



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



**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOABSORVÍVEIS COM  
VARIADO NÍVEL DE ORIENTAÇÃO MOLECULAR PARA APLICAÇÃO  
COMO BIOMATERIAL**

***JOÃO JOSÉ PONCIANO***

Campina Grande  
abril/2010

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

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOABSORVÍVEIS COM  
VARIADO NÍVEL DE ORIENTAÇÃO MOLECULAR PARA APLICAÇÃO  
COMO BIOMATERIAL

**João José Ponciano**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG) como requisito parcial à obtenção do título de MESTRE EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS.

Orientador: Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Campina Grande  
Abril/2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

P795d

2010 Ponciano, João José.

Desenvolvimento de membranas bioabsorvíveis com variado nível de orientação molecular para aplicação como biomaterial / João José Ponciano. — Campina Grande, 2010.

72 f. : il. col.

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

Referências.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook.

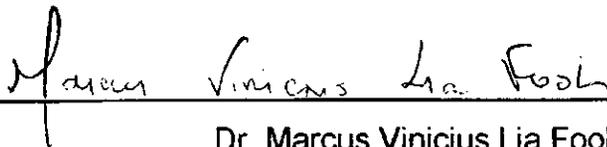
1. Quitosana. 2. Biopolímero. 3. Orientação Molecular. 4. Biodegradação. 5. Lisozima. I. Título.

CDU – 577.144.4(043)

**DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS BIOABSORVÍVEIS COM VARIADO  
NÍVEL DE ORIENTAÇÃO MOLECULAR PARA APLICAÇÃO COMO  
BIOMATERIAL**

**João José Ponciano**

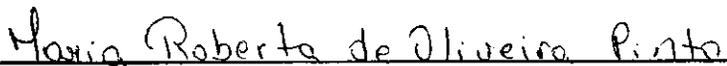
Dissertação Aprovada em 15/04/2010 pela banca examinadora constituída dos  
seguintes membros:



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook

Orientador

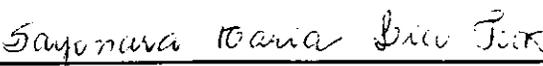
UAEMa – UFCG



Dr.ª Maria Roberta de Oliveira Pinto

Examinadora Externa

UEPB



Dr.ª Sayonara Maria Lia Fook

Examinadora Externa

UEPB

## *Dedico este trabalho*

*Ao meu pai Manoel (in memórian), pelo seu exemplo de homem e a minha mãe Josefa (Nina), pela sua dedicação e empenho diante das dificuldades, para que todos os seus filhos estudassem.*

*À minha esposa Rosemary, por seu apoio, incentivo, atenção, dedicação e pelas valiosas sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos meus filhos João Gabriel e Daniel Kenae, por me proporcionarem tantas alegrias e descontrações, às vezes em momentos difíceis. Que este trabalho sirva também de incentivo na caminhada acadêmica de vocês.*

*A todos os meus irmãos, os biológicos e os universais, por acreditarem em mim e pelo incentivo que sempre me dedicaram.*

"Você não pode ensinar nada a um  
homem; você pode apenas ajudá-lo a  
encontrar a resposta dentro dele mesmo"

(*Galileu Galilei*)

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pelo universo e pela oportunidade de sempre melhorarmos e evoluirmos.*

*Ao meu orientador prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook, por sua dedicação, ensinamentos e orientação incentivadora em todas as etapas deste trabalho, mas principalmente por sua singela amizade. Os momentos passam na vida, porém uma verdadeira amizade não.*

*Às Bancas do Seminário e de Defesa de Dissertação, compostas pelos professores Líbia de Souza Conrado, José Alexsandro da Silva, Maria Roberta de O. Pinto e Sayonara Maria Lia Fook, pelas correções e sugestões valiosas para a conclusão deste trabalho.*

*À equipe que trabalha com quitosana: Rosseberg, Rosemary C. Lima e Thiago, pelas valiosas contribuições e sugestões.*

*À Carla Ramalho, aluna de doutorado, por sua gentileza e contribuições.*

*À Carol e aos demais colegas do mestrado e do doutorado, cujas colaborações e convívio contribuíram de forma decisiva para o bom desempenho deste trabalho.*

*À Márcia da Secretaria de Pós-Graduação do DEMa/UFCG, pela simpatia e, principalmente, pela dedicação e boa vontade no desempenho de suas funções.*

*A todos os funcionários do Laboratório de Engenharia de Materiais e do Laboratório de Caracterização do DEMa/UFCG.*

*Aos demais professores e funcionários do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA/UFCG), que de forma direta ou indireta contribuíram para o meu aprendizado e para o bom andamento deste trabalho.*

*Ao CNPq pelo o suporte financeiro.*

**Obrigado a todos**

## **JOÃO JOSÉ PONCIANO**

### **Formação Acadêmica**

Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual da Paraíba, UEPB.

Período: 1992-1996

Curso de aperfeiçoamento em Ortodontia pela Associação Brasileira de Especialistas e Pós-Graduação da Odontologia, ABEPO-SP.

Período: 2000-2202

## PUBLICAÇÕES CIENTÍFICAS

### Trabalhos apresentados em congressos e eventos

1- PONCIANO, J.J.; PONCIANO, R.C.O.; MARINHO, R.L.; MARINHO, A.V. Síndrome do Respirador Bucal: Interação Ortodontia–Fonoaudiologia com Aparelho Guia PAM. In: **III Congresso Paraibano de Odontologia**. Campina Grande, 2007.

2- PONCIANO, FOOK, M.V. L.; PONCIANO, R.C.O; PONCIANO, T. N.; FONSECA, F. R. A. Estudo da Toxicidade de ligas de Nitinol: Uma Contribuição à Ortodontia. In: **II Jornada Campinense de Odontologia**. Campina Grande, 2009.

3- PONCIANO, J.J.; FOOK, M.V. L.; PONCIANO, R. C. O.; FONSECA, F. R. A.; BARBOSA, R. C. Biocibernética Bucal Aplicada a Ortodontia. In: **II Jornada Campinense de Odontologia**. Campina Grande, 2009.

4- PONCIANO, J.J; FOOK, M.V. L.; PONCIANO, R.C.O.; PONCIANO, T. N.; BRASILINO, M. J. B. Estudo Comparativo da Superfície de Bráquetes Comerciais Novos e Usados. In: **II Jornada Campinense de Odontologia**. Campina Grande, 2009.

## RESUMO

A quitosana é um polissacarídeo amino, derivado do processo de desacetilação da quitina. Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, esta tem sido proposta como um biopolímero potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia, medicina e odontologia. No entanto, apesar de toda sua potencialidade, o uso da quitosana na forma de membranas com orientação molecular preferencial tem sido pouco estudado. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação das propriedades de membranas de quitosana obtidas com diferentes níveis de orientação molecular. Dessa forma, pretendeu-se avaliar: a biodegradabilidade da quitosana com variado grau de desacetilação na presença da lisozima; relacionar a morfologia das membranas com a orientação molecular; estabelecer correlações entre a orientação molecular e a biodegradação e identificar relações entre a energia superficial e a orientação molecular nas condições pesquisadas. As membranas foram caracterizadas pelas seguintes técnicas: Ensaio de Biodegradação, Difração de raios-X (DRX), Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Tensão Superficial (TS). Com os resultados obtidos observou-se que: no teste de Biodegradação a enzima lisozima se mostrou eficiente na degradação da quitosana; o DRX mostrou variações na cristalinidade das membranas; o FTIR mostrou que, comparativamente, houve alterações significativas nos espectros das membranas antes e após de submetidas a biodegradação *in vitro*; as micrografias do MEV mostraram a formação de poros nas membranas degradadas e os resultados da Tensão Superficial indicaram um padrão mais hidrofóbico nas membranas orientadas.

**PALAVRAS-CRAVE:** Quitosana; Biopolímero; Orientação Molecular; Biodegradação; Lisozima.

## ABSTRACT

The chitosan is an amino polysaccharide, obtained by the alkaline deacetylation of chitin. Abundant natural polymer, biodegradable and non-toxic, it has been proposed as a biopolymer potentially attractive for several uses, mainly in engineering, biotechnology, medicine and dentistry. However, the use of chitosan membranes with preferential molecular orientation hasn't been very investigated. In matter, the purpose of this work was to evaluate the properties of chitosan membranes obtained with different levels of molecular orientation. Therefore, intended to evaluate: the biodegradation of the chitosan membranes with varied degree of deacetylation in contact with the lysozyme enzyme; to relate the morphology of the membranes with the molecular orientation; to establish correlations between the molecular orientation and the biodegradation and to identify relationships between the surface tension and the molecular orientation in the researched conditions. The chitosan membranes were characterized by *in vitro* degradation, ray-X diffraction, Fourier transform infrared, scanning electron microscope and surface tension. According to the results, the lysozyme enzyme was shown efficient in the biodegradation of the chitosan membranes; the ray-X diffraction of the membranes showed alterations in the crystallinity; the spectra of the chitosan membranes showed significant alterations after the contact with the lysozyme; the micrographs showed the formation of pores in the degraded membranes and the results of the surface tension indicated a more hydrophobic standard in the guided membranes.

**Key-words:** Chitosan; Biopolymer; Molecular Orientation; Biodegradation; Lysozyme.

**SUMÁRIO**

|   | Pag. |
|---|------|
| <b>AGRADECIMENTO</b> .....  | iii  |
| <b>PUBLICAÇÕES</b> .....  | vi   |
| <b>RESUMO</b> .....   | vii  |
| <b>ABSTRACT</b> .....   | viii |
| <b>SUMÁRIO</b> .....  | ix   |
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....                                      | xii  |
| <b>SÍMBOLOS E ABREVIACÕES</b> .....                                 | xvi  |
| <b>INTRODUÇÃO E OBJETIVOS</b> .....                                 | 22   |
| <b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                                  | 25   |
| <b>2.1 Biomateriais</b> .....                                       | 25   |
| <b>2.2 Materiais biodegradáveis</b> .....                           | 27   |
| <b>2.2.1 Polímeros biodegradáveis</b> .....                         | 28   |
| <b>2.2.2 Polímeros bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis</b> .....     | 31   |
| <b>2.2.3 Hidrólise de polímeros sintéticos biodegradáveis</b> ..... | 32   |
| <b>2.2.4 Enzimas</b> .....  | 33   |
| <b>2.3 Orientação molecular em filmes poliméricos</b> .....         | 35   |
| <b>2.3.1 Cristalinidade</b> .....                                   | 35   |
| <b>2.4 Tensão superficial</b> .....                                 | 38   |
| <b>2.4.1 Energia de superfície</b> .....                            | 38   |
| <b>2.4.2 Molhabilidade</b> .....                                    | 40   |

|         |  |    |
|---------|--|----|
| 2.4.3   | <i>Espalhamento</i> .....  | 41 |
| 2.4.4   | <i>Goniometria</i> .....   | 41 |
| 2.5.    | <i>Quitina</i> .....   | 42 |
| 2.5.1   | <i>Histórico</i> .....   | 43 |
| 2.5.2   | <i>Estrutura e propriedades</i> .....  | 44 |
| 2.5.3   | <i>Fontes de quitina</i> .....   | 46 |
| 2.5.4   | <i>Aplicações da quitina</i> .....   | 47 |
| 2.5.5   | <i>Desacetilação da quitina</i> .....  | 48 |
| 2.6     | <i>Quitosana</i> .....   | 49 |
| 2.6.1   | <i>Estrutura e propriedades</i> .....  | 50 |
| 2.6.2   | <i>Biodegradação da quitosana</i> .....  | 52 |
| 2.6.3   | <i>Aplicações gerais da quitosana</i> .....  | 55 |
| 2.6.4   | <i>Aplicações da quitosana como biomateriais</i> .....                                   | 56 |
| 3.      | <b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 60 |
| 3.1     | <b>Materiais</b> .....   | 60 |
| 3.1.1   | <i>Obtenção das membranas de quitosanas</i> .....  | 60 |
| 3.1.2   | <i>Degradação enzimática (biodegradação)</i> .....                                       | 60 |
| 3.2     | <b>Métodos</b> .....   | 60 |
| 3.2.1   | <i>Preparação das membranas de quitosana com orientação molecular preferencial</i> ..... | 60 |
| 3.2.2   | <i>Caracterização</i> .....  | 62 |
| 3.2.2.1 | <i>Ensaio de biodegradação enzimática</i> .....  | 63 |
| 3.2.2.2 | <i>Difração de raios X (DRX)</i> .....   | 63 |
| 3.2.2.3 | <i>Espectroscopia por Infravermelho com Transformada de Fourier(FTIR)</i> .....          | 64 |

|   |    |
|---|----|
| 3.2.2.4 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....                            | 64 |
| 3.2.2.5 <i>Tensão Superficial (TS)</i> .....  | 65 |
| 3.2.2.6 <i>Medidas do ângulo de contato</i> .....   | 65 |
| 3.2.3 <i>Metodologia de trabalho</i> .....  | 65 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....  | 67 |
| 4.1 Caracterização das matérias-primas.....   | 67 |
| 4.1.1 <i>Difração de Raios-X (DRX)</i> .....  | 67 |
| 4.1.2 <i>Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de<br/>Fourier (FTIR)</i> ..... | 68 |
| 4.2 Caracterização das membranas produzidas.....  | 70 |
| 4.2.1 <i>Ensaio de biodegradação enzimática</i> .....                                     | 70 |
| 4.2.2 <i>Difração de Raios X (DRX)</i> . ....   | 72 |
| 4.2.3 <i>Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de<br/>Fourier (FTIR)</i> ..... | 75 |
| 4.2.4 <i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....                              | 79 |
| 4.2.5 <i>Medidas do ângulo de contato</i> .....   | 82 |
| 5. CONCLUSÕES.....  | 84 |
| 6. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS.....  | 86 |
| REFERÊNCIAS.....  | 87 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   | Pag. |
|---|------|
| Figura 2.1 Quitosana como exemplo de um biomaterial de 3ª geração.....  | 26   |
| Figura 2.2 Exemplos de polímeros biodegradáveis.....  | 29   |
| Figura 2.3 Hidrólise com quebra das ligações éster e formação de<br>cadeias menores.....                      | 30   |
| Figura 2.4 Fluxograma esquemático da biodegradação de um biopolímero..  | 32   |
| Figura 2.5 Ilustração de uma enzima.....  | 34   |
| Figura 2.6 Ilustração de orientação molecular no polímero em processos<br>por Injeção, extrusão ou sopro..... | 37   |
| Figura 2.7 Forças atuando em átomos ou moléculas no interior e na<br>superfície de um material.....           | 39   |
| Figura 2.8 Água em forma de esfera em estado de menor energia.....  | 40   |
| Figura 2.9 Diagrama esquemático da medição do ângulo de contato.....  | 42   |
| Figura 2.10 Estrutura química da quitina.....   | 44   |
| Figura 2.11 Estrutura química da celulose.....  | 45   |
| Figura 2.12 Representação esquemática das estruturas polimórficas<br>da quitina.....                          | 46   |
| Figura 2.13 Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana..                                     | 49   |
| Figura 2.14 Estrutura química da quitosana.....   | 50   |
| Figura 2.15 Estrutura biológica da lisozima, composta por 129 aminoácidos..                                   | 54   |
| Figura 2.16 Ciclo da quitina.....   | 55   |
| Figura 3.1 Seqüência operacional da elaboração das membranas de<br>quitosana.....                             | 61   |

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Figura 3.2 | Esquema do dispositivo de vidro usado para estirar as membranas, dando uma orientação molecular preferencial.....   | 62 |
| Figura 3.3 | Fluxograma da metodologia de trabalho.....  | 66 |
| Figura 4.1 | Difratogramas de raios-X do pó das quitosanas usadas neste trabalho(GD de 90% e 98%).....   | 67 |
| Figura 4.2 | Espectros de FTIR dos pós das quitosanas usadas neste trabalho (GD de 90% e 98%).....   | 68 |
| Figura 4.3 | Difratogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa menor (a) e placa média (b), não degradadas.....                 | 73 |
| Figura 4.4 | Difratogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa maior (a) e sem orientação preferencial(b), não degradadas.....  | 73 |
| Figura 4.5 | Difratogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% orientadas nos dispositivos placa menor (a) e placa média (b), não degradadas.....                 | 73 |
| Figura 4.6 | Difratogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% orientadas nos dispositivos placa maior (a) e sem orientação preferencial (b), não degradadas..... | 74 |
| Figura 4.7 | Difratogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa menor (a) e placa média (b), com degradação de 30 dias.....      | 74 |
| Figura 4.8 | Difratogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa  |    |

|   |    |
|---|----|
| maior (a) e sem orientação (b), com degradação de 30 dias.....  | 74 |
| Figura 4.9 Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% e variadas orientações moleculares, sem degradação.....  | 76 |
| Figura 4.10 Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% e variadas orientações moleculares, sem degradação.....   | 76 |
| Figura 4.11 Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% e variadas orientações moleculares, com degradação de 30dias.....   | 77 |
| Figura 4.12 Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% e variadas orientações moleculares, com degradação de 60 dias.....  | 77 |
| Figura 4.13 Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% e variadas orientações moleculares, com degradação de 30 dias.....  | 78 |
| Figura 4.14 Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% e variadas orientações moleculares, com degradação de 60 dias.....  | 78 |
| Figura 4.15 Micrografias das membranas de quitosana com GD de 90%, antes (a1, b1, c1 e d1) e após (a2, b2, c2 e d2) serem submetidas aos ensaios de biodegradação, onde: (a1, a2) estiradas na placa menor; (b1, b2) estiradas na placa média; (c1,c2) estiradas na placa maior e (d1, d2) sem orientação preferencial..... | 80 |

Figura 4.16 Micrografias das membranas de quitosana com GD de 98%, antes (a1, b1, c1 e d1) e após (a2, b2, c2 e d2) serem submetidas aos ensaios de biodegradação, onde: (a1, a2) estiradas na placa menor; (b1, b2) estiradas na placa média; (c1, c2) estiradas na placa maior e (d1, d2) sem orientação preferencial..... 81

Figura 4.17 Medidas do ângulo de contato para as membranas de quitosana: com GD de 90% e 98% (não degradadas e com 30 dias de degradação); sem orientação e orientadas nos dispositivos (placa menor, placa média e placa maior)..... 83

**SÍMBOLOS E ABREVIACÕES**

|                   |   |
|-------------------|---|
| ASTM              | American Society for Testing and Materials                  |
| Ca                | Cálcio  |
| CaCO <sub>3</sub> | Carbonato de cálcio   |
| CCT               | Centro de Ciências e Tecnologia                             |
| cm                | Centímetro  |
| DEMa              | Departamento de Engenharia de Materiais                     |
| DRX               | Difração de Raios X   |
| FTIR              | Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier |
| GA                | Grau de acetilação  |
| GD                | Grau de desacetilação                                       |
| h                 | Hora  |
| H                 | Hidrogênio  |
| HCl               | Ácido clorídico   |
| K                 | Potássio  |
| KOH               | Hidróxido de potássio                                       |
| M                 | Molar   |
| MEV               | Microscopia Eletrônica de Varredura                         |
| Mg                | Miligrama   |
| Mg                | Magnésio  |
| mL                | Mililitro   |
| m/v               | Relação massa/volume  |
| Na                | Sódio   |
| NaCl              | Cloreto de sódio  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| NaOH            | Hidróxido de sódio                                      |
| NH              | Amina   |
| OH              | Hidroxila   |
| PBS             | Tampão fosfato salino                                   |
| PEAD            | Polietileno de alta densidade                           |
| PEG             | Poli(etileno glicol)                                    |
| PEO             | Poli(óxido de etileno)                                  |
| PGA             | Poli(ácido glicólico)                                   |
| PHAs            | Poli(hidroxialcanoatos)                                 |
| PLA             | Poli(ácido láctico)                                     |
| pH              | Potencial de hidrogênio iônico                          |
| PP              | Polipropileno   |
| qt              | Quitosana   |
| T <sub>g</sub>  | Temperatura de transição vítrea                         |
| TS              | Tensão superficial                                      |
| UAEm            | Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais            |
| UFCG            | Universidade Federal de Campina Grande                  |
| v/v             | Relação volume/volume                                   |
| Zn              | Zinco   |
| °C              | Graus Celcius   |
| γ <sub>s</sub>  | Energia de superfície do sólido                         |
| γ <sub>LV</sub> | Tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor |
| γ <sub>SL</sub> | Energia da interface sólido – líquido                   |
| Θ               | Theta   |

## 1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A Engenharia de tecidos tem sido considerada, nos últimos anos, como um recurso para tratamentos médicos utilizados na reconstrução de tecidos defeituosos no campo da engenharia biomédica. Desta forma, consiste em um importante suporte para utilização de biomateriais, que agrupa, um conjunto de conhecimentos e técnicas utilizadas na reconstrução de novos órgãos e tecidos e no restabelecimento de suas funções. Este restabelecimento das funções de um tecido pode ser feito através da utilização de implantes permanentes ou temporários. Por essas razões, a engenharia de tecido tem sido alvo de grandes atenções nos campos da ciência, engenharia e medicina. Dentre as diversas classes existentes no campo dos biomateriais, uma classe promissora vem despertando grande interesse científico e tecnológico nos últimos anos. Trata-se dos materiais poliméricos, que têm crescido suas aplicações nas áreas médicas e biotecnológicas. Inserido na vasta área dos materiais poliméricos estão os biopolímeros, que podem ser de origem natural ou sintética, bioinertes ou bioativos, biodegradável ou não (HONG et al, 2007; BARBANTI et al, 2005; WANG, 2006; KHOR, 2003; RIGOLON, 2001;).

Os polímeros sofrem, durante o processo de obtenção, diversas transformações, geradas pelas variações das condições de processamento. Dependendo destas variáveis, podem ocorrer variações da microestrutura, cristalinidade, orientação molecular e, conseqüentemente, de suas propriedades finais. Em polímeros semicristalinos, a orientação molecular está diretamente relacionada aos processos de cristalização sob tensão e relaxação. A medida da orientação molecular de um polímero contribui de forma significativa para que haja um melhor entendimento com relação à estrutura, bem como as suas propriedades finais, fornecendo parâmetros para uma melhora nos métodos de processamento e com isso, minimizando possíveis propriedades indesejáveis (ALMEIDA et al, 2007).

A busca por materiais que possam ser reabsorvidos pelo sistema biológico, sendo de preferência de origem natural, tem crescido de maneira exponencial, 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, promovendo conseqüentemente, uma cura mais rápida de ferimentos (KHOR, 2003).

A condição fundamental para qualquer material sintético ou natural ser utilizado como biomaterial é não causar processos inflamatórios e, tampouco propiciar qualquer reação indesejável do corpo. Esta propriedade elementar é conhecida como biocompatibilidade. Adicionalmente, um biomaterial deve resistir/suportar solicitações químicas, térmicas e mecânicas sem substancial deterioração (reação química, fratura, abrasão) e, também, não deve alterar o meio biológico, propriedade esta denominada de biofuncionalidade (FOOK, 2005).

Os polímeros são materiais que vêm sendo utilizados com vantagens como implantes devido a sua facilidade de produção e manuseio e pelo fato de apresentarem características mecânicas semelhantes a dos materiais biológicos. Entre os polímeros de origem natural, destaca-se a quitina e a quitosana, sendo esta última um polímero derivado do produto da desacetilação da quitina, mas que também pode ocorrer de forma natural. Muito se tem estudado e publicado sobre quitosana e seus usos na última década. Por se tratar de um polímero natural, biodegradável, extremamente abundante e atóxico, a quitosana tem sido proposta como um material potencialmente atraente para usos diversos, principalmente em engenharia, biotecnologia, odontologia, medicina e nas ciências farmacêuticas (TAKAHASHI et al, 2007).

A quitosana é um polissacarídeo formado por uma cadeia linear, composto por grupos funcionais característicos: o grupo amino e o grupo acetamido, localizado no carbono dois da estrutura e hidroxilas, que conferem propriedades únicas a esse biopolímero. Essas propriedades estão relacionadas principalmente ao grau de desacetilação, que representa a porcentagem de grupos aminos presente na cadeia, sendo um parâmetro chave que influencia nas propriedades físico-químicas e biológicas dos filmes de quitosana. Quando o material apresenta um teor maior que 50% de grupos

aminos na cadeia, esse material é denominado quitosana (WU & ZIVANOCIY, 2008; KASSAI, 2008; SANTOS et al, 2007; CHAVES et al, 2005; HAMILTON et al, 2006).

No entanto, apesar da intensa pesquisa nesta área, o uso da quitosana na forma de membranas com orientação molecular preferencial tem sido pouco estudado. Há escassez de informações detalhadas sobre as condições para a obtenção destas membranas orientadas e sobre os fatores que influenciam nas características físicas, químicas, mecânicas e biológicas destes materiais, como também de resultados comparativos entre as características de membranas com e sem orientação molecular preferencial. É sabido que a orientação das cadeias poliméricas exerce um forte efeito sobre as propriedades mecânicas do polímero aumentando, por exemplo, sua resistência à tração, como também ocorre uma diminuição na taxa de degradação devido ao aumento da cristalinidade (DUARTE, 2004).

Neste sentido, o objetivo principal desta dissertação foi a avaliação das propriedades de membranas de quitosana obtidas com diferentes níveis de orientação molecular. Em complemento, os objetivos secundários foram: relacionar a morfologia das membranas com a orientação molecular; estabelecer correlações entre a orientação molecular e a biodegradação; identificar relações entre a energia superficial e a orientação molecular nas condições pesquisadas e, avaliar a biodegradabilidade da quitosana com variado grau de desacetilação na presença da lisozima.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

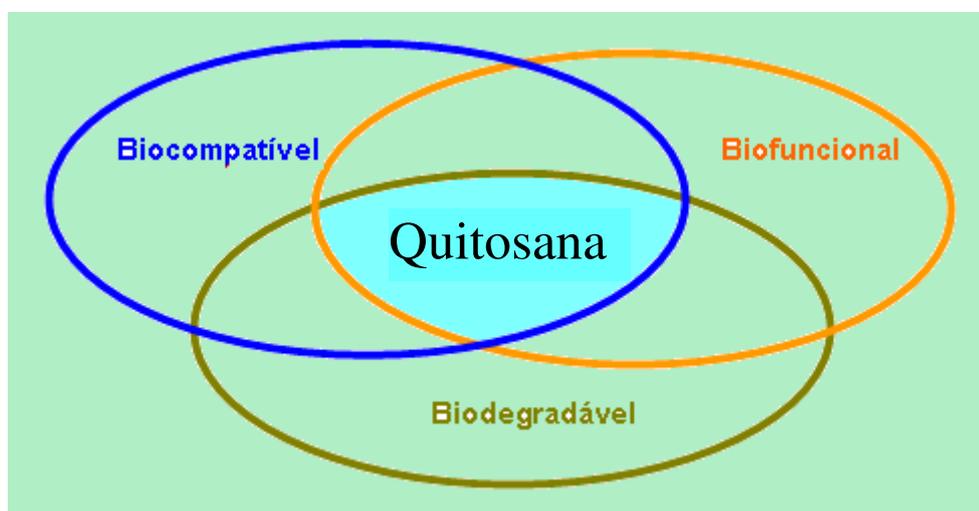
### **2.1 Biomateriais**

Há mais de um século, muitos pesquisadores vêm dedicando esforços para encontrar materiais com características adequadas para restauração ou substituição dos tecidos no corpo humano. Em uma fase inicial, a procura por tais compostos se deu através da utilização de materiais de origem biológica, como no caso dos enxertos e dos transplantes, os quais são classificados como autógenos (onde o doador é o próprio receptor), alógenos (onde o doador e o receptor são da mesma espécie) e xenógenos (onde o doador e o receptor são de espécies diferentes). Devido às desvantagens desses materiais e também do grande desenvolvimento científico e tecnológico, muitos trabalhos foram realizados com o objetivo de dispor de materiais de origem sintética com características adequadas que permitissem diminuir e, em alguns casos, eliminar o uso de matérias de origem biológica (RESENDE, 2007; KAWACHI et al, 2000).

Biomaterial é definido como qualquer substância ou combinação destas que não sejam fármacos, de origem natural ou sintética, que pode ser usada por qualquer que seja o período de tempo, tratando ou substituindo parcial ou totalmente qualquer tecido, órgão ou função do corpo, com a finalidade de manter e/ou alterar a qualidade de vida do paciente. Dentre os naturais destacam-se o colágeno purificado, as fibras protéicas, os polissacarídeos e os tecidos tratados. Já os sintéticos são constituídos por metais, cerâmicas, polímeros ou compósitos (OREFICE et al, 2006; DALLAN, 2005).

Um biomaterial usado em aplicações específicas, não deve ser necessariamente inerte ou inócuo. Quando esse material desenvolve respostas teciduais adequadas ao sistema hospedeiro, caracteriza-se como biocompatível. Já a biofuncionalidade, caracteriza-se por desempenhar funções desejadas dadas as suas propriedades mecânicas, químicas, ópticas, elétricas, etc. A biodegradação é uma condição em que o biomaterial é degradado por

enzimas ou microrganismo específicos presentes no corpo do hospedeiro ou no meio-ambiente. Porém, essas propriedades nem sempre ocorrem simultaneamente no mesmo material. Ele pode ser, por exemplo, só biocompatível; biocompatível e biofuncional; biocompatível e biodegradável ou ainda, biocompatível, biofuncional e biodegradável. Quando o biomaterial atende a estas três propriedades ele é classificado de 3ª geração. A quitosana pode ser citada como exemplo (Figura 2.1). Sendo assim, é de grande importância para os biomateriais a capacidade de apresentarem uma resposta apropriada quando aplicado no organismo, não causando, por exemplo, reação inflamatória, reação de corpo estranho ou mesmo toxicidade. Conforme a aplicação e as características requeridas do material se pode optar por um ou outro tipo, ou pela utilização conjugada de mais de um deles (DALLAN, 2005; HENCH, 1998; RATNER et al, 1996; MARK & CALVERT, 1994; DUCHEYNE & LEMMONS, 1988).



**Figura 2.1-** Quitosana com exemplo de um biomaterial de 3ª geração.

Fonte: Própria.

O desafio do campo de biomateriais é que todos os dispositivos de implantes substituem tecidos vivos cujas propriedades físicas são resultado de milhões de anos de otimização evolutiva, 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 de propriedades. O sucesso ou fracasso relativo de um biomaterial reflete o julgamento científico e de engenharia usados na avaliação deste ajuste. A interação de muitos e complexos fatores físicos, biológicos, clínicos e tecnológicos deve ser considerada (OREFICE et al, 2006).

Os biomateriais têm tido diversas aplicações como: biossensores, implantes, liberação controlada de fármacos, lentes intraoculares, substituintes de órgãos, etc. A cada ano são desenvolvidos novos biomateriais com o intuito de oferecer outras opções de tratamento para diversas enfermidades (SAN ROMAN & REIS, 2004).

Portanto, a ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar. Seu objetivo geral não engloba apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos lesados, mas também o entendimento das interações destes com o organismo receptor. Tal fato tem levado diferentes pesquisadores, dentre eles, odontólogos, médicos, engenheiros, químicos e biólogos, à criação e ao aperfeiçoamento de dispositivos que sejam simultaneamente biocompatíveis, biofuncionais e, quando necessário, biodegradáveis. Sendo assim, o desenvolvimento de biomateriais envolve profissionais de diversas áreas da ciência, sendo a multidisciplinaridade uma necessidade no desenvolvimento desses materiais (DALLAN, 2005; SANTOS, 2001; RATNER et al, 1996).

## **2.2 Materiais biodegradáveis**

Durante séculos, grandes lesões teciduais, originadas normalmente de traumas mecânicos ou de doenças degenerativas, trouxeram problemas em função dos poucos recursos terapêuticos disponíveis. A extração de grandes porções de tecidos levava a um significativo decréscimo da qualidade de vida do paciente e, assim, a substituição e/ou regeneração de regiões corpóreas danificadas tornou-se um objetivo. Com o aumento da expectativa de vida

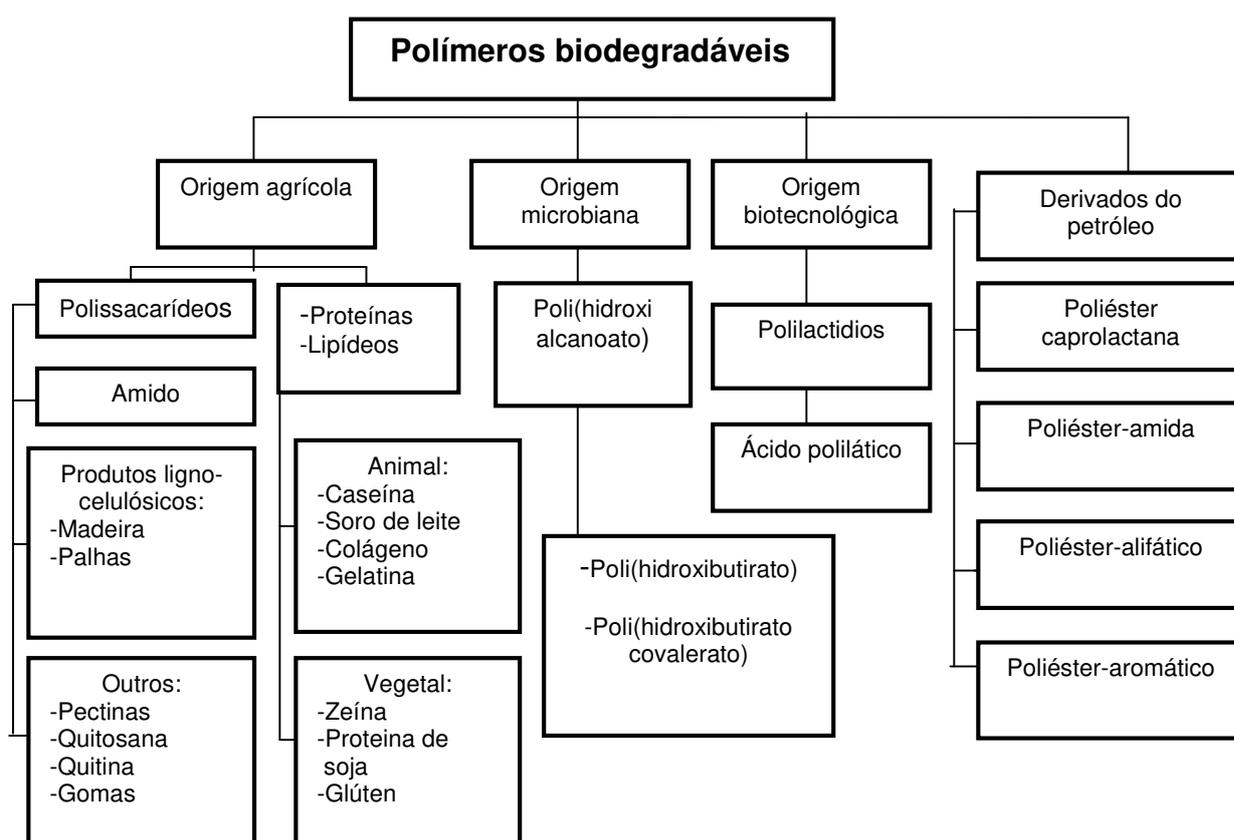
humana, obtida com o descobrimento dos antibióticos e dos quimioterápicos, além da melhoria das condições sanitárias e de higiene, a busca por metodologias para a substituição de tecidos lesados tornou-se uma necessidade. Os tecidos naturais são reparados de maneira contínua e remodelados de forma que se ajustem às inúmeras mudanças que ocorrem no ambiente fisiológico. Nenhum biomaterial, incluindo os biopolímeros, 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 (SANTOS & WADA, 2007).

Os biomateriais empregados podem ser classificados como bioestáveis ou permanentes e biodegradáveis ou temporários. Os materiais permanentes são compostos utilizados com o objetivo de substituir um tecido lesado por tempo indeterminado. Dessa forma, são produzidos de modo a reter as suas características mecânicas e físico-químicas por longos períodos. Por outro lado, existem situações onde há necessidade de um suporte que preencha apenas temporariamente a região lesada, até que a recomposição tecidual se concretize, ou ainda que direcione o processo regenerativo. Nesse caso, uma alternativa são os biomateriais temporários. Os materiais biodegradáveis são aqueles degradados tanto *in vitro* quanto *in vivo* sendo, portanto, utilizados como dispositivos temporários (SANTOS & WADA, 2007; DALLAN, 2005; TORMALA et al, 1998).

### **2.2.1 Polímeros biodegradáveis**

O aumento substancial do uso de polímeros de origem petroquímica em diversas aplicações nas últimas décadas, com conseqüente geração de grandes quantidades de resíduos, é pauta de diversas discussões atuais, já que estes polímeros são em geral descartados muito rapidamente e possuem um longo ciclo de vida, o que gera um sério impacto ambiental. Uma das

soluções encontradas é a utilização de polímeros biodegradáveis (Figura 2.2), que vêm despertando um crescente interesse em pesquisadores de diversas áreas, devido à diversidade de suas aplicações nos campos da medicina, biotecnologia e na área ambiental. Polímeros biodegradáveis são considerados como uma nova classe de um campo de estudo que vêm se destacando devido ao crescimento da importância desses materiais no mercado mundial. Um vasto número de polímeros biodegradáveis tem sido sintetizado recentemente e alguns microrganismos e enzimas capazes de degradá-los têm sido identificados (OREFICE et al, 2006; FORMOLO et al, 2003; DUARTE, 2004).

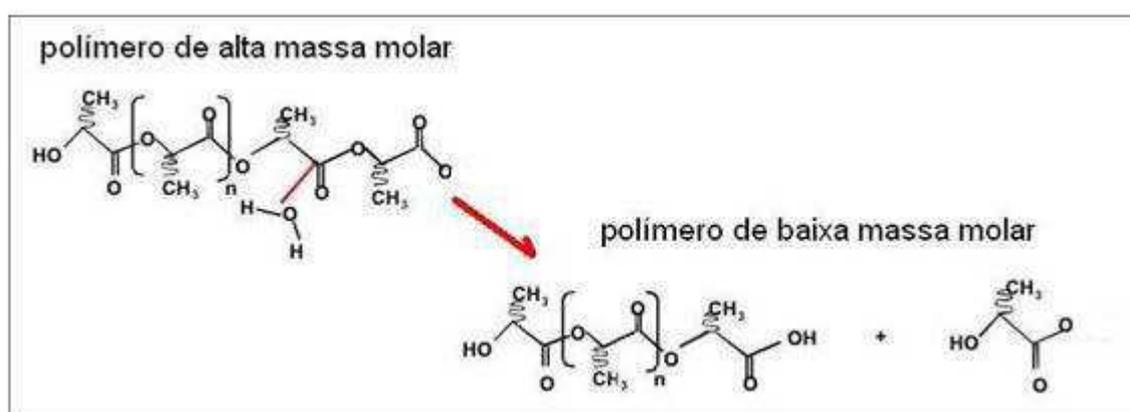


**Figura 2.2.** Exemplos de polímeros biodegradáveis.

Fonte: (RIBEIRO, 2006).

O polímero é dito biodegradável quando apresenta uma redução da sua massa molar (Figura 2.3) ao entrar em contato com o ambiente biológico.

Segundo a norma ASTM D 6400-99, os polímeros biodegradáveis são aqueles no qual a degradação resulta da ação de microrganismo de ocorrência natural, tais como bactérias, fungos e algas. Entretanto, com o crescimento das pesquisas relacionadas com a biodegradação no meio ambiente, torna-se necessário estabelecer com critério os termos a serem utilizados, pois os mesmos foram se aprimorando nos últimos anos. Para a Sociedade Japonesa de Polímeros Biodegradáveis, polímeros biodegradáveis são materiais que se transformam em compostos moleculares de baixa massa molecular, onde no mínimo uma etapa no processo de degradação ocorre através do metabolismo deste material pelos organismos que ocorrem na natureza. A biodegradação de um polímero é um processo que leva a uma mudança em sua estrutura química causada pela atividade biológica que resulta em produtos finais de ocorrência natural (OREFICE et al, 2006; DUARTE, 2004).



**Figura 2.3-** Hidrólise com quebra das ligações éster e formação de cadeias menores.  
**Fonte:** (SIMÕES, 2007).

Macromoléculas naturais, por exemplo, proteínas, celulose e amido são geralmente degradadas em sistemas biológicos por hidrólises seguidas de oxidação. Observa-se, então, que a maioria dos polímeros sintéticos biodegradáveis contem ligações hidrolisáveis ao longo da cadeia polimérica, por exemplo, ligações amida, éster e uréia são suscetíveis à biodegradação pelos microrganismos e enzimas hidrolíticas. Desde que enzimas proteolíticas

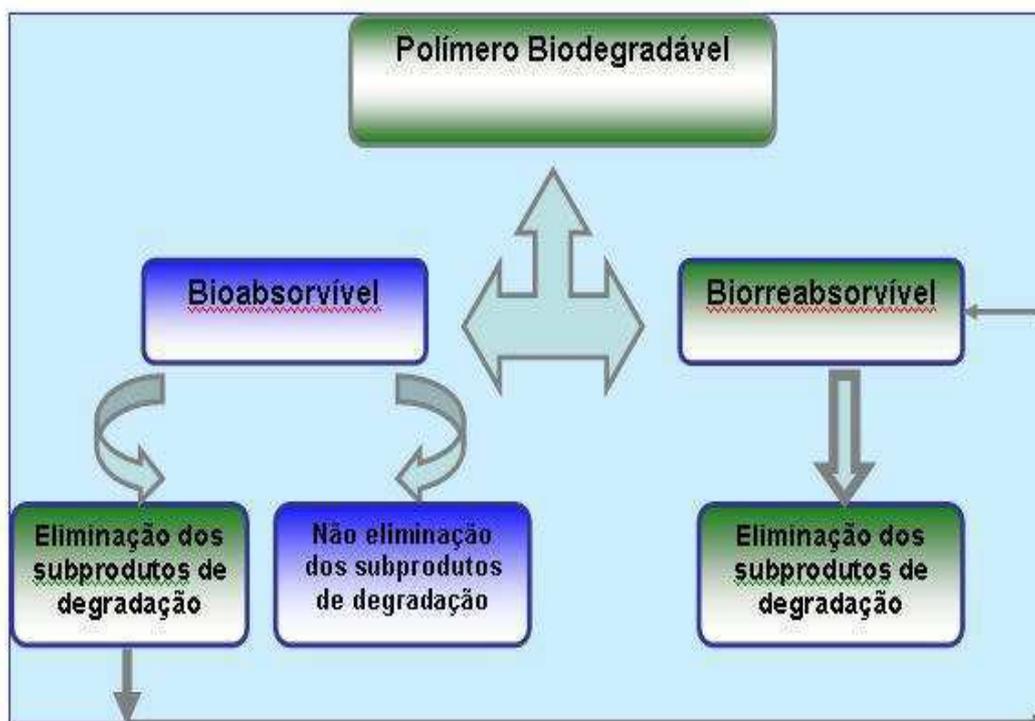
catalisam especificamente a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes aos substituintes nas proteínas, polímeros substituídos contendo substituintes tais como benzil, hidroxila, carboxila, metila e grupo fenila têm sido preparados na perspectiva de que a introdução destes substituintes possa aumentar a biodegradabilidade (OREFICE et al, 2006).

### **2.2.2 Polímeros bioabsorvíveis e biorreabsorvíveis**

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 (SANTOS & WADA, 2007).

Bioabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver nos fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular, como no caso da dissolução lenta de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Exemplos deste tipo de material são o poli-óxido de etileno (PEO) e o poli-etileno glicol (PEG) (SANTOS & WADA, 2007; SIMÕES, 2006; VERT et al, 1999).

Biorreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que sofrem degradação através de clivagem das cadeias, com redução da massa molar, formando oligômeros e monômeros, que são reabsorvidos *in vivo* e eliminados por rotas metabólicas do organismo. Biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. A palavra “biorreabsorção” é aplicada quando a eliminação é total. Um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas. Os materiais poliméricos biorreabsorvíveis são os compostos utilizados preferencialmente em dispositivos temporários (SANTOS & WADA, 2007; SIMOES, 2007; VERT et al, 1999). A Figura 2.4 mostra de forma ilustrativa o fluxograma esquemático da biodegradação de um polímero.



**Figura 2.4.** Fluxograma esquemático da biodegradação de um biopolímero.  
**Fonte:** Própria

### 2.2.3 Hidrólise de polímeros sintéticos biodegradáveis

O processo de degradação dos polímeros semicristalinos ocorre em duas fases: a primeira consiste na penetração e na difusão das moléculas de água nas regiões amorfas do material e subseqüentemente, cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas. Por ocorrer na fase amorfa inicialmente, há redução do peso molecular sem diminuição das propriedades mecânicas já que a matriz polimérica permanece unida devido às regiões cristalinas. A segunda fase acontece quando parte considerável da região amorfa está degradada e a reação prossegue no centro dos domínios cristalinos (RIBEIRO, 2006).

Polímeros hidrolisáveis, tais como poliésteres, são frequentemente mais propensos à degradação. Por exemplo, o PLA e o PGA hidrolisam muito mais rapidamente que PHAs por um mecanismo de hidrólise praticamente abiótico

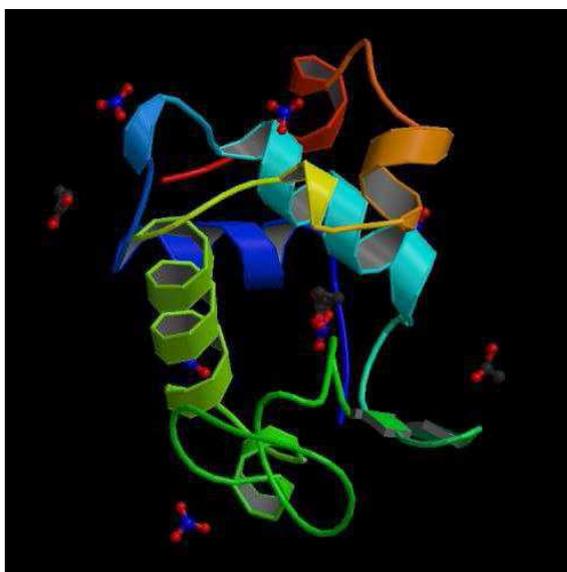
devido ao seu caráter mais hidrofílico, sendo a taxa de hidrólise abiótica principalmente controlada pela massa molar, embora tenha sido relatado que a taxa de qualquer hidrólise enzimática de poliésteres é principalmente determinada pela cristalinidade. Várias pesquisas mostraram que, após grande parte das regiões amorfas sofrer degradação, o segundo estágio correspondente às regiões cristalinas começa. Assim, verificou-se que um dos principais fatores de controle da hidrólise enzimática de polímeros biodegradáveis é o grau de cristalinidade destes, ou seja, quanto maior o grau de cristalinidade do polímero, menor sua taxa de degradação (OREFÍCE et al, 2006).

O controle da degradação é importante não só para adequá-lo as suas aplicações, mas também para minimizar o processo inflamatório presente. Sua permanência prolongada ou degradação precoce é indesejada. Alguns estudos associam alto grau de cristalinidade e degradação demorada com uma incidência maior de reações teciduais desfavoráveis, provavelmente por resposta inflamatória às partículas remanescentes que, embora quimicamente biocompatíveis, fisicamente atuam como resíduos, provocando encapsulamento e até mesmo formação de granulomas. Em outros trabalhos a degradação muito rápida é associada à ocorrência de reações inflamatórias de corpo estranho. O tipo e a intensidade das reações inflamatórias são fortemente relacionados à liberação de partículas poli, oligo ou monoméricas durante a degradação. É possível que essas respostas estejam ligadas à liberação de produtos intermediários ácidos em quantidades excessivas (SIMÕES, 2007; RIBEIRO, 2006).

#### **2.2.4 Enzimas**

As enzimas são um grupo de substâncias orgânicas de natureza geralmente proteica com atividade intra ou extracelular que têm funções catalisadoras (Figura 2.5). As reações químicas sem a sua presença,

aconteceriam a uma velocidade extremamente baixa. Essas substâncias promovem a diminuição da energia de ativação necessária para que se dê uma reação química, resultando no aumento da velocidade da reação e possibilitando o metabolismo dos seres vivos. Para sua atividade ótima, certas enzimas devem se associar a co-fatores, os quais podem ser íons metálicos, por exemplo,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{Zn}^{2+}$ . Todas as enzimas são ajustadas a um ambiente específico no qual suas atividades e estrutura dimensional são ótimas para um determinado propósito. Por exemplo, para as enzimas dos seres humanos ou as isoladas de suas células, este ambiente é uma solução aquosa a pH 6-8, uma força iônica de 0,15 mol/L (como é o ambiente salino normal, 0,9% NaCl) e temperatura de 35-40°C. Uma mudança extremamente pequena de um destes parâmetros pode desativar totalmente a enzima e até destruí-la irreversivelmente (ORÉFICE et al, 2006).



**Figura 2.5.** Ilustração de uma enzima

**Fonte:** <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/L/Lysozyme.html>

## 2.3 Orientação molecular em filmes poliméricos

### 2.3.1 *Cristalinidade*

O arranjo de átomos e moléculas em cristais é a forma de organização da matéria de mínima energia o que proporciona uma maior estabilidade da estrutura. Processos de cristalização são muitas vezes restringidos por fenômenos governados pela cinética. Macromoléculas apresentam normalmente pequena mobilidade em comparação a átomos e pequenas moléculas, o que dificulta a sua acomodação rápida em posições energeticamente mais favoráveis. Como consequência da competição entre os fatores energéticos, entrópicos e cinéticos e em função de suas características estruturais (constituição da cadeia, natureza das forças intermoleculares, mobilidade da cadeia, tamanho médio de cadeia e distribuição de massa molar, etc.), os polímeros podem ser divididos em polímeros amorfos e polímeros semicristalinos (SOLLA, 2005).

Os polímeros podem cristalizar de duas formas: a partir do estado fundido ou por cristalização a frio de um estado sólido amorfo. Também se pode obter ordem estrutural nos materiais poliméricos por aplicação de tensões (tração ou cisalhamento) que tendem a alinhar as moléculas no sentido da sollicitação. Esta aplicação de tensão pode ser feita de várias formas:

- No estado sólido, acima da  $T_g$ : estiramento a frio (*cold drawing*);
- Durante o resfriamento, em estado pastoso: *melt spinning*;
- Durante a evaporação do solvente: *gel drawing*.

Em todos os casos acima, em maior ou menor grau, tem-se uma estrutura anisotrópica com as cadeias poliméricas e/ou os cristais orientados preferencialmente à direção da tensão (RABELLO, 1989).

Um polímero isotrópico tem a mesma estrutura e propriedades em todas as direções. Sob deformação no estado sólido, o polímero se torna anisotrópico, por causa do alinhamento das cadeias poliméricas e, portanto, ficam orientadas em relação a uma direção particular. O grau de orientação com relação a uma direção particular expressa uma medida da extensão da

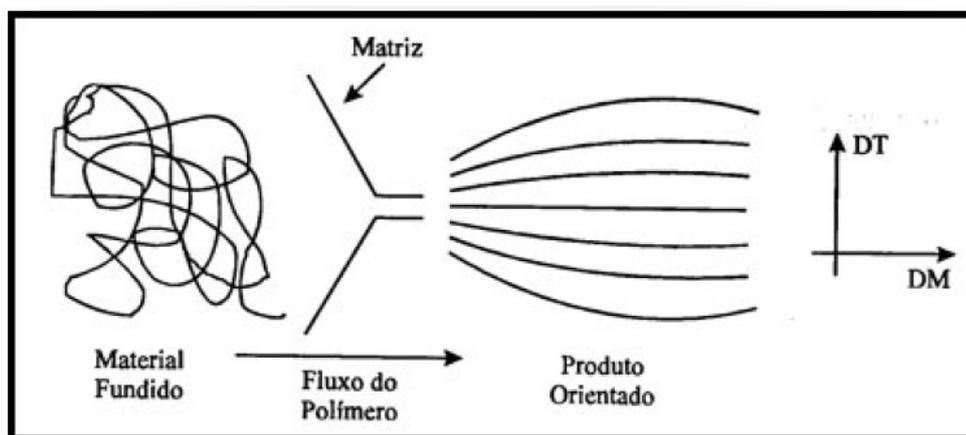
anisotropia produzida pelo processo de deformação. Já que as propriedades de um polímero anisotrópico apresentam uma dependência direcional, uma medida da orientação no polímero revela suas propriedades durante a deformação (DUARTE, 2004).

O alinhamento das cadeias possibilita a adequação dessas em estruturas mais compactas, ou seja, cristalinas. Apesar de simples, esse modelo prevê satisfatoriamente uma série de fenômenos envolvidos em polímeros semicristalinos. Entre esses fenômenos, se destaca o fato de que polímeros semicristalinos, ou aqueles dotados de potencialidade para a cristalização, apresentam níveis maiores de cristalização quando estirados e orientados. O alinhamento de cadeias ainda permite que as ligações entre átomos de carbono (C-C) fiquem orientadas no sentido do comprimento da fibra. Tensões aplicadas nessa direção serão sustentadas diretamente pelas ligações de alta energia (C-C) e em menor proporção por forças secundárias entre as cadeias (SOLLA, 2005).

A orientação de filmes trata de um processo físico de orientação de cadeias moleculares do polímero que permite a obtenção de filmes muito finos, mas com propriedades adequadas à conservação e ao manuseio que apresenta modificações em várias outras características: solubilidade, reação química, propriedades mecânicas, etc. Por exemplo, promove um aumento na resistência à tração e na rigidez do material, melhoria na transparência, brilho e lisura e, para polímeros cristalinos como o PP, significativo efeito de redução da permeabilidade de gases e ao vapor d'água, da ordem de 50%, dependendo do grau de temperatura de orientação. Materiais fabricados, por exemplo, com PEAD altamente orientado são aproximadamente dez vezes mais resistentes do que os fabricados a partir do polímero não orientado, pois a orientação aumenta o empacotamento e a cristalinidade das cadeias e conseqüentemente, a rigidez do polímero. A orientação no polímero pode ser detectada por várias técnicas entre elas a difração de raios-X, para obter informação sobre a orientação das fases cristalinas e amorfas do polímero (DUARTE, 2004; COUTINHO et al, 2003).

As propriedades mecânicas de tração são melhoradas com o alinhamento da cadeia, tornando o polímero mais cristalino, aumentando também a resistência à degradação. Em estudos anteriores, foi verificado que a degradação enzimática em polímeros ocorre de forma mais lenta quando estes têm um maior grau de cristalinidade. Assim, a orientação molecular pode determinar uma desaceleração na taxa de degradação, sendo este fator desejável em algumas aplicações dos polímeros (ORÉFICE et al., 2006; DUARTE, 2004).

A Figura 2.6 mostra o esquema de como se dá a orientação molecular no processamento industrial de polímeros.



**Figura 2.6-** Ilustração de orientação molecular no polímero em processos por injeção, extrusão ou sopro.

**Fonte:** (DUARTE, 2004).

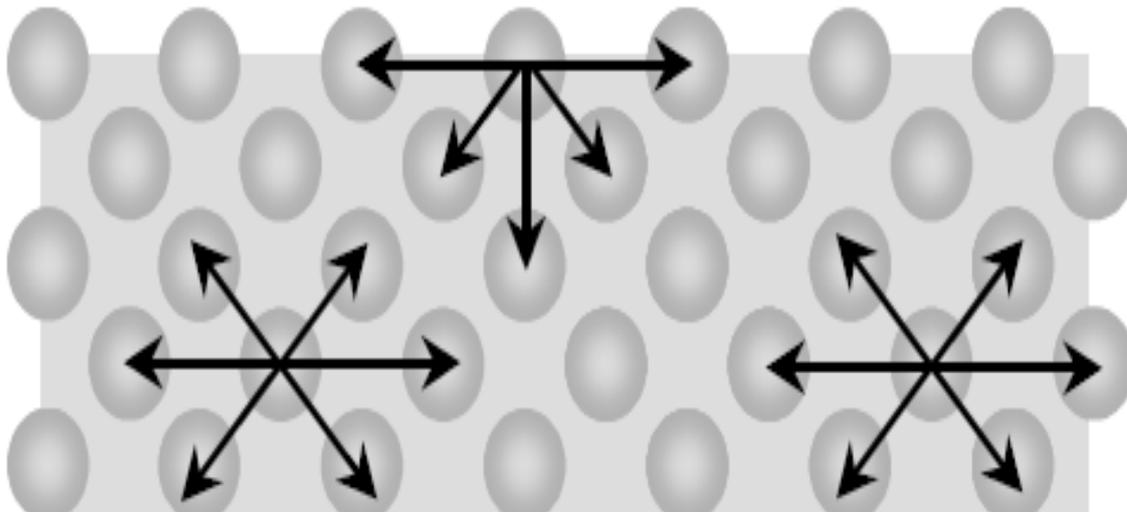
A caracterização experimental da orientação molecular em sistemas poliméricos pode ser realizada através do uso de várias técnicas, como por exemplo: difração de raios-X, birrefringência ótica, ressonância magnética nuclear, espectroscopia na região do infravermelho, fluorescência de raios X, espectroscopia Raman, tensão superficial, figura de pólo entre outras. Figura de pólo é a forma mais utilizada para a representação da orientação em materiais poliméricos. Qualitativamente, a figura de pólo apresenta como vantagem a facilidade da visualização da orientação preferencial das cadeias poliméricas em relação aos eixos de interesse, como por exemplo, o eixo

principal de fluxo do material durante o processamento e o eixo de estiramento de um filme (COUTINHO et al., 2003).

## **2.4 Tensão superficial**

### **2.4.1 Energia de superfície**

Nas superfícies de líquidos e sólidos os átomos e moléculas apresentam maior energia do que os situados no interior daqueles. No caso de líquidos, esta energia é chamada de tensão superficial. Geralmente, quanto maior a resistência de ligação de uma substância, maior a energia de superfície. Como as ligações metálicas são muito mais fortes do que as ligações Van der Waals encontradas nos líquidos, os metais apresentam energia de superfície maior. O conceito de energia de superfície pode ser mais facilmente compreendido usando um líquido como exemplo: átomos e moléculas do líquido podem se mover livremente procurando ocupar uma posição de menor energia potencial, ou seja, um lugar onde as forças (atrativas e repulsivas) agindo em todas as direções estejam em equilíbrio. Por outro lado, as partículas na superfície do material experimentam apenas forças dirigidas para dentro do líquido (Figura 2.7). Devido a isto, as superfícies são sempre regiões de maior energia. E é justamente a diferença entre as energias das espécies na superfície e no interior do material que se denomina *energia de superfície* ou *tensão interfacial* (SOUZA et al, 2006; O'BRIEN & RYGE, 1981).



**Figura 2.7-** Forças atuando em átomos ou moléculas no interior e na superfície de um material.

**Fonte:** (SOUZA et al, 2006).

De acordo com o princípio da menor energia, a natureza tende sempre a um estado de mínima energia. É por esta razão, por exemplo, que uma gota de água tende à forma esférica (Figura 2.8), pois esta é a forma geométrica de mesmo volume com a menor área superficial. Da mesma forma, a adesão de um material sobre outro será tanto melhor quando maiores forem as energias de superfícies envolvidas. Quando um líquido entra em contato com uma superfície sólida, este vai ser sujeito a dois tipos de forças que atuam em sentidos contrários: a força de adesão e a força de coesão. A força de adesão é a atração entre moléculas diferentes, ou seja, a afinidade das moléculas do líquido com as moléculas do sólido. Atua no sentido de o líquido molhar o sólido. A força de coesão é a atração intermolecular entre moléculas semelhantes, ou seja, a afinidade entre as moléculas do líquido. Atua no sentido de manter o líquido em sua forma original. Se a força de adesão for superior à de coesão, o líquido vai interagir favoravelmente com o sólido, molhando-o (SOUZA et al, 2006; LEE, 1991).



**Figura 2.8-** Água em forma de esfera em estado de menor energia.

**Fonte:** <http://br.geocities.com/saladefisica6/hidrostatica/capilaridade.htm>

#### **2.4.2 Molhabilidade**

A molhabilidade pode ser também considerada como um fenômeno termodinâmico que contribui para uma boa difusão, pois é favorecida pelo contato das macromoléculas durante a migração de líquidos da superfície de um polímero para seu interior. Além disso, a molhabilidade de um polímero é também necessária, na verdade, essencial para um bom mecanismo de adsorção, levando a formação de interações moleculares como interações de *Van De Waals*, interações ácido-base, e ligações de hidrogênio interfacial. Para se aumentar a molhabilidade de um polímero pode-se usar dois possíveis métodos. O primeiro desses envolve o aumento da energia superficial dos polímeros através da incorporação de grupos polares na sua estrutura. O segundo método envolve o princípio da minimização da barreira de energia, através do aumento de rugosidade do material, o que gera um conseqüente aumento a resistência adesiva. Assim, o molhamento está relacionado com as energias das interfaces, e este conhecimento de como determiná-lo é muito importante quando se deseja aumentá-lo, como na produção de materiais para brasagem, ou reduzi-lo, como na elaboração de produtos impermeáveis (COSTA et al., 2008).

### **2.4.3 Espalhamento**

Enquanto o molhamento é um processo termodinâmico, o espalhamento é cinético. Pode-se dizer que o molhamento é correlacionado ao ângulo de contato, enquanto o espalhamento relaciona-se com o acréscimo da área projetada. É possível abordar o fenômeno do espalhamento hidrodinâmica ou termodinamicamente. Do ponto de vista termodinâmico, o espalhamento acontece com a redução da energia livre de *Helmholtz*. A abordagem do fenômeno do espalhamento do ponto de vista hidrodinâmico, leva em consideração, normalmente, fluidos de alta viscosidade e sobre substratos não metálicos. O que os fenômenos de molhamento e espalhamento têm em comum, é que estão todos relacionados com a tensão de superfície dos materiais (COSTA et al, 2008; SOUZA et al, 2006; LEE, 1991).

### **2.4.4 Goniometria**

A goniometria é uma medida macroscópica que permite a determinação da energia de superfície de um determinado material. Para isso, uma gota de uma dada solução é colocada sobre uma determinada amostra em estudo. Após a deposição da gota observa-se a forma e a curvatura da mesma, ou seja, o ângulo de contato. Este é definido como o ângulo entre um plano tangente a uma gota do líquido e um plano contendo a superfície onde o líquido se encontra depositado, conforme indica a Figura 2.9. Nesta figura,  $\gamma_S$  e  $\gamma_{LV}$  são a energia de superfície do sólido e a tensão superficial do líquido em equilíbrio com o vapor, respectivamente;  $\gamma_{SL}$  é a energia da interface sólido – líquido (SOUZA et al, 2006).



**Figura 2.9.** Diagrama esquemático da medição do ângulo de contato.  
**Fonte:** (SOUZA et al, 2006)

Pela medida do ângulo da curvatura pode-se relacionar o ângulo de contato com a tensão superficial apresentada pelo material em relação à solução empregada. Se as moléculas do líquido forem atraídas para as moléculas do sólido na mesma ou maior intensidade do que estão atraídas entre si, o líquido irá espalhar-se completamente sobre a superfície do sólido, e não haverá formação do ângulo de contato ( $\Theta = 0$  grau). O aumento no ângulo de contato, que corresponde à menor tensão superficial apresentada, significa menor aderência da solução aos materiais empregados. Como a tendência do líquido para se espalhar aumenta à medida que o ângulo de contato diminui, o ângulo de contato se constitui em um útil indicador da capacidade de molhamento de um líquido em uma superfície; um ângulo de contato em  $0^\circ$  indica molhamento total, e valores abaixo de  $90^\circ$  correspondem a um bom molhamento. Valores superiores a  $90^\circ$  indicam molhamento pequeno e nenhum molhamento é conseguido com ângulo de contato de  $180^\circ$  (SOUZA et al, 2006; ANUSAVICE, 2005; O'BRIEN & RYGE, 1981).

## 2.5 Quitina

A quitina (do grego *khitón* = caixa de proteção) é um polissacarídeo de origem natural que por apresentar um grupo acetamido se destaca do ponto de vista químico, e sua desacetilação leva a um novo polissacarídeo, com fórmula química similar, denominado quitosana. A quitina se assemelha quimicamente com a celulose e possui características físico-químicas interessantes como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade. No entanto, seu

reconhecimento científico não apareceu logo após sua descoberta, e sim após o conhecimento de suas propriedades. A confirmação da porção glicosamina na estrutura da molécula, que possui a característica principal um grupo amino no carbono 2, tornaram esse polímero interessante do ponto de vista químico, físico e biológico (ALMEIDA, 2009).

### **2.5.1 Histórico**

A quitina, que é o precursor direto da quitosana, foi descoberta em cogumelos pelo professor francês *Henri Braconnot* em 1811, aproximadamente 30 anos mais cedo do que a celulose, porém, em contraste com esta última, permaneceu como um recurso de biomassa por muito tempo não utilizado. O produto foi nomeado inicialmente como fungina e por meio de análises observou-se parecer possuir impurezas, possivelmente outro polissacarídeo. Em sua opinião se tratava de um composto totalmente diferente da celulose (ALMEIDA, 2009).

Em 1823, Odier isolou um resíduo insolúvel contido em carapaças de insetos, o qual chamou de quitina, obtida pelo seguido tratamento desse resíduo com soluções de KOH. Ele não detectou o nitrogênio da molécula, entretanto foi o primeiro a concluir que a quitina se assemelhava com vegetais e com substâncias estruturais encontradas em carapaças de insetos. Existem dúvidas se Odier tinha conhecimento da substância encontrada por Braconnot, pois em sua referência ele não é citado. Odier também identificou a quitina em carapaças de caranguejo desmineralizado e sugeriu que era o material básico de exoesqueleto em todos os insetos, e possivelmente em aracnídeos. Somente em 1843 Payen detectou a presença do nitrogênio na quitina. Pesquisadores da época, como Odier e Children, relataram em seus trabalhos que isolaram a quitina com múltiplos tratamentos com soluções de hidróxido de potássio concentrado, e, portanto, muito provavelmente tenham obtido quitosana ao invés da quitina (ALMEIDA, 2009; CRAVEIRO et al, 1999).

Devido à similaridade da quitosana e quitina com a celulose, uma enorme

confusão se estabeleceu até meados do século XX, quando pesquisas demonstraram se tratar de substâncias diferentes. A celulose, por ser bastante utilizada na indústria da época, passou a contar com intensos investimentos, em contraste com a quitina e quitosana, que ficaram restritas à pesquisa básica. Apesar de ter sido descoberta há dois séculos, seu estudo e aplicação só apresentou significância por volta de 1970 (ALMEIDA, 2009; CRAVEIRO et al, 1999).

### 2.5.2 Estrutura e propriedades

A quitina é um polímero de cadeia linear formado por unidades poli [ $\beta$ , (1-4) ligação N-acetil-D-glicosamina] ou N-acetilglicosamina unidas por ligações glicosídicas, formando um polissacarídeo cristalino cuja fórmula geral é  $[C_8H_{13}O_5N]_n$ . A similaridade da estrutura da molécula da quitina que apresenta o grupo acetil no carbono 2 (Figura 2.10), com a molécula da celulose que tem como única diferença a substituição do grupo acetil pelo grupo hidroxila também no carbono 2 (Figura 2.11), reflete em uma utilização similar dos dois polímeros na natureza, como materiais estruturais e de defesa (ROBERTS, 1992). A quitina é a segunda substância orgânica mais abundante na biosfera, superada apenas exatamente pela celulose, mas supera esta última em termos de taxa de reposição, que chega a ser duas vezes maior que a da celulose (ALMEIDA, 2009; FILHO et al, 2007; CRAVEIRO et al, 1999).

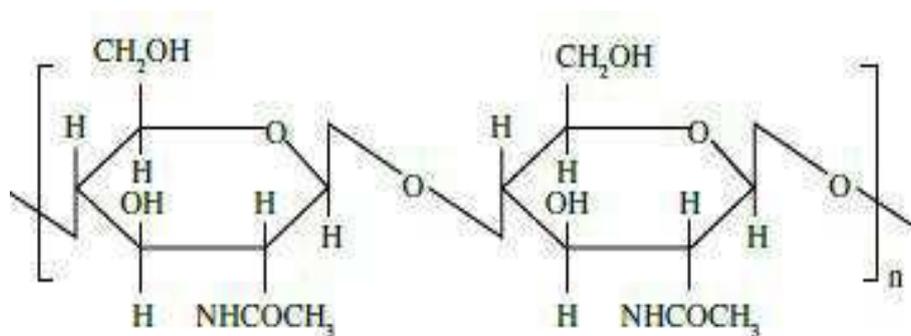
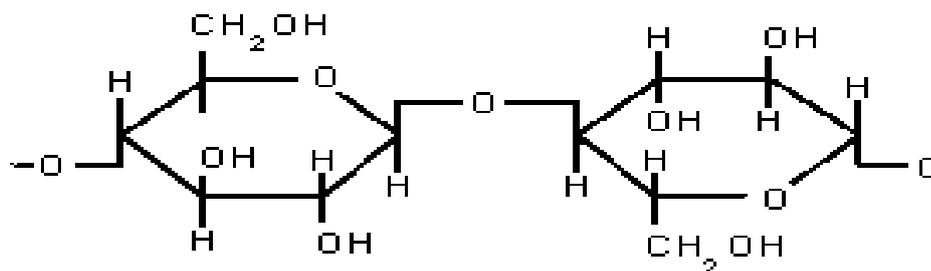


Figura 2.10. Estrutura química da quitina (NETO et al, 2008).

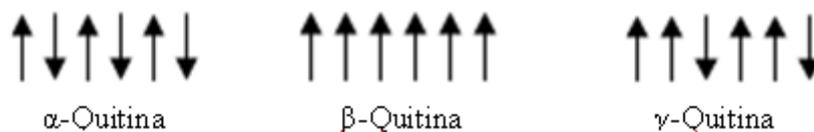


**Figura 2.11.** Estrutura química da celulose (NETO et al, 2008).

A quitina tem uma estrutura cristalina bem organizada evidenciada por estudos de difração de raios X. Existem 3 formas polimórficas: quitina  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  que diferem no arranjo das cadeias dentro de regiões cristalinas. A  $\alpha$ -quitina é encontrada em estruturas rígidas e resistentes, como a cutícula de artrópodes, e nesses casos ocorre fortemente associada a proteínas, materiais inorgânicos ou ambos. As formas  $\beta$ - e  $\gamma$ -quitina ocorrem em estruturas flexíveis embora também resistentes. A  $\alpha$ -quitina é a forma mais abundante e é também considerada a mais estável, visto que a conversão das duas últimas formas na primeira é irreversível (ALMEIDA, 2009).

As polimorfias de quitina correspondem a diferentes arranjos no estado sólido, decorrentes de disposições distintas das cadeias do polímero nas lamelas ou folhas que constituem os domínios cristalinos (Figura 2.12). A  $\alpha$ -quitina corresponde a um empacotamento denso resultante da disposição antiparalela das cadeias poliméricas em diferentes lamelas ou folhas, o que favorece a existência de numerosas ligações hidrogênio inter- e intra-cadeias da mesma lamela e de lamelas vizinhas. No caso de  $\beta$ -quitina as cadeias pertencentes a diferentes lamelas dispõem-se paralelamente, o que dificulta o estabelecimento de ligações hidrogênio intermoleculares envolvendo cadeias de lamelas adjacentes e resulta em material menos densamente empacotado. Em  $\gamma$ -quitina parece ocorrer uma combinação dos dois arranjos anteriormente descritos, pois as cadeias de duas lamelas em disposição paralela são intercaladas por lamela em que as cadeias se dispõem antiparalelamente. Essa

estrutura é a menos estudada e conhecida e sugere-se que possa ser uma distorção das duas estruturas anteriores (FILHO et al, 2007).



**Figura 2.12.** Representação esquemática das estruturas polimórficas de quitina, sendo que as setas representam as cadeias poliméricas no sentido do terminal não-redutor para o redutor.

Fonte: (FILHO, 2007).

### 2.5.3 Fontes de quitina

A quitina é o segundo mais abundante material orgânico, perdendo somente para a celulose em quantidade de produção anual. Tem como principais fontes naturais as carapaças de crustáceos (notadamente caranguejo, camarão e lagosta), sendo também encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos (NETO et al, 2008; CRAVEIRO et al, 1999).

Para a utilização da quitina, proveniente de exoesqueleto de crustáceos, é necessária uma purificação, pois esta está associada intimamente a proteínas, material inorgânico como  $\text{CaCO}_3$ , pigmentos e lipídeos. De modo simples, significa a passagens por processos de desproteínização, normalmente utilizando  $\text{NaOH}$ ; desmineralização, utilizando de preferência o  $\text{HCl}$  e despigmentação com tratamento de etanol, algum ácido ou EDTA. Em função das condições empregadas nesses tratamentos as características das quitinas obtidas, tais como pureza, cristalinidade, são fortemente afetadas (BATTISTI & FILHO, 2008; ROBERTS, 1992). A Tabela 2.1 mostra as principais fontes de quitina e quitosana.

**Tabela 2.1-** Fontes naturais de quitina e quitosana

| <b><i>Animais Marinhos</i></b> | <b><i>Insetos</i></b> | <b><i>Microorganismos</i></b> |
|--------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Anelídeos                      | Escorpiões            | Algas verdes                  |
| Moluscos                       | Aranhas               | Leveduras                     |
| Celenterados                   | formigas              | Fungos                        |
| Lagosta                        | Besouros              | Esporos                       |
| Camarão                        | --                    | Algas marrons                 |
| Caranguejo                     | --                    | --                            |
| <b>Krill</b>                   | --                    | --                            |

**Fonte:** (CRAVEIRO et al., 1999).

Nos últimos anos, devido ao aumento na demanda da quitina e quitosana para diferentes utilizações, outras fontes desses polímeros estão sendo avaliados como, por exemplo, a extração de quitina do fungo utilizado na produção de ácido cítrico. Alguns fungos contêm quitosana, formada pela ação de quitina-desacetilases na quitina, sendo que essa pode ser isolada de suas paredes celulares. Esse procedimento para produzir quitosana é mais caro do que o processo convencional de desacetilação química da quitina usado até o momento, tornando-se um processo inviável economicamente. Apesar disso, a quitosana pode ser isolada, sem a necessidade de um tratamento muito danoso com soluções alcalinas e isso pode se tornar importante no futuro (ALMEIDA, 2009; KURITA, 2006; MUZZARELLI et al, 1994; MCGAHREN et al, 1984).

#### **2.5.4 Aplicações da quitina**

Por ser altamente nitrogenada, a quitina é utilizada rotineiramente como material quelante em reações químicas. Apresenta grande variedade de usos,

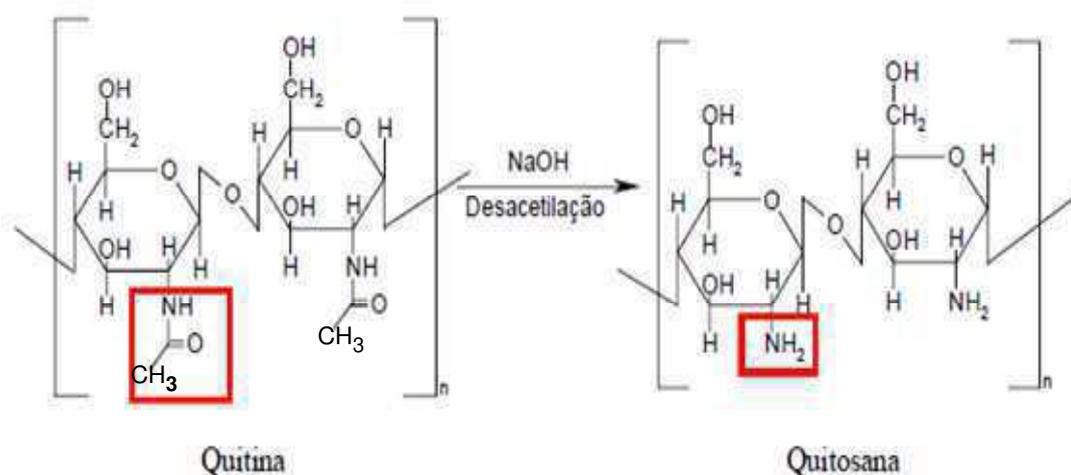
principalmente na indústria têxtil, alimentícia e de cosméticos; porém, sua maior aplicação encontra-se na produção de quitosana, que por sua vez, se presta a inúmeras aplicações (NETO et al, 2008; CRAVEIRO et al, 1999).

### **2.5.5 Desacetilação da quitina**

O parâmetro que diferencia quitosana e quitina é sem dúvida, o grau de desacetilação (GD) ou grau de acetilação (GA), que são complementares entre si para o valor de 100% do grau determinado, ou seja, se uma quitosana apresenta 75% de grau de desacetilação, implica dizer que esta tem 25% de grupos acetilados no substituinte do carbono número 2 ou 25% de grau de acetilação. O GD identifica a quitosana como copolímero com a quitina. O percentual de grupos amino deve ser superior a metade dos grupamentos acetamido presentes no carbono número 2 do copolímero. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50% de unidades 2-amino-2-desoxi-Dglicopirranose. O grau médio de acetilação (GA) define a porcentagem de unidades 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopirranose presentes, em média, nas cadeias do polímero. Em função de suas composições distintas os polímeros exibem propriedades bem diferentes. Do ponto de vista prático é a solubilidade que permite a distinção mais simples e rápida, pois quitosanas são solúveis em soluções aquosas diluídas de vários ácidos; as soluções de ácido acético e clorídrico são as mais comumente empregadas, mas quitina não é solúvel nesses meios, sendo dissolvida apenas em poucos sistemas solventes (FILHO et al., 2007; LIMA, 2005).

Os processos químicos de desacetilação da quitina podem ser realizados pela via homogênea, a qual se realiza com álcali-quitina, ou heterogênea, sendo esta a mais extensivamente usada e estudada. Geralmente a quitina é suspensa em soluções aquosas concentradas de NaOH ou KOH (40-60%) por tempo variáveis (0,5-24h) e a temperaturas relativamente elevadas (50-130 °C). Em função de suas diferentes estruturas,  $\alpha$ - e  $\beta$ -quitina não são igualmente susceptíveis à reação de desacetilação. A desacetilação da quitina também

ocorre na natureza através de enzimas específicas como a quitinase ou pela ação de microrganismos. A quitosana assemelha-se quimicamente com o biopolímero original quitina tendo no carbono 2 uma amina primária ( $-NH_2$ ). A presença de grupos amino desacetilados permite maior reatividade da quitosana em relação à quitina. Por isso, a quitosana desperta muito interesse para diversas aplicações (ASSIS et al, 2008; FILHO et al, 2007). A Figura 2.13 mostra o esquema de desacetilação da quitina formando a quitosana.



**Figura 2.13.** Esquema de desacetilação da quitina, originando a quitosana.

**Fonte:** Adaptado de (STAMFORD, 2006).

## 2.6 Quitosana

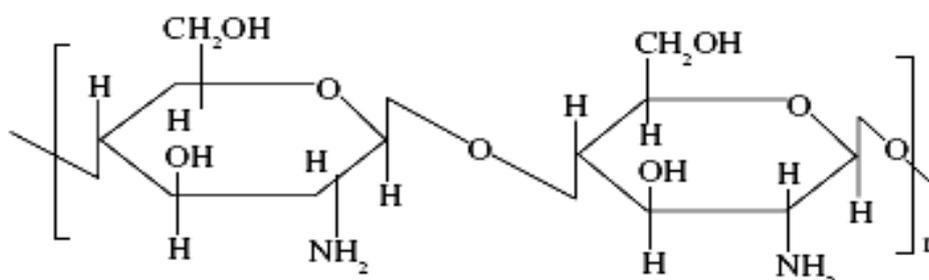
A quitosana foi descoberta em 1859 por Rouget, quando do contato da quitina com uma solução de hidróxido de potássio em ebulição. A mesma só foi produzida industrialmente pela primeira vez em 1971 no Japão que em 1986 já possuía quinze indústrias produzindo quitina e quitosana em escala comercial. Há algum tempo a quitosana tem sido submetida à avaliação prática, sobretudo em decorrência de suas características físico-químicas, que resultam em propriedades como fácil formação de géis, capacidade filmogênica e boas propriedades mecânicas. Apresenta também a propriedade de ser

solúvel em ácidos orgânicos e minerais diluídos, mas precipita a um valor de pH superior a 6.0, funcionando assim como uma resina trocadora de íons. Esta propriedade difere a quitosana das outras fibras até então conhecidas, como por exemplo, a celulose, guar, pectina, alginato de sódio, colestiramina (ASSIS & SILVA, 2003; HIRANO, 1989).

Estruturalmente, quitina e quitosana são polímeros rígidos fortemente interligados por ligações de hidrogênio o que faz que se decomponham a partir de 300°C e que não possuam ponto de fusão. A interação com solventes polares é fortemente induzida pelos dipolos OH e NH permanentes da molécula (DALLAN, 2005; CHIANDOTTI, 2005).

### 2.6.1 Estrutura e propriedades

A quitosana não é muito encontrada de forma natural, ocorrendo de maneira muito dispersa na natureza, em alguns microorganismos. Portanto, devido à baixa ocorrência natural, ela é obtida normalmente por meio da desacetilação da quitina em solução alcalina, mecanismo este já descrito anteriormente no tópico (2.5.5). Sua fórmula química é:  $[(C_6H_{11}O_4N)_n]$  (CRAVEIRO et al., 1999). A estrutura química da quitosana está apresentada na Figura 2.14.



**Figura 2.14.** Estrutura química da quitosana (NETO et al, 2008).

A quitosana normalmente é insolúvel em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, sendo completamente solúvel em soluções fracas de ácidos orgânicos (acético, fórmico, cítrico) e em alguns ácidos inorgânicos diluídos (clorídrico, nítrico, perclórico ou fosfórico), resultando em soluções viscosas capazes de formar filmes. Em ácidos, os grupos amino livres são protonados e a molécula torna-se altamente solúvel. A solubilidade da quitosana estará intimamente relacionada com a quantidade de grupos amino protonados ( $-NH_3^+$ ) na cadeia polimérica. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior o número de interações eletrostáticas repulsivas entre as cadeias. Deste modo, o conhecimento preciso do teor de grupos ( $-NH_2$ ) é um fator de muita importância e que poderá condicionar a utilização da quitosana nas suas diferentes aplicações (ALMEIDA, 2009; NETO et al, 2008; ASSIS et al, 2008; DALLAN, 2005).

Outro importante parâmetro a ser ressaltado refere-se à carga da quitosana em meio ácido. Este polímero se comporta como um polieletrólito, ou seja, apresenta uma alta densidade de carga (uma carga positiva por unidade de glicosamina). Uma vez que biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucléicos e ácidos graxos, dentre outras, podem apresentar cargas negativas em suas superfícies, freqüentemente verifica-se apreciável interação destas com a quitosana, o que justifica sua atividade sobre elas (DALLAN, 2005).

A quitosana apresenta reconhecida propriedade antimicrobiana (bactericida, bacteriostática, fungicida e fungistática) e cicatrizante. É biocompatível e naturalmente degradada no organismo. As aplicações e características da quitosana dependem fundamentalmente do grau de desacetilação e do grau de polimerização. Para tanto, é exigido um rígido controle das condições reacionais, as quais são essenciais para o processo em escala industrial, considerando a necessidade de obtenção de um polímero de cadeia longa com grau de desacetilação na faixa desejada. Uma outra característica importante da quitosana está na possibilidade de modificações estruturais de modo a obter diversas formas de interação química e resistência mecânica (DALLAN, 2005; TORRES et al, 2005; ASSIS & SILVA, 2003).

O grande interesse de cientistas pela quitosana como materiais poliméricos, com aplicações na área biomédica, se dá pelo fato destes polissacarídeos possuírem características tecnológicas e econômicas relevantes além de apresentarem propriedades biológicas adequadas. A aplicação esta justificada por sua variedade de propriedades físico-químicas e biológicas, possuindo biocompatibilidade, bioatividade e biodegradabilidade, além de ser atóxico e produzido por fontes naturais e renováveis. A biodegradabilidade é devida à metabolização da quitosana por algumas enzimas humanas, como por exemplo, a lisozima, condizendo com um dos requisitos primários de um processo de biodegradação ocorrer, que é ser susceptível a uma reação de hidrólise enzimática (FRAGA et al, 2006; DALLAN, 2005; SIMTH, 2005; SENEL & McCLURE, 2004; BERGER et al, 2004; CAMPANA & SIGNINI, 2001).

A quitina e a quitosana podem ser empregadas como biomateriais sob a forma de filmes de recobrimento (membranas), soluções coloidais ou esponjas, no tratamento de ferimentos ou queimaduras; na área farmacêutica são bastante utilizadas como carreadores de fármacos e na indústria de cosméticos; apresentam várias utilizações na agricultura e na indústria de alimentos. Os filmes obtidos do meio natural e de polímeros renováveis (biodegradáveis) tem atraído mais atenção nos últimos anos, motivado pela preocupação com o meio ambiente. Esses filmes geralmente apresentam propriedades como biodegradabilidade, não-toxicidade, podendo substituir polímeros sintéticos, abrindo espaço para o desenvolvimento de novos materiais ( SILVA et al, 2006; SANTOS et al, 2006; DALLAN, 2005).

### **2.6.2 Biodegradação da quitosana**

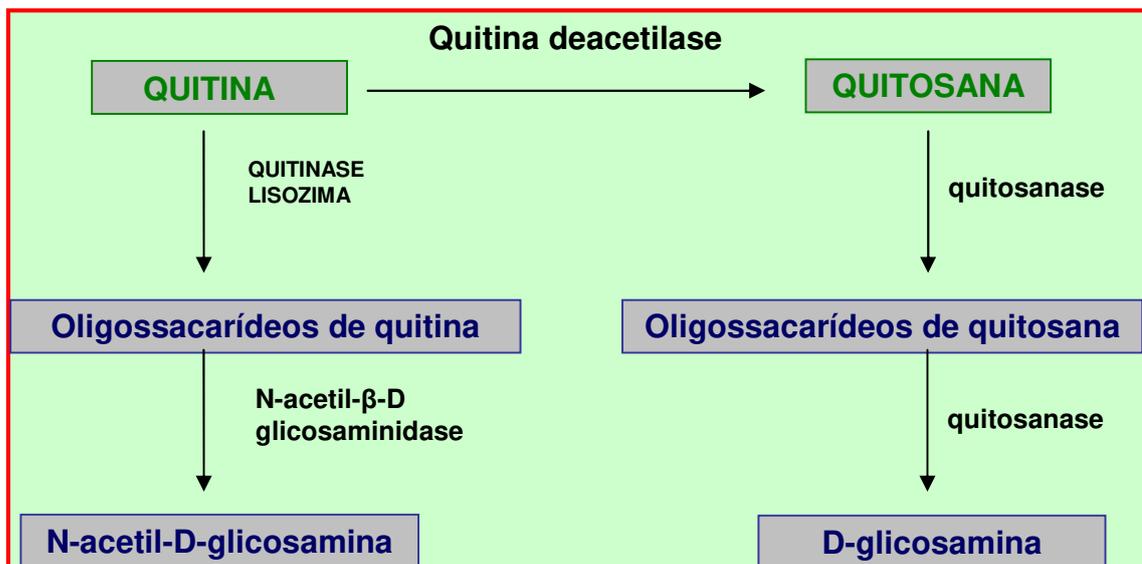
A degradação de um biomaterial em meios biológicos é uma das variáveis de grande relevância para sua caracterização, já que tal propriedade está diretamente relacionada ao tempo de vida útil dos materiais após o início de sua utilização pelo paciente. Assim, é com base nesta característica que os

materiais podem ser classificados como biodegradáveis ou não biodegradáveis (MARTINE, 1995).

A quitosana, por se tratar de um polissacarídeo, sofre degradação quando em solução aquosa, sendo neste caso, quebradas as ligações do complexo polimérico, que se unem aos íons  $H^+$  e  $OH^-$  da água. Outra via de degradação da quitosana no organismo ocorre pela ação da lisozima, que é uma enzima composta por uma cadeia polipeptídica única, com 129 aminoácidos (Figura 2.15). Sua atividade catalítica é a hidrólise da ligação glicosídica  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4), que une os resíduos de açúcares aminados 2-deoxi-N-acetilglicosamina, presentes na quitosana e também na parede celular de bactérias, dissolvendo-as, auxiliando assim o sistema imunológico. Esta enzima está comumente presente em fluidos corpóreos como a saliva (<150 mg/100 mL) e a lágrima (18 a 80 mg/100 mL), além de ser encontrada livremente dissolvida em grande parte dos tecidos. Entretanto, sua concentração tecidual aumenta em uma reação inflamatória, pois esta é sintetizada pelos macrófagos e secretada nos lisossomos, auxiliando na remoção de restos celulares e bacterianos do local da infecção (RODAS, 2004; Qu et al, 2000).

A degradação da quitosana no organismo leva a liberação de amino-açúcares que podem ser, incorporados nos caminhos metabólicos de glicosaminoglicanas e glicoproteínas, ou simplesmente excretados pelo organismo. Os produtos da degradação enzimática da quitosana são oligômeros de N-acetil-D-glicosamina, os quais apresentam propriedades cicatrizantes, antimicrobianas e são totalmente reabsorvíveis pelo organismo (ALMEIDA, 2009; PREVOST et al., 2006;). A Figura 2.15 mostra a estrutura biológica da lisozima, composta por 129 aminoácidos.





**Figura 2.16-** Ciclo da quitina.

**Fonte:** (DALLAN, 2005).

As enzimas hidrolíticas envolvidas neste processo (lisozima, quitinase, quitina deacetilase e quitosanase) estão largamente distribuídas nos tecidos e fluidos corpóreos dos animais e das plantas, além de também se encontrarem presentes em microrganismos do solo (CRAVEIRO et al., 1999).

### **2.6.3 Aplicações gerais da quitosana**

A quitosana exibe diversas propriedades físico-químicas e biológicas interessantes, como biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, e tem várias aplicações em diferentes campos como, por exemplo, tratamento de água não potável, agricultura, cosméticos, processamento de alimentos e aplicações biomédicas, entre outras (ALMEIDA, 2009). Um resumo das principais aplicações da quitosana na área industrial, nutricional e de saúde pode ser visualizado na Tabela 2.2.

**Tabela 2.2** – Principais aplicações da quitosana.

| <b>Área Industrial</b>   | <b>Áreas de saúde e nutricional</b>  |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Purificação de água residual de indústrias</li> <li>▪ Estabilizante de gorduras em preparações alimentícias</li> <li>▪ Estabilizante de aromas</li> <li>▪ Meio de troca iônica</li> <li>▪ Aditivo de cosméticos e xampus</li> <li>▪ Absorvente na remoção de metais pesados</li> <li>▪ Proteção bactericida de sementes</li> <li>▪ Estabilizante de frutas e verduras perecíveis</li> <li>▪ Agente para a imobilização de microrganismos</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Agente absorvedor de gorduras</li> <li>▪ Promoção da perda de peso</li> <li>▪ Redução de colesterol LDL</li> <li>▪ Regeneração de pele</li> <li>▪ Antiácido</li> <li>▪ Auxiliar no controle da pressão arterial</li> <li>▪ Regenerador de estrutura óssea</li> <li>▪ Redução do nível de ácido úrico</li> <li>▪ Bactericida e antiviral</li> <li>▪ Inibidor da formação de placas dentárias</li> <li>▪ Auxiliar na absorção de cálcio</li> <li>▪ Membrana artificial</li> </ul> |

**Fonte:** (DALLAN ,2006).

#### **2.6.4 Aplicações da quitosana como biomaterial**

As aplicações dadas aos biomateriais obtidos a partir da quitosana têm evoluído muito nas últimas três décadas, e vão desde o simples uso como excipientes para a indústria farmacêutica até avançadas aplicações na área de engenharia tecidual, podendo ser permeados por células, atuando como moldes para a formação de estruturas biológicas complexas. Testes clínicos foram realizados a fim de verificar que biomateriais baseados em quitosana não demonstram qualquer inflamação ou reação alérgica seguida de

implantação, injeção, aplicação tópica ou ingestão no corpo humano (ALMEIDA, 2009; NETO et al, 2008; KHOR & LIMA, 2003).

No que se refere às aplicações biomédicas, a quitosana conjuga as propriedades de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioatividade, com propriedades de adsorção, permitindo que seja utilizada até mesmo em terapias genéticas, no tratamento de reações imunológicas ou alérgicas, através da adsorção de partículas de quitosana carreando fragmentos de genes através da parede intestinal, inativando alérgenos de origem alimentar. Biomateriais à base de quitosana tiveram utilização sugerida como bioadesivo, agente cicatrizador, agente antimicrobiano, material de bandagem, molde para enxerto de pele, agente hemostático, material para sutura e para lentes de contato, na forma de filmes, géis, cápsulas, micro cápsulas ou soluções (NETO et al, 2008).

Na área odontológica, este biomaterial foi apresentado primeiramente na forma de gel, obtido a partir de diferentes granulações e concentrações do pó da quitosana, e passou-se a avaliar a possibilidade de sua utilização em sítios cirúrgicos ou em terapia periodontal não cirúrgica. Nos casos de sítios fechados, bolsas periodontais, defeitos infra-ósseos, o gel pode ser levado com uma seringa sem a necessidade de anestesia e pode ser adicionada solução hidroalcoólica para diminuir sua viscosidade. Já para o preenchimento de defeitos ósseos, essa fluidez deve ser ajustada para que haja um completo preenchimento da cavidade e, portanto, não deve ter um alto grau de escoamento (NETO et al, 2008; GERENTES et al, 2002).

Os “Sistemas de liberação de fármacos” (*“Drug-delivery systems”*) surgiram na década de oitenta e representam biomateriais utilizados pela indústria como agentes liberadores de drogas sistêmicas ou locais, capazes de proporcionar taxas de liberação controladas e prolongadas dessas drogas, de maneira a se obter uma resposta ótima com o mínimo de efeitos colaterais. A quitosana, por ser um biomaterial seletivamente permeável, surgiu como bom candidato a meio de liberação de medicamentos no meio gastrointestinal, na mucosa oral, canais radiculares, dentinas cariadas ou bolsas periodontais, e os estudos realizados têm apresentado resultados que corroboram com o uso da

quitosana nesta aplicação, visto que explicitam as qualidades dessa substância como agente de liberação de fármacos, principalmente quando se necessita de liberação lenta e controlada (NETO et al, 2008; RAVI KUMAR, 2000).

Biomateriais de quitosana também têm sido considerados como acelerador da reparação tecidual, capazes de aumentar a produção de matriz extracelular através do aumento de produção de fatores de crescimento. Também aceleram a infiltração de linfócitos polimorfonucleares nas fases iniciais de cicatrização tecidual, aumentando consideravelmente a osteopontina, uma fosfoproteína capaz de aumentar a ligação celular na ferida em cicatrização. Alguns autores citam que a quitosana estimula o crescimento celular, porque as células aderem fortemente ao polímero e proliferam mais rapidamente. Este comportamento tem sido aproveitado para os estudos em engenharia de tecidos, sendo a quitosana utilizada em trabalhos de regeneração da pele, do tecido ósseo e cartilaginoso e na preparação de pele artificial. Experimentos utilizando aplicações tópicas de quitosana através de pomadas e bandagens mostraram que este biopolímero promove uma rápida cicatrização de ferimentos e abscesso infectados por *Staphylococcus sp.* Tais aplicações diminuíram o tempo de coagulação, que é de fundamental importância na cicatrização de ferimentos (UENO et al 2001; CRAVEIRO et al, 1999).

Devido às propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, este polímero pode atuar como material substituto ósseo que, ao longo do tempo, vai sendo substituído por osso natural. Polímeros de quitosana são constituídos por arranjos paralelos de pontes de hidrogênio que conferem melhores propriedades mecânicas, com alta resistência a cargas, bem como estabilidade ao enxerto, características extremamente importantes especialmente nos estágios iniciais de formação óssea. Membranas feitas de quitosana, com potencial para utilização em técnicas de regeneração tecidual guiada, têm sido testadas. Dados iniciais sugerem um período de degradação dependente do grau de desacetilação da quitosana utilizada, fator que também interfere na resistência mecânica do biomaterial avaliado, e a possibilidade de associação de outras substâncias à quitosana nas membranas. Ao associarmos as

características que fazem da quitosana um potencial agente liberador de drogas e aquelas relacionadas às suas propriedades reparadoras teciduais, idealizamos os biomateriais dela obtidos no campo da engenharia tecidual. Materiais capazes de carrear fatores de crescimento, e que sejam biocompatíveis e biodegradáveis como a quitosana, surgem como a vedete de pesquisas nessa área (NETO et al, 2008; MUZZARELLI & MUZZARELLI, 2002).

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Materiais**

Neste item estão descritos os materiais utilizados para a obtenção e para a caracterização das membranas de quitosana.

##### **3.1.1 *Obtenção das membranas de quitosana***

As quitosanas usadas nesta pesquisa foram adquiridas na forma de pó da Polymar Ciência e Nutrição S/A, com grau de desacetilação de 90% e 98% e utilizadas sem purificação. O ácido acético glacial e o hidróxido de sódio foram adquiridos na Vetec Química Ltda. A água utilizada nos ensaios foi destilada no laboratório do DEMA/UFCG.

##### **3.1.2 *Degradação enzimática (biodegradação)***

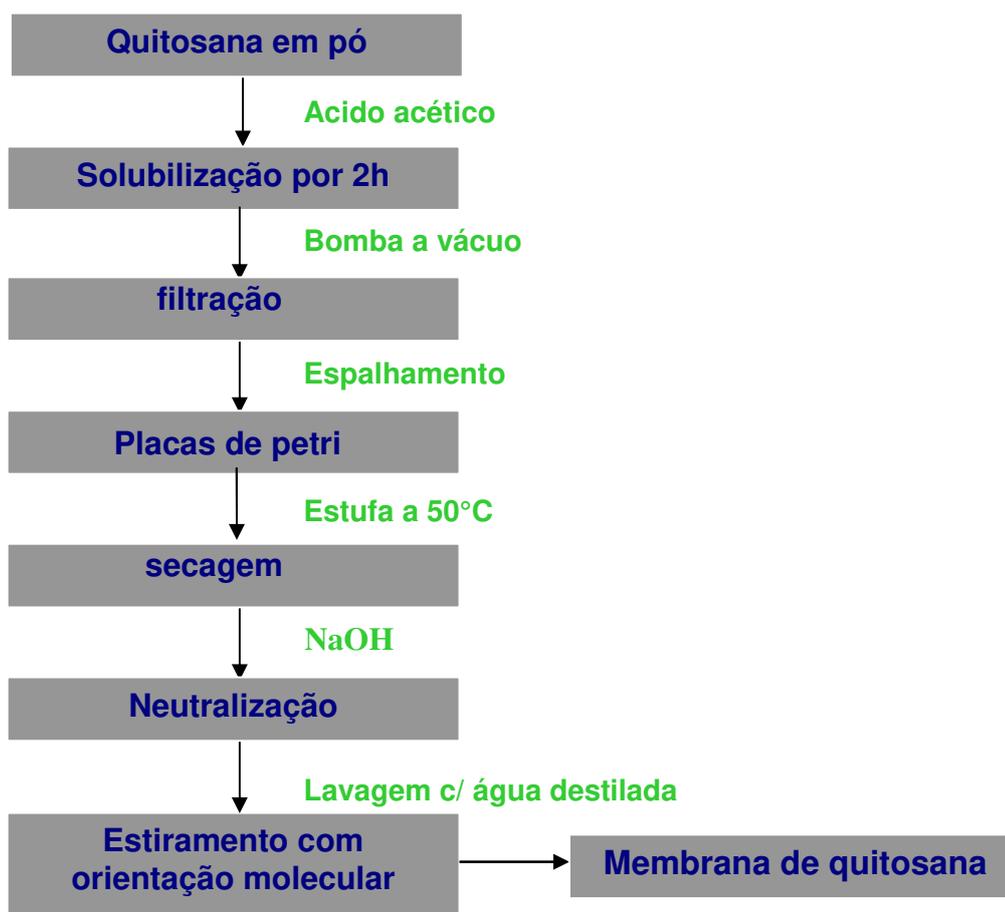
Para o ensaio de degradação enzimática foram utilizados a enzima lisozima e o tampão fosfato (PBS), obtidos da Sigma Aldrich Brasil Ltda.

#### **3.2 Métodos**

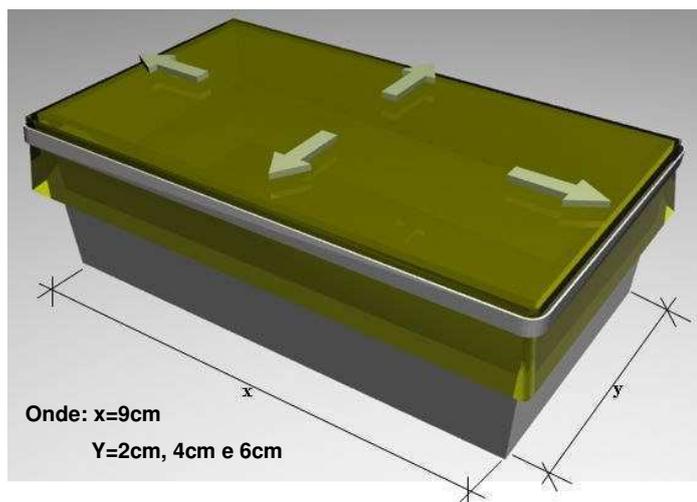
##### **3.2.1 *Preparação das membranas de quitosana com orientação molecular preferencial***

Foram preparadas membranas de quitosana com GD de 90% e 98% conforme a descrição a seguir: uma solução de quitosana de 2,0% (m/v) foi preparada a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético diluído, sob agitação magnética a 50<sup>0</sup>C por 2h. Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo. Sessenta mililitros do filtrado foram vertidos em placas de petri com diâmetros de 14,5cm e acondicionadas em estufa a 50<sup>0</sup>C por 20h para evaporação do ácido acético e formação da membrana. Após a secagem das mesmas, 35mL de uma solução diluída de hidróxido de sódio

foram adicionados a fim de assegurar a neutralização das membranas. Em seguida, estas foram lavadas em água corrente e submersas em um recipiente com água destilada por 2h. Depois de neutralizadas, as membranas foram estiradas e orientadas em dispositivos de vidro retangulares com três dimensões diferentes: 9cm x 2cm; 9cm x 4cm; e 9cm x 6cm, recipientes estes que foram denominados respectivamente de: placa menor (p.menor); placa média (p.média) e placa maior (p.maior). Em seguida as membranas foram secas por 24h a temperatura ambiente. As etapas de preparação das membranas estão expostas na Figura 3.1., e o esquema do dispositivo de vidro usado para estiramento está exposto na Figura 3.1.



**Figura 3.1** - Seqüência operacional de elaboração das membranas de quitosana.  
**Fonte:** Própria



**Figura 3.2-** Esquema do dispositivo de vidro usado para estirar as membranas, dando uma orientação molecular preferencial.  
**Fonte:** Própria

### 3.2.2 Caracterização

As matérias-primas (pós de quitosana) usadas neste trabalho foram caracterizadas por duas técnicas: Difração de Raios X e Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier.

Posteriormente, as membranas obtidas foram caracterizadas pelas seguintes técnicas:

- Ensaio de Biodegradação (degradação enzimática);
- Difração de Raios X (DRX)
- Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR);
- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);
- Tensão Superficial (TS).

As análises de Difração de Raios X, Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier, Microscopia Eletrônica de Varredura e Tensão Superficial foram realizadas nas membranas antes e após estas terem sido submetidas aos ensaios de biodegradação.

As caracterizações foram realizadas no Laboratório de Engenharia de Materiais da UAEMa/ CCT/UFCG.

### **3.2.2.1 Ensaio de biodegradação enzimática**

A metodologia empregada utilizou como base a norma ASTM F1635-04 (*Standard Test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*). As membranas secas foram cortadas na dimensão de 1,5 x 2,5 cm<sup>2</sup>, pesadas em balança analítica e desinfetadas utilizando-se o etanol a 70%. As membranas foram então, isoladamente, colocadas em placas de Petri. As amostras foram divididas em dois grupos para avaliação da biodegradação. O primeiro grupo contendo uma solução de lisozima/PBS com concentração de 5g/L e, o segundo apenas com a solução de PBS, para controle. As amostras foram incubadas por um período de 60 dias em estufa microbiológica à temperatura de 37°C. Com 30 e 60 dias, um lote de amostras foi analisado. As amostras foram lavadas com água destilada, secas por 24 horas em estufa a 50°C e pesadas em balança analítica. As diferenças percentuais das massas das amostras antes e após o ensaio forneceram os resultados referentes à degradação enzimática das membranas. Deve-se salientar que o ensaio foi realizado em triplicata.

### **3.2.2.2 Difração de Raios X (DRX)**

O espalhamento de raios X é uma das técnicas mais antigas, porém ainda bastante utilizada no estudo da estrutura dos polímeros. A técnica foi usada para verificar a cristalinidade da matéria-prima utilizada neste trabalho e nas membranas de quitosana produzidas a partir da mesma. As análises de difração de raios X foram conduzidas em aparelho XRD-6000 Shimadzu, utilizando-se radiação K $\alpha$  do cobre (1,5418 Å), tensão de 40kV, corrente 30mA, 2 $\theta$  com varredura variando de 5 a 50° a uma taxa de 1°/min.

### **3.2.2.3 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

A espectroscopia na região do infravermelho é freqüentemente aplicada como um dos mais importantes métodos analíticos usados na determinação de moléculas orgânicas no estado líquido, sólido e gasoso. A espectroscopia vibracional tem sido aplicada em determinações qualitativas e quantitativas de materiais poliméricos, onde vários parâmetros podem ser investigados, incluindo grupos terminais, ramificações de cadeias, configuração e conformação. É uma técnica baseada nas vibrações dos átomos nas moléculas e pode ser obtida passando radiação através da amostra e determinando que fração de radiação incidente é absorvida em uma energia particular; a energia em que algum pico em um espectro de absorção aparece correspondente à freqüência de vibração de uma parte da amostra da molécula (LIMA, 2007).

A técnica FTIR foi usada para identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas matérias-primas utilizadas nesta pesquisa e nas membranas de quitosana produzidas a partir das mesmas. As análises foram realizadas com varredura de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . O equipamento utilizado foi um Spectrum 400 da Perkin Elmer.

### **3.2.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

Essa técnica é utilizada para analisar a morfologia de materiais sólidos, pois permite uma caracterização rápida e precisa da superfície e de suas subestruturas. A área a ser analisada é bombardeada por um fino feixe de elétrons de alta voltagem, que são direcionados na superfície da amostra coberta por um filme condutivo. Como resultado da interação do feixe de elétrons com a superfície da amostra em análise ponto a ponto, uma série de radiações é emitida, e, quando captada corretamente, fornece informações da natureza topográfica da amostra, cujas imagens se apresentam com aparência natural em três dimensões.

Nesta pesquisa foi usado um microscópio eletrônico de varredura de bancada, modelo TM-1000, marca Hitachi, com aumento de 10000X, profundidade focal de 1mm, resolução de 30nm, 15KV, baixo vácuo e pressão variada (1 a 270 Pa), sem recobrimento metálico, mesmo em amostras não condutoras.

#### **3.2.2.5 *Tensão Superficial (TS)***

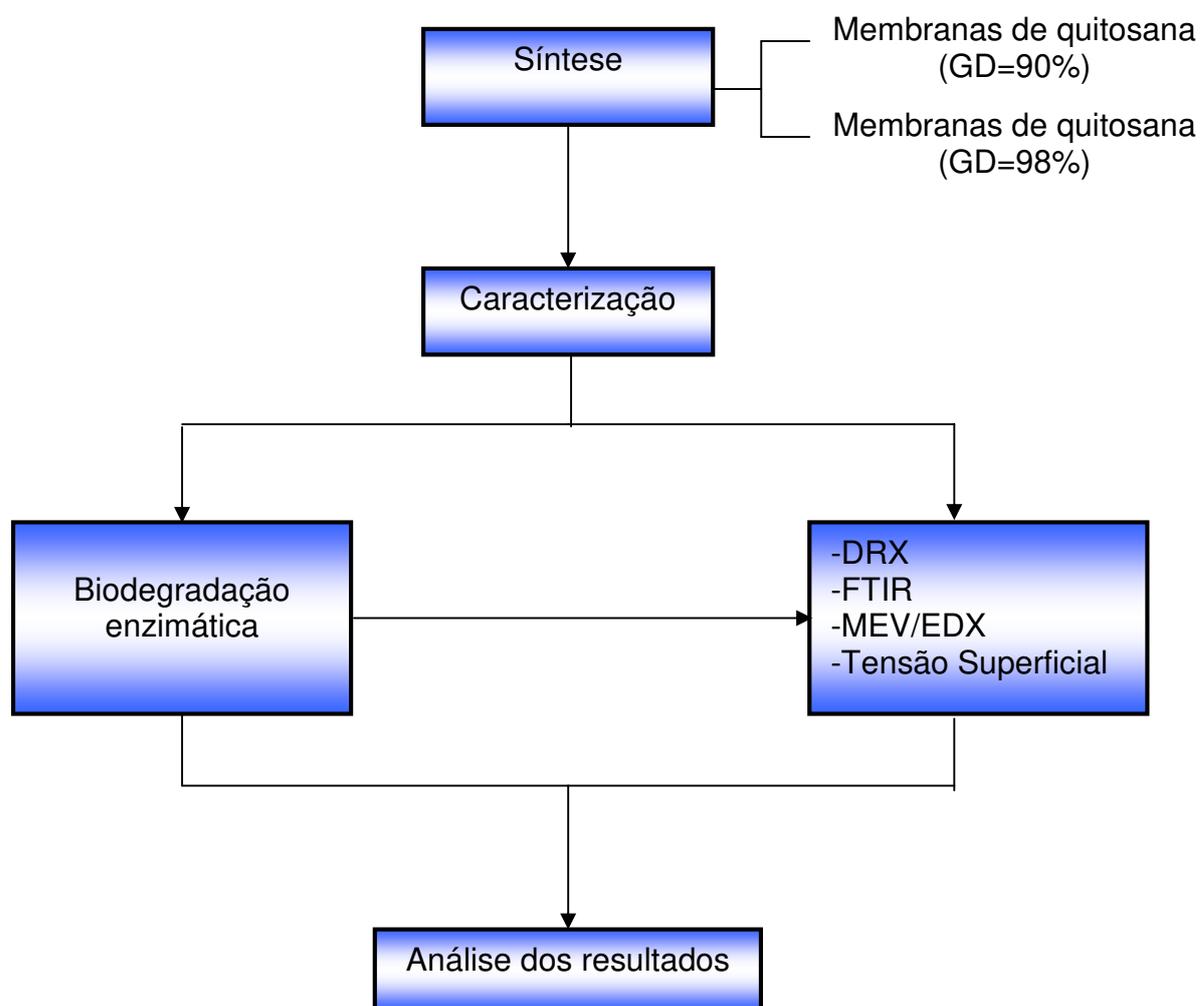
#### **3.2.2.6 *Medidas do ângulo de contato***

As análises de ângulo de contato foram efetuadas com o gotejamento de uma gota de água destilada na superfície da membrana, com posterior análise das medidas dos ângulos formados pela bolha de água, com software próprio do Grupo de Biomateriais do DEMa/UFCG.

O equipamento utilizado foi desenvolvido por técnicos do Departamento de Engenharia Mecânica da UFCG e encontra-se instalado no Laboratório de Biomateriais do DEMa/UFCG.

#### **3.2.3 *Metodologia de trabalho***

O fluxograma da metodologia de trabalho seguida nesta pesquisa se encontra na Figura 3.3.



**Figura 3.3-** Fluxograma da metodologia de trabalho

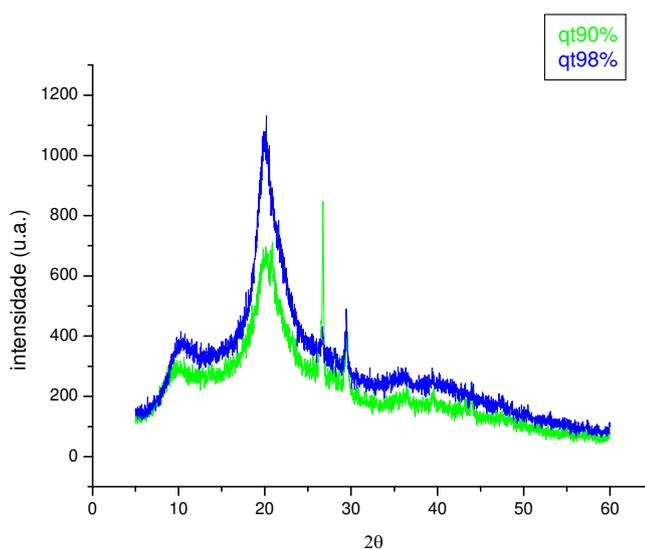
## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização das matérias-primas

A fim de se obter informações sobre as matérias-primas utilizadas neste trabalho e poder compará-las com as membranas produzidas a partir das mesmas, estas foram caracterizadas empregando-se duas diferentes técnicas: Difração de Raios-X (DRX) e Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), sendo os resultados obtidos descritos nos itens a seguir.

#### 4.1.1 Difração de Raios-X (DRX)

A fim de se verificar a cristalinidade dos polissacarídeos utilizados neste trabalho, foram realizados ensaios de difração de raios-X das matérias-primas (quitosana em pó) com GD de 90 e 98%. Os difratogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 4.1.

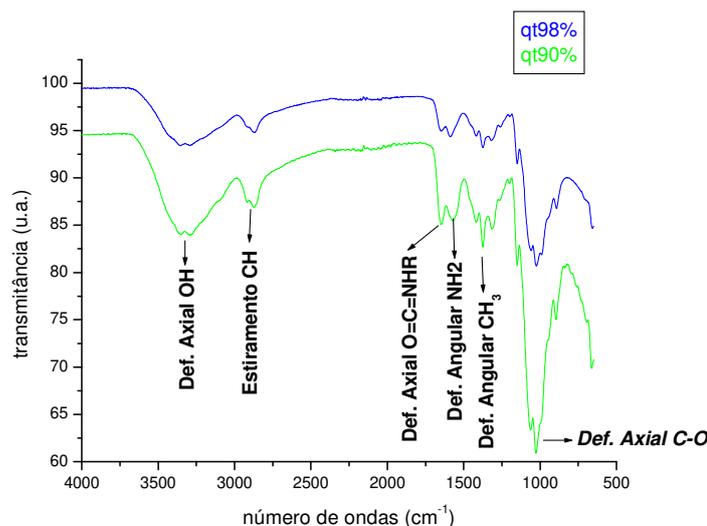


**Figura 4.1-** Difratogramas de raios-X do pó das quitosanas usadas neste trabalho(GD de 90% e 98%).

Conforme descrito na literatura (SENEL e McCLURE, 2004; TOMIHATA e IKADA, 1997) e ilustrado na Figura 4.1, o polissacarídeo quitosana é um polímero semicristalino, já que apresenta em seu difratograma, picos definidos. Foi observado um pico bem definido em  $2\theta$  igual a  $20^\circ$  e um outro pico menos definido em  $2\theta$  igual a  $10^\circ$  praticamente iguais tanto para a quitosana com GD de 90% com para a de 98%, valores estes que coincidem com os obtidos por Xu et al., (2005). Em  $2\theta$  igual a  $27^\circ$  observa-se um pico intenso presente só na quitosana com GD de 90%, dando a indicação que esta é mais cristalina que a de 98%.

#### 4.1.2 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

A fim de se caracterizar os grupos funcionais presentes nas matérias primas utilizadas neste trabalho, quitosana em pó com GD de 90% e 98%, foram realizados ensaios de Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Os espectrogramas obtidos podem ser visualizados na Figura 4.2.



**Figura 4.2-** Espectros de FTIR dos pós das quitosanas usadas neste trabalho (GD de 90% e 98%).

Comparando os espectros da Figura 4.2 com os espectros encontrados na literatura (SHIGEMASA, et al, 1996; LIMA, 2007), pode-se verificar que as matérias-primas usadas neste trabalho apresentam todas as absorções relativas à quitosana e encontram-se descritas na Tabela 4.1. De acordo com o espectro formado, pode-se observar em especial, que a banda encontrada na região de  $1652\text{ cm}^{-1}$ , característica de uma amida I (LIMA, 2007), em comparação com a banda encontrada na região de  $1586\text{ cm}^{-1}$ , característica de uma amina (LIMA, 2007), apresenta intensidade maior na quitosana com GD de 90% e menor na de 98%, confirmando assim, que as quitosanas não são totalmente desacetiladas e que existe uma diferença no grau de desacetilação das mesmas.

**Tabela 4.1-** Bandas de absorção no FTIR dos pós das quitosanas usadas neste trabalho com GD de 90 e 98%.

| <b>Número de onda (<math>\text{cm}^{-1}</math>)</b> | <b>Atribuição</b>   |
|---|---|
| 3334  | deformação axial de O-H e N-H do grupo $\text{NH}_2$                      |
| 2928 e 2873   | deformação axial de C-H de grupos $\text{CH}_2$ e $\text{CH}_3$           |
| 1652  | deformação axial de $\text{RHN-C=O}$ (amida)                              |
| 1586  | deformação angular N-H do grupo $\text{NH}_2$ (amina)                     |
| 1423 e 1319   | deformação angular de O-H e deformação angular de C-H do anel glicosídico |
| 1377  | deformação angular do C-H de $\text{CH}_3$                                |
| 1150,1062 e1020                                     | deformação axial do C-O-C da ligação éter                                 |

## 4.2 Caracterização das membranas produzidas

### 4.2.1 Ensaios de biodegradação enzimática

Os resultados obtidos da degradação após um e dois meses de ensaio estão indicados na Tabela 4.2. Deve-se ressaltar que, sabendo-se da possível degradação da quitosana pelo próprio solvente utilizado para a dissolução da lisozima (tampão PBS), paralelamente foi avaliada a influência desta variável na degradação das membranas.

**Tabela 4.2** – Degradação enzimática das membranas (perda de massa) de quitosana produzidas com GD de 90% e 98% e variadas orientações moleculares.

| *Ensaio | Perda de massa das membranas (%) |              |                   |              |
|---------|----------------------------------|--------------|-------------------|--------------|
|         | 1 mês de ensaio                  |              | 2 meses de ensaio |              |
|         | PBS                              | Lisozima/PBS | PBS               | Lisozima/PBS |
| 1       | 2,52                             | 17,95        | 2,75              | 25,19        |
| 2       | 1,32                             | 21,55        | 4,29              | 19,19        |
| 3       | 3,95                             | 18,79        | 2,26              | 33,55        |
| 4       | 2,08                             | 16,10        | 3,80              | 26,43        |
| 5       | 0                                | 0            | 0                 | 0            |
| 6       | 0                                | 0            | 0                 | 0            |
| 7       | 0                                | 0            | 0                 | 0            |
| 8       | 0                                | 0            | 0                 | 0            |

\*1, 2 e 3 = membranas de quitosana com GD de 90% e variado nível de orientação molecular; 4 = membrana de quitosana com GD de 90% sem orientação molecular; 5, 6, 7 = membranas de quitosana com GD de 98% e variado nível de orientação molecular; 8 = membrana de quitosana com GD de 98% sem orientação molecular.

Analisando-se os resultados obtidos com a degradação enzimática das membranas (Tabela 4.2) temos: comparando-se os valores quando da

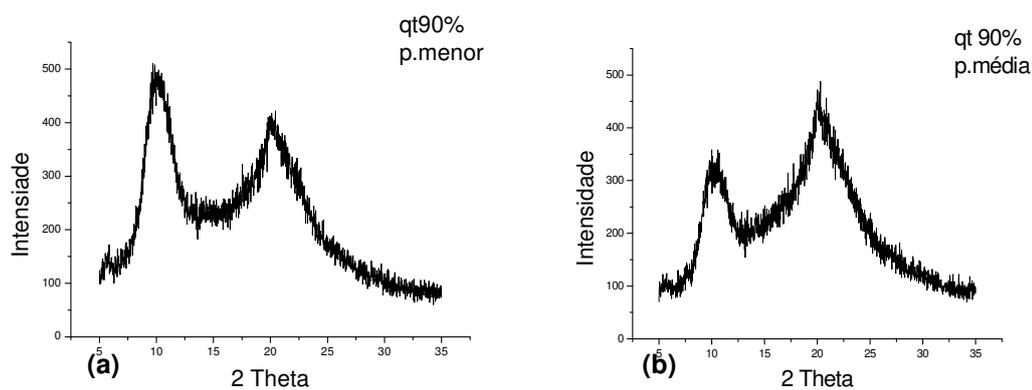
exposição a lisozima/PBS e somente ao tampão PBS pelo período de um mês, observou-se que todas as amostras com GD de 90% apresentaram perda de massa que variaram entre 16,10% e 21,55% (exposição a lisozima/PBS) e entre 1,32% e 3,95% (exposição apenas ao PBS). Contudo, as amostras com GD de 98% não apresentaram perda de massa em nenhuma das condições. Quando transcorridos dois meses de ensaio, observou-se que todas as amostras com GD de 90% continuaram sendo degradadas, ou seja, perdendo massa, que variaram de 19,19% a 33,55% (exposição a lisozima/PBS) e entre 2,26% e 4,29% (exposição apenas ao PBS). Já as amostras com GD de 98% permaneceram sem apresentar perda de massa para ambas as condições. Em todo o ensaio, no caso das membranas com GD de 90% (que ocorreu degradação), o maior valor observado no PBS foi de 4,29%, enquanto que na lisozima/PBS foi de 33,55%; resultado considerado satisfatório. Já as membranas com GD de 98% não apresentaram degradação em todo o ensaio. De acordo com a literatura consultada (SENEL & MCCLURE, 2004; TOMIHATA & IKADA, 1997), este comportamento pode ser explicado com base nas características da quitosana utilizada. Apesar da quitosana ser considerada um polímero degradável pela lisozima, tal degradabilidade é dependente, dentre outros fatores, do grau de desacetilação, já que a lisozima se liga aos grupamentos N-acetilglicosamina presentes na estrutura deste polissacarídeo (SUH & MATTHEW, 2000). Segundo Varum et al (1996), Kurita et al (2000), estes grupamentos apresentam um papel fundamental no reconhecimento da quitosana como substrato para a lisozima.

Portanto, levando-se em consideração principalmente o grau de desacetilação das quitosanas utilizadas neste trabalho, uma vez que as demais variáveis são as mesmas para todas as membranas produzidas, podemos concluir que a degradação apresentada pelas membranas com GD de 90% é justificada. Com relação às membranas com GD de 98% que praticamente não apresentaram degradação em todo o ensaio, como os grupos acetamido (-NHCOCH<sub>3</sub>), foram quase todos substituídos por grupos amino (-NH<sub>2</sub>), com isso, a lisozima teve dificuldade de reconhecer a quitosana como substrato e, portanto, a ausência de degradação nestes ensaios também é justificada.

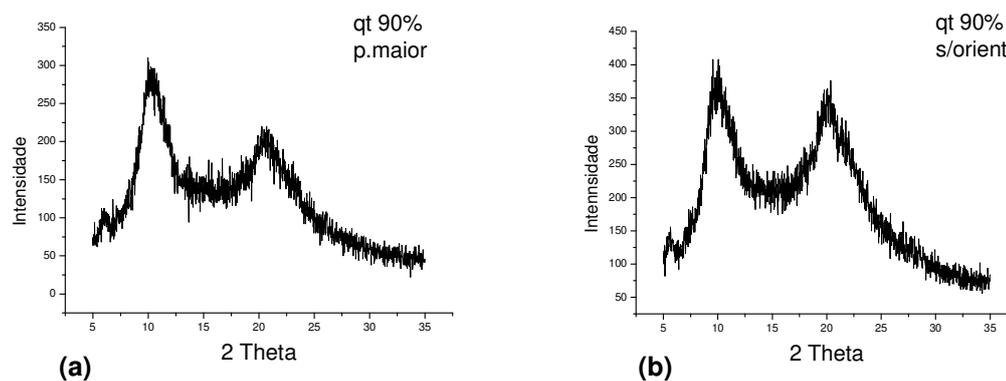
Comparando-se os valores de degradação das membranas quando da exposição à lisozima/PBS nos dois períodos, de um e dois meses, e quando da exposição somente ao tampão PBS, notou-se que, em todos os ensaios que ocorreram degradação, esta foi muito mais intensa sob a ação da lisozima, o que indica a eficiência desta enzima na degradação da quitosana. Com relação aos ensaios com e sem orientação molecular preferencial, não foi observado diferença significativa na degradação das membranas em decorrência destas variáveis. Esperávamos que os ensaios “sem orientação molecular preferencial” apresentassem um maior grau de degradação, porém nas condições pesquisadas, o experimento não foi conclusivo com relação a este aspecto.

#### **4.2.2 Difração de Raios X (DRX)**

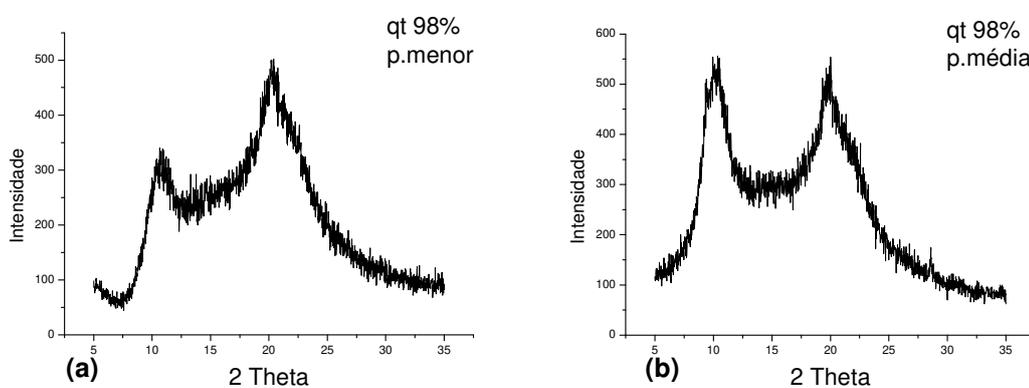
Foi utilizada a Difração de Raios X visando a comparação dos espectros obtidos entre as membranas produzidas e os pós das quitosanas (matéria-prima), como também entre as membranas produzidas antes e após os ensaios de biodegradação. Pretendia-se fazer as análises para as membranas submetidas aos ensaios de biodegradação com 30 e 60 dias com GD de 90% e 98%, porém só foi possível realizá-lo no lote de amostras degradado durante 30 dias com GD de 90%, devido ao estado físico das outras amostras, não foi possível prepará-las para o teste em todas as condições estudadas. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas Figuras (4.3; 4.4; 4.5; 4.6; 4.7 e 4.8).



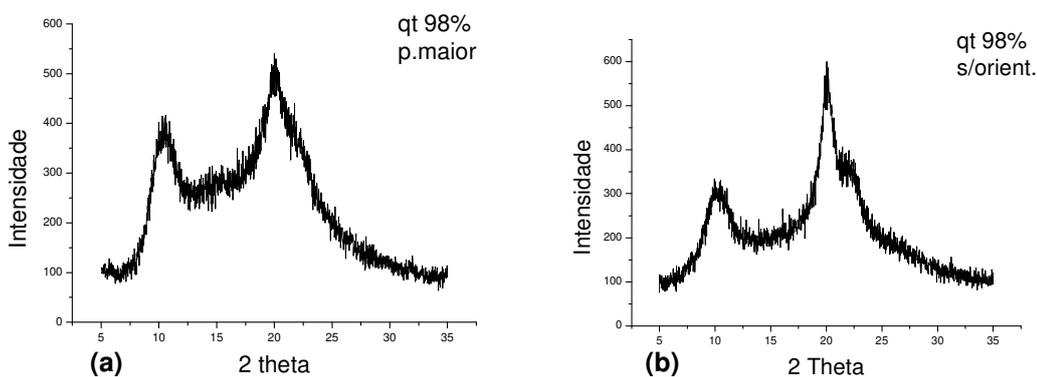
**Figura 4.3-** Difratomogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa menor (a) e placa média (b), não degradadas.



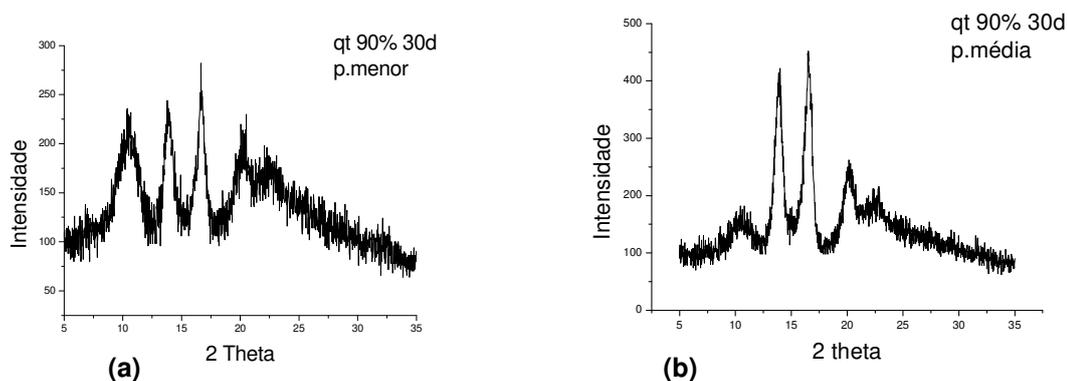
**Figura 4.4-** Difratomogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa maior (a) e sem orientação preferencial (b), não degradadas.



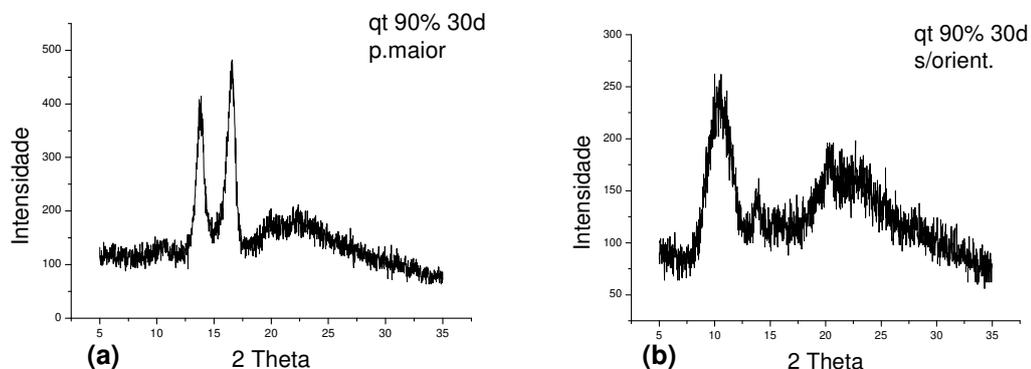
**Figura 4.5-** Difratomogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% orientadas nos dispositivos placa menor (a) e placa média (b), não degradadas.



**Figura 4.6-** Difratomogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% orientadas nos dispositivos placa maior (a) e sem orientação preferencial (b), não degradadas.



**Figura 4.7-** Difratomogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa menor (a) e placa média (b), com degradação de 30 dias.

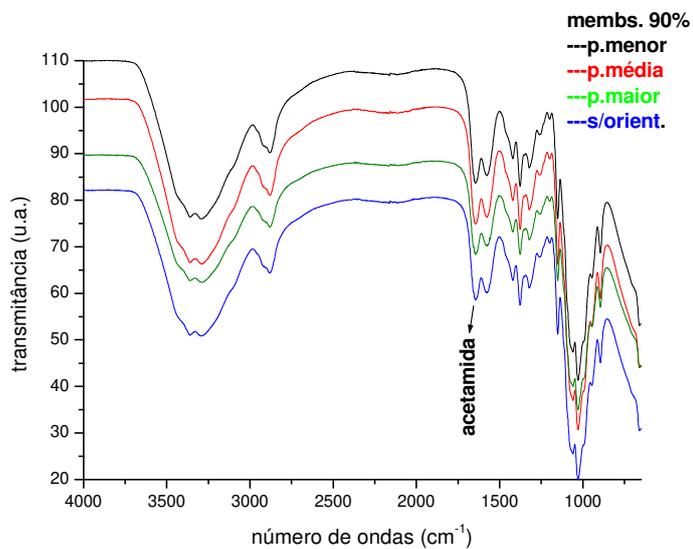


**Figura 4.8-** Difratomogramas de raios-X das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% orientadas nos dispositivos placa maior (a) e sem orientação preferencial (b), com degradação de 30 dias.

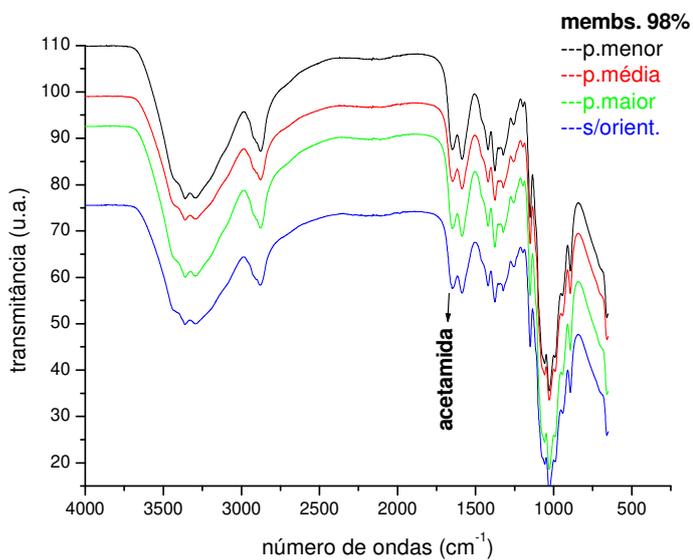
Com os resultados dos DRXs das membranas de quitosana com GD de 90% e 98%, observa-se que em todas as condições (orientadas nos dispositivos placa menor, placa média, placa maior e sem orientação preferencial) antes de serem submetidas aos ensaios de biodegradação Figuras (4.3; 4.4; 4.5; 4.6), apresentaram os picos característicos da quitosana, que são um pico em torno de  $2\theta$  igual  $10^\circ$  e um outro pico em torno de  $2\theta$  igual a  $20^\circ$ , porém todos eles variaram de intensidade, indicando assim, que os dispositivos usados nos estiramentos das membranas de fato proporcionam variadas orientações nas cadeias moleculares das mesmas. Depois de submetidas aos ensaios de biodegradação Figuras (4.7 e 4.8), as membranas apresentaram alterações significativas nos difratogramas, inclusive com formações de novos picos bem definidos, o que indica uma mudança na estrutura do material e, conseqüentemente, na cristalinidade, possivelmente pela diminuição dos domínios amorfos, uma vez que, segundo Oréface 2006, os processos de biodegradação se iniciam por estas regiões, para posteriormente atingirem os domínios cristalinos.

#### **4.2.3 Espectroscopia do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)**

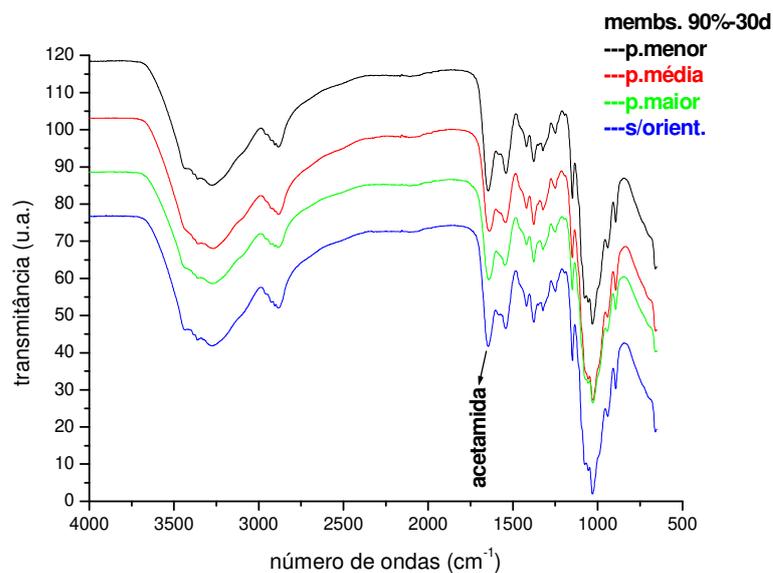
Foi utilizada a espectroscopia por infravermelho (FTIR), visando a comparação dos espectros obtidos entre as membranas produzidas e os pós das quitosanas (matéria-prima), como também entre as membranas produzidas antes e após os ensaios de biodegradação. Os resultados obtidos encontram-se ilustrados nas Figuras (4.9; 4.10; 4.11; 4.12; 4.13 e 4.14).



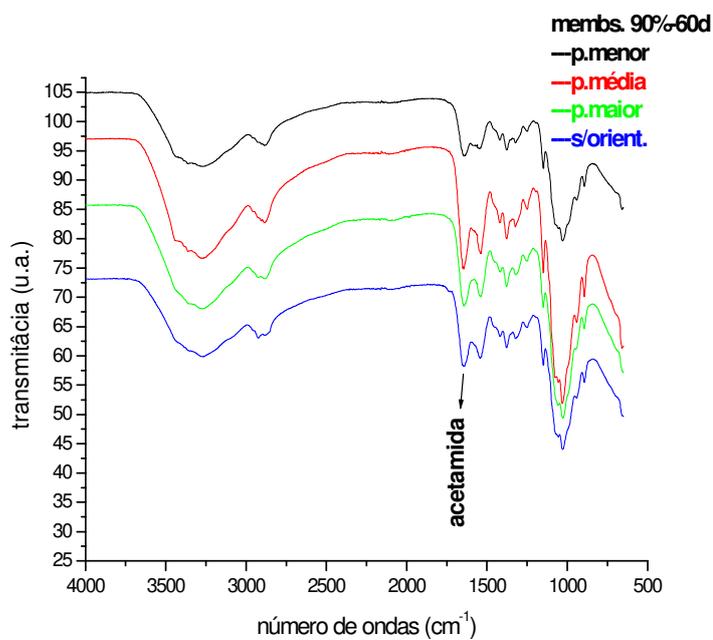
**Figura 4.9-** Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% e variadas orientações moleculares, sem degradação.



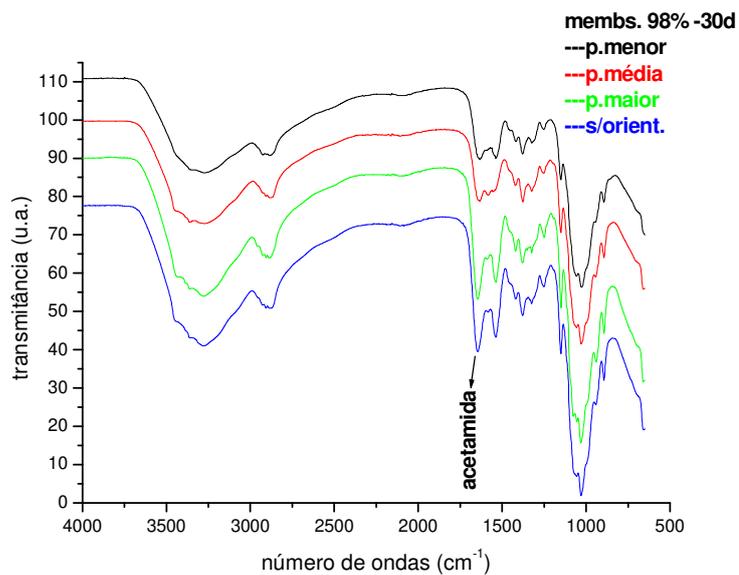
**Figura 4.10-** Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% e variadas orientações moleculares, sem degradação.



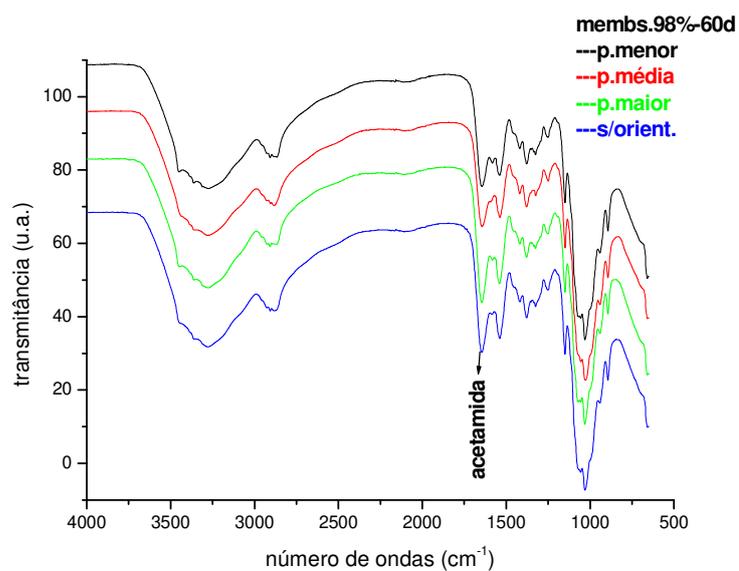
**Figura 4.11-** Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% e variadas orientações moleculares, com degradação de 30 dias.



**Figura 4.12-** Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 90% e variadas orientações moleculares, com degradação de 60 dias.



**Figura 4.13-** Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% e variadas orientações moleculares, com degradação de 30 dias.



**Figura 4.14-** Espectros de FTIR das membranas produzidas de quitosana com GD de 98% e variadas orientações moleculares, com degradação de 60 dias.

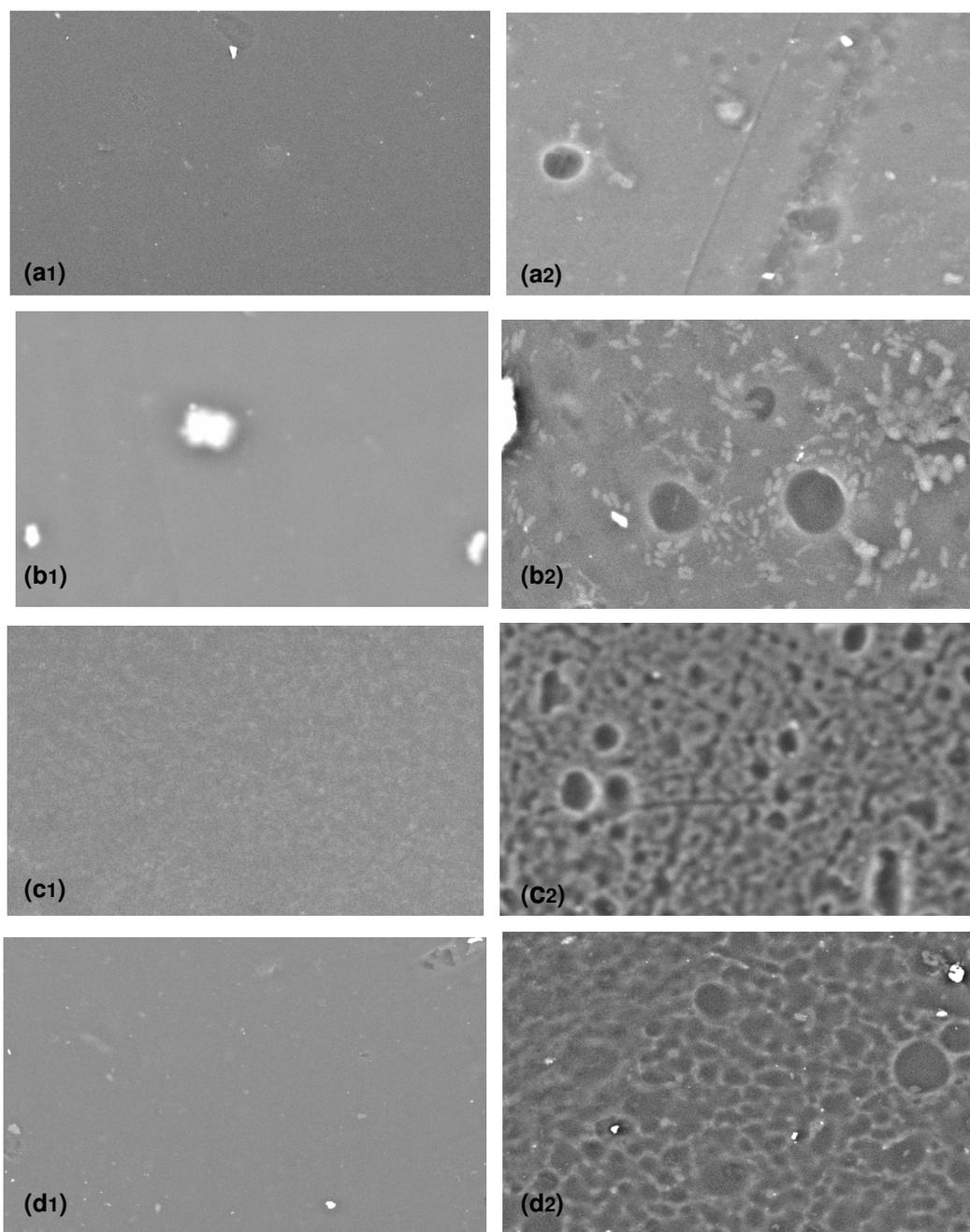
A partir dos espectros do FTIR das Figuras referentes às membranas produzidas, tanto com GD de 90% como de 98%, comparando-se com o espectro do FTIR obtido com os pós das quitosanas usados como matéria-prima, observa-se que praticamente não apresentaram diferenças significativas. Este resultado já era esperado, uma vez que as membranas com variado nível de orientação molecular, as possíveis alterações que ocorreram nas cadeias são de ordem física e não química, não modificando, conseqüentemente, os grupos funcionais presentes nas membranas. Como foi comentado anteriormente no tópico (4.1.2.), para o espectro das quitosanas em pó, a banda encontrada na região de  $1652\text{ cm}^{-1}$ , característica de uma amida I (BASKAR & KUMAR, 2009; LIMA, 2007), também apresenta intensidade maior nas membranas com GD de 90% e menor na de 98%, como já era esperado.

Nos espectros das membranas depois da degradação, observa-se que todas as bandas características da quitosana continuam presentes, porém com intensidade que variaram. Esse comportamento pode ter ocorrido devido a mudanças verificadas na textura das amostras depois de degradadas, interferindo assim, na leitura do FTIR ou, possivelmente, indica mudança na cristalinidade das membranas, pois no processo de biodegradação, as enzimas quebram as ligações químicas do material, causando modificações na sua estrutura (SUDHAKAR, 2007). Em particular, ainda com relação a banda encontrada na região de  $1652\text{ cm}^{-1}$ , observa-se que esta aumentou de intensidade em todas as amostras com GD de 90% e 98%. Acredita-se que isso ocorreu, devido também a ação da lisozima na quebra das cadeias da quitosana, que segundo a literatura pesquisada (SUH & MATTHEW, 2000), ocorre sobre os grupos acetamidos, deixando-os mais livres e, por isso, os espectros deram a indicação de uma maior presença desses radicais.

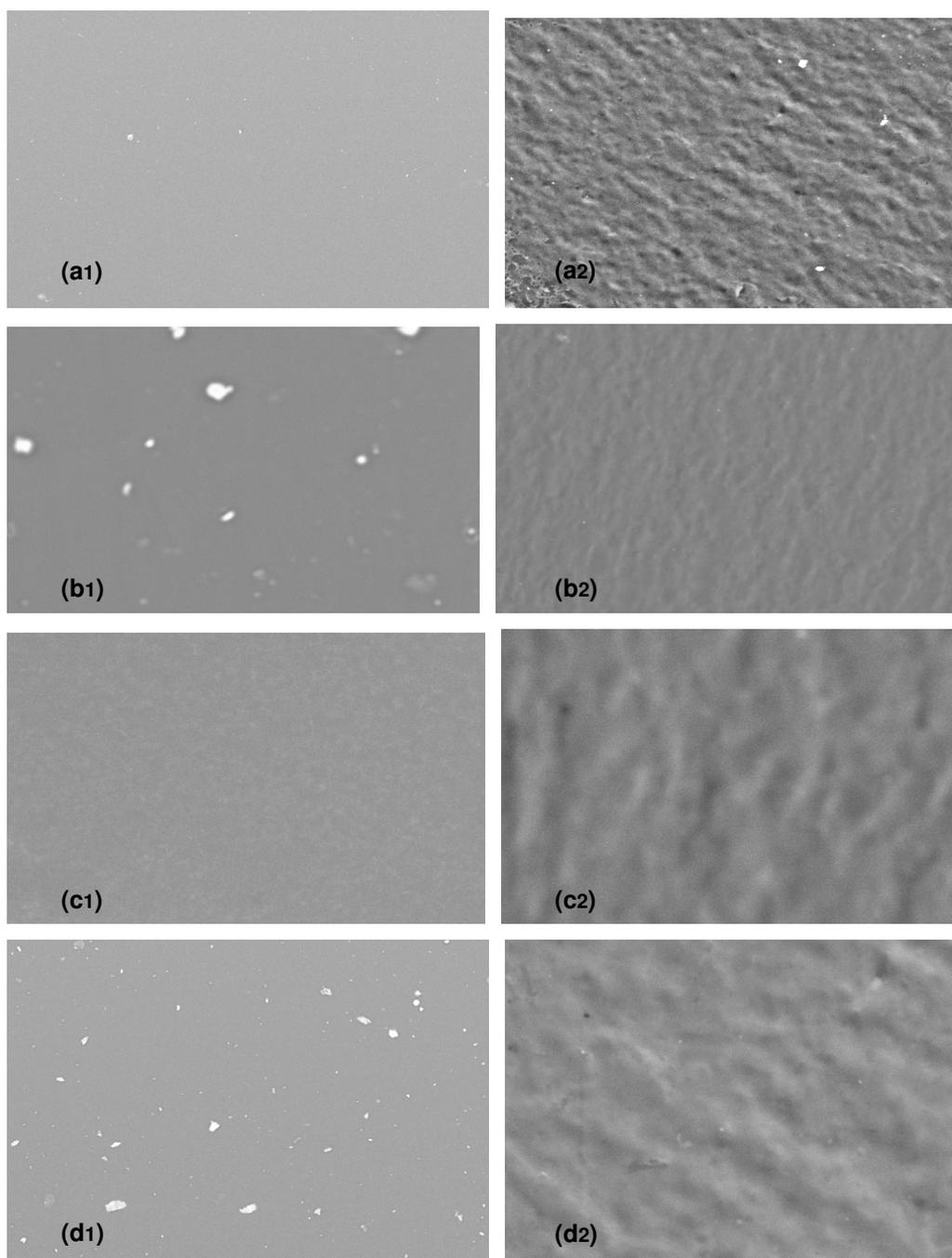
#### **4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

A microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para analisar a morfologia da superfície das membranas, antes e após as mesmas serem

submetidas à biodegradação enzimática. Para se ter um resultado mais expressivo da biodegradação, resolveu-se fazer as análises do lote de membranas submetidas ao ensaio com 60 dias. As micrografias estão expostas nas Figuras 4.15 e 4.16.



**Figura 4.15-** Micrografias das membranas de quitosana com GD de 90%, antes (a1, b1, c1 e d1) e após (a2, b2, c2 e d2) serem submetidas aos ensaios de biodegradação, onde: (a1, a2) estiradas na placa menor; (b1, b2) estiradas na placa média; (c1, c2) estiradas na placa maior e (d1, d2) sem orientação preferencial.



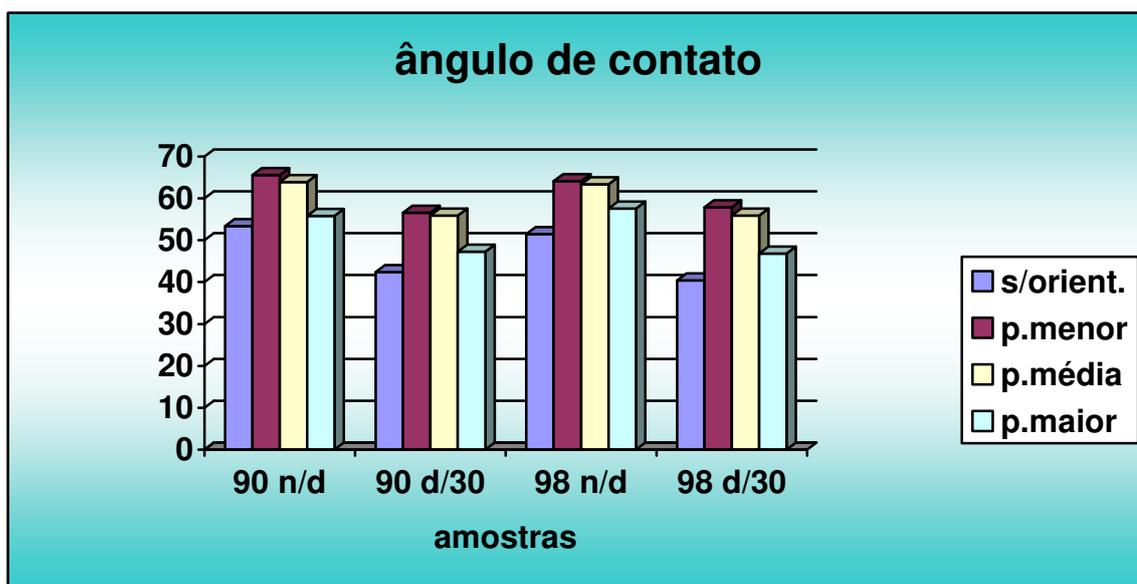
**Figura 4.16-** Micrografias das membranas de quitosana com GD de 98%, antes (a1, b1, c1 e d1) e após (a2, b2, c2 e d2) serem submetidas aos ensaios de biodegradação, onde: (a1, a2) estiradas na placa menor; (b1, b2) estiradas na placa média; (c1, c2) estiradas na placa maior e (d1, d2) sem orientação preferencial.

Como se observa nas micrografias do MEV mostradas nas Figuras 4.15 e 4.16, a morfologia da superfície das membranas não submetidas aos ensaios de biodegradação (a<sub>1</sub>, b<sub>1</sub>, c<sub>1</sub> e d<sub>1</sub>), diferiram daquelas submetidas aos ensaios (a<sub>2</sub>, b<sub>2</sub>, c<sub>2</sub> e d<sub>2</sub>). As primeiras apresentaram superfícies aparentemente lisas e uniformes e estão de acordo com a literatura (DALLAN, 2005; BASKAR & KUMAR, 2009), enquanto que as segundas apresentaram superfícies mais irregulares, com estruturas que indicam, aparentemente, a formação e/ou aumento de poros, principalmente nas membranas com GD de 90%, as quais, segundo os resultados dos ensaios de biodegradação, sofreram perdas de massas. Este resultado estar de acordo com o esperado, pois segundo a literatura (RATNER, 1996), as membranas que sofrem efetivamente degradação (perda de massa), geralmente apresentam superfícies mais irregulares, sem uniformidade, inclusive com formação de poros.

#### **4.2.5 Medidas do ângulo de contato**

Foi utilizada a técnica da medida do ângulo de contato visando analisar o grau de hidrofiliabilidade das membranas, antes e após as mesmas serem submetidas aos ensaios de biodegradação. Pretendia-se fazer a medida do ângulo de contato para as membranas submetidas aos ensaios de biodegradação com 30 e 60 dias, porém só foi possível realizá-lo no lote de amostras degradado durante 30 dias, uma vez que, no lote de 60 dias, devido ao estado físico das amostras, não foi possível prepará-las para o teste.

Os resultados obtidos estão expostos na Figura 4.17. Deve-se salientar que os resultados apresentaram um erro percentual em torno de 5% para mais ou para menos.



**Figura 4.17-** Medidas do ângulo de contato para as membranas de quitosana: com GD de 90% e 98% (não degradadas e com 30 dias de degradação); sem orientação e orientadas nos dispositivos (placa menor, placa média e placa maior).

Com esses resultados observa-se que com relação ao grau de desacetilação, as membranas apresentaram um perfil semelhante, não sendo esta variável um fator determinante para o grau de hidrofiliabilidade das mesmas. Depois de submetidas aos ensaios de biodegradação, observa-se em todas as amostras, um aumento na hidrofiliabilidade das membranas, uma vez que todos os valores estão abaixo dos medidos nas membranas não degradadas. Com relação às amostras, com e sem orientação molecular preferencial, observa-se que as sem orientação, apresentaram um perfil mais hidrofílico, tanto antes como depois da degradação. Com relação apenas às amostras com orientação preferencial, pode-se observar que, as que foram estiradas no dispositivo (placa menor) apresentaram um perfil menos hidrofílico e as que foram estiradas no dispositivo (placa maior) apresentaram um perfil mais hidrofílico.

## 5. CONCLUSÕES

Biomateriais à base de quitosana são uma realidade nas áreas biomédicas, e sua aplicação vem sendo estudada em vários campos, desde a indústria farmacêutica, até a engenharia tecidual. Obtidos a partir de matéria-prima abundante e de baixo custo, estes biomateriais podem ser de grande valia no âmbito da saúde pública aqui no Brasil e nos chamados países em desenvolvimento.

Conforme os objetivos propostos e os resultados obtidos nesta pesquisa, concluiu-se que:

- Os resultados da biodegradação enzimática in vitro, mostraram a eficiência da enzima lisozima na biodegradação da quitosana;
- O grau de desacetilação da quitosana é uma variável importante na biodegradação da mesma. Nesta pesquisa, a quitosana com GD de 90% degradou, enquanto a de 98% não;
- Os resultados do DRX mostraram que as membranas orientadas nos dispositivos (placa menor, placa média e placa maior) apresentaram variações nos picos característicos da quitosana, indicando a influência do estiramento realizado nestes dispositivos na orientação das cadeias;
- Nas membranas submetidas aos ensaios de biodegradação os resultados do DRX mostraram modificações nos difratogramas, inclusive com o surgimento de novos picos, indicando que houve alterações estruturais e na cristalinidade das mesmas;
- Os resultados do FTIR mostraram que, comparativamente, houve alterações significativas nos espectros das membranas antes e após de submetidas a biodegradação, indicando modificações nas suas estruturas, como indicou também o DRX ;

- Com as análises morfológicas por MEV, verificou-se que as membranas com grau de desacetilação de 90%, depois de submetidas aos ensaios de biodegradação, apresentaram formação de poros;
- Segundo os resultados da tensão superficial, o grau de desacetilação não é determinante para o grau de hidrofobicidade das membranas de quitosana;
- As membranas degradadas, comparativamente com as não degradadas, apresentaram um perfil mais hidrofílico, assim como as não orientadas preferencialmente, comparativamente com as orientadas.

## 6. SUGESTÕES PARA FUTURAS PESQUISAS

O presente trabalho constitui-se em uma base para futuras pesquisas sobre membranas de quitosana com orientação molecular submetidas a ensaios de degradação enzimática. A investigação mais apurada das possibilidades de uso dessas membranas como biomateriais leva à necessidade de se aprofundar os estudos relacionados às propriedades e ao comportamento desse material *in vivo*. Assim, sugerimos:

- Realizar ensaios de biodegradação com membranas de quitosana com outros graus de desacetilação;
- Fazer um estudo também da influência do peso molecular na biodegradação da quitosana;
- Realizar um estudo comparativo entre membranas de quitosana dos tipos densas e porosas e a influência das mesmas na biodegradação;
- Fazer uma análise comparativa das propriedades mecânicas das membranas de quitosana com variadas orientações moleculares.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.M.; BRANCIFORTI, M.C.; BRETAS, R.E.S. Avaliação da orientação molecular de moldados de polipropileno utilizando figuras de pólo obtidas por difração de raios X. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n.1, p.28-25, 2007.

ALMEIDA, T.L. de. **Desenvolvimento de membrana composta de pval e quitosana compatível com o sistema dermo-epidérmico**. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, 2009.

ANUSAVICE, K.J. *Philip's Materiais Dentários*. 11<sup>a</sup> ed. 764p. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

ASSIS, A.S et al. Bioconversão de resíduos de camarão *litopenaeus vannamei* para produção de biofilme de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 09, n. 05, p.480-491, 2008.

ASSIS, O. B. G.; SILVA, V. L. Caracterização estrutural e da capacidade de absorção em água em filmes finos de quitosana processadas em diversas concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, n. 4, p.223-228, 2003.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros bioabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BASKAR, D.; KUMAR, T.S.S. Effect of deacetylation time on the preparation, properties and swelling behavior of chitosan films. **ELSERVIER- Carbohydrate Polymers**, v.78, p. 767–772, 2009.

BATTISTI, M.V; FILHO, S.P.C. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Revista Química Nova**, v. 31, n.8, p. 2014-2019, 2008.

BERGER, J.; REISTT, M.; MAYER, J.M.; FELTT, O.; GURNY, R. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.57,p.35-52, 2004.

BRANCIFORTI, M.C; MACHADO, R; BRETAS, R.E.S. Orientação molecular em polímeros através de figuras de pólo. **III Workshop sobre textura**. São Paulo, p.33-35, 2006.

BROWN, C.D.; KREILGAARD, L.; NAKAKURA, M.; CARAM-LELHAM, N.; PETTIT, D.K.; GOMBOTZ, W.R. e HOFFMAN, A.S. Release of PEGylated

granulocyte-macrophage colony-stimulating factor from chitosan/glycerol films. **Journal of Controlled Release**, v.72, p.35-46, 2001.

CAMPANA, S.P.; SIGNINI, R. Efeitos de aditivos na desacetilação de quitina. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 11, n. 4, p.169-173, 2001.

CHAVES, E.L., MAGADAN, 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.

CHIANDOTTI, R.S. **Síntese e propriedades de derivados de quitosana: lauroil quitosana**. 73f. Dissertação (Mestrado em química). Universidade Federal do Paraná-UFPR. 2005.

COUTINHO, F.M.B; MELLO, IL; MARIA, L.C. DE S. Polietileno: Principais tipos, propriedades e aplicações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, nº 1, p. 1-13, 2003.

COSTA, T.H.C. I; FEITOR, M.C.; ALVES JUNIOR, C. ; BEZERRA, C.M. Caracterização de filmes de poliéster modificados por plasma de O<sub>2</sub> a baixa pressão. **Revista Matéria**, v. 13, n. 1, pp. 65 – 76, 2008.

CRAVEIRO, A.A.; CRAVEIRO, A.C. e QUEIROZ, D.C. **Quitosana – A fibra do futuro**, Padetec, 124p, 1999.

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

DUARTE, M.A.T. **Estudo do processamento e da degradação térmica do poli(3-hidroxiбутирато) e de suas blendas com poli(ε-caprolactona)**. 109f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais). Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC. 2004.

DUCHEYNE, P.; LEMMONS, J. E. (Ed.). Bioceramics: materials characteristics versus in vivo behavior. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 523, p. 54-71, 1988.

FILHO, S.P.C. et al. Extração, estruturas e propriedades de α- e β- quitina. **Revista Química Nova**, V. 30, n 3, p: 644-650, 2007.

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**. 96f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química. Araraquara, 2005.

FORMOLO, M.C. , SCHNEIDER A. L., DUARTE, M.A.T. PEZZIN A. P. T., Polihidroxicanoatos: biopolímeros produzidos a partir de fontes renováveis. **Revista Saúde e Meio Ambiente**. n.2, v.4, p. 14-21, 2003.

GERENTES, P.; VACHOUD, L.; DOURY, J.; DOMARD, A. Study of a chitin-based gel as injectable material in periodontal surgery. **Biomaterials**, 2002.

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

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 effects on fibroblast cell attachment and proliferation. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 17, p. 1373-1381, 2006.

HENCH, L.L., "Bioceramics", **Journal of American Ceramic Society**, v. 81, n. 7, p.1705-1728, 1998.

HIRANO, S. Chitin and Chitosan, **Elsevier**, New York, p.37-43, 1989.

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.

KAWACHI, E. Y.; BERTRAN C. A.; REIS, R. R. dos.; ALVES, O. L. Biocerâmicas: Tendências e Perspectivas de uma Área Interdisciplinar. **Química Nova**. v.4, n.23, p.518, 2000.

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

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

KOIDE, S.S. Chitin-chitosan: properties, benefits and risks. (Center for Biomedical Research, Population Council, New York, NY 10021, USA). **Nutr. Res. (N. Y.)**, **18(6)**, **1091-1101 (English)**. Elsevier Science Inc. CODEN: NTRSDC. ISSN: 0271-5317. DOCUMENT TYPE: Journal; General Review CA Section: 18 (Animal Nutrition), 1998.

KURITA ,K.; KAJI, Y.; MORI, T. e NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of b-chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v.42, p.19-21, 2000.

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

LEE, L. H. **Fundamentals of Adhesion**. Plenum Press, 1991.

LIMA, M.S.Pde. **Preparo e caracterização de membranas de quitosana modificadas com poli (ácido acrílico)** 89 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-Graduação em Química. Natal, 2007.

LIMA, I.deS. **Quitosanas e quitosanas química e morfologicamente modificadas com anidrido succinico – propriedades, adsorção e termoquímica**. 145f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, 2005.

MARK, J.E. e CALVERT, P.D. Biomimetic, hybrid and in situ composites. **Materials Science and Engineering: C**, v.1, n.3, p.59-173, 1994.

MARTINI, F.H. **Fundamentals of anatomy and physiology**. New Jersey, A Simon & Schuster Company, 3ª edição, p.28, 1995.

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

MUZZARELLI, C; MUZZARELLI, R.A. Natural and artificial chitosan-inorganic composites. **J. Inorg Biochem.**; v.92. p.89-94, 2002.

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

NEEDLEMAN, I.G.; SMALES, F.C.; MARTIN, G.P. An investigation of bioadhesion for periodontal and oral mucosal drug delivery. **J. Clin Periodontol.**; v.24. p.394-400, 1997.

NETO, R.S. et al. Biomateriais à base de quitosana com aplicação médica e odontológica: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.37, p:155 - 161, 2008.

O'BRIEN, W.J; RYGE, G. **Materiais dentários**. 382 p.1ª edição. Rio de Janeiro. Editora Interamericana, 1981.

OREFICE, R.L.; PEREIRA, M.M; MANSUR, H.S. **Biomateriais: Fundamentos e Aplicações**. 1ª edição. Rio de Janeiro. Editora Cultura Médica, 2006.

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

QU, X.; WIRSEN, A.; ALBERTSSON, A-C. Effect of lactic/glycolic acid side chains on the thermal degradation kinetics of chitosan derivatives. **Polymer**, v.41, p.4841-4847, 2000.

RABELLO, M. S. **Estrutura super-molecular de polímeros** (apostila). 121f. Universidade Federal da Paraíba, Campina Grande, 1989.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine, **academic press**, San Diego 1996.

RAVI KUMAR, N.M.V. A review of chitin and chitosan applications. **Reactive & Functional Polymers**. n.26, v.46, p.1-27, 2000.

RESENDE, C.X. **Estudo teórico - experimental de duas soluções para testes de bioatividade e revestimento de metais**. 82f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais). Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE. Rio de Janeiro, 2007.

RIBEIRO, R.P. **Efeito da radiação gama no comportamento in vitro de um copolímero bioabsorvível**. 116f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais). Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2006.

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

RODAS, A.C.D. **Desenvolvimento de membranas como compósitos dérmico-epidérmicos**. 149f. Tese (Doutorado – Tecnologia Nuclear), IPEN - Instituto de Pesquisas Nucleares, São Paulo, 2004.

ROGERS M.E, LONG T.E: Synthetic Methods in Step-Growth Polymers – chapter 2 – **Polyesters**. John Wiley & Sons, 2003.

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.

SAN ROMAN J.; REIS R. **Biodegradable systems in medica functions: desing, processing, testing and applications**. 1ªed. Editora CRC:Boca Ratón, 2004.

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, nº 4, p. 308-317, 2007.

SANTOS Jr., A. **Cultura de Células Vero sobre polímeros bioabsorvíveis a base de poli-L-ácido láctico**. 150f. UNICAMP, . Tese de Doutorado – Instituto de Biologia, - UNICAMP- Universidade Estadual de Campinas, 2001.

SENEL, S.; McCLURE., S.J. Potential application of chitosan in veterinary medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p.1467-1480, 2004.

SHIGEMASA, Y. et al. Evaluation of different absorbance ratios from infrared spectroscopy for analyzing the degree of deacetylation in chitin. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 18, p. 237–242, 1996.

SIMTH, R. . Biodegradable polymers for industrial applications. **New York: CRC Press**, 516p,.2005.

SIMOES, M.S. **Desenvolvimento e estudo *in vitro* de implante biorreabsorvível em poli (L-lactídeo) (PLLA) para artrodese de coluna lombar**. 124f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2007.

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.

SOLLA, M.P. **Estudo da cristalização de sistemas poliméricos multifásicos**. 32f. Monografia (conclusão do curso de engenharia química). UFRGS, 2005.

SOUZA, M.A de.; MASSI, M.; PESSOA, R.S. Estudo das alterações superficiais de filmes de DLC promovidas pelo processo de corrosão por plasma. Anais do 12º Encontro de Iniciação Científica e Pós-Graduação do ITA, 2006.

SUH, J.K.F. e MATTHEW, H.W.T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, v.21, p.2589-2598, 2000.

SUDHAKAR, M.; TRISHUL, A.; DOBLE, M.; KUMAR, K. S.; JAHAN, S.J.; INBAKANDAN, D.; VIDUTHALAI, R.R.; UMADEVI, V.R.; MURTHY, P. S.; VENKATESAN, R. Biofouling and biodegradation of polyolefins in ocean waters. *Polym. Degrad. Stabil.* 28, 1-10, 2007.

STAMFORD, T.C.M. **Produção, caracterização e atuação anticariogênica de quitosana extraída de *Cunninghamella elegans* UCP 542**. 153f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco – UFPE – Recife, 2006.

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.

TAKEUCHI, H.; MATSUI, Y.; YAMAMOTO, H.; KAWASHIMA, Y. Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their

effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats. **J Control Release**. 2003; v.86. p.235-42, 2003.

TOMIHATA, K. e IKADA, Y. *In vitro* and *in vivo* degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. **Biomaterials**, v.18, n.7, p.567-575, 1997.

TORMALA, P.; POHJONEN, T. e ROKKANEN, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers (Part H)**, v.212, p.101-111, 1998.

TORRES, M.A; VIEIRA, R.S; BEPPU, M.M; SANTANA, C.C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, nº 4, p.306-312, 2005.

UENO, H.; MURAKAMI, M.; OKUMURA, M.; KADOSAWA, T.; UEDE, T.; FUJINAGA, T.; Chitosan accelerates the production of osteopontin from polymorphonuclear leukocytes. **Biomaterials**.;22:1667-73, 2001.

VARUM, K.M.; HOLME, H.K.; IZUME, M.; STOKKE, B.T. e SMIDSROD, O. Determination of enzymatic hydrolysis specificity of partially *N*-acetylated chitosan. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.1291, p.5-15, 1996.

VERT M, LI SM, SPENLEHAUER G, GUERIN P: Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **J Mater Sci: Mater Med**, 3:432-446, 1992.

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

WISNIEWSKA-WRONA, M.; NIEKRASZEWICZ, A.; STRUSZCZYK, H. e GUZINSKA, K. Estimation of polymer compositions containing chitosan for veterinary applications. **Fibres & Textiles in Eastern Europe**, v.38, n.3, p.82-87, 2002.

WU, T.; ZIVANOCIY, S. Determination of the degree of acetylation (DA) of chitin and chitosan by an improved first derivative UV method. **Carbohydrate Polymers**, v. 73, p. 248-253, 2008.

XU, Y.X.; KIM, K.M.; HANNA, M.A. e NAG, D. Chitosan-starch composite film: preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v.21, p.185-192, 2005.

<http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/L/Lysozyme.html>; acessado em 15/02/2010.

<http://br.geocities.com/saladefisica6/hidrostatica/capilaridade.htm>; acessado em 02/12/2009.

