.P.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principle of Tissue Engineering*. San Diego: Academic Press. 3^a ed. 1307p, 2007.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. Quitosana: Biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v. 32, p. 672-678, 2009.

LI, Q.; YANG, D.; MA, G.; XU, Q.; CHEN, X.; LU, F.; NIE, J. Synthesis and characterization of chitosan-based hydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 44, p. 121-127, 2009.

MARCONI, W.; PIOZZI, A. Structure and Properties of Polymeric Materials. In: BARBUCCI, R. *Integrated Biomaterials Science*. Kluwer Academic Publishers: New York. 2002.

MARRECO, P.R.; MOREIRA, P.L.; GENARI, S.C.; MORAES, A.M. Effect of Different Sterilization Methods on the Morphology, Mechanical Properties, and Cytotoxicity of Chitosan Membranes Used as Wound Dressings. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 71A, p. 268-277, 2004

MARTINEZ, L.; AGNELY, F.; LECLERC, B.; SIEPMANN, J.; COTTE, M.; GEIGER, S.; COUARAZE. Cross-linking of chitosan and

chitosan/poly(ethylene oxide) beads: A theoretical treatment. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 67, p. 339-348, 2007.

MARTINO, A.D.; SITTINGER, M.; RIABUD, M.V. Chitosan: A versatile biopolymer for orthopaedic tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 5983-5990, 2005.

MATTHEW, H.W.T. Polymers for Tissue Engineering Scaffolds. In: DUMITRIUS, S. *Polymeric Biomaterials*. Marcel Dekker: New York, 2002.

MI, F.L.; SHY, S.S.; WU, Y.B.; LEE, S.T.; SHYONG, J.; HUANG, R.N. Fabrication and characterization of sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing. *Biomaterials*, v. 22, p.165-173, 2001.

MISRA, G.P.; GIL, E.S.; LOWE, T.L. In the Biomedical Arena. In: BHATTACHARYA, A.; RAWLINS, J.W.; RAY, P. *Polymer Grafting and Crosslinking*. Wiley: New Jersey. 2009.

MORI, T.; OKUMURA, M.; MATSUURA, M.; UENO, K.; TOKURA, S.; OKAMOTO, Y.; MINAMI, S.; FUJINAGA, T. Effect of chitin and its derivatives on the proliferation and cytokine production of fibroblasts in vitro. *Biomaterials*, v. 18, p. 947-951, 1997.

NAGAHAMA, H.; NEW, N.; JAYAKUMAR, R.; KOIWA, S.; FURUIKE, T.; TAMURA, H. Biodegradable chitin membranes for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*, v.73, p. 295-302, 2008.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 762-798, 2007.

NAZHAT, S.N. Thermal Analysis of Biomaterials. In: GABBOTT, P. *Principles and Applications of Thermal Analysis*. United Kingdom: Blackwell Publishing, p. 464, 2008.

NICHOLSON, J.W. *The Chemistry of Medical and Dental Materials*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2002.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of The Alamar Blue(resazurina) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Biochemistry*, v. 267, p. 5421-5426, 2000.

ORÉFICE, R.; PEREIRA, M.M.; MANSUR, H.S. *Biomateriais: Fundamentos e Aplicações*. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006.

OSORIO, S.M.L. Novel polymeric systems based on natural materials: development and biological performance. 2007, 146p. Dissertação (Mestrado em Processamento e Caracterização de Materiais), Escola de Engenharia, Universidade do Minho, Braga, Portugal, 2007.

PACHENCE, J.M.; KOHN, J. Biodegradable Polymers. In: LANZA, R.P.; LANGER, R.; VACANTI, J. *Principle of Tissue Engineering*. San Diego: Academic Press. 2^a ed. 995p, 2000.

PARK, J.; LAKES, R.S. *Biomaterials: an Introduction*. 3th Edition. New York: Springer, 2007.

PEDRO, A.S.; ALBUQUERQUE, E.C.; FERREIRA, D.; SARMENTO, B. Chitosan: An option for development of essential oil delivery systems for oral cavity care?. *Carbohydrate Polymers*, 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.12.016.

PENICHE, C.; FERNANDEZ, M.; RODRIGUES, G.; PARRA, J.; JIMENEZ, J.; BRAVO, A.L.; GÓMEZ, D.; ROMÁN, J.S. Cell support of chitosan/hyaluronic acid and chondroitin sulphate system. Morphology and biological behavior. *Journal of Material Science: Mater Med*, v. 18, p. 1719-1726, 2007.

PERROT, S.; DORTERTRE-CATELLA, H.; MARTIN, C.; WARNET, J.M.; RAT, P. A New Nondestructive Cytometric Assay Based on Resazurin Metabolism and an Organ Culture Model for the Assessment of Corneal Viability. *Cytometry Part A*, v. 55A, p. 7-14, 2003.

PETERS, K.; UNGER, R.E.; KIRKPATRICK, C.J. Biocompatibility Testing. In: NARAYAN, R. (Ed). *Biomedical Materials*. Springer: New York, 2009.

PILLAI, C.K.S.; PAUL, W.; SHARMA, C.P. Chitin and Chitosan Polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, v. 34, p.641-678, 2009.

PRASHANTH, K.V.H.; KITTUR, F.S.; THARANATHAN, R.N. Solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 27-33, 2002.

RABEA, E.; BADAWY, M.E.T.; STEVENS, C.V.; SMAGGHE, G.; STEURBAUT, W. Chitosan as Antimicrobial Agent: Applications and Mode of Action. *Biomacromolecules*, v. 4, p. 1457-1465, 2003.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. In: RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E.; *An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier: Amsterdam, 2^a Ed. 2004.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*, v. 31, p. 603-632, 2006.

RIVERO, S.; GARCIA, M.A.; PINOTTI, A. Composite and bi-layer films based on gelatin and chitosan. *Journal of Food Engineering*, v.90, p.531-539, 2009.

RUDIN, A. *The Elements of Polymers Science and Engineering: An Introductory Text and Reference for Engineers and Chemists*. San Diego: Academic Press, 1999.

SANTOS, C.; SEABRA, P.; VELEIRINHO, B.; DELGADILLO, I.; SILVA, J.A.L. Acetylation and molecular mass effect on barrier and mechanical properties of shortfin squid chitosan membranes. *European Polymer Journal*, v. 42, p. 3277-3285, 2006.

SANTOS, J.L.S. *Functionalization of Dendrimers for Improved Gene Delivery to Mesenchymal Stem Cells*. 2009, 161p. Tese (Doutorado em Química dos Materiais). Universidade da Madeira, Centro de Química da Madeira, Funchal, Portugal, 2009.

SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, p. 308-317, 2007.

SAWYER, L.C.; GRUBB, D.T.; MEYER, G.F. *Polymer Microscopy*. Springer: New York. 2008.

SHI, D. *Introduction to Biomaterials*. Tsinghua University Press and World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd.: London, 2006.

SIGNINI, R.; FILHO, S.P.C. Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, p. 58-64, 2001.

SILVA, H.S.R.C. SANTOS, K.S.C.R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. *Química nova*, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.

SILVA JR, P.E.; ORÉFICE, R.L. Compósitos bioativos obtidos a partir da inserção de vidro bioativo em matriz de poli(metacrilato de metila). *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 11, p. 109-115, 2001.

TAKAHASHI, T.; IMAI, M.; SUZUKI, I. Water permeability of chitosan membrane involved in deacetylation degree control. *Biochemical Engineering Journal*, v.36, p. 43-48, 2007.

TEOH, S.H. Introduction to Biomaterials Engineering and Processing – an overview. In: HIN, T.S. *Engineering Materials for Biomedical Applications*. World Scientific: New Jersey, 2004.

TOKURA, S.; TAMURA, H. Chitin and Chitonsa. In: KAMERLING, T.P.; BOONS, G.J.; LEE, Y.C.; SUZUKI, A.; TANIGUCHI, N.; VORAGEM, A.G.J. *Comprehensive Glycoscience from Chemistry to Systems Biology*. Elsevier. 2007.

TREMEI, A.; CAI, A.; TIRTAATMADJA, N.; HUGHES, B.D.; STEVENS, G.W.; LANDMAN, K.A.; O'CONNOR, A.J. Cell migration and proliferation during monolayer formation and wound healing. *Chemical Engineering Science*, v. 64, p. 247-253,2009.

TSAI, H.S.; WANG, Y.Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. *Polymer Bulletin*, v. 60, p. 103-113, 2008.

URAGAMI, T.; TOKURA, S. *Materials Science of Chitin and Chitosan*. Japan: Kodansha Ltd., 2006.

VAN DER VEGT, A.K. *From polymers to plastic*. DUP Blue Print: Delft. 2002.

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

WANG, M. Composite scaffolds for bone tissue engineering. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 2, v. 2, p. 80-84, 2006.

WANG, S. HOLYOAK, G.R.; LIU, G.; BUNCH, T.J.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.D. Effects of resazurina on bovine oocyte fertilization and embryo development in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 51, p. 205-213, 1998.

WILLIAMS, D.F. Enzymatic hydrolysis of Polylactic. *Eng. Med.*, v. 10, p.5-7, 1981.

WILLIAMS, D.F. *Definitions in Biomaterials*. Elsevier: Amsterdam, 1987.

WILLIAMS, D. Biocompatibility. In: Blitterswijk, C.V. *Tissue Engineering*. Elsevier: Amsterdam, 2008.

WONG, J.Y.; BRONZINO, J.D. *Biomaterials*. Boca Raton: CRC Press. 2007.

ZHANG, X.; YANG, D.; NIE, J. Chitosan/polyethylene glycol diacrylate films as potential wound dressing material. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p.458-462, 2008.

ZHENG, L.Y.; ZHU, J.F. Study on antimicrobial activity of chitosan with different molecular weights. *Carbohydrate Polymers*, v. 54, p. 527-530, 2003.