

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

DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ARCABOUÇOS TRIDIMENSIONAIS DE
QUITOSANA – GELATINA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL DE PELE

Aluna: MARIA EDUARDA R. DE R. MOREIRA CAVALCANTI

Orientador: Prof. Dr. MARCUS VINICIUS LIA FOOK

CAMPINA GRANDE - PB
AGOSTO/2013

Maria Eduarda Ramos de Rangel Moreira Cavalcanti

**DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ARCABOUÇOS
TRIDIMENSIONAIS DE QUITOSANA – GELATINA PARA REGENERAÇÃO
TECIDUAL DE PELE**

Trabalho de dissertação apresentado à banca examinadora do Programa de Pós Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, Área de Concentração: Polímeros, como exigência final para obtenção do título de Mestre em Ciências e Engenharia de Materiais.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

CAMPINA GRANDE, 2013





FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCC


- C376d Cavalcanti, Maria Eduarda Ramos Rangel Moreira.
Desenvolvimento e avaliação de arca-bouços tridimensionais de quitosana – Gelatina para regeneração tecidual da pele / Maria Eduarda Ramos de Rangel Moreira Cavalcanti. -- 2013.
100 f. : il. color.
- Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia.
- "Orientação: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook".
Referências.
1. Quitosana. 2. Gelatina. 3. Regeneração tecidual. 4. Queimados. 5. Curativos. I. Fook, Marcus Vinícius Lia. II. Título.

CDU 677.473 (043)

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DE ARCABOUÇOS TRIDIMENSIONAIS
DE QUITOSANA – GELATINA PARA REGENERAÇÃO TECIDUAL DE PELE.

MARIA EDUARDA RAMOS DE RANGEL MOREIRA CAVALCANTI

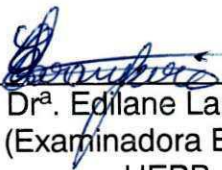
Dissertação Aprovada em 29/08/2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
(Orientador)
UAEMa/UFCG



Dr.ª Adriana Lima Holanda
(Examinadora Externa)
UEPB



Dr.ª Edilane Laranjeira
(Examinadora Externa)
UEPB

RESUMO

A pele é o órgão do corpo mais suscetível às lesões em diversos níveis. É o maior órgão do corpo e tem como função o revestimento deste, agindo como proteção contra os inconvenientes do meio externo. Dentre os mais variados tipos de lesões a que a pele está exposta, pode-se destacar as queimaduras, que por sua vez possuem vários tipos e graus de complexidade, além de diferentes motivações, e conseqüentemente, tratamentos direcionados para cada uma delas. A assepsia e o uso de curativos são os procedimentos mais utilizados para evitar a perda de fluidos corpóreos e controle da infecção, sendo estes alguns dos requisitos mais importantes para uma regeneração efetiva da área afetada. A quitosana e a gelatina são dois dos biopolímeros reconhecidos pela sua biocompatibilidade e biodegradação, e possuem algumas características que unidas podem contribuir com a necessidade de utilização de materiais mais eficientes no para uso em curativos. Desta forma, o presente trabalho tem o objetivo de desenvolver arcabouços tridimensionais de quitosana pela técnica de freeze-drying e posterior recobrimento superficial com a gelatina. A Pesquisa foi dividida em duas partes metodologias a fim de facilitar a discussão e obter uma melhor resposta a aplicação almejada. Para tanto, diversas técnicas de caracterização foram realizadas tanto na primeira etapa, quanto na segunda, a fim de direcionar o final da pesquisa a um resultado satisfatório as expectativas de geração futura de um produto vendável. Ao final foram obtidas estruturas porosas interconectadas, com diâmetros de poros médios entre 43,8 μ m e 200 μ m, intumescimento médios entre 1.150% e velocidade de permeação ao vapor de água de 4.156 g/m² dia. Ensaio mecânicos demonstraram que os arcabouços produzidos possuem módulos de elasticidade de 8,1MPa em média. Os resultados de viabilidade celular do arcabouço final apresentou percentagem superior a 90%. Os resultados obtidos demonstram que o objetivo da pesquisa foi alcançado, de melhorar as propriedades dos arcabouços de quitosana com a associação da gelatina, além de indicarem que a aplicação para regeneração tecidual da pele possui potencial em níveis menos elevados de complexidade.

Palavras-chave: *Quitosana, gelatina, regeneração tecidual, queimados, curativos.*

ABSTRACT

The skin is the organ of the body more susceptible to injury at various levels. It is the largest organ of the body, work as coating of the body and acts as a protection against the inconvenience of the external environment. Among the various types of injury to the skin is exposed, may be mentioned burns, which one have various types and degrees of complexity, and various reasons, thereafter each one needs individual treatments. The asepsis and the use of bandages are procedures commonly used to prevent loss of body fluids and control of infection, these are among the most important requirements for effective regeneration of the affected area. The chitosan and gelatin are biopolymers known for their biocompatibility and biodegradability, their also have certain characteristics which together may contribute to obtain materials more efficient for use in this in dressings. Thus, this study aims to develop three-dimensional scaffolds of chitosan by the technique of freeze-drying and subsequent surface coating with gelatin. The research was divided into two methods in order to facilitate discussion and to better respond to obtain desired application. For this purpose, various characterization techniques were performed in both in the first stage, as in the second aims to discuss and development satisfactory search expectations for the future generation of a salable product. At the end were obtained interconnected porous structure with average pore diameters between 43.8 μm and 200 μm , average swelling between 1.150% and the permeation rate to water vapor of 4,156 g/m² day. Mechanical testing demonstrated that the frameworks produced elastic modulus on average of 8.1MPa. The results of cell viability of the scaffolds presented percentage higher than 90%. The results demonstrate that the research objective was achieved, to improve the properties of chitosan scaffolds with gelatin, and indicate that this application for tissue regeneration of the skin has the potential to lower levels of complexity.

Key-words: *Chitosan, gelatin, tissue regeneration, burns, bandages.*

ACRÔNIMOS

ATR – Attenuated total reflectance – Refletância total atenuada

EDS – Energy Dispersion Spectroscopy - Espectroscopia de Dispersão de Energia;

FTIR – Fourier Transform Infrared Spectroscopy – Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier

ISO – International Standard Office

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MEC – Matriz Extracelular

MTT - Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
mL – mililitro

uL- microlitro

µm – micrometro

Nm - nanometro

LPS - Lipopolissacarídeo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da pele.....	15
Figura 2 - Imagem que demonstra o conceito de Biomimética.....	20
Figura 3 - Arcabouço e contagem de células vivas para testes em vivos.	21
Figura 4 - Dispositivo médico - Válvula cardíaca confeccionadas com biomateriais.....	23
Figura 5 - Estrutura da quitosana.....	25
Figura 6 - Esferas de quitosana.	26
Figura 7 – Fluxograma I: Detalha Etapa I.....	30
Figura 8- Quatro últimos procedimentos metodológicos: (4) mistura da solução através do agitador mecânico; (5) solução vertida em placa de petri; (6) amostras sendo congeladas (7) e liofilizadas.....	31
Figura 9 - Cinco procedimentos para neutralização das amostras de quitosana.	31
Figura 10 – (a) Verificação do pH da água; (b) Amostras 1cm x 1cm; (c) Becker com 100mL com amostra imersa; (d) Amostra sendo pesada após imersão...	34
Figura 11- (a) Eppendorfs com as secções de quitosana, nas três concentrações vedando-o; (b) Depois as amostras indo para a estufa; (c) Temperatura da estufa a 36,5°C.	35
Figura 12 - FTIR das três concentrações de quitosana – 1,5%, 2,0% e 2,5%.	36
Figura 13 - FTIR comparativo da concentração de quitosana 2,5% e da quitosana pura em pó.....	37
Figura 14 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 1,5 %, submetidos à taxa de congelamento de -20°C.....	39
Figura 15 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 2,0 %, submetidos à taxa de congelamento de -20°C.....	39

Figura 16 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 2,5 %, submetidos à taxa de congelamento de -20°C.....	40
Figura 17 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 1,5%.	41
Figura 18 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2,0%.	41
Figura 19 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2, 5%.	42
Figura 20 - Média de concentração de quitosana (%) versus tamanho de poros (µm).....	42
Figura 21 - Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 1,5%.....	44
Figura 22 - Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,0%.....	44
Figura 23 - Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,5%.....	45
Figura 24- Ensaio de intumescimento das amostras de 1,5%.....	48
Figura 25 - Ensaio de intumescimento das amostras de 2,0%.....	49
Figura 26 - Ensaio de intumescimento das amostras de 2,5%.....	50
Figura 27 - Relação de tamanho de poros versus intumescimento.....	51
Figura 28 - Permeação do líquido através da observação da diminuição da água deionizada nos <i>ependorfs</i>	52
Figura 29- Velocidade de permeação de vapor de água das três concentrações de quitosana.....	54
Figura 30 - Alongamento máximo das três concentrações de quitosana.	56
Figura 31 - Tensão máxima das três concentrações de quitosana.	57
Figura 32 - Modulo de Young das três concentrações de quitosana.....	57
Figura 33 - Forma estrutural da gelatina.	67
Figura 34 - Fluxograma II: Detalha Etapa II.	70
Figura 35- Preparo da solução de gelatina.	71
Figura 36 - Metodologia do mergulho para solução líquida de gelatina.	71
Figura 37 - Metodologia do mergulho para solução semissólida de gelatina. ...	72

Figura 38 - Ilustração de algumas partes do procedimento de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos.	73
Figura 39 - Gráfico comparativo de FTIR de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% com gelatina 0,25%.	75
Figura 40 - Gráfico comparativo de FTIR de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% com gelatina 2,5%.	76
Figura 41 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, submetidos à taxa de congelamento de -20°C e liofilizados.	78
Figura 42 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.	78
Figura 43 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%, submetidos à taxa de congelamento de -20°C e liofilizados.	79
Figura 44 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.	80
Figura 45 - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.	81
Figura 46 - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.	82
Figura 47 - Ensaio de intumescimento das amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.	84
Figura 48 - Ensaio de intumescimento das amostras de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.	85
Figura 49- Velocidade de permeação de vapor de água das três concentrações de quitosana - gelatina.	88
Figura 50 - Comparativo do alongamento máximo dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.	91
Figura 51 - Comparativo da tensão máxima dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.	91
Figura 52 - Comparativo de módulo de Young dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.	92

Figura 53 - Viabilidade de macrófagos de camundongos na presença dos arcabouços de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, além do controle. 93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diferentes tipos de curativos disponíveis no mercado e suas aplicações.	18
Tabela 2- Concentrações e quantidade de amostras.	32
Tabela 3 - Quantidade de amostra, nome e concentração para teste de intumescimento.	33
Tabela 4 - Espessura e peso de cada amostra que foram realizados ensaios de permeabilidade.	35
Tabela 5 - Quantidade em porcentagem (%) de carbono, oxigênio e do sódio encontrado no experimento, para as três diferentes concentrações de quitotana (1,5%, 2,0% e 2,5%).	45
Tabela 6 - Quantidade em porcentagem (%) de carbono, oxigênio e do sódio referente ao teórico para a quitotana 80%.	46
Tabela 7 - Espessura, volume, densidade e médias das quatro amostras de quitosana 1,5% (A, B, C e D).	46
Tabela 8 - Espessura, volume, densidade e médias das quatro amostras de quitosana 2,0% (A, B, C e D). *Os valores de A 2,0% foram desconsiderados para a média da densidade.	47
Tabela 9 -Espessura, volume, densidade e médias das quatro amostras de quitosana 2,5% (A, B, C e D).	47
Tabela 10 - Média em porcentagem (%) das perdas de água durante 240 horas, das diferentes concentrações de quitosana.	53
Tabela 11- Média em porcentagem (%) das perdas de massa durante 240 horas, das diferentes concentrações de quitosana.	54
Tabela 12 - Mostra os valores obtidos nos ensaios de tensão máxima, alongamento máximo e modulo de Young das três concentrações de quitosana.	56
Tabela 13 - Tabela 7 - Médias da espessura, volume e densidade de amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.	83
Tabela 14 - Média em porcentagem (%) das perdas de água durante 336 horas, das diferentes concentrações de quitosana-gelatina.	87

SUMÁRIO

Capítulo I

1	INTRODUÇÃO	8
2	JUSTIFICATIVA	11
3	OBJETIVOS	13
3.1	GERAL	13
3.2	ESPECÍFICOS	13
4	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
4.1	ANATOMIA E FISILOGIA DA PELE.....	15
4.2	ALTERAÇÕES DA PELE POR DANO TÉRMICO – CALOR	16
4.3	CURATIVOS	17
4.4	ENGENHARIA DE TECIDOS.....	20
4.4.1	Arcabouços	21
4.5	BIOMATERIAIS.....	23
4.6	QUITOSANA.....	24
5	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE I.....	29
5.1	LOCAL DA PESQUISA	29
5.2	MATERIAIS.....	29
5.2.1	Matéria- prima	29
5.2.2	Reagentes	29
5.3	ETAPAS EXPERIMENTAIS	29
5.4	METODOLOGIA	30
5.4.1	Preparação dos arcabouços de quitosana.....	30
5.4.2	Neutralização dos arcabouços de quitosana.....	31
5.4.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	32

5.4.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
5.4.5	Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS)	32
5.4.6	Ensaio de Intumescimento	33
5.4.7	Ensaio de Permeabilidade	34
5.4.8	Ensaio Mecânicos.....	35
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
6.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	36
6.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	38
6.3	ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS) 43	
6.4	ENSAIO DE INTUMESCIMENTO	46
6.5	ENSAIO DE PERMEABILIDADE	52
6.6	ENSAIOS MECÂNICOS.....	55
7	CONCLUSÕES PARCIAIS	59
	REFERÊNCIAS.....	60
1	REVISÃO DA LITERATURA.....	67
1.1	GELATINA	67
1.2	RECOBRIMENTO POR IMERSÃO	68
2	MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE II.....	69
2.1	LOCAL DA PESQUISA	69
2.2	MATERIAIS.....	69
2.2.1	Matéria- prima	69
2.3	ETAPAS EXPERIMENTAIS	69
2.4	METODOLOGIA	70
2.4.1	Preparação da Gelatina.....	70
2.4.2	Recobrimento com a Solução de Gelatina	71

2.4.3	Ensaio de Viabilidade Celular.....	72
2.4.3.1	Ensaio de Avaliação de Viabilidade Celular dos macrófagos	73
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1	ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR).....	75
3.2	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	77
3.3	ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS)	81
3.4	ENSAIO DE INTUMESCIMENTO	82
3.5	ENSAIO DE PERMEABILIDADE	86
3.6	ENSAIOS MECÂNICOS.....	89
4	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	93
5	CONCLUSÕES PARCIAIS	95
6	CONCLUSÕES FINAIS.....	96
7	PERSPECTIVAS FUTURAS	98
	REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

A pele é o maior órgão do corpo e o vínculo do meio interno com o meio externo. É uma barreira que protege o corpo dos traumas, da desidratação e da invasão por microorganismos externos, além de participar da regulação da temperatura corporal, de excreção e absorção de substâncias. A epiderme é a camada externa da pele e a derme, a região vascularizada da pele (LEE, 2006).

Dentre as causas mais comuns de lesões cutâneas, encontram-se as queimaduras. Estas são bastante comuns, pois a pele é a maior área de contato do corpo e pode ser facilmente submetida às alterações por dano térmico, através de calor, radiação, eletricidade, dentre outros fatores de risco, que podem provocar lesões graves e de difícil reparação e regeneração tecidual (RAMOS & SILVA; CASTRO, 2009).

Nos últimos anos, o estudo de lesões cutâneas causadas por queimaduras tem sido intensificado, principalmente devido ao fato das mesmas ocuparem o terceiro lugar entre os acidentes que mais ocorrem no mundo, além de tratar-se de uma doença debilitante e de vastas consequências à vítima (ROSSI et al., 2003). Além disto, dados da Sociedade Brasileira de Queimados revelam que por ano, pelo menos um milhão de pessoas são vítimas de queimaduras no Brasil, sendo dois terços destas envolvendo crianças, e que 13.735 mortes entre 1996 e 2008 foram registradas tendo como causa as queimaduras (Ministério da Saúde, 2012).

A Engenharia de Tecidos é um campo interdisciplinar que reúne as ciências da vida e engenharias para promover estudos que investiguem um modo de manter ou reparar tecidos do corpo e suas funções, através de substitutos compatíveis com o meio biológico. Estes substitutos tem como função o suporte para o crescimento de células e adicionalmente servem como suporte mecânico e estrutural do tecido original até a formação do novo tecido (BARBANTI et al., 2005; LUO et al., 2007).

Uma atenção considerável tem sido dada para os biomateriais à base de polímeros de origem natural, dentre eles a quitosana. Considerada como

material com grandes possibilidades para modificações estruturais com almeçadas propriedades para destinações específicas, este polímero vem sendo amplamente estudado para aplicações industriais baseadas na formação de filmes e fibras, com ênfase na investigação de suas propriedades mecânicas, de modo a ser utilizado no campo biomédico, na liberação controlada de fármacos, para cicatrização, bem como na engenharia de tecidos. Além de propriedades favoráveis, como por exemplo, sua atividade antibacteriana, a quitosana ainda possui a vantagem de ser atóxica, renovável, com grande importância econômica e ambiental (RINAUDO, 2006).

Na última década, um dos veículos para pesquisa em biomateriais funcionais tem sido o desenvolvimento de arcabouços ou matrizes tridimensionais, podendo ser compreendidos na engenharia de tecidos como, dispositivos utilizados para promover a proliferação e crescimento celular, fornecendo um ambiente estável quimicamente e estruturalmente. Para que essas funções sejam exercidas com eficácia é desejável que os arcabouços sejam biocompatíveis e biodegradáveis e apresentem propriedades de superfície adequadas, como por exemplo, a rugosidade (SHI, 2006; WILLIAMS, 2008; FIDÉLES, 2010).

Além disso, pode-se encontrar na literatura uma ampla investigação dada pela motivação em associar à quitosana a outros biopolímeros, tais como: colágeno, gelatina, poli-hidroxicanoatos e poli (α -hidróxi ácidos). A união da quitosana a esses materiais biocompatíveis pode ser promissora com relação à melhoria das propriedades mecânicas e adesão de células, oferecendo uma grande aplicação em engenharia de tecidos (AUSTIN, 2007; LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

Estes polímeros sintéticos têm sido usados na confecção de barreiras mecânicas, que por sua vez oferecem controle da estrutura e das propriedades físico-químicas, da cristalinidade, condições hidrofílicas e hidrofóbicas, padrão de degradação, além das propriedades mecânicas. O material pode ser processado em diversas formas e microestruturas variando assim a área superficial desejada, quantidade, tamanho e distribuição de poros. Naturalmente, essas variáveis irão interferir de maneira direta nas diferentes

aplicações, sendo umas das potencialidades o uso em liberação controlada de fármacos, em órgãos artificiais e para reconstrução tecidual.

Partindo deste contexto, o presente trabalho se propõe produzir arcabouços de quitosana em três diferentes concentrações, através do processo de *freeze drying*, que será detalhado no Capítulo I, e posterior associação à gelatina, através do recobrimento superficial, que será exposto no Capítulo II. A partir desse desenvolvimento, e posterior caracterização, podem-se obter respostas mais específicas quanto ao controle da taxa de degradação e das propriedades mecânicas, bem como a possível aplicação e utilização na regeneração tecidual.

2 JUSTIFICATIVA

Como visto, a pele é o órgão do corpo que está mais propenso a lesões em diversos níveis, isso se dá pela sua importância funcional de revestimento do corpo e de proteção contra os inconvenientes do meio externo. As queimaduras são uma das lesões mais frequentes, principalmente aquelas do cotidiano que estão associadas a acidentes com alimentos superaquecidos. Existem vários tipos de queimaduras, em graus de complexidade e motivações diferenciadas, e conseqüentemente, tratamentos direcionados para cada um deles. (RAMOS & SILVA; CASTRO, 2009).

O crescimento da engenharia de tecidos na última década promove, a partir do seu caráter interdisciplinar, integrando conhecimento de áreas como a medicina e a engenharia de materiais, estudos direcionados para reparação de tecidos doentes ou danificados, tendo como principal vantagem a combinação de componentes biocompatíveis, matrizes porosas e componentes biológicos para aplicações específicas. (BARBANTI et al., 2005; LUO et al., 2007).

O desenvolvimento de novos biomateriais possibilita a investigação no domínio da engenharia de tecidos, já que o estudo da correlação entre biomateriais e células é fundamental para favorecer a reconstrução natural do tecido. Neste sentido, a pesquisa de biomateriais funcionais tem sido dirigida para o desenvolvimento de arcabouços compatíveis, que podem ser bastante investigados dentro da engenharia de materiais, tanto através da avaliação das técnicas de processamento, quanto da observação e comparação da morfologia e propriedades físico-químicas obtidas nas matrizes porosas. (RINAUDO, 2006).

Um dos biomateriais promissores para aplicação como suporte poroso é a quitosana, devido à sua degradação contínua sem que haja reação inflamatória do corpo. As matrizes porosas de quitosana podem ser obtidas, entre outras técnicas, através de um processo de congelamento e liofilização (*freeze drying*), gerando uma microestrutura porosa com alto grau de interconectividade entre os poros, dependendo da temperatura de congelamento da solução. Essa técnica é econômica, com fatores de viabilidade técnica (por possuir variáveis adaptáveis), além de proporcionar um

produto final de boa qualidade. (SHI, 2006; WILLIAMS, 2008; FIDÉLES, 2010; SAMPAIO 2012).

Atendendo que a matriz extracelular dos tecidos humanos é amplamente composta por proteínas, e que estas possuem um papel determinante para a adesão celular, torna-se conveniente a utilização de uma proteína na superfície da quitosana de forma a mimetizar e incrementar a capacidade que o arcabouço de quitosana possui para a formação de um novo tecido (Massia, 2004). Além do estudo dos arcabouços produzidos, uma das principais justificativas é a avaliação da gelatina como proteína associada superficialmente a quitosana, de modo a perceber até que ponto esta é determinante e favorável para a aplicação desejada.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente trabalho se propõe a desenvolver arcabouços de quitosana através da técnica de *freeze-drying*; incorporar gelatina a estes a partir do recobrimento superficial, e caracterizá-las para avaliação de aplicação na regeneração da pele.

3.2 ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho consistem em:

- Desenvolver arcabouços de quitosana 1,5%, 2,0% e 2,5% através da técnica *freeze-drying*;
- Incorporar a gelatina a quitosana através do recobrimento superficial e avaliar as variáveis de processamento para obtenção de arcabouços quitosana-gelatina;
- Avaliar as propriedades físico-químicas e morfológicas dos arcabouços de quitosana e quitosana-gelatina;
- Avaliar a citotoxicidade dos arcabouços de quitosana e quitosana-gelatina;
- Estabelecer relações entre os dois materiais estudados e suas respostas para regeneração tecidual.

Capítulo I

Arcabouços de Quitosana para Regeneração da Pele

4 REVISÃO DA LITERATURA

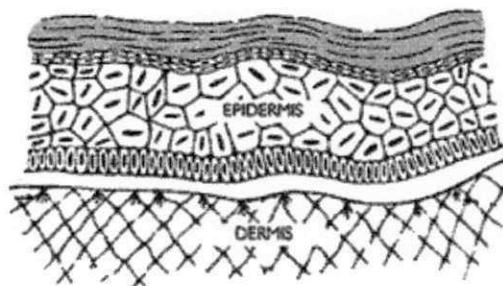
4.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DA PELE

A pele é o órgão mais externo do corpo humano. É a interface entre o corpo e o meio externo, representando de 10% a 15% do peso corporal e tem como finalidade recobrir e proteger os tecidos mais profundos contra traumatismos, desidratação e invasão por microrganismos externos. É formada por estruturas ectodérmicas (epiderme, unidade pilossebácea-apócrina, unidade écrina e unhas) e mesodérmicas (derme, vasos sanguíneos, músculo eretor do pelo e tecido celular subcutâneo). (LEE, 2006; LANGEMO, 2005; GRAY, 2000; KORIA, 2006).

Suas funções incluem proteção contra traumas físicos, térmicos, radiação UV, agentes oxidantes, invasão microbiana e proteção imune. Dentro destas importantes funções, a permeabilidade da barreira epidérmica, a qual controla o movimento transcutâneo da água e outros eletrólitos, é provavelmente a mais importante. A barreira física é predominantemente situada na epiderme. (LEE, 2006).

A pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme e por uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme, ilustrado na Figura 1 (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1999).

Figura 1 - Estrutura da pele



Fonte: Figura adaptada de Dystrophic Epidermolysis Bullosa Research Association of America.

A pele saudável por sua vez, com suas três camadas anatomicamente diferentes, o estrato córneo (10 µm), a epiderme viável (100 µm) e a porção mais alta da derme papilar (100 - 200 µm) tendo cada uma, diferentes constantes de difusão, é de certa maneira permeável a várias substâncias. (SANTOS; OLIVEIRA; GUEDES, 2009).

4.2 ALTERAÇÕES DA PELE POR DANO TÉRMICO – CALOR

Alterações na pele por danos térmicos são reconhecidas como queimaduras, que por sua vez, definem-se como uma lesão tecidual decorrente de um trauma causado por agentes térmicos, químicos, elétricos e /ou radioativos, que atuam levando à destruição parcial ou total da pele e seus anexos, podendo atingir inclusive as camadas mais profundas, como o tecido celular subcutâneo, músculos, tendões e ossos. (SERRA; BRAVO; CASTRO, 2009).

Determinar o grau de queimadura significa determinar a profundidade da lesão térmica na pele. O correto diagnóstico da profundidade só poderá ser feito através do estudo histopatológico (biópsia). O grau de profundidade da queimadura vai depender do agente causal, tempo de exposição e de condições prévias do paciente. (COHEN, 2000; KALGAARD, 1997).

A ferida provocada que apresenta grande área de tecido desvitalizado é rapidamente colonizada por bactérias e leva algum tempo para cicatrizar. Conseqüentemente existe um risco considerável de infecção nas grandes queimaduras, mas menos provável nas pequenas lesões. Histologicamente, resulta em necrose de coagulação da epiderme, podendo atingir profundidade variável da derme e dos tecidos subjacentes. (SERRA; BRAVO; CASTRO, 2009).

Os cuidados com as feridas podem ser dadas através da limpeza sistemática e diária da área queimada, acompanhada do desbridamento de tecidos desvitalizados e curativos com antimicrobianos tópicos, para prevenção da infecção. A correta terapia tópica das queimaduras representou,

historicamente, uma diminuição de 50% nos índices de óbito dos pacientes queimados. Espera-se de um bom agente tópico antibacteriano que este retarde a colonização bacteriana; mantenha a densidade bacteriana na ferida em níveis inferiores aos alcançados por outros meios; resulte numa microbiota de ferida relativamente homogênea; e determine o mínimo possível de reações adversas para pacientes. São eles: Solução de Nitrato de Prata a 0,5%, Acetato de Mafenide, Sulfadiazina de Prata a 1%, Sulfadiazina de Cério. (SERRA; BRAVO; CASTRO, 2009).

Relacionado à cicatrização, quanto mais profunda for à queimadura, menos este tecido se assemelhará com a pele normal, tornando seu tratamento muito mais complexo. Quando somente a epiderme é destruída, a regeneração formará um epitélio idêntico à pele normal. Porém, até a formação de todas as camadas da epiderme e do estrato córneo, a pele se apresentará ressecada, com a perda elevada de água transepidermica e manto lipídico insuficiente. (MAIO, 2004).

4.3 CURATIVOS

O tratamento de um ferimento e assepsia cuidadosa deste tem como principais objetivos a prevenção e/ou redução dos riscos de infecções, a eliminação de fatores desfavoráveis ao processo de cicatrização e a diminuição da probabilidade de infecções devido ao uso adequado de técnicas e procedimentos. (DALLAN, 2005).

Os curativos atualmente disponíveis no mercado podem ser classificados como: convencionais, hidrogéis, hidrocolóides, polímeros, bioativos, enzimas proteolíticas, curativos antiodor e filmes adesivos. O tratamento de queimaduras também pode ser realizado de diversas formas, variando de caso para caso, conforme as necessidades, as possibilidades e a experiência da equipe médica responsável. (CANDIDO, 2001).

Na Tabela 1, adaptada de Dallan (2005), observa-se uma diversificada possibilidade de curativos disponíveis no mercado e as suas aplicações, para variadas situações.

Tabela 1 - Diferentes tipos de curativos disponíveis no mercado e suas aplicações.

TIPO DE LESÃO	TIPO DE CURATIVO	EXEMPLOS
Infectada	Convencional, gazes com antissépticos, anti-biotocoterapia específica	Gazes de algodão, Bactigras® e Inadine®
Tecido necrótico com placas de fibrina	Convencional, enzimas proteolíticas, soluções hipertônicas	Gazes, colagenase, papaína, açúcar, Dersani®, soluções salinas hipertônicas e Aquacel®
Lesão seca e dolorosa	Hidrogel	Intrasite gel® e Gelduoderm gel®
Boa granulação e pouca secreção	Hidrocolóide	Duoderm® e Comfeel®
Boa granulação e muita secreção	Alginatos, espumas de poliuretano	Kaltostat®, Allevyn® e Combiderm®
Odor fétido	Curativos com carvão e prata	Actisorb®, Carbonet® e Carboflex®
Úlceras neuropáticas superficiais	Fator de crescimento tópico	Regranex®
Úlceras crônicas de difícil cicatrização	Equivalente de pele humana	Apligraf® e Dermagraft®
Úlceras de estase	Curativos compressivos	Elásticos: atadura elástica Inelásticos: bota Deunna®, Flexidress®, Profore®, Viscopaste® e Theraboot®

Como se observa na Tabela 1, atualmente, os produtos mais utilizados no tratamento de queimaduras são: sulfadiazina de prata associada ou não ao nitrato de cério, hidrocolóides, hidrogéis, ácido linoléico, ácido ricinoléico, *Aloe Vera*, elicina, papaína, albumina, gazes não aderentes, membranas sintéticas (como por exemplo: Omiderm®, Tegaderm®, Dermafilm®, Opsite®, Praflex®, Granuflex®, Epigard® e Biobrane®) ou biológicas, matriz de regeneração dérmica e alginato, dentre outros. (DALLAN, 2005).

Os curativos destinados ao uso em queimaduras possuem características particulares. Duas características importantes de um curativo utilizado no tratamento de queimaduras referem-se à redução da perda de fluídos corpóreos pelo paciente e ao controle da infecção. Outras características importantes e que devem ser consideradas são a aderência à ferida, a porosidade, a macroestrutura e as dimensões do curativo, suas propriedades

mecânicas, a taxa de biodegradação e a ausência de antigenicidade. (RATNER et al., 1996).

Conceitualmente, estes curativos podem ser classificados como temporários ou permanentes; epidérmicos, dérmicos ou compósitos; biológicos ou sintéticos. Em termos práticos, os curativos são classificados em temporários ou permanentes, sendo os do tipo temporários subdivididos em biodegradáveis e não biodegradáveis. Os curativos permanentes são sempre do tipo não biodegradáveis (SHERIDAN & TOMPKINS, 1999; DALLAN, 2005).

Os curativos temporários, do tipo não biodegradáveis, podem ser agrupados em duas categorias distintas: aqueles que não permitem o crescimento de células em suas superfícies podendo ser utilizados como recobrimentos ou aqueles que possuem poros em suas estruturas, permitindo assim, a migração celular. Tal característica permite a adesão do curativo à ferida havendo, portanto, a necessidade de sua retirada por intervenção cirúrgica (DALLAN, 2005).

Os curativos temporários, do tipo biodegradáveis, podem ser classificados como suportes (*scaffolds*) ou como barreiras. No caso dos suportes, os curativos atuam como matrizes para o crescimento de células, sendo degradados (por enzimas ou pelo próprio meio fisiológico) ao longo do processo de cicatrização. Já os curativos do tipo barreira, diferentemente dos suportes, não devem favorecer a adesão de células em suas superfícies e possuem como principais funções a proteção física e microbiológica do leito do ferimento além do controle da perda de fluidos corpóreos. Assim, para o bom desempenho destes curativos, características adequadas de flexibilidade, resistência mecânica e permeabilidade são fundamentais. Por serem biodegradáveis, estes curativos são degradados e absorvidos pelo organismo ao longo do processo de cicatrização, não sendo necessária a sua retirada. (DALLAN, 2005).

4.4 ENGENHARIA DE TECIDOS

A engenharia de tecidos é reconhecida como uma área científica em contínua expansão, e que consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos, através do recrutamento de tecido do próprio paciente, que são dissociados em células e estas cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, para então serem reinseridos no paciente. (BARBANTI et al., 2005).

Biomimética é um novo estudo da engenharia de tecidos, que investiga as construções da natureza em todos os seus aspectos estéticos e funcionais, e procura reproduzir estes projetos e processos no desenvolvimento de soluções para os problemas humanos. A Biomimética, ilustrada na Figura 2, não visa necessariamente basear-se naquilo que pode ser extraído dos organismos e de seus ecossistemas, mas sim, no que pode ser aprendido com eles (BENYUS, 2002).

Figura 2 - Imagem que demonstra o conceito de Biomimética.



Fonte: www.ecodesenvolvimento.org

Um desafio importante para a engenharia de tecidos é a concepção de materiais que possam ajudar o corpo humano na sua capacidade de regeneração, recuperando não só a estrutura do tecido danificado, mas também a sua função. O reparo inicia com técnicas *in vitro* de cultivo de células

em arcabouços, ilustrado na Figura 3, para posterior implantação no hospedeiro (MA, 2001).

Figura 3 - Arcabouço e contagem de células vivas para testes em vivos.



Fonte: Arquivo próprio.

Além disso, para definição da geometria em três dimensões (3D) do tecido reconstituído, o arcabouço fornece o microambiente para as células regenerativas, possibilitando a adesão, a proliferação, diferenciação e gênese do novo tecido. Portanto, a composição química, estrutura física e funcional são atributos importantes para biomateriais na engenharia de tecidos. Para atender às diversas necessidades da área, vários materiais têm sido explorados como suporte para a regeneração tecidual (VALLET-RAGÍ, 2009).

4.4.1 Arcabouços

Arcabouços tridimensionais servem como substratos temporários para suportar e guiar a formação tecidual em diferentes ambientes de regeneração de tecidos *in vitro* e *in vivo*. Como meio apropriado, os arcabouços devem possuir unidades moleculares que possibilitem modificações e taxa controlada de biodegradação, não desenvolver toxicidade tóxica ou sistêmica, ter propriedades para promover ou inibir interação célula-matriz e célula-célula, apresentar respostas imunes à inflamação, ser material de fácil produção ou aquisição e purificação e possuir compatibilidade com a substância química e com soluções aquosas em condições fisiológicas (LUO et al., 2007; OLSOON, 2008).

A estrutura dos arcabouços deve possuir cinco fatores considerados desejáveis: superfície que permita adesão e crescimento celular; nenhum componente ou subproduto de sua degradação deve provocar reações inflamatórias ou tóxicas; apresentar estrutura tridimensional; a porosidade deve proporcionar elevada área superficial para interação célula-suporte e ter espaço para a regeneração da matriz extracelular. *In vivo*, a porosidade e interconexão dos poros são essenciais para proliferação de vasos, facilitando a nutrição do tecido ao redor do implante. Biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioreabsorção são geralmente exigidas para as matrizes, e a taxa de degradação também deve coincidir com a taxa de formação do novo tecido ideal para servir ao propósito do modelo (MA, 2001; SANTOS Jr & WADA, 2007; LARANREJA & FÁVERE, 2009).

O tamanho dos poros é uma questão muito importante porque, se os poros forem muito pequenos, poderá ocorrer à oclusão dos poros pelas células. Isso evitará a penetração celular, produção da matriz extracelular e a neovascularização nas áreas internas do arcabouço. Se os poros forem muito grandes podem tornar o material do implante frágil. Além disso, mesmo micromovimentos do implante (que são difíceis de evitar), geralmente na interface, podem cortar o suprimento de sangue para o tecido e causar complicações, tais como, morte tecidual, inflamação e destruição da estabilidade interfacial (HENCH, 1991; SALGADO et al., 2004; DEVILLE et al., 2006).

KLAWITER e HULBERT (1971) e WHANG e colaboradores (1999), demonstraram através de experimentos o efeito do tamanho do poro na regeneração de tecidos. Os poros de 5 μm permitem a neovascularização, entre 5-15 μm o crescimento de fibroblastos, 40-100 μm o crescimento da matriz osteóide e 100-350 μm a regeneração óssea. Adicionalmente, tamanhos de poros de 100-1000 μm determinará as propriedades mecânicas em um nível global. Tamanhos variando de 1–10 μm influenciam na adesão e atividade de células individuais (HOLLISTER et al., 2005).

4.5 BIOMATERIAIS

Biomateriais podem ser definidos como substâncias de origens naturais ou sintéticas que são aceitas de maneira transitória ou permanente pelos tecidos que constituem os órgãos. São utilizados como suportes que tratam, restauram ou substituem algum tecido, órgão ou função do corpo, podendo ainda ser usado como dispositivo médico de material não biológico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (WILLIAMS, 2008), como ilustrado na Figura 4, onde se tem uma válvula cardíaca sendo implantada no corpo humano para substituir uma função que não está sendo realizada de maneira eficiente pelo órgão.

Figura 4 - Dispositivo médico - Válvula cardíaca confeccionadas com biomateriais.



Fonte: Arquivo próprio.

Um dos pré-requisitos essenciais para intitular um material como um biomaterial é a sua biocompatibilidade, ou que este seja bioinerte. Um biomaterial compatível é definido como aquele que não influencia negativamente o meio biológico, de modo que não sejam observadas reações tóxicas, alérgicas ou carcinogênicas. Em 1987 o termo biocompatibilidade foi redefinido como sendo a habilidade de um material desempenhar uma resposta tecidual apropriada em uma aplicação específica (WILLIAMS, 2008).

Assim como a biocompatibilidade, é importante que o material tenha aplicações direcionadas para o uso de matrizes biodegradáveis. Biodegradável é um termo utilizado para polímeros e dispositivos sólidos que, devido à degradação macromolecular, sofrem dispersão *in vivo*, sem a eliminação dos produtos e subprodutos pelo organismo. Polímeros biodegradáveis podem ser

atacados por elementos biológicos de forma que a integridade do sistema seja afetada, formando-se fragmentos ou outros subprodutos de degradação, que podem ser removidos do seu local de ação, mas não necessariamente do organismo (BARBANTI et al., 2005; SANTOS JR & WADA, 2007).

Os biopolímeros são utilizados como biomateriais por apresentar propriedades de mesma natureza que a dos tecidos humanos a serem reconstituídos. Derivados de fontes renováveis, tais como, plantas, animais, e microrganismos, os polímeros naturais utilizados, por exemplo, como arcabouços oferecem vantagens devido a sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. Além disso, apresentam componentes similares a matriz extracelular (MEC) nativa, que podem também evitar o estímulo de inflamação crônica ou reações imunológicas e toxicidade, geralmente detectada com polímeros sintéticos (GRIFFITH et al., 2005; MANO et al., 2007; YANG et al., 2010).

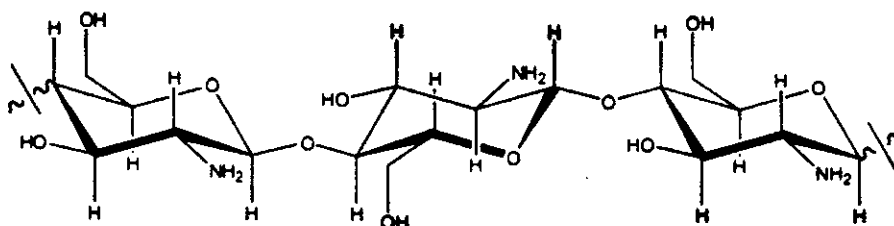
4.6 QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero, derivado da desacetilação parcial da quitina. É um composto não imunogênico e que apresenta uma degradação lenta em meio aquoso e, mesmo com a presença de lisozimas, o seu produto de degradação, a glicosamina, não é tóxico. É considerada como um material funcional apropriado para aplicações biomédicas por sua alta biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-antigenicidade propriedades de adsorção. Reações anti-inflamatórias ou alérgicas não têm sido observadas em humanos sujeitos a aplicação local, implantação, injeção e ingestão. A habilidade da quitosana de propiciar o ataque e proliferação celular é atribuída as suas propriedades químicas. A estrutura química da quitosana é similar aos glicosaminoglicanos, o maior componente da matriz extracelular do osso e cartilagem (SUH & MATTHEW, 2000; SANTOS Jr & WADA, 2007; THEIN-HAN & MISRA, 2009).

A quitosana pode ser definida como um copolímero de 2-amino-2-deoxi- β -D-glicose e 2-acetamino-2-deoxi- β -D-glicopiranosose, de composição variável

em função do grau residual de acetilação, cujas unidades também são unidas por ligações glicosídicas β -(1,4), como ilustradas na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura da quitosana.



Fonte: FIOROTTI, 2009.

Uma das características mais promissoras da quitosana é sua excelente habilidade para ser processada em estruturas porosas com poros interconectados para uso em transplante de células e regeneração tecidual. As estruturas de quitosana porosa podem ser formadas por congelamento e liofilização de soluções de quitosana-ácido acético em moldes apropriados (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

Biomateriais baseados em quitosana constituem uma classe emergente com aplicação em vários campos biomédicos. Recentemente, o aumento do interesse nas aplicações biomédicas a partir do desenvolvimento de novos materiais baseados na neste biopolímero, tem sido corroborado pelo vasto número de publicações científicas, bem como patentes. Principalmente a partir de novas modificações físico-químicas, promovendo novas atividades biológicas para fins específicos como, por exemplo, na engenharia de tecidos e liberação de fármacos (FIOROTTI, 2009; LARANJEIRA & FÁVERE, 2009).

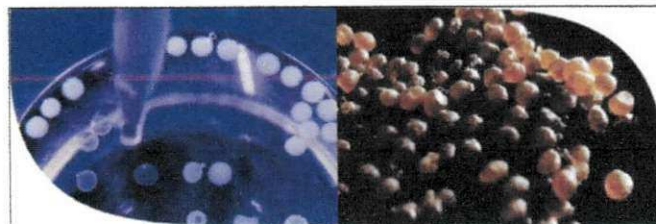
Além da fácil degradação, esse biopolímero pode ajudar na eficácia terapêutica, com liberação progressiva e controlada, assim como diminuir a toxicidade e ter maior tempo de permanência na circulação. Sua capacidade de ser usado em várias formas, tais como géis, copolímeros, é outra característica que torna a quitosana um material atrativo para a liberação de fármaco. Podendo formar partículas coloidais, prendendo a carga negativa das moléculas através de diversos meios, tais como químico e reticulação iônica. A

versatilidade da quitosana junto a outras propriedades biológicas, incluindo biocompatibilidade, gera um material adequado para liberação de fármaco (LEE et al., 2004).

A quitosana estimula a proliferação de células e suas propriedades biológicas são bastante eficazes no tratamento de feridas, pois tem a capacidade de acelerar a migração de células para a área lesada (LEE et al., 2004). Em sua formulação básica, apresenta grupos aminos que são estruturalmente semelhantes aos aminoácidos que constituem a pele. Esta característica é um aspecto favorável na redução de irritações ou rejeições localizadas além de atuar na redução do sangramento. Somada a capacidade de estimular a regeneração da derme, outra característica que reforça o potencial médico da quitosana é sua natureza hidrofílica (ASSIS, 2007).

De uma maneira geral, a quitosana oferece amplas possibilidades também para a engenharia de tecidos. Matrizes para cultura celular podem ser desenvolvidas na forma de géis, esponjas, fibras, esferas - ilustradas na Figura 6 - arcabouços porosos com incorporação de materiais poliméricos, tais como gelatina e colágeno, no intuito de ajustar propriedades químicas e comportamento mecânico de acordo com o tecido de aplicação (CHENITE et al., 2000; HU et al., 2004; JIANKANG et al., 2009; KIM et al., 2009). Além disso, pode-se citar como uma das grandes vantagens da quitosana para a engenharia de tecidos, a formação de suportes com poros interconectados, com osteocondutividade e habilidade de intensificar a formação óssea in vitro e in vivo (THEIN- HAN & MISTRA, 2009).

Figura 6 - Esferas de quitosana.



Fonte: Arquivo próprio.

No tratamento de ferimentos ou queimaduras, a quitina e a quitosana podem ser empregadas sob a forma de filmes de recobrimento (membranas),

soluções coloidais ou esponjas tridimensionais (CRAVEIRO & CRAVEIRO, 2000).

4.7 *Freeze-drying*

As estruturas porosas de quitosana podem ser fabricadas através do método de *freeze-drying*, que é uma tecnologia utilizada com frequência para soluções quitosana-ácido acético, através do congelamento e liofilização em moldes apropriados, geralmente placas de petri. A separação do acetato de quitosana a partir da fase do cristal de gelo e por seguinte a remoção do gelo através da liofilização tornam o material poroso, onde o tamanho médio dos seus poros pode ser controlado quando variada a velocidade de congelamento. Além disso, propriedades dos arca-bouços podem ser controladas pela mudança de concentração da quitosana, bem como, temperatura e velocidade de congelamento (LARANJEIRA & FÁVERE, 2009; YANG et al., 2010).

Essa técnica permite a obtenção de estruturas porosas por meio de congelamento da solução de um determinado polímero em temperaturas que podem variar entre -20°C e -196°C . A remoção do solvente é realizada através de sublimação, sendo assim, durante a liofilização, os espaços ocupados pelos cristais de gelo formados tornam-se vazios, originando os poros (CORRELO et al., 2007; FRANKS, 2007).

Durante a etapa de congelamento, os cristais do solvente crescem e as moléculas do soluto são excluídas até a amostra congelar completamente. Modificando algumas variáveis de congelamento, como, a temperatura de congelamento, concentração da solução, tipo de solvente, e a direção do congelamento, torna-se possível produzir materiais com morfologias porosas (QIAN; ZHANG, 2010).

A estrutura dos poros é uma réplica de dendritos de cristais de gelo emaranhados no final da solidificação; o diâmetro, forma e interconectividade dos poros e são regulados pelo tamanho e morfologia de cristais de gelo (YUNOKI et al., 2006; O'BRIEN et al., 2004).

A etapa de congelamento é bastante importante para o processo, visto que durante essa é que são definidos o tamanho e a distribuição dos cristais de gelo. O tempo de congelamento é um dos fatores determinantes, pois dependendo de como ele se processa, têm-se diferentes velocidades de congelamento e taxas de congelamento resultantes. A taxa de congelamento induz a formação de cristais de gelo de diferentes tamanhos e após a liofilização o espaço ocupado por esses cristais ficará vazio, conseqüentemente, afetará a geometria e o tamanho dos poros no material seco (CHAVES et al., 2009; CORRELO et al., 2007; HSHIEH et al., 2007).

5 MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE I

5.1 LOCAL DA PESQUISA

O desenvolvimento da pesquisa se deu no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande – Paraíba.

5.2 MATERIAIS

5.2.1 Matéria- prima

Para a preparação dos arcabouços foi utilizada a seguinte matéria-prima: Quitosana em pó de médio peso molecular com grau de desacetilação de 75% - 85%, adquirida da empresa Sigma Aldrich.

5.2.2 Reagentes

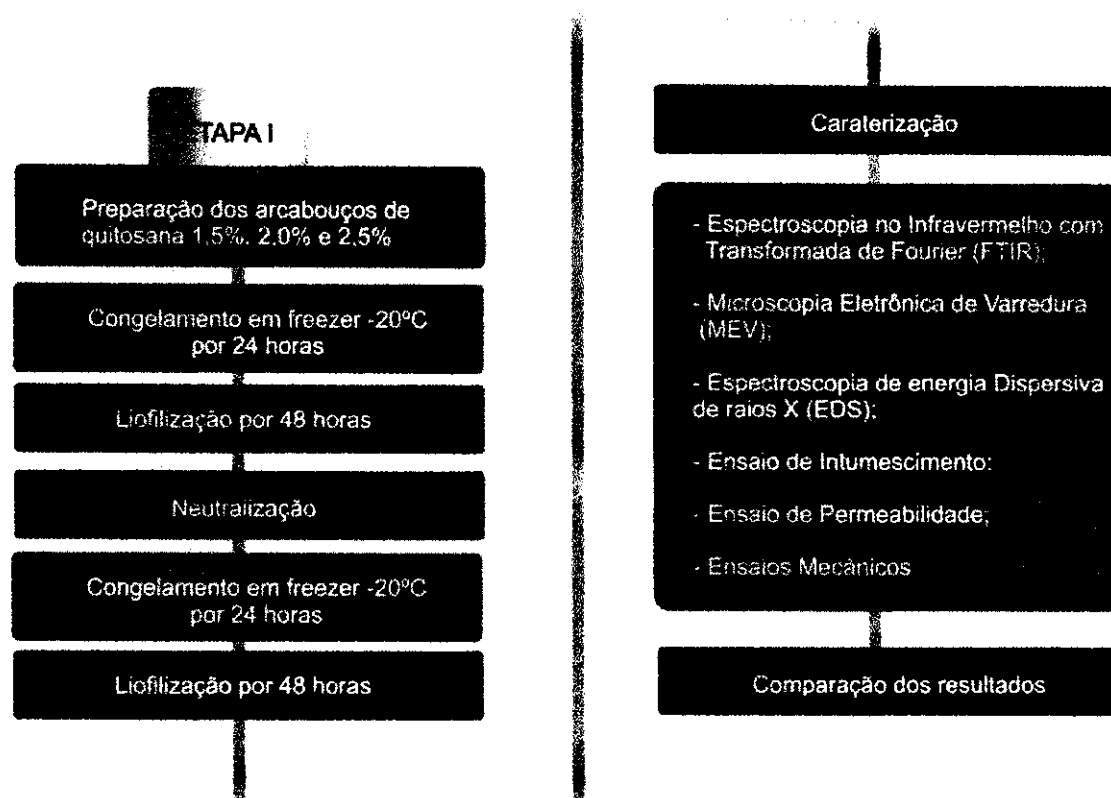
Para a preparação de solução de quitosana foi utilizado o ácido acético (CH_3COOH) em 1% (V/V), adquirido da empresa Vetec. E para neutralização dos arcabouços foi utilizado o hidróxido de sódio (NaOH) da empresa NEON.

5.3 ETAPAS EXPERIMENTAIS

A Etapa I foi realizada com o objetivo de obter informações sobre os arcabouços de quitosana em três diferentes concentrações e avaliar o comportamento e propriedades destas estruturas para a regeneração da pele.

Os procedimentos experimentais estão descritos no Fluxograma I.

Figura 7 – Fluxograma I: Detalha Etapa I.



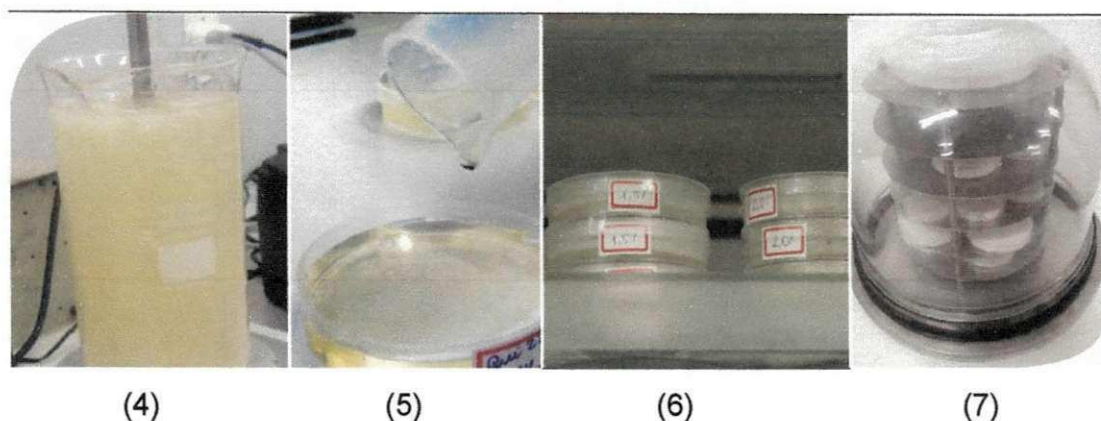
5.4 METODOLOGIA

5.4.1 Preparação dos arcabouços de quitosana

Para a preparação de arcabouços de quitosana foi utilizada a seguinte metodologia: 1) preparação de solução de ácido acético 1% (v/v); 2) calculou-se a quantidade necessária de quitosana para soluções de 1,5% (m/v), de 2,0% (m/v) e de 2,5% (m/v), respectivamente 3) pesou-se os valores adequados em uma balança; 4) fez-se a mistura das soluções de quitosana (separadamente) em Becker através de um agitador mecânico durante 24 horas; 5) mediu-se 20 mL de solução que depois foram vertidas em placas de

petri; 6) congelaram-se as amostras por 24 horas; 7) liofilizaram-se as amostras por 48 horas, como ilustrados na Figura 8.

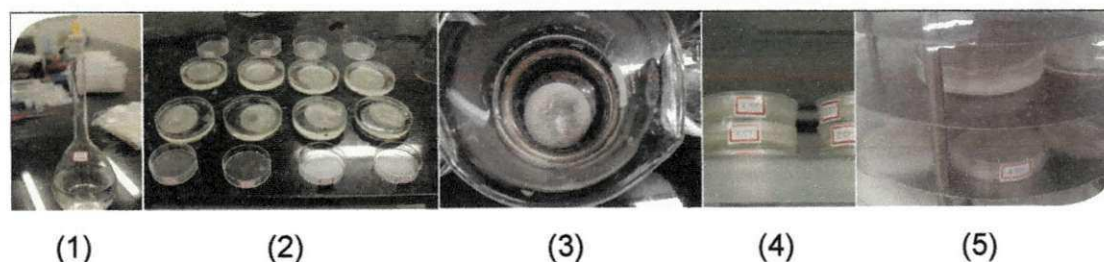
Figura 8- Quatro últimos procedimentos metodológicos: (4) mistura da solução através do agitador mecânico; (5) solução vertida em placa de petri; (6) amostras sendo congeladas (7) e liofilizadas.



5.4.2 Neutralização dos arcabouços de quitosana

Para a neutralização dos arcabouços de quitosana foi aplicada a metodologia de Fidèles (2010) que segue as seguintes etapas: 1) preparação de solução de hidróxido de sódio 1M; 2) imersão dos arcabouços na solução por 1 hora; 3) imersão dos arcabouços em água por 1 hora; 4) congelamento das amostras; 5) liofilização, ilustradas na Figura 9.

Figura 9 - Cinco procedimentos para neutralização das amostras de quitosana.



Após o procedimento de preparação e neutralização dos arcabouços, verificou-se a quantidade de amostras, ilustradas na Tabela 2, resultantes do processo para o subsequente recobrimento com a gelatina através do processo imersão superficial por mergulho. A diferença de quantidades de amostras

obtidas para as diferentes concentrações podem ser atribuídas à viscosidade da solução de quitosana ser maior com o aumento da concentração, e também devido a problemas do equipamento, onde algumas amostras foram perdidas.

Tabela 2- Concentrações e quantidade de amostras.

Concentração	Quantidade de amostra
1,5%	12
2,0%	16
2,5%	18

5.4.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise de FTIR o equipamento utilizado foi o modelo spectrum 400 da Perkin Elmer, avaliando amostras obtidas a partir do corte de 1cm² de uma secção do arcabouço, dentro de um intervalo de comprimentos de onda de 4000 a 600 cm⁻¹.

5.4.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microestruturas dos arcabouços foram visualizadas a partir do equipamento MEV, TM-1000, HITACHI, com amostras seccionadas em tamanho de 1cm².

5.4.5 Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS)

Os elementos químicos das amostras de quitosana seccionadas em 1cm² foram obtidas a partir do dispositivo de energia dispersiva acoplado ao equipamento MEV, TM-1000, HITACHI.

5.4.6 Ensaio de Intumescimento

O ensaio de intumescimento foi realizado de acordo com a norma ASTM D1056-07, e foram utilizadas as três diferentes concentrações dos arcabouços de quitosana – 1,5%, 2,0%, 2,5%, a fim de obter respostas quanto ao tempo, volume e variações do inchamento dos mesmos.

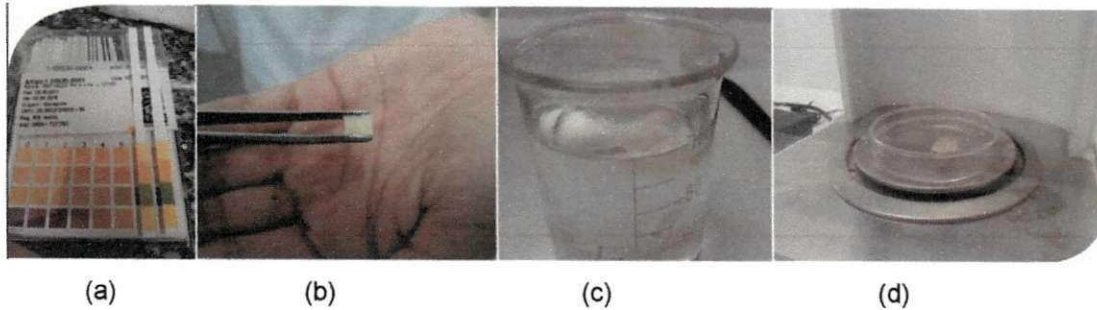
Para tal experimento, primeiramente verificou-se o pH da água, antes e depois da imersão das amostras, para constatar se ocorria alguma alteração, e não foi identificada nenhuma modificação. Utilizou-se após tal preocupação, quatro arcabouços de quitosana liofilizados, cortados em pedaços quadrados de 1cm x 1cm. No total foram cortadas quatro amostras de cada concentração e foram chamadas de A, B, C e D; como ilustra a Tabela 3.

Tabela 3 - Quantidade de amostra, nome e concentração para teste de intumescimento.

Concentração	Nome da amostra
1,5%	A1,5%, B1,5%, C1,5% e D1,5%
2,0%	A2,0%, B2,0%, C2,0% e D2,0%
2,5%	A2,5%, B2,5%, C2,5% e D2,5%

Após a verificação do pH (a), as amostras foram medidas em sua espessura, a com o auxílio de um paquímetro, padronizadas em tamanhos de 1cm² e logo após pesadas, para identificação do seu peso seco. Feito esse procedimento, os pequenos pedaços quadrados, foram colocados dentro de um Becker com 100 mL de água deionizada (c), durante uma variação de tempo controlada através de um cronômetro, e logo após pesadas novamente na balança, para verificação do seu peso pós-imersão (d), como ilustra a Figura 10.

Figura 10 – (a) Verificação do pH da água; (b) Amostras 1cm x 1cm; (c) Becker com 100mL com amostra imersa; (d) Amostra sendo pesada após imersão.



A variação de tempo controlada foi realizada de maneira progressiva, para verificação do comportamento dos arcabouços para diferentes tempos de imersão em meio aquoso. A progressão foi feita com intervalo de dois em dois minutos, resultando o total de 25 minutos para cada amostra.

5.4.7 Ensaio de Permeabilidade

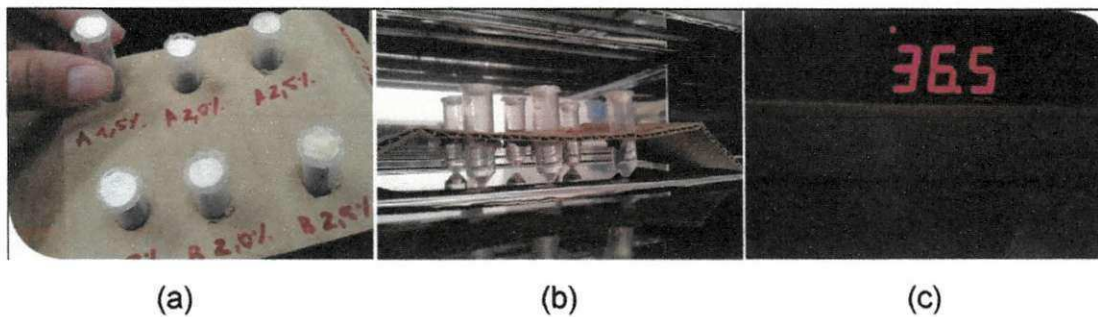
O ensaio de permeabilidade foi realizado logo após o ensaio de intumescimento. Para obter as respostas esperadas foi realizado o ensaio a partir da norma ASTM E 96-00, de modo adaptado à realidade do laboratório.

Utilizou-se recipientes hospitalares conhecidos como *ependorfs*, com 1 mL de água deionizada, vedados com secções de quitosana - como se fossem tampas - das concentrações de 1,5%, 2,0% e 2,5%, que foram medidas em sua espessura. Depois, essas foram individualmente pesadas juntamente com os *ependorfs* e colocados na estufa à temperatura de 36,5°C e, subsequente, pesados após 24 horas durante 4 dias, pesados após 72 horas e posteriormente novamente 24 horas por mais 3 dias, totalizando 10 dias de experimento, como ilustrados na Tabela 4 e Figura 11, respectivamente.

Tabela 4 - Espessura e peso de cada amostra que foram realizados ensaios de permeabilidade.

	Peso	Espessura
A 1,5%	1,896g	3,174mm
B 1,5%	1,913g	3,148mm
A 2,0%	1,920g	3,332mm
B 2,0%	1,815g	2,754mm
A 2,5%	1,884g	3,261mm
B 2,5%	1,911g	5,255mm

Figura 11- (a) Eppendorfs com as secções de quitosana, nas três concentrações vedando-o; (b) Depois as amostras indo para a estufa; (c) Temperatura da estufa a 36,5°C.



5.4.8 Ensaios Mecânicos

Os ensaios mecânicos foram realizados em uma máquina universal de ensaios eletromecânicos, Instron, modelo 3366, com uma célula de carga de 500N. O teste foi realizado em cinco amostras retangulares com dimensões de 50 mm x 10 mm para cada concentração, a uma velocidade de 5 mm/min. A partir de seus resultados têm-se respostas quanto à tensão e alongamento máximo e o módulo de elasticidade das amostras.

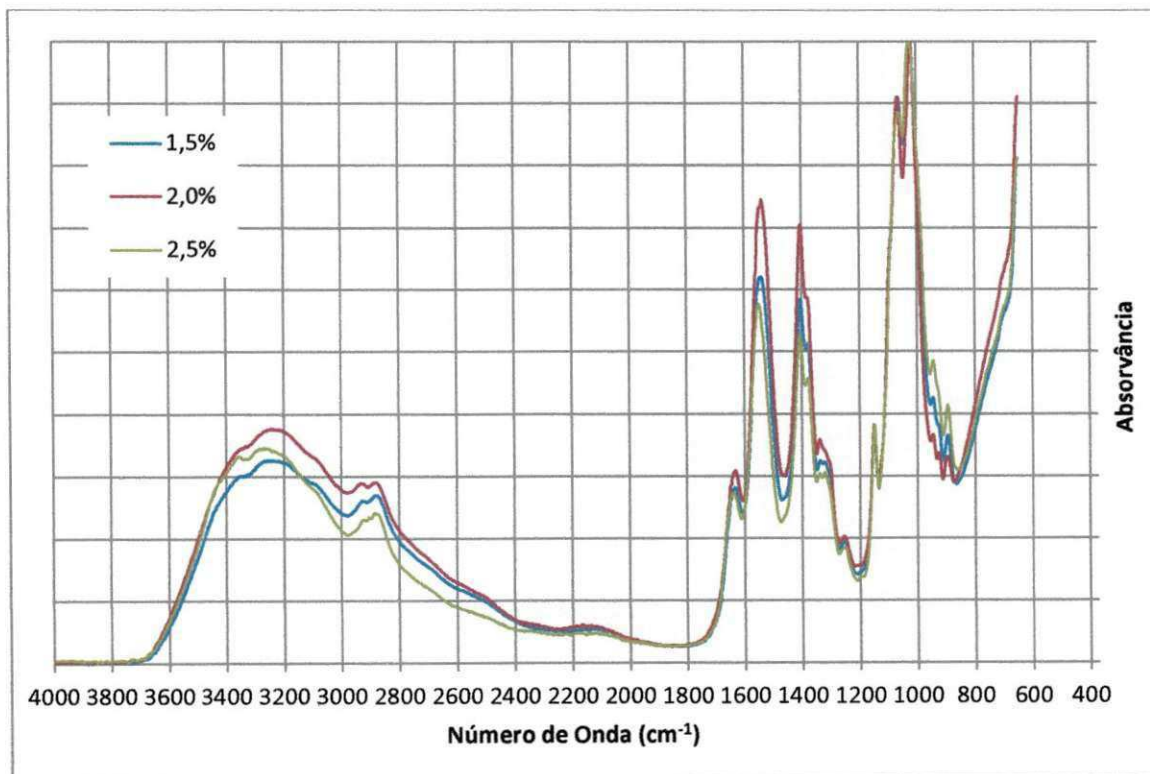
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A análise de FTIR permite a análise vibracional de polímeros, que fornece informações sobre três importantes características estruturais: a composição química, a estrutura configuracional e conformacional e as forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações intermoleculares (AIMOLI, 2007).

Essa técnica é proposta para identificar a presença de grupos funcionais dos materiais, revelando-se útil na identificação da quitosana e comparando através das bandas e dos picos o comportamento das diferentes concentrações utilizadas, como se observa na Figura 12.

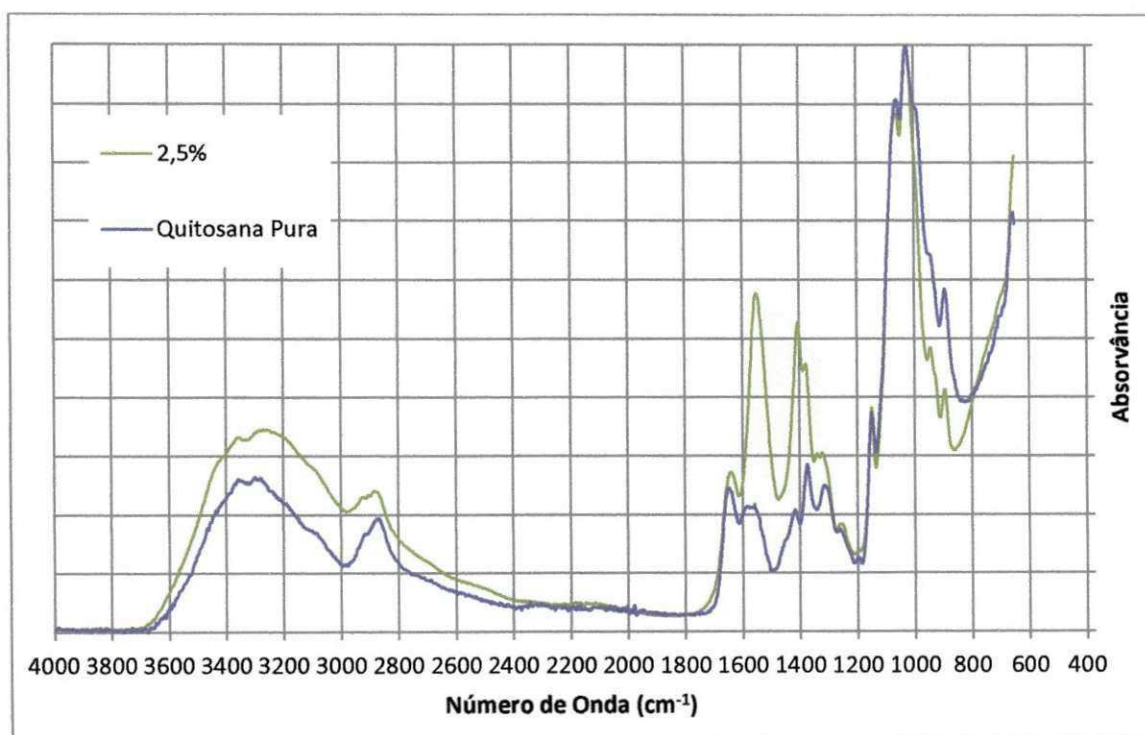
Figura 12 - FTIR das três concentrações de quitosana – 1,5%, 2,0% e 2,5%.



Como se verifica nos espectrogramas com as três diferentes concentrações de quitosana, apresentados no gráfico da Figura 13, não se observam alterações significativas em relação ao aumento da concentração, o que significa que o empacotamento das macromoléculas de quitosana no arcabouço não tem influência significativa, na interação das ligações intermoleculares.

Por outro lado, quando comparado com a matéria prima original, a quitosana pura, verificam-se algumas diferenças, como pode ser observado no gráfico da Figura 13.

Figura 13 - FTIR comparativo da concentração de quitosana 2,5% e da quitosana pura em pó.



Primeiramente, as bandas de absorção correspondentes aos grupos hidroxílicos (OH), na gama dos 3450 cm^{-1} , ficam menos definidos, ou seja, mais amplos, possivelmente devido à confinamento que as macromoléculas de quitosana sofrem quando dissolvidas, o que obriga a interações entre os grupos referidos. Em relação à quitosana pura, o alongamento da ligação C=O (amida I) apresenta um pico próximo a 1655 cm^{-1} , representando a estrutura de

N-acetilglucosamina, bem como o pico para o alongamento de NH_2 (amida II) a 1600 cm^{-1} representando o grupo funcional glucosamina.

No espectro dos arcabouços a 2,5%, como se pode observar na Figura 13, o alongamento do grupo $\text{C}=\text{O}$ (amida I), a 1655 cm^{-1} quase não foi observado. Além disso, o pico forte em $1550\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, correspondente ao alongamento assimétrico de um íon carboxilado, que neste caso trata-se do sal de acetato que se encontra presente, podendo afirmar, portanto, que ocorreu uma alteração química resultando na interação do íon carboxilado na estrutura do arcabouço.

Este resultado é ainda corroborado pela literatura, onde no trabalho realizado por Nunthanid e colaboradores, em 2004, mostra o processo de secagem da quitosana dissolvida em ácido acético, o *spray drying*, que se assemelha à liofilização, uma vez que ocorre secagem direta de uma solução de quitosana (NUNTHANID et al., 2004).

6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é um instrumento utilizado para a análise microestrutural de materiais sólidos, devido a sua alta resolução e à grande profundidade de foco, resultando em imagens com aparência tridimensional (PADILHA & AMBROZIO FILHO, 2004; AIMOLI, 2007).

Para essa pesquisa, foi realizado tal ensaio para verificar a estrutura morfológica da quitosana em suas três concentrações e depois compará-las com as amostras de quitosana com recobrimento de gelatina. As Figuras 14, 15 e 16, respectivamente ilustram as micrografias obtidas para os arcabouços nas três concentrações, submetidos à taxa de congelamento lento, de -20°C .

Figura 14 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 1,5 %, submetidos à taxa de congelamento de -20°C.

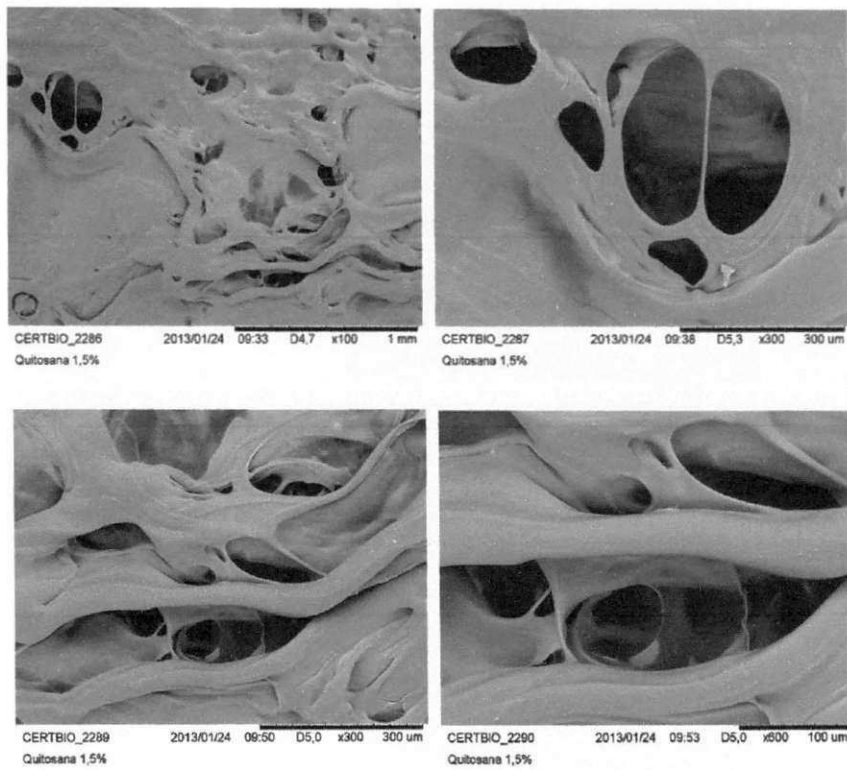


Figura 15 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 2,0 %, submetidos à taxa de congelamento de -20°C.

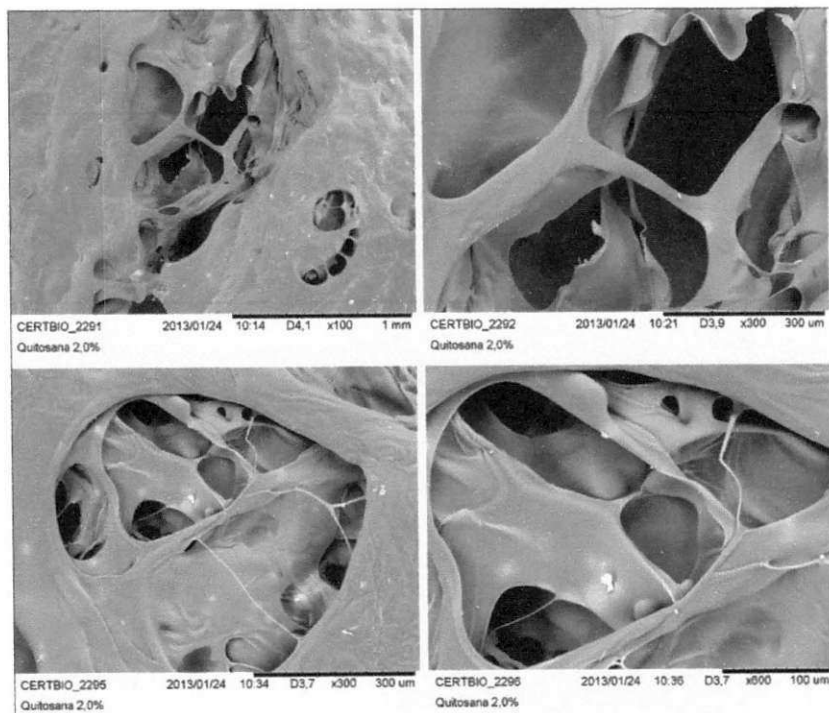
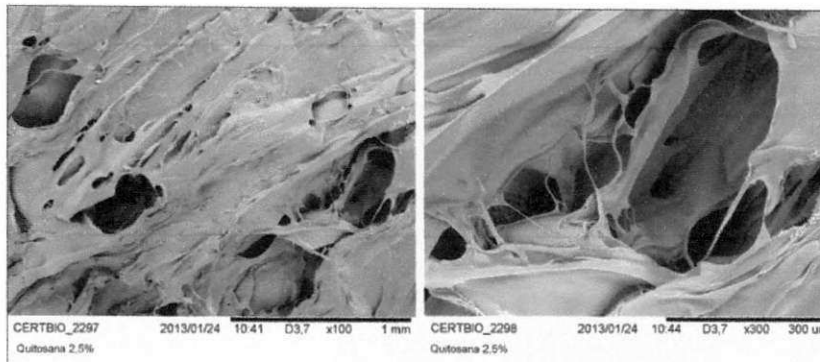


Figura 16 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana liofilizados com concentração de 2,5 %, submetidos à taxa de congelamento de -20°C .



A arquitetura de um arcabouço para engenharia de tecidos é tão importante quanto à composição química do material do qual é fabricado. A presença de poros no arcabouço com dimensões apropriadas para o crescimento tecidual não é suficiente, os poros também necessitam ser abertos e interconectados (KIDOAKI et al., 2005).

A interconectividade entre os poros é a característica principal da porosidade, que tem se confirmado ao longo de vários estudos, como sendo responsável pela manutenção e crescimento do tecido, pelo transporte de nutrientes e drenagem de líquidos intersticiais (RATNER et al., 1996; LIEBSCHNER et al., 2003).

De acordo com as micrografias ilustradas na Figura 14, 15 e 16, pode-se perceber a presença de poros isolados e interconectados, bem como, algumas áreas mais densas. Comparando as micrografias com as obtidas através da literatura de Sampaio e Fook (2012), constatou-se que os arcabouços tem uma porosidade baixa, o que está diretamente relacionada à taxa de congelamento.

Segundo Sampaio (2012), que variou a taxa de congelamento na produção de arcabouços, foi verificado que o número e tamanho de poros variavam. Assim, quanto mais rápido o congelamento, maior o número de poros, e menor o tamanho dos mesmos. Uma vez que os poros são formados pela sublimação dos cristais de água, pode-se interpretar tal resultado pelo mecanismo de nucleação e crescimento dos cristais. Quanto mais lento o congelamento for, mais tempo terão para se concentrarem, ficando menos dispersos pela estrutura tridimensional, mas com tamanhos superiores.

Observa-se também na superfície dos arca-bouços variados tamanhos de poros que permitem a interconexão da estrutura. O tamanho de poros pode ser medido a partir da análise das imagens com escala e utilizando-se um software apropriado. No gráfico das figuras 17, 18 e 19, encontram-se os três histogramas obtidos para a dispersão do tamanho de poros em cada uma das concentrações.

Figura 17 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 1,5%.

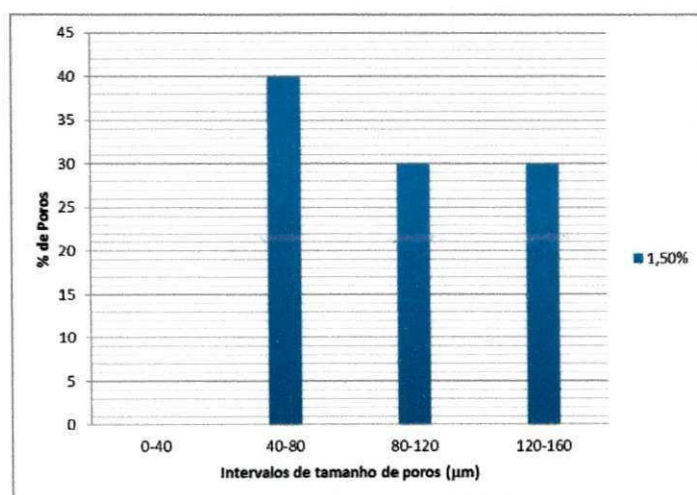


Figura 18 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2,0%.

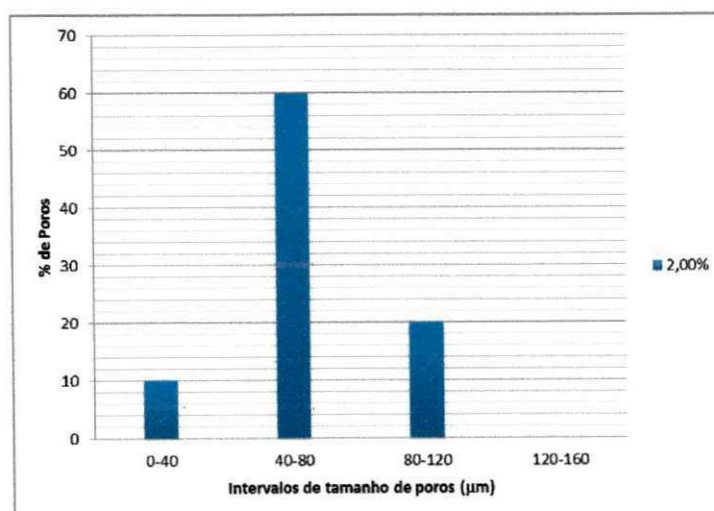
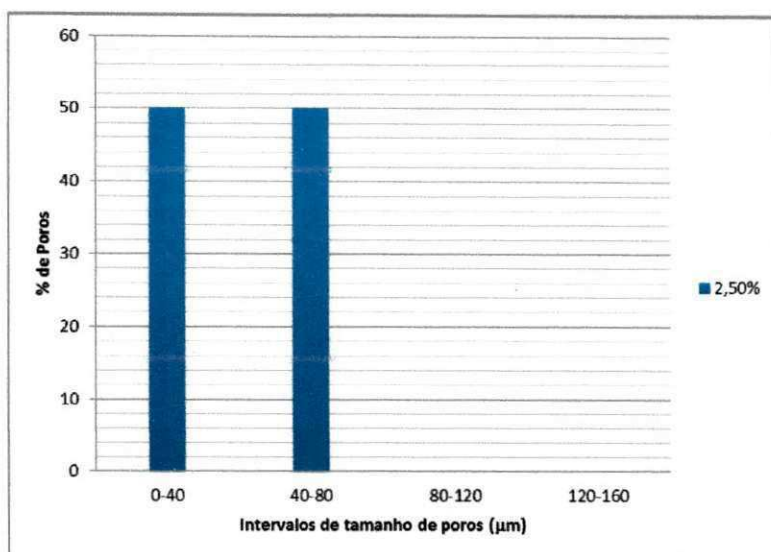
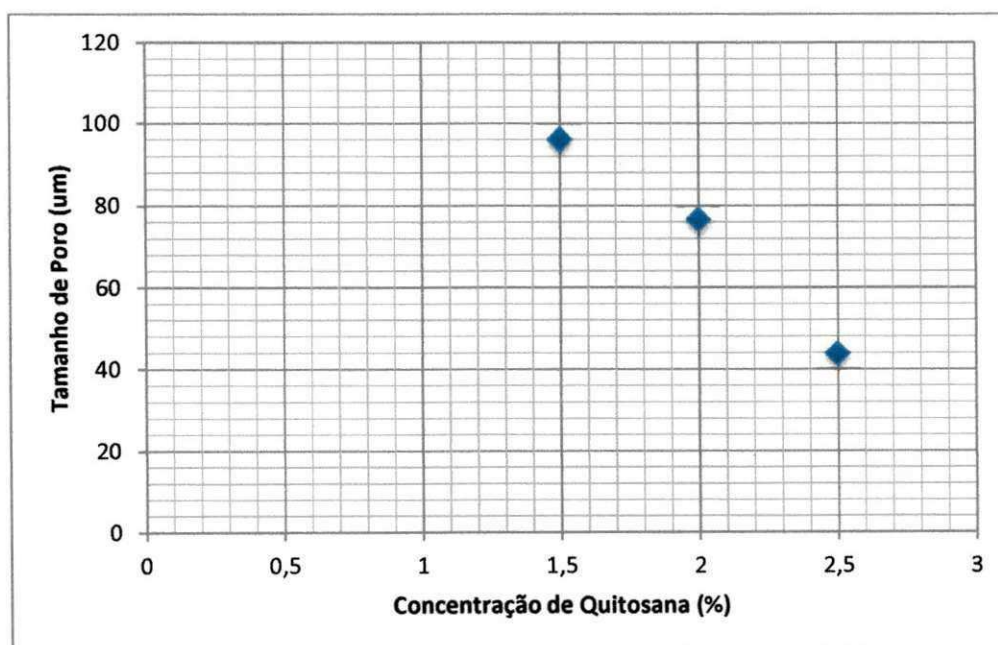


Figura 19 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2, 5%.



A variação nos tamanhos de poros, com a concentração de quitosana, pode ser verificada a partir da análise do gráfico da Figura 20, onde se tem uma média dos tamanhos de poros para as três concentrações, sendo 96,00μm para 1,5%, 75,22μm para 2,0% e 43,80μm para 2,5%.

Figura 20 - Média de concentração de quitosana (%) versus tamanho de poros (μm).



As taxas de congelamento utilizadas foram às mesmas para todas as concentrações, e pelo que se constata, o aumento da concentração dificulta a nucleação e a migração dos cristais de água, originando conseqüentemente, poros menores. Apesar da estrutura porosa não ser teoricamente a ideal, esta será passível de aplicação para os testes requeridos.

6.3 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS)

É uma técnica analítica utilizada para a análise elementar ou a caracterização química de uma amostra. É um acessório essencial no estudo de caracterização microscópica, no qual os elementos químicos presentes numa amostra podem ser identificados através do espectro de raios X emitido pela amostra. O diâmetro reduzido do feixe permite a determinação da composição mineral em amostras de tamanhos muito reduzidos (< 5 µm), permitindo uma análise quase que pontual (FIDÉLES, 2010).

Essa técnica foi utilizada nesta pesquisa com o intuito de detectar se existia algum elemento químico diferente daqueles obtidos em amostras de quitosana, e constatação de uma possível falha em algum dos procedimentos metodológicos, através do dispositivo de energia dispersiva acoplado ao equipamento MEV, TM-1000, HITACHI.

Os gráficos das Figuras 21, 22 e 23, respectivamente, mostram uma pequena porcentagem de sódio encontrada nos arcabouços de quitosana, o que pode ter ocorrido devido ao tempo empregado no processo de neutralização não ter sido suficiente para total remoção desta substância. Os arcabouços de quitosana ficaram imersos em solução de 20 mL de NaOH (1M) por 1 hora e depois em 60 mL água deionizada por mais 1 hora.

Para esta pesquisa não se torna necessário, porém, aumentar o tempo de neutralização, visto que ele não interferiu negativamente para a viabilidade de aplicação almejada.

Figura 21 - Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 1,5%.

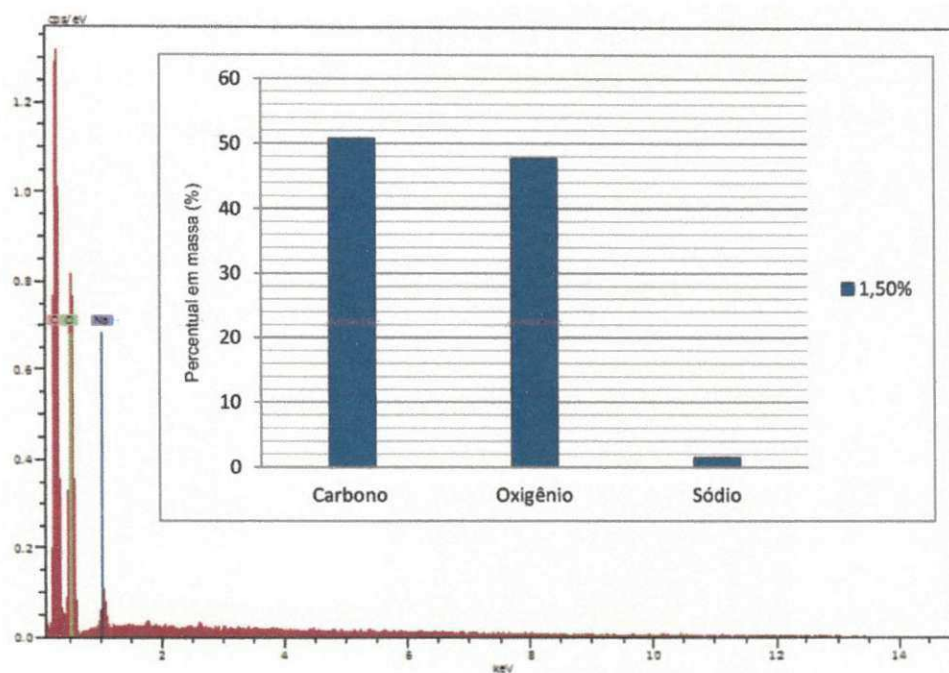


Figura 22 - Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,0%.

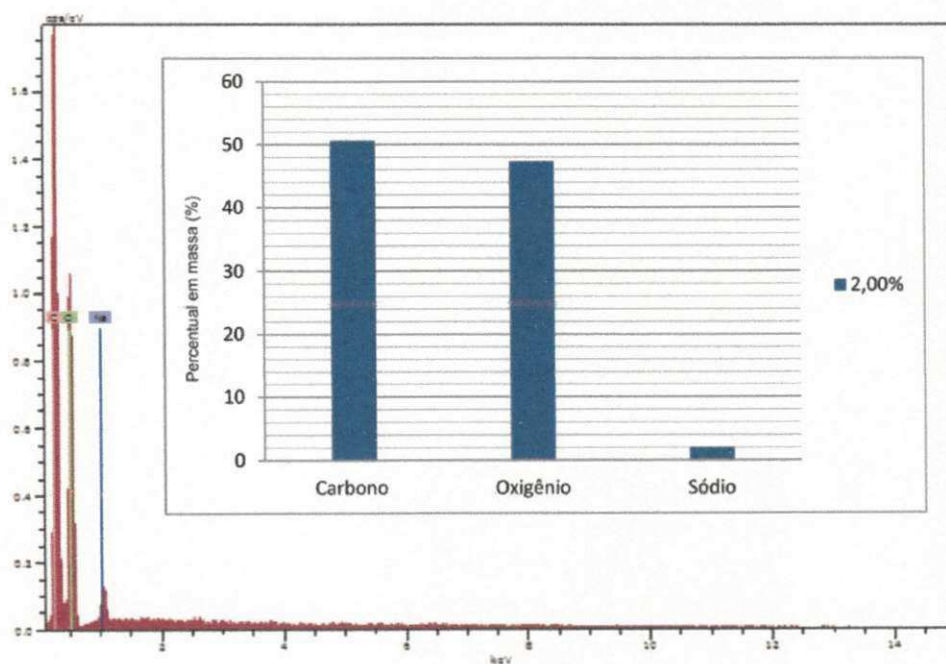
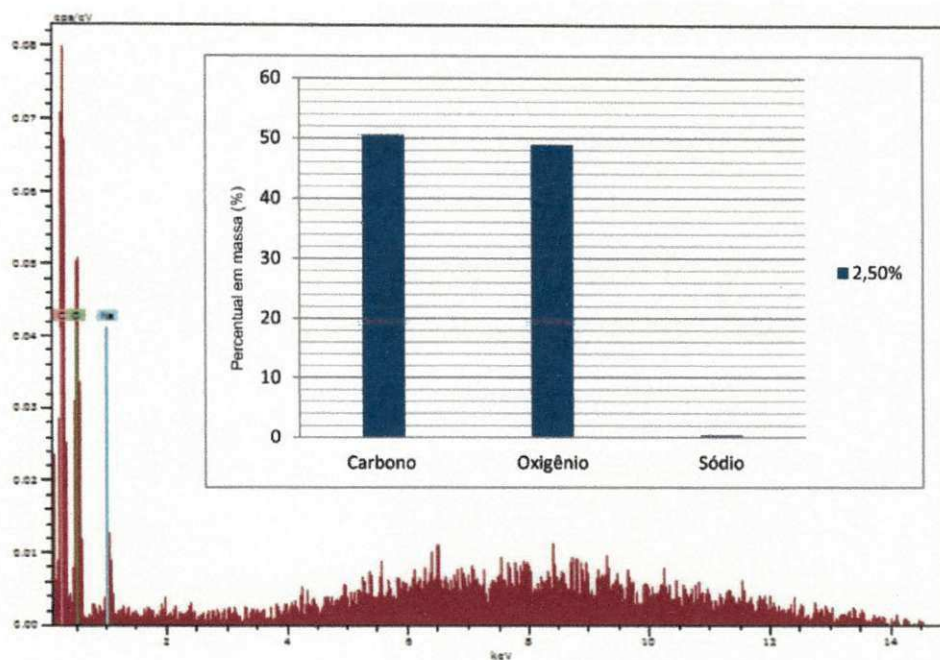


Figura 23 - Espectroscopia de energia Dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,5%.



Nas Tabelas 5 e 6, pode-se observar que o sódio encontrado não interfere de maneira relevante nos arcabouços de quitosana. Podendo ser verificado através das porcentagens médias, um resultado bastante semelhante entre os valores experimentais e teóricos da quitosana. Nos valores experimentais a média do carbono foi de 50,67% e do teórico para quitosana 80% de 53,3%; já para o oxigênio a média experimental aponta 48,00%, enquanto o do teórico de quitosana 80% expressa 46,6%.

Tabela 5 - Quantidade em porcentagem (%) de carbono, oxigênio e do sódio encontrado no experimento, para as três diferentes concentrações de quitotana (1,5%, 2,0% e 2,5%).

Experimental	Quitosana 1,5%	Quitosana 2,0%	Quitosana 2,5%
Carbono	50,78	50,66	50,57
Oxigênio	47,72	47,30	49,00
Sódio	1,5	2,03	0,42

Tabela 6 - Quantidade em porcentagem (%) de carbono, oxigênio e do sódio referente ao teórico para a quitotana 80%.

Quitosana 80%	Número de átomos	(%)
Carbono	6,4	53,3
Oxigênio	4,2	46,7

A variação destes valores confirma a presença de um grupo carboxílico, tal como analisado no ensaio FTIR. Por outro lado, a presença destes grupos iônicos poderia alterar o pH do meio onde estaria inserido, o que não se verificou. Ou seja, quando em contato com água deionizada, os arcabouços não baixaram o pH da solução, possivelmente devido ao aprisionamento do íon acetato no arcabouço.

6.4 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

Para o ensaio de intumescimento, como já foi dito anteriormente, foram utilizadas quatro amostras de cada concentração (1,5%, 2,0% e 2,5%), com tamanhos de 1cm². Essas foram pesadas secas e depois de imersas em água deionizada em uma variação progressiva de tempo de 2 minutos. Além do comprimento e espessura, cada amostra também foi medida em sua espessura, volume e densidade, como se pode ver nas Tabelas 7, 8 e 9, respectivamente.

Tabela 7 - Espessura, volume, densidade e médias das quatro amostras de quitosana 1,5% (A, B, C e D).

	Quitosana A 1,5%	Quitosana B 1,5%	Quitosana C 1,5%	Quitosana D 1,5%	Média
Espessura	1,493mm	1,456mm	1,800mm	1,757mm	1,626mm
Volume	149,3mm ³	145,6mm ³	180,0mm ³	175,7mm ³	162,6mm ³
Densidade	0,1138647 g/cm ³	0,12362637 g/cm ³	0,11666667 g/cm ³	0,10813887 g/cm ³	0,11557415 g/cm ³

Tabela 8 - Espessura, volume, densidade e médias das quatro amostras de quitosana 2,0% (A, B, C e D). *Os valores de A 2,0% foram desconsiderados para a média da densidade.

	Quitosana A 2,0%	Quitosana B 2,0%	Quitosana C 2,0%	Quitosana D 2,0%	Média
Espessura	1,982mm	2,322mm	1,807mm	2,076mm	2,046 mm
Volume	198,2mm ³	232,2mm ³	180,7mm ³	207,6mm ³	204,6mm ³
Densidade	0,484359 g/cm ³	0,111972g/cm ³	0,110681g/cm ³	0,11079g/cm ³	0,11115g/cm ³

Tabela 9 -Espessura, volume, densidade e médias das quatro amostras de quitosana 2,5% (A, B, C e D).

	Quitosana A 2,5%	Quitosana B 2,5%	Quitosana C 2,5%	Quitosana D 2,5%	Média
Espessura	3,608mm	3,855mm	3,085mm	4,424mm	3,743mm
Volume	360,8mm ³	385,5mm ³	308,5mm ³	442,4mm ³	374,3mm ³
Densidade	0,127494 g/cm ³	0,088197 g/cm ³	0,155592 g/cm ³	0,124322 g/cm ³	0,123901 g/cm ³

Para realização dos cálculos para os valores verificados após a imersão em água deionizada em uma variação progressiva de tempo de 2 minutos, resultando no total de 25 minutos para as amostras de 1,5% e de 64 minutos para as amostras de 2,0% e 2,5%, se tem a seguinte equação:

$$\%Intumescimento = \frac{Peso_{total} - Peso_{Seco}}{Peso_{Seco}} \times 100$$

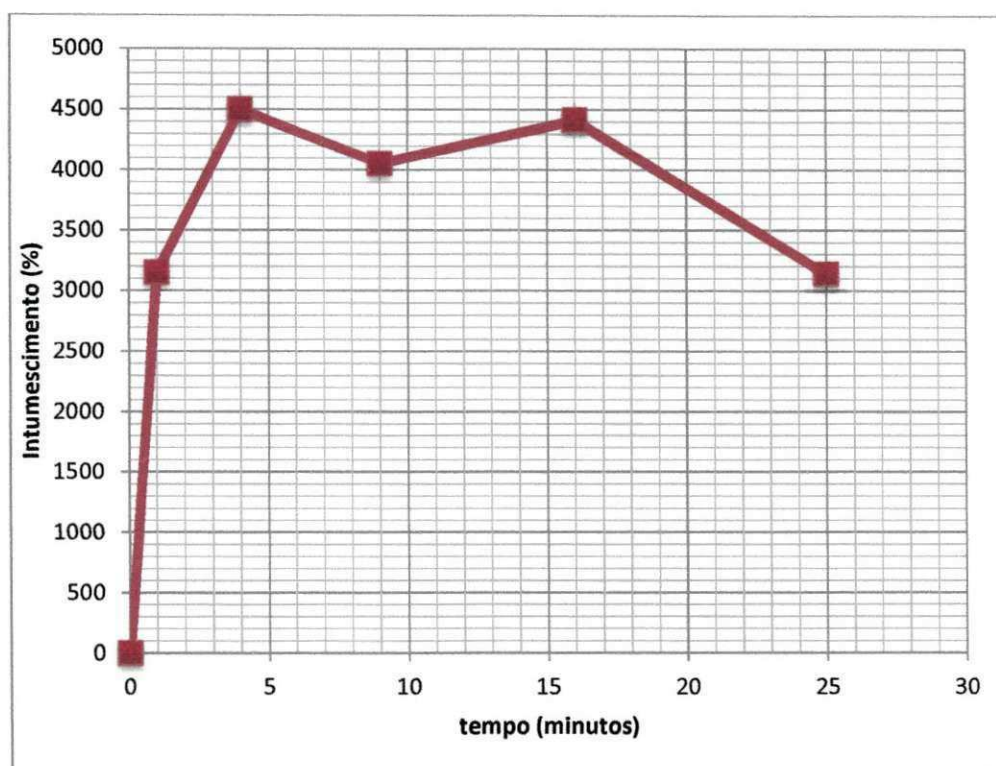
Depois dos valores obtidos, fez-se um gráfico a partir dos dados para verificação da curva que representa o intumescimento em porcentagem (%) versus o tempo em minutos.

Observando o gráfico da Figura 24, pode-se perceber uma mudança bastante elevada do valor do peso inicial para o primeiro minuto de imersão na água deionizada, mostrando que sua capacidade de absorção é elevada, chegando a 3288%. Os tempos seguintes mostram uma oscilação entre aumento e perda na capacidade de absorção, até atingir a estabilidade e,

posterior diminuição. Percebe-se que a oscilação acontece entre o tempo de 4 minutos a 15 minutos, com dois aumentos – 4 minutos e 15 minutos – e uma queda, próximo aos 9 minutos.

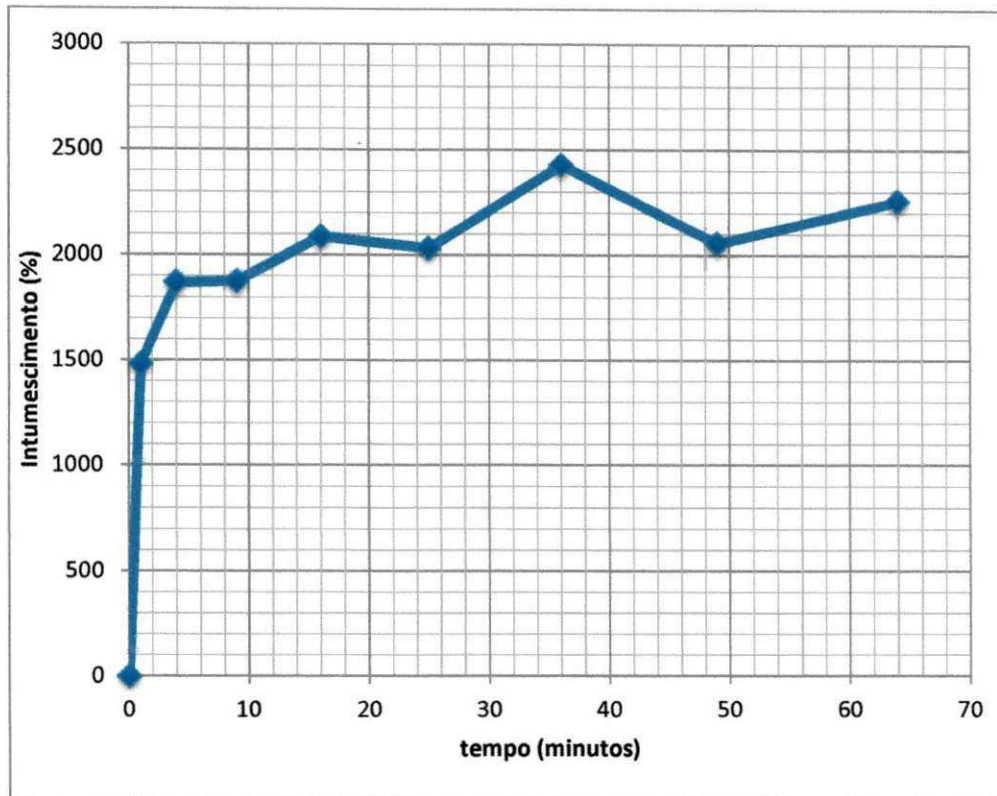
Verifica-se, contudo, que o pico máximo atingido é de 4500% e o mínimo de aproximadamente 3000%.

Figura 24- Ensaio de intumescimento das amostras de 1,5%.



No gráfico da Figura 25, observa-se que após a imersão em água deionizada as amostras de 2,0% apresentaram um aumento em seu peso de 1500%, a metade do crescimento de amostras de 1,5%. Tais amostras, porém demonstraram maior estabilidade, com oscilações de valores menores do que a concentração anterior. Percebe-se que o seu valor máximo é atingido em aproximadamente 35 minutos, apontando aproximadamente 2400%, sendo este número novamente a metade do pico máximo da concentração de 1,5%.

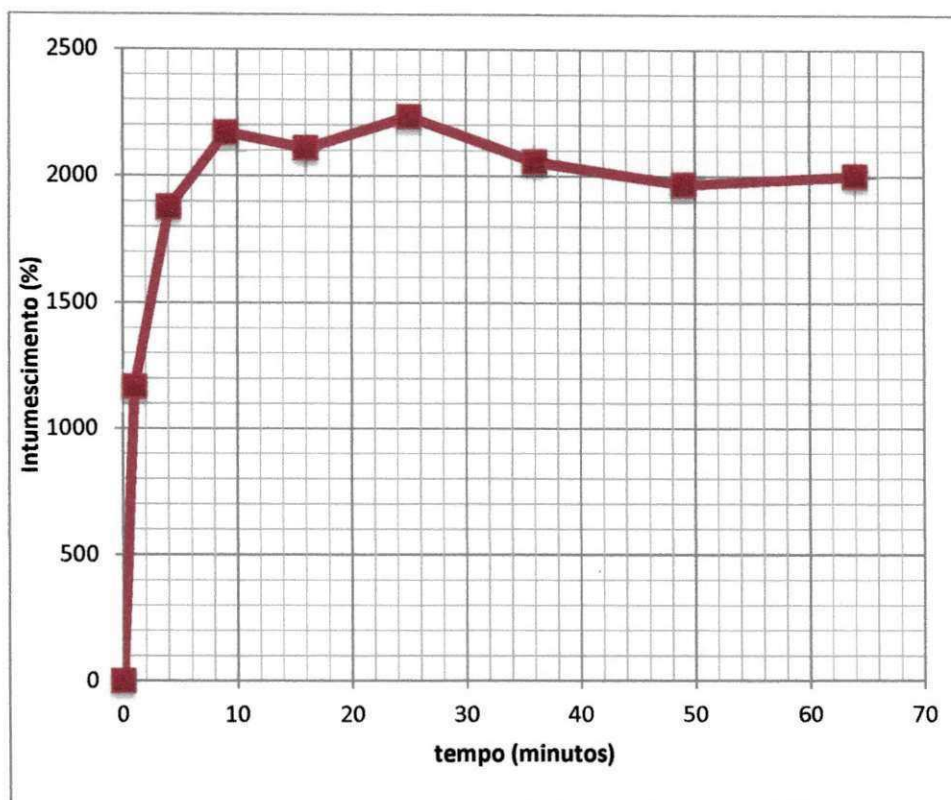
Figura 25 - Ensaio de intumescimento das amostras de 2,0%.



No gráfico da Figura 26, verifica-se, que após a imersão em água deionizada as amostras de 2,5% apresentaram o aumento de 1150% em seu peso, que é um pouco menos do valor encontrado para 2,0% e mais da metade de 1,5%.

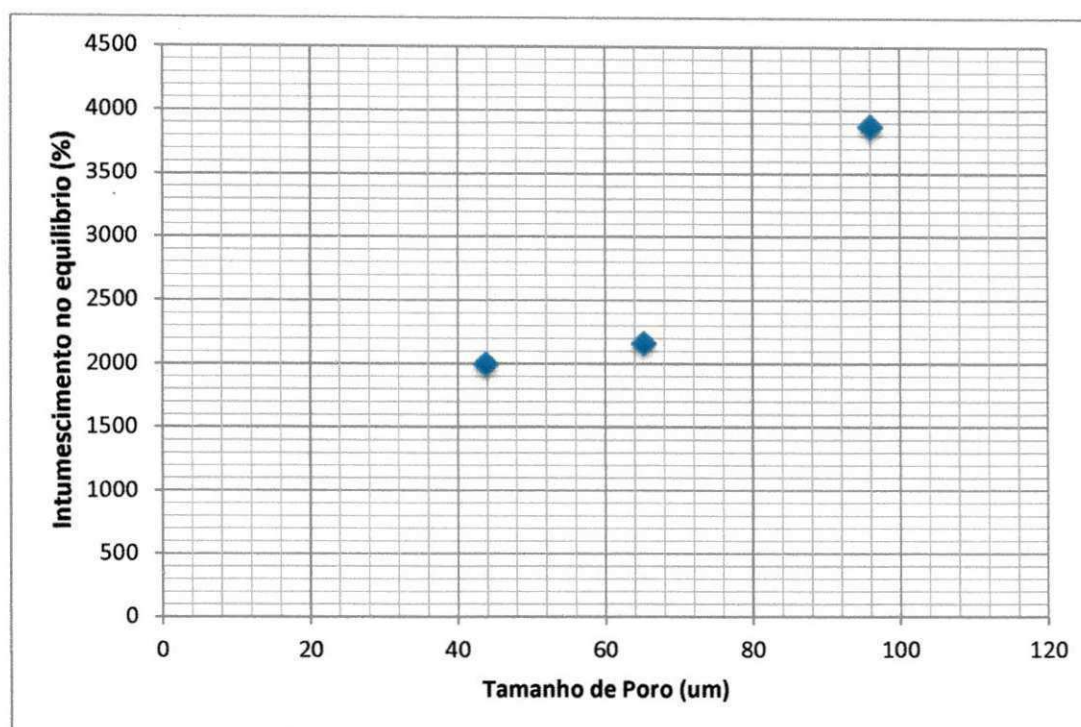
Também é possível observar através do gráfico, que o pico máximo para a concentração de 2,5% foi de aproximadamente 2700% no tempo de aproximadamente 27 minutos. Assim como a concentração de 2,0%, a concentração de 2,5% se apresentou mais estável quanto à variação no intumescimento, e também suportou o tempo de 64 minutos de ensaio, sem se partir.

Figura 26 - Ensaio de intumescimento das amostras de 2,5%.



Ao se considerar o gráfico da Figura 27, verifica-se que o tamanho de poro tem uma influência significativa na capacidade de absorção de água. Tal é fácil de perceber uma vez que ao penetrar nos arcabouços, a água irá preencher esses espaços vazios. Este resultado dá ainda uma indicação de que os poros são efetivamente conectados, senão a porcentagem de intumescimento teria que evoluir de forma mais lenta.

Figura 27 - Relação de tamanho de poros versus intumescimento.



Discutindo os resultados de um ponto de vista operacional, verifica-se que as amostras com maior concentração de quitosana, apresentam maior estabilidade em relação à retenção de água, mesmo que em menor quantidade. Na realidade a quantidade menor continua a ser bastante significativa, o que expressa que estes arcabouços possuem potencial para reter água na superfície da pele e por isso são bons candidatos para a sua regeneração.

O ensaio concebeu respostas importantes quanto à observação das taxas de intumescimento para o posterior recobrimento das amostras de quitosana pela gelatina através do método de imersão. Percebeu-se que não é necessário que essa imersão seja num período de tempo longo, visto que a quitosana absorve uma quantidade considerável de líquido, em um curto espaço de tempo.

6.5 ENSAIO DE PERMEABILIDADE

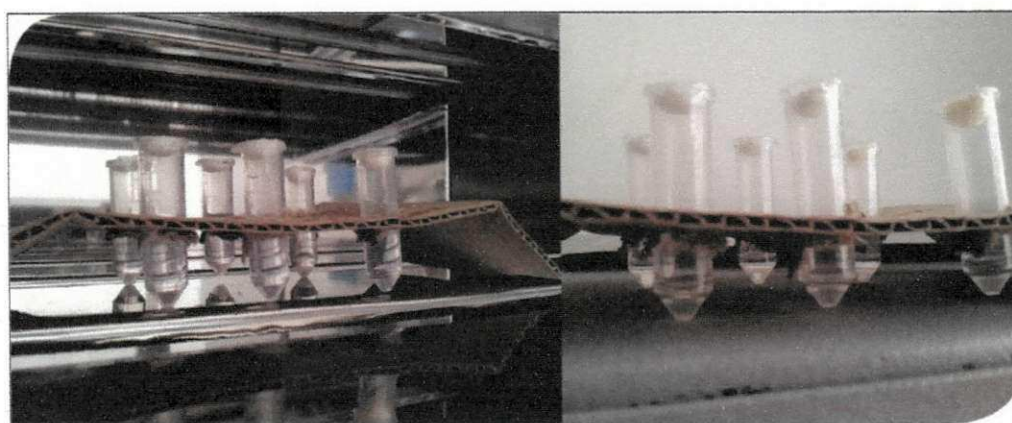
O ensaio de permeabilidade associado ao teste de intumescimento fornece resposta acerca dos presentes arcabouços para regeneração de pele.

As proteínas são fundamentais para todos os aspectos da reparação de tecidos tal qual a síntese de colágeno, a proliferação epidérmica e a neovascularização. Acrescido a este fato, o uso de curativos auxilia na obtenção de um ambiente local úmido adequado para a aceleração do processo de cicatrização e para que isto seja possível, os curativos devem apresentar taxas de transmissão de vapor d'água adequadas. (STARKEY, 2001; DALLAN, 2005).

Neste sentido, a permeação de solução aquosa é bastante importante na aplicação em engenharia de tecido, pois é através dela que se dá a troca de nutrientes e proteínas que são favoráveis à resposta imune, e conseqüente regeneração do tecido e degradação do arcabouço.

O experimento foi realizado em uma estufa a 36,5°C a fim de mimetizar a temperatura do corpo humano e determinar a permeabilidade dos arcabouços como se estivessem à superfície da pele humana. A partir da Tabela 10, verifica-se que ocorre a perda de peso durante os dias de ensaio, ficando nítido, inclusive a olho nu, conforme observado na Figura 28, que o vapor de água deionizada permeou do interior do *ependorf*, atravessou o arcabouço e libertou-se na atmosfera da estufa.

Figura 28 - Permeação do líquido através da observação da diminuição da água deionizada nos *ependorfs*.



Verifica-se através dos valores da Tabela 10, que as amostras de quitosana 2,0% ficaram completamente sem água deionizada em 216 horas de experimento, que representa nove dias, enquanto que as demais concentrações completaram os 10 dias de experimento.

As médias das concentrações de quitosana de 1,5% e 2,0% permearam mais rapidamente durante 240 horas do que o arcabouço de quitosana 2,5%. A concentração mais baixa (1,5%) de quitosana apresentou 0,7% durante 216 horas de experimento, enquanto que a concentração intermediária (2,0%) apresentou 0%. O que nos permite concluir que a concentração que permeou mais rapidamente foi a de 2,0%, seguida da de 1,5% e por fim a de 2,5%. Entretanto, todas apresentaram boa resposta à aplicação proposta, que consiste na permeação de líquido para a troca de nutrientes, e consequente regeneração tecidual de pele.

Tabela 10 - Média em porcentagem (%) das perdas de água durante 240 horas, das diferentes concentrações de quitosana.

	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	168 horas	192 horas	216 horas	240 horas
Quitosana 1,5%	100%	84,6%	71,2%	59,0 %	50,4%	16,8%	6,5%	0,7%	0%
Quitosana 2,0%	100%	84,5%	70,5%	58,1%	50,7%	15,2%	4,5%	0%	0%
Quitosana 2,5%	100%	85,8%	73,0%	61,6%	53,2%	20,1%	10,1%	3,1%	0%

A perda de massa em porcentagem (%), visualizada na Tabela 11, corrobora com os resultados da tabela anterior, onde se observa uma perda média total da massa da concentração de quitosana 2,0% em 216 horas, e nas demais apenas em 240 horas, ao término do experimento. Porém percebe-se uma perda contínua maior na concentração de 1,5%, seguida da de 2,0% e de 2,5%. Isso ocorre devido ao número de poros e aos tamanhos de poros, evidenciados anteriormente pelas microscopias de MEV, serem maiores na concentração mais baixa e intermediária de quitosana, permitindo que haja mais passagem para o líquido permear.

Tabela 11- Média em porcentagem (%) das perdas de massa durante 240 horas, das diferentes concentrações de quitosana.

	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas	96 horas	168 horas	192 horas	216 horas	240 horas
Quitosana 1,5%	1,9%	1,7%	1,6%	1,4%	1,3%	1,0%	0,9%	0,8%	0,8%
Quitosana 2,0%	1,8%	1,7%	1,5%	1,4%	1,3%	1,0%	0,9%	0,8%	0%
Quitosana 2,5%	1,8%	1,7%	1,6%	1,5%	1,4%	1,0%	0,9%	0,9%	0,8%

A velocidade de permeação é determinada a partir da seguinte equação:

$$WVP = \frac{\Delta w}{A \cdot \Delta t}, \text{ em que:}$$

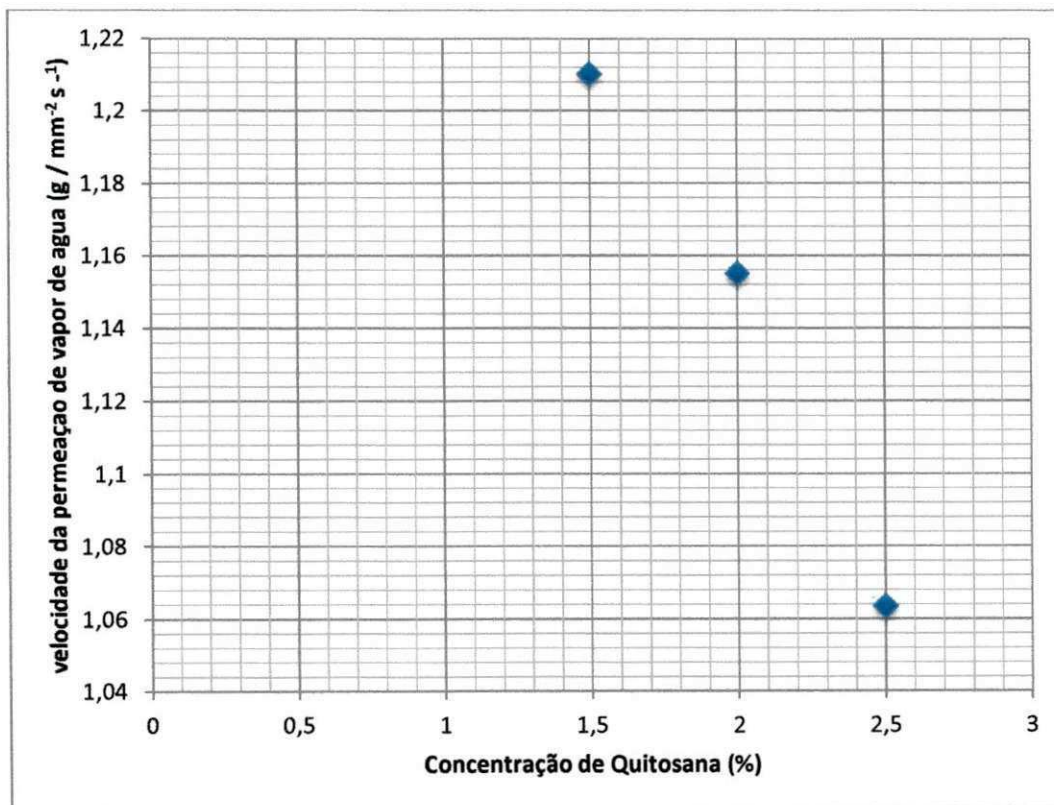
Δw - é a variação da massa de água;

A - é a área de permeação;

Δt - é a variação de tempo.

Na Figura 29 pode-se observar os resultados de velocidade de permeação para as três concentrações de quitosana (1,5%, 2,0% e 2,5).

Figura 29- Velocidade de permeação de vapor de água das três concentrações de quitosana.



Comparando os resultados de velocidade de permeação dos arcabouços de quitosana é possível perceber que as amostras de 2,5% apresentaram velocidade de permeação de vapor de água inferior que as outras duas concentrações, o que fez com que necessitassem de mais tempo para realização da permeação completa. Nota-se também, assim como para a perda de vapor de água e de massa, que a concentração de 1,5% teve maior velocidade de permeação, seguida da de 2,0%.

Avaliando todos os resultados obtidos para este ensaio, foi constatado que as duas concentrações, a mais baixa e a intermediária, de quitosana não estão muito superiores a de 2,5% no que diz respeito à permeação, onde se percebe que mesmo com menor quantidade e tamanho de poros, esta se apresentou de maneira satisfatória, podendo ser atribuído a tal resultado, a alta interconectividade dos poros desta concentração, também verificada nas microscopias de MEV, que apesar de não terem sido suficientes para permear mais rapidamente que as demais durante o experimento, compensou em partes, a qualidade inferior dos poros.

6.6 ENSAIOS MECÂNICOS

Realizaram-se ensaios mecânicos de tração uniaxial sobre os arcabouços de quitosana nas três concentrações. Corpos de provas em formatos retangulares foram submetidos a um esforço que tende a alongá-los até à ruptura. Os corpos de provas tiveram suas dimensões padronizadas, de modo que os resultados obtidos pudessem ser comparados e, se necessário, reproduzidos. O objetivo do presente ensaio foi comparar as propriedades mecânicas das amostras obtidas com as propriedades mecânicas da pele humana.

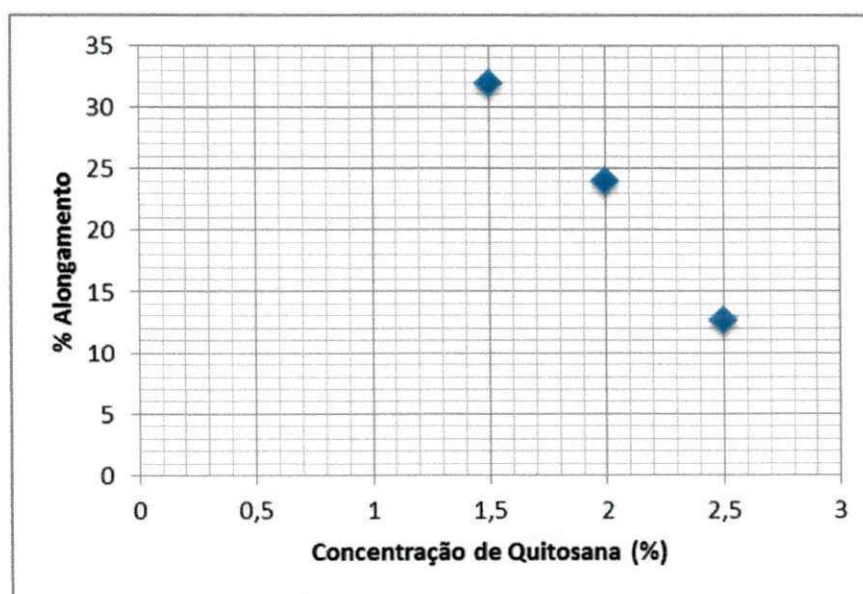
As amostras foram fixadas em uma máquina de ensaios que aplica esforços crescentes na sua direção axial, sendo medidas as deformações correspondentes. Os esforços ou cargas foram mensurados na própria máquina, e observam-se valores médios de tensão máxima, alongamento máximo e módulo de Young (módulo de elasticidade) a partir das Figuras 31, 32 e 33, respectivamente e da Tabela 12.

Tabela 12 - Mostra os valores obtidos nos ensaios de tensão máxima, alongamento máximo e modulo de Young das três concentrações de quitosana.

	Tensão Máxima	Alongamento Máximo	Modulo de Young
Concentração	MPa	%	MPa
1,5%	0,21	31,86	2,95
2,0%	0,24	23,92	5,22
2,5%	0,51	12,61	16,92

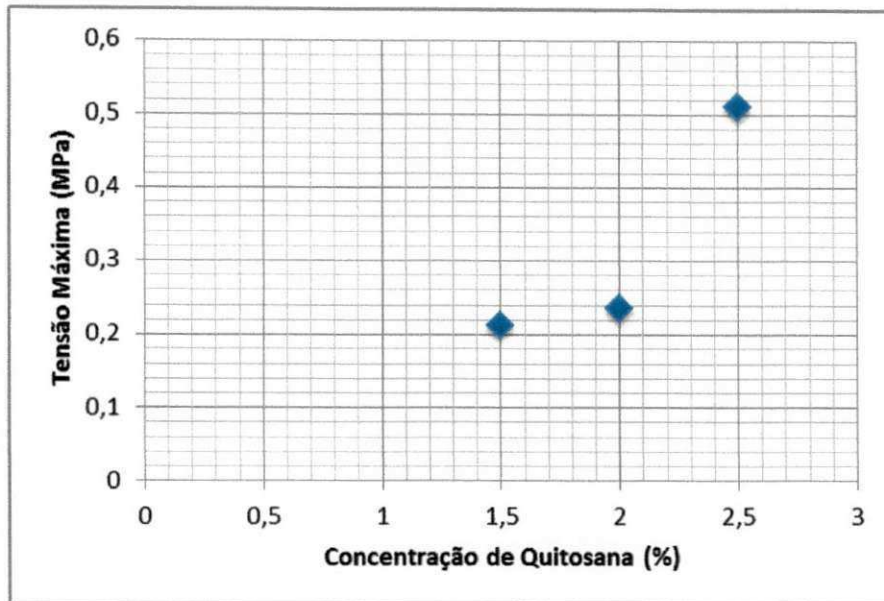
A Tabela 12 e o gráfico da Figura 30 mostram que a concentração de 1,5% possui um alongamento maior no que se diz respeito ao alongamento das concentrações de 2,0% e 2,5%.

Figura 30 - Alongamento máximo das três concentrações de quitosana.



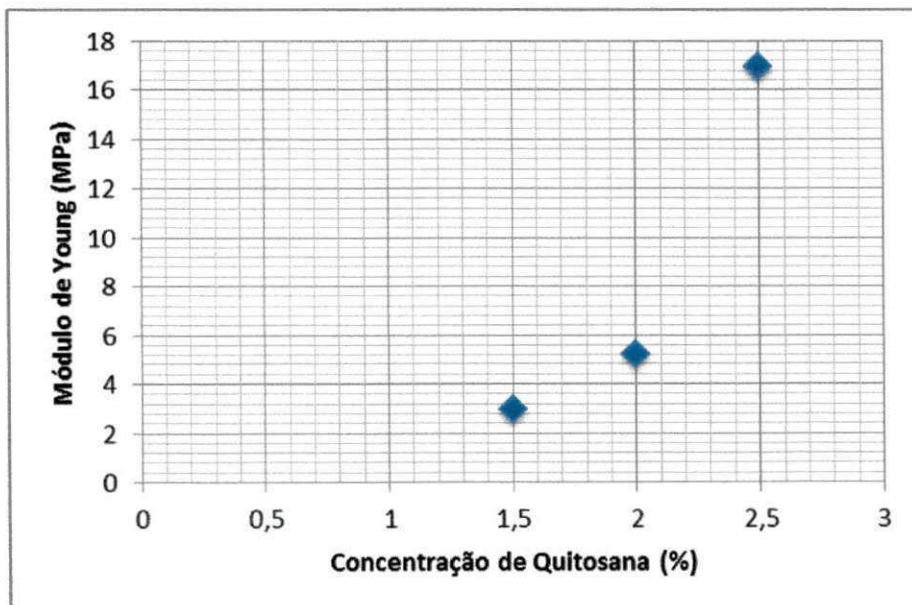
Já para o ensaio de tensão máxima, tem-se a concentração 2,5% com mais resistência do que as concentrações 1,5% e 2,0%. Essas duas últimas, porém, apresentaram um valor médio bem aproximado, como pode-se no gráfico da Figura 31.

Figura 31 - Tensão máxima das três concentrações de quitosana.



O módulo de Young, ou módulo de elasticidade, representado no gráfico da Figura 32, na concentração de 2,5% possui um valor superior às demais concentrações.

Figura 32 - Módulo de Young das três concentrações de quitosana.



Analisando e discutindo os resultados em geral, verifica-se que o alongamento máximo diminui com o aumento da concentração usada. As macromoléculas

de arcabouço quando submetidas a uma força unidirecional tendem a orientar-se nessa direção, e com menores concentrações, as macromoléculas tem mais espaço útil e menores interações entre elas, tornando-se mais livres para a reorientação ocorrer, o que em termos macroscópicos se evidencia por uma capacidade de alongamento superior.

Em relação à tensão máxima, verifica-se uma elevação da mesma com o aumento da concentração. Tal fenômeno é explicado pelo crescimento das interações entre as macromoléculas de quitosana com a ordem da concentração, ou seja, a coesão dos arcabouços é potencializada e por isso necessita de mais força para ocorrer extensão.

Na mesma linha de pensamento, surge o módulo de elasticidade, que indica a tensão necessária para a deformação numa unidade de área. O módulo de Young tem crescimento em relação ao aumento da concentração devido à combinação dos dois efeitos referidos, ou seja, a menor capacidade de orientação numa direção e maior interação macromolecular.

É possível ainda discutir a proximidade dos valores de 1,5% e 2,0% pelo número de poros que os arcabouços possuem, pois estes são traduzidos por pontos de acúmulo de tensão que obrigam ao colapso da estrutura a tensões menores. Por outro lado, a extensão é superior, uma vez que um poro tende a deformar mais facilmente, sendo este um espaço vazio. Desta forma, podem-se realizar gráficos comparativos das propriedades mecânicas com o tamanho de poro, obtendo-se resultados semelhantes aqueles obtidos com o crescimento da concentração de quitosana.

Comparativamente com a pele humana, Gennisson e colaboradores, determinaram em 2004, que esta possuía valores para o módulo de elasticidade entre os 3,6 MPa e 9,3 MPa, que se encontram próximos aos arcabouços com concentrações entre 2,0% e 2,5%, o que revela que este produto é promissor para esta aplicação. Pode-se notar ainda que, a esterilização necessária para este produto irá possivelmente provocar uma redução nas propriedades mecânicas do produto, devido à quebra da massa molar polimérica, podendo cair para valores próximos dos desejados.

7 CONCLUSÕES PARCIAIS

Através da Etapa I, referente à produção e caracterização dos arcabouços de quitosana 1,5%, 2,0% e 2,5%, tornou-se possível investigar e comparar as suas características individuais, e analisar se suas propriedades morfológicas e químico-físicas viabilizariam a continuação da pesquisa a partir da Etapa II, que investiga as variáveis e resultados do recobrimento da gelatina por imersão.

As caracterizações realizadas de maneira comparativa entre as três concentrações mostrou de maneira pontual a importância do cruzamento de informações e resultados para viabilizar o produto de modo eficiente, atendendo aos requisitos necessários para uma aplicação de sucesso.

Diante de resultados de todos os ensaios, pode-se concluir neste capítulo, que os arcabouços de quitosana 1,5% produzidos não possuem os requisitos necessários para a Etapa II, pois se apresentaram mais frágeis que as demais concentrações, principalmente quanto ao teste de intumescimento, tornando-se inviável à aplicação em regeneração tecidual da pele.

As concentrações 2,0% e 2,5% se apresentaram viáveis a Etapa II, sendo a de 2,5% considerada melhor quanto às respostas para alguns ensaios. Porém, decidiu-se por não descartar a concentração de 2,0%, visto que, a metodologia de recobrimento superficial por imersão ainda precisaria de estudo, principalmente quanto às variáveis de mergulho, tempo, concentração de gelatina, dentre outros fatores, e estes arcabouços poderiam ser utilizados para estes testes metodológicos.

Atribui-se a composição química da quitosana algo aproximado ao acetato de quitosana e não à sua composição pura. Entretanto, isto se torna uma característica positiva para a aplicação almejada, visto que, deste modo é possível obter uma estrutura mais solúvel e de degradação mais rápida, conveniente a curativos não permanentes, ou seja, biodegradáveis, requisito proposto.

Conclui-se por fim, que o aumento da concentração é inversamente proporcional ao número e tamanho de poros, que por sua vez tem influência nas propriedades de intumescimento, modulo de elasticidade e permeação ao vapor.

REFERÊNCIAS

- AIMOLI, C. G. **Investigação da adequação de membranas de quitosana quimicamente modificadas para uso como biomaterial: estudo da calcificação in vitro**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Campinas, 2007.
- ASSIS, O.B.G.; SILVA, V.L. **Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, n. 4, p. 223-228, 2003.
- AUSTIN, K. **Scaffold design: use of chitosan in cartilage tissue engineering**. *MMG 445 Basic biotechnology e-journal*, v.3, 62-66, 2007.
- BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. **Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos**. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 15, n.1, p. 13-21, 2005.
- BENYUS, Janine M. **Biomimicry: Innovation Inspired by Nature**. New York: Perennial, 2002.
- CANDIDO, L.C. **Nova abordagem no tratamento de feridas**. Editora Senac, São Paulo, SP, 2001. 282p.
- CHAVES, K. C. B.; MARQUES, L.G.; FREIRE, J.T. **Determinação das curvas de congelamento em freezer convêncional e nitrogênio líquido da pimenta “dedo-demoça”**. In: VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica, 2009.
- CHENITE, A., CHAPUT, C., WANG, D., COMBES, C., BUSCHMANN, M.D., HOEMANN, C.D., LEROUX, J.C., ATKINSON, B.L., BINETTE, F., SELMANI, A. **Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ**. *Biomaterials*, v.21, p. 2155–2161, 2000.
- COHEN, JS. **Erythromelalgia: new theories and new therapies**. *J Am Acad Dermatol*, 2000.
- CORRELO, V. M.; GOMES, M.E.; TUZLAKOGLU, K.; OLIVEIRA, J.M.; MALAFAYA, P.B.; MANO, J.F.; NEVES, N.M.; REIS, L.R. **Tissue engineering using natural polymers**. In: *Byomedical polymers*. Ed. Jenkins, M. Woodhead Publishing Ltda.: Cambridge, 2007.
- CRAVEIRO, A.A. e CRAVEIRO, A.C. **Membrana de quitina e quitosana para utilização em regeneração de tecidos e cicatrizações**. Patente brasileira, PI 9805480-5A. 12/09/2000.
- DALLAN, P. R. M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação em regeneração de pele**. 2005. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Universidade Estadual de Campinas.

DEVILLE, S., SAIZ, E., TOMSIA, A.P. **Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering.** *Biomaterials*, v.27 p.5480–5489, 2006.

FIDÉLES, T. B. **Filmes reticulados de quitosana para aplicação como biomaterial.** 2010. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciência e Tecnologia. Campina Grande, 2010.

FIOROTTI, J. L. **Obtenção De Quitosana A Partir De Resíduos Na Indústria Pesqueira Aracruz.** Dissertação (Mestrado) Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, Faculdade de Aracruz. Espírito Santo, 2009.

FOOK, A.C.B.M. **Desenvolvimento de arcabouços compósitos hidroxiapatita-biopolímero para engenharia de tecidos.** 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2012.

FRANKS, F. **Freeze-drying of pharmaceutical and biopharmaceuticals: principles and practice.** RSC Publishing: Cambridge, 2007.

GENNISSON, L., BALDEWECK, T., TANTER, M., CATHELIN, S., FINK, M., L., S., CORNILLON, C., QUERLEUX, B. **Assessment of elastic parameters of human skin using dynamics elastography.** *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. p. 980–989, 2004.

GRAY H. **The Common Integument.** In Gray H. **Anatomy of the human body.** Philadelphia: Lea & Febiger, 1918; Bartleby.com, 2000. www.bartleby.com/107/.

GRIFFITH, C.K., MILLER, C., SAINSON, R.C., CALVERT, J.W., JEON, N.L., HUGHES, C.C., *et al.* **Diffusion limits of an *in vitro* thick prevascularized scaffold.** *Tissue Eng.* v.11, p.257–66, 2005.

HENCH, L.L. **Bioceramics: From Concept to Clinic.** *J. Am. Ceram. Soc.*, v. 74, p.1487-1510, 1991.

HOLLISTER, S. J., TABOAS, J.M., SCHEK, R.M., LIN, C., CHU, T.M. **Bone tissue engineering: Design and Fabrication of Bone Tissue Engineering Scaffolds.** ISBN 0-8493-1621-9, 2005.

HSHIEH, C.-Y.; TSAI, S.-P.; HO, M.-H.; WANG, D.-M.; LIU, C.-E.; HSIEH, C.-H.; TSENG, H.-C.; HSHIEH, H.-J. **Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds.** *Carbohydrate polymers*, v.67, p. 124-132, 2007a.

HU, Q., LI, B., WANG, M., SHEN, J. **Preparation and characterization of biodegradable chitosan/ hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture.** *Biomaterials*, v.25, p. 779-785, 2004.

JIANKANG, H., DICHEN, L., YAXIONG, L., BO, Y., HANXIANG, Z., QIN, L., BINGHENG, L., YI, L. **Preparation of chitosan–gelatin hybrid scaffolds with well-organized microstructures for hepatic tissue engineering.** *Acta Biomaterialia*, v. 5, p. 453–461, 2009.

JONES, J.R., POOLOGASUNDARAMPILLAI, G., ATWOOD, R.C., BERNARD, D., LEE, P.D. **Nondestructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds.** *Biomaterials*, v.28, n.7, p.1404–1413, 2007.

JUNQUEIRA, L.C. e CARNEIRO, J. **Pepe e Anexos.** In: *Histologia Básica*. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, p.303-314, 1999.

KALGAARD, OM; SEEM, E; KVERNEBO, K; **Erythromelalgia: a clinical study of 87 cases.** *J Int Med*, 1997.

KIDOAKI, S., KWON, I.K., MATSUDA, T. **Mesoscopic spatial designs of nano- and microfiber meshes for tissue-engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques.** *Biomaterials*, v.26, p.37–46, 2005.

KIM, S.H., LIM, B.K., SUN, F., KOH, K., RYU, S.C., KIM, H.S., *et al.* **Preparation of high flexible composite film of hydroxyapatite and chitosan.** *Polym Bull*, v. 62, p.111–8, 2009.

KORIA P, ANDREADIS ST. **Epidermal Morphogenesis: the transcriptional program of human keratinocytes during stratification.** *J Invest Dermatol*, 2006.

KRÖNCKE, K.D.; FEHSEL, K.; KOLB-BACHOFEN, V. **Nitric oxide: citotoxily versus cytoprotection – how, why, when, and where?** *No Biol Chem*, v. 1, p. 107-120, 1997.

LANGEMO DK, BROWN G. **Skin fails too: acute, chronic and end-stage skin failure.** *Adv Skin Wound Care*, 2005.

LARANJEIRA, M.C.M.; FÁVERE, V.T. **Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico.** *Química Nova*, v. 32, n. 3, p. 672-678, 2009.

LEE SH, JEONG K, AHN K. **An update of the defensive barrier function of skin.** *Yonsei Med J*, 2006.

LEE, E-J., KOH, Y-H., YOON, B-H. KIM, H-E., KIM, H-W. **Highly porous hydroxyapatite bioceramics with interconnected pore channels using camphene-based freeze casting.** *Materials Letters*, v. 61, p. 2270–2273, 2007.

LEE, S.B., KIM, Y.H., CHONG, M.S., HONG, S.H., LEE, Y.M.. **Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method.** *Biomaterials*, v.26 p.1961–8, 2005.

LEE, T.W.Y; ROBINSON, J.R. **Sistema de Liberação Controlada de Drogas.** In: GENNARO, A.R.(Ed.) Remington: A Ciência e a Prática da Farmácia, 20.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. cap.47, p.931-960, 2004.

LIEBSCHNER, M.A.K.; WETTERGREEN, M.A. **Topics in tissue Engineering;** Ashammakhi e Ferretti, USA, 2003.

LIMA, R. S. C. **Desenvolvimento de Sistemas de Liberação Controlada de Fármacos: Quitosana/Insulina.** 2010. 112f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos). Curso de Engenharia de Processos da Universidade Federal de Campina Grande. 2010.

LIU, W.B. *et al.* **Influence of pH values on preparation of hydroxyapatite/gelatin composites.** J. Mater. Sci., v.41, p. 1851-1853, 2006.

LUO, Y. *et al.* **Three-Dimensional Scaffolds.** Principles of Tissue Engineering, 3 ed., 2007.

MA, L., GAO, C., MAO, Z., ZHOU, J., SHEN, J., HU, X., HAN, C. **Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering.** Biomaterials, v. 24, p.4833–4841, 2003.

MA, P.X., ZHANG, R.Y. **Microtubular architecture of biodegradable polymer scaffolds.** J Biomed Mater Res, v.56, p.469–77, 2001.

MA, P.X.; ZHANG, R.; XIAO, G.; FRANCESCHI R. **Engineering new bone tissue *in vitro* on highly porous poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds.** Biomed. Mater. Res., v.54, p. 284-293, 2001.

MANO, J.F., NEVES, N.M., REIS, R.L. Mechanical. **Characterization of biomaterials.** Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2005.

MAO, J.S.; ZHAO, L.G.; YIN, Y.J.; YAO, K.D. **Structure and properties of bilayer chitosan–gelatin scaffolds.** Biomaterials, v. 24, p. 1067–1074, 2003.
MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological Methods. v. 65, p. 55-63, 1983.

NUNTHANID,J., LAUNGTANA- ANANA, M., SRIAMORNSAKA P. **Characterization of chitosan acetate as a binder for sustained release tablets.** Journal of Controlled Release 99, p.15–26, 2004.

O'BRIEN, F.J. **Biomaterial and scaffolds for tissue engineering.** Materials Today, v.14, n.3, p. 88-95, 2011.

O'BRIEN, F.J.; HARLEY, B.A.; YANNAS, I.V.; GIBSON, L. **Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen–GAG scaffolds.** Biomaterials, v.25, p.1077–86, 2004.

OLIVERIRA, G.V; SANTOS, S.N.M.B; GUEDES, A.C.M. . **Fundamentos de Dermatologia**. Editora Atheneu, 1, p. 3 – 16, 2009.

OLSSON, D.C. — **Comportamento biológico de matriz *scaffold* acrescida de células progenitoras na reparação óssea**. Ciência Rural, v.38, n.8, 2008.
OTSUKI, B., TAKEMOTO, M., FUJIBAYASHI, S., NEO, M., KOKUBO, T., NAKAMURA, T. **Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants**. Biomaterials, v.27, n.35, p.5892–5900, 2006.

PADILHA, A. F ; AMBROZIO FILHO, F . **Técnicas de análise microestrutural**. São Paulo : Hemus, 2004.

QIAN, L.; ZHANG, H. **Controlled freezing and freeze drying: a versatile route for porous and micro-/nano-structured materials**. J. Chem. Technol. Biotechnol., v.86, p. 172–184, 2011.

RAMOS & SILVA, M.; CASTRO, M.C.R. **Fundamentos de Dermatologia**. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 2009.

RATNER, B. D. *et al.* **An introduction to materials in medicine**. San Diego: Academic Press, 1996.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J. e LEMONS, J.E. **Biomaterials science – An introduction to materials in medicine**. Academic Press, London, 1996. 484p.

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

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

SALGADO, A.J., COUTINHO, O.P., REIS, R.L. **Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends**. Macromol. Biosci. v.4, p.743–765, 2004.

SAMPAIO, G. Y. H. **Desenvolvimento de arcabouços biodegradáveis para regeneração de tecidos cartilagosos**. Dissertação. 136p. Universidade Federal de Campina Grande, Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais. Campina Grande, 2012.

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

SERRA, M.C.V.F; BRAVO, B.S.F; CASTRO, M.C.R . **Fundamentos de Dermatologia**. Editora Atheneu, 43, p. 555 585, 2009.

SHERIDAN, R.L. e TOMPKINS, R.G. **Skin substitutes in burns.** Burns, v.25, p.97-103, 1999.

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

STARKEY, C. **Recursos terapêuticos em fisioterapia.** 2.ed. São Paulo: Manole, p. 404, 2001.

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

THEIN-HAN, W.W.; MISRA, R.D.K. **Biomimetic chitosan – nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering.** Acta Biomaterialia. v.5, p.1182–1197), 2009.

VALLET-REGÍ, M., GONZÁLEZ-CALBET, J.M. — **Calcium phosphates as substitution of bones tissue.** Progress in Solid State Chemistry, v. 32, p. 1-31, 2004.

WEINBERG, J.B.; MISUKONIS, M.A.; SHAMI, P.J.; MASON, D.L.; SAUIS, W.A.; DITTMAN, E.R.; WOOD, G.K.; SMITH, B.; McDONALD, K.E.; BACHUS, A.F.; HANEY, GRANGER, D.L. **Human mononuclear phagocyte inducible nitric oxide synthase (INOS).** Blood, v. 86, n. 3, p. 1184-1195, 1995.

WILLIAMS, D.F. **On the mechanisms of biocompatibility.** Biomaterials, v. 29, p. 2941-2953, 2008.

YANG, B.; LI, X.; SHI, S.; KONG, X.; GUO, G.; HUANG, M.; LUO, F.; WEI, Y.; ZHAO, X.; QIAN, Z. **Preparation and characterization of a novel chitosan scaffold.** Carbohydrate polymers, v. 80, p. 860-865, 2010.

YASZEMSKI, M.J.; PAYNE, R.F.; HAYES, W.C.; LANDER, R.; MIKOS, A.G. **Evolution of bone transplantation: molecular, cellular and tissue strategies to engineer human bone.** Biomaterials v.17, p. 175–85, 1996.

YUNOKI, S., IKOMA, T., MONKAWA, A., OHTA, K., KIKUCHI, M., SOTOME, S., SHINOMIYA, K., TANAKA, J. **Control of pore structure and mechanical property in hydroxyapatite/collagen composite using unidirectional ice growth.** Materials Letters, v. 60, p. 999–1002, 2006.

ZHANG, Z., WANG, S., TIAN, X., ZHAO, Z., ZHANG, J., LV, D. **A new effective scaffold to facilitate peripheral nerve regeneration: Chitosan tube coated with maggot homogenate product.** Medical Hypotheses, v.74, p. 12-14, 2010.

Capítulo II

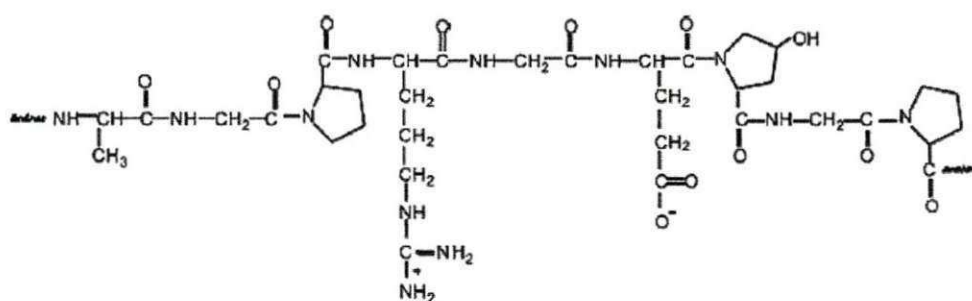
**Recobrimento de Arcabouços de Quitosana com
Gelatina para otimização da regeneração de pele**

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 GELATINA

A gelatina é uma proteína solúvel derivada da desnaturação parcial do colágeno. Assim como o colágeno, a gelatina apresenta um grande atrativo, o fato de ser reabsorvida *in vivo*. É purificada, obtida por hidrólise ácida parcial (Tipo A) ou hidrólise alcalina parcial (Tipo B) do colágeno animal e pode ser constituída por uma mistura dos dois tipos. Sua estrutura química está ilustrada na Figura 33. (LIU et al., 2006; LIEN et al., 2010).

Figura 33 - Forma estrutural da gelatina.



Fonte: PEÑA et al., 2010.

Quando associada à água, a gelatina forma um gel coloidal semissólido. A qualidade dessa gelatina, porém, depende de suas propriedades reológicas, onde o que define a sua qualidade comercial, além das propriedades físico-químicas (composição, solubilidade, transparência, cor, odor e gosto), são a resistência desse gel a estabilidade térmica. (STAINSBY, 1987; WAINWRIGHT, 1997; BIGI et al., 2004).

Os biomateriais constituídos de gelatina têm sido aplicados como pele artificial e arcabouços para engenharia de tecidos. A combinação de gelatina e arcabouços de quitosana pode conduzir a uma absorção do fluido da ferida, e liberar lentamente uma droga para a ferida durante um tratamento. (MÜLLER, 1997).

Alimentos, produtos farmacêuticos e indústrias são os principais usos dados para a gelatina, que tem várias outras aplicações, como por exemplo, na biomédica para curativos de uso cirúrgico, arcabouços tridimensionais e regeneração de tecidos. (BIGI et al., 2004).

1.2 RECOBRIMENTO POR IMERSÃO

O revestimento por imersão é um processo simples de deposição de uma película fina de solução para uma placa, cilindro, forma regular ou irregular de um dado objeto. O processo envolve a imersão de um substrato para um reservatório de solução durante algum tempo, assegurando assim que este seja completamente molhado, e, em seguida, a retirada do substrato do banho de solução. A formação da película de líquido é conseguida através de dois mecanismos principais - drenagem por gravidade de uma solução líquida e evaporação do solvente (LAUDAU, LEVICH; 1942).

Nessa etapa do projeto, Etapa II, pretendeu-se determinar o processo metodológico de imersão da gelatina nos arcabouços de quitosana 2,5%, concentração escolhida na etapa anterior, por sua viabilidade. Além da metodologia, também serão realizados as mesmas caracterizações do Capítulo I, a fim de comparar as amostras de quitosana com amostras de quitosana com gelatina, e avaliar se a gelatina promove alguma melhoria no material para aplicação na engenharia de tecidos.

A metodologia teve seu início baseada nas concentrações utilizadas por FOOK, 2012, sendo estas de 2,0%, 5% e 10%. Como os objetivos, seguimentos e aplicações foram distintos, e conseqüentemente os resultados dos testes piloto de recobrimento se apresentaram experimentalmente diferentes, optou-se por dispensar as concentrações de 5% e 10% e continuar os testes seguintes com as duas demais concentrações com o intuito de atingir um resultado satisfatório à utilização idealizada.

A porcentagem de 2% se apresentou satisfatória em alguns testes de recobrimento realizados, porém considerou-se a possibilidade de aumentar em 0,5% sua concentração por uma questão de padronização da escala.

2 MATERIAIS E MÉTODOS – PARTE II

2.1 LOCAL DA PESQUISA

O desenvolvimento da pesquisa se deu no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais – CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande – Paraíba.

2.2 MATERIAIS

2.2.1 Matéria- prima

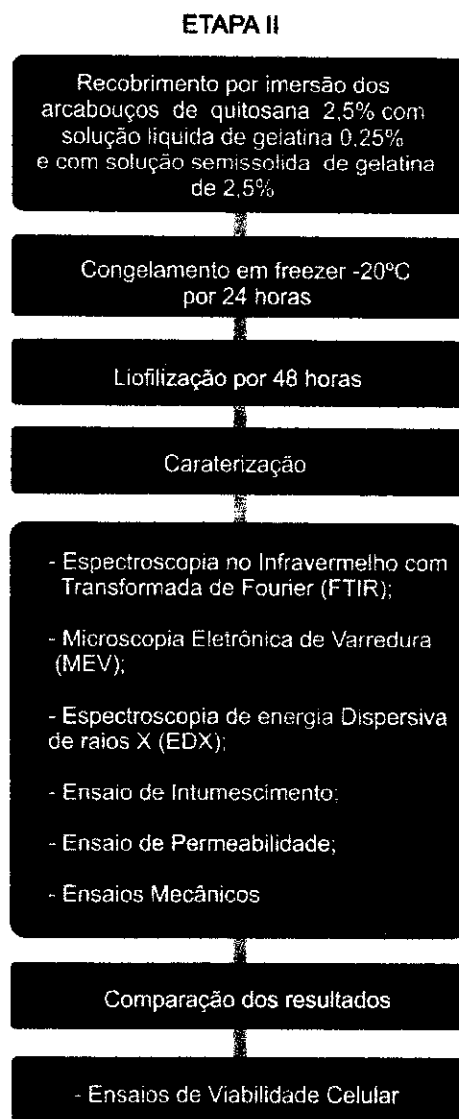
Para a preparação da solução de gelatina foi utilizada a seguinte matéria-prima: Gelatina de pele suína G2500 – tipo A, ~ 300g bloom, adquirida da Sigma Aldrich.

2.3 ETAPAS EXPERIMENTAIS

A Etapa II foi realizada com o objetivo de aperfeiçoar os arcabouços de quitosana de concentração de 2,5% produzidos na Etapa I, com recobrimentos superficiais de gelatina em duas concentrações (0,25% e 2,5%) e metodologias diferentes, de modo a avaliar, de acordo com as características e propriedades destas, qual se adequa e possui maior potencial para aplicação na regeneração tecidual de pele.

Os procedimentos experimentais estão descritos no Fluxograma II da Figura 34.

Figura 34 - Fluxograma II: Detalha Etapa II.



2.4 METODOLOGIA

2.4.1 Preparação da Gelatina

A solução de gelatina foi preparada através da sua dissolução em água deionizada para obtenção de concentrações finais de 0,25% e 2,5% (m/v), em

agitação magnética e aquecimento em temperatura de 40°C até dissolvê-la totalmente, como ilustra a Figura 35.

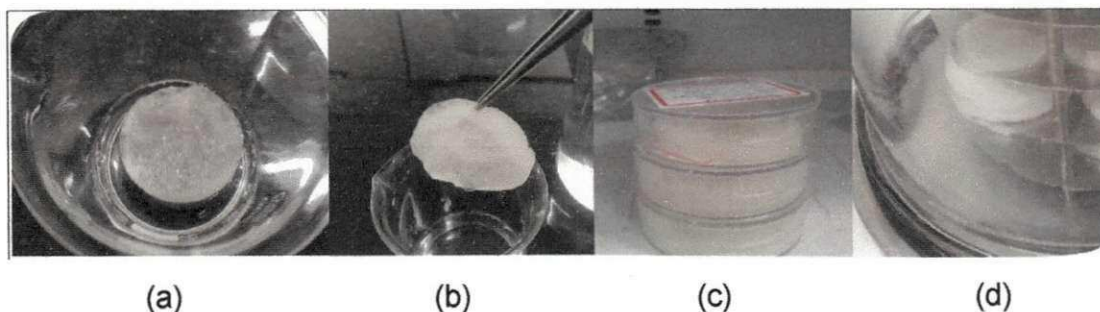
Figura 35- Preparo da solução de gelatina.



2.4.2 Recobrimento com a Solução de Gelatina

O recobrimento da quitosana com a solução de gelatina foi realizada da seguinte maneira: Primeiro colocou-se 100 mL de solução líquida de gelatina de 0,25% em becker, onde foi imerso um arcabouço de quitosana de 2,5%, permanecendo submerso durante um minuto e depois retirado (a). Durante a remoção do arcabouço do becker, este ficou suspenso até o escoamento total do excesso de líquido (b). Subsequentemente, a amostra foi colocada em placa de petri, congelada a - 20°C durante 24 horas (c) e liofilizada por 48 horas (d), como ilustram as imagens da Figura 36.

Figura 36 - Metodologia do mergulho para solução líquida de gelatina.



Outro procedimento realizado foi o recobrimento da quitosana com solução de gelatina semissólida, onde foi utilizada a seguinte metodologia: Colocou-se 100 mL e solução líquida de gelatina de 2,5% em um becker. Aguardou-se o tempo aproximado de 40 minutos, para que a gelatina passasse do estado líquido para o semissólido. O arcabouço de quitosana 2,5% foi imerso na concentração de gelatina, onde permaneceu submerso durante um minuto e depois retirado. Nesse processo, o arcabouço ficou com apenas um dos lados imersos dentro da solução, justamente pelo estado físico da gelatina, e por isso não se fez necessário à suspensão destes para a retirada do excesso de líquido, como no procedimento anterior. O arcabouço foi colocado em uma placa de petri na posição que foi realizado o mergulho, ou seja, com a camada de gelatina voltada para baixo, de modo que a solução não permeasse para o restante do arcabouço, proporcionando uma estrutura com duas superfícies diferenciadas. As amostras foram congeladas à temperatura de -20°C durante 24 horas e liofilizadas por 48 horas, como ilustram as imagens da Figura 37.

Figura 37 - Metodologia do mergulho para solução semissólida de gelatina.



2.4.3 Ensaios de Viabilidade Celular

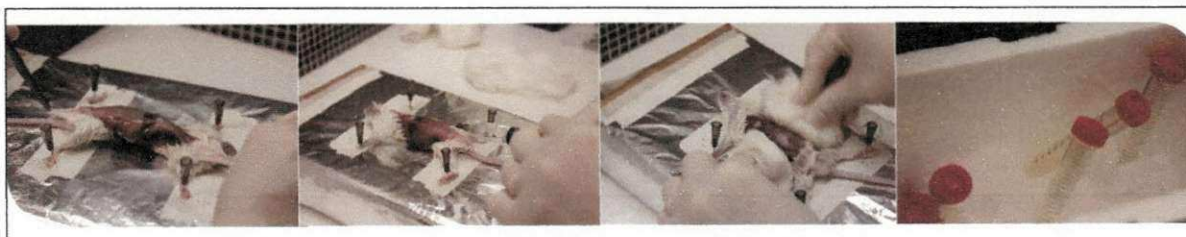
Seguindo a norma ISO 10993-5, foram realizados após as conclusões parciais da Etapa II, a avaliação de viabilidade celular dos macrófagos. Este ensaio permitiu observar de modo comparativo, se houve otimização do arcabouço de quitosana quando associado à gelatina, quanto à viabilidade celular.

2.4.3.1 Ensaio de Avaliação de Viabilidade Celular dos macrófagos

Para realização desse ensaio as amostras foram seccionadas de acordo com o tamanho do poço da placa de cultura ($\approx \varnothing 6,5\text{mm}$) e esterilizadas por exposição aos raios ultravioleta por 40 minutos. Seis camundongos de uma mesma linhagem foram inoculados, três dias antes do experimento, com uma solução aquosa de Tioglicolato de Sódio a 3,0%. Após o aguardo de três dias, os animais foram sacrificados em uma câmara de dióxido de carbono (CO_2), para então, ocorrer o processo de remoção dos macrófagos.

Essa remoção se inicia através de uma exposição da cavidade peritoneal do animal, e subsequente injeção de 5 mL de PBS (pH 7,4) gelado e estéril, massagem vigorosa nessa cavidade e a retirada das células abdominais através de uma seringa. Após tal procedimento, as células obtidas foram imediatamente transferidas para tubo estéril, como ilustradas na Figura 38, e centrifugadas a 2000 rpm durante 5 minutos à temperatura de 4°C em um equipamento intitulado Centrifuge Eppendorf 5810R. O sobrenadante foi desprezado e as células foram colocadas em 1 mL de fosfato pH 7,0, (SAMPAIO, 2012; FOOK, 2012).

Figura 38 - Ilustração de algumas partes do procedimento de avaliação da viabilidade celular dos macrófagos.



Fonte: Arquivo próprio.

A contagem de macrófagos é realizada logo em seguida com o auxílio de uma câmara hemocitométrica de Neubauer em uma diluição 1:100 do Líquido de Lázarus e visualizada no microscópio óptico Diastar, Reichert, Buffalo, NY, utilizando-se o aumento de 200x. Subsequente a esse

procedimento, as células foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células em meio RPMI-1640-C, e em uma placa estéril de 96 poços de fundo plano foram adicionados 100 μ L dessas células em poços determinados previamente, de acordo com os tipos de amostras e quantidade de animais. A placa foi levada a estufa onde permaneceu por 1 hora, a 37°C (SAMPAIO, 2012).

Após a formação do tapete celular foram adicionados à placa 200 μ L de RPMI 1640-C às amostras a serem testadas. Em poços pré-determinados, com as mesmas condições anteriores, foram adicionados 100 μ L de LPS (lipopolissacarídeo bacteriano derivado de *E. coli*, adquirido da empresa Sigma Aldrich) a uma concentração de 10 mL, ou apenas meio de cultura, o controle negativo. A placa 1 foi incubada em estufa com atmosfera de CO₂ por 24 horas, a 37 °C. (SAMPAIO, 2012)

Passado esse período, sobre a cultura celular foram adicionados 100 μ L de uma solução de MTT - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] - a 0,5 mg/mL em RPMI-1640. As placas foram incubadas a 37° C com 5% de CO₂ por 3 horas. Após essa incubação, foram descartados o sobrenadante e as amostras utilizadas, e adicionado 100 μ L de álcool isopropílico. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (*Multiskan Ascent, Labsystems Research Tech.*) a 540 nm com filtro de referência de 620 nm. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100 % de viabilidade (SAMPAIO, 2012).

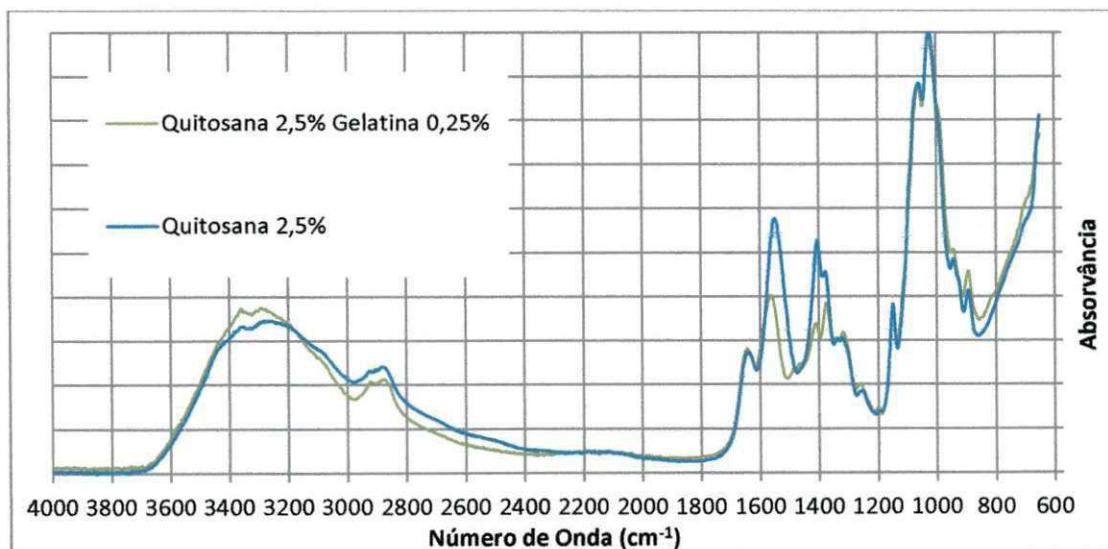
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Como visto anteriormente, esta técnica é proposta para identificar a presença de grupos funcionais dos materiais, revelando-se útil na identificação da presença da gelatina na superfície do arcabouço de quitosana. Atendendo que nas metodologias a gelatina é colocada apenas nas superfícies, optou-se por utilizar o acessório ATR (*attenuated total reflectance* ou refletância total atenuada) para a caracterização das amostras, uma vez que esta técnica realiza ensaios superficiais.

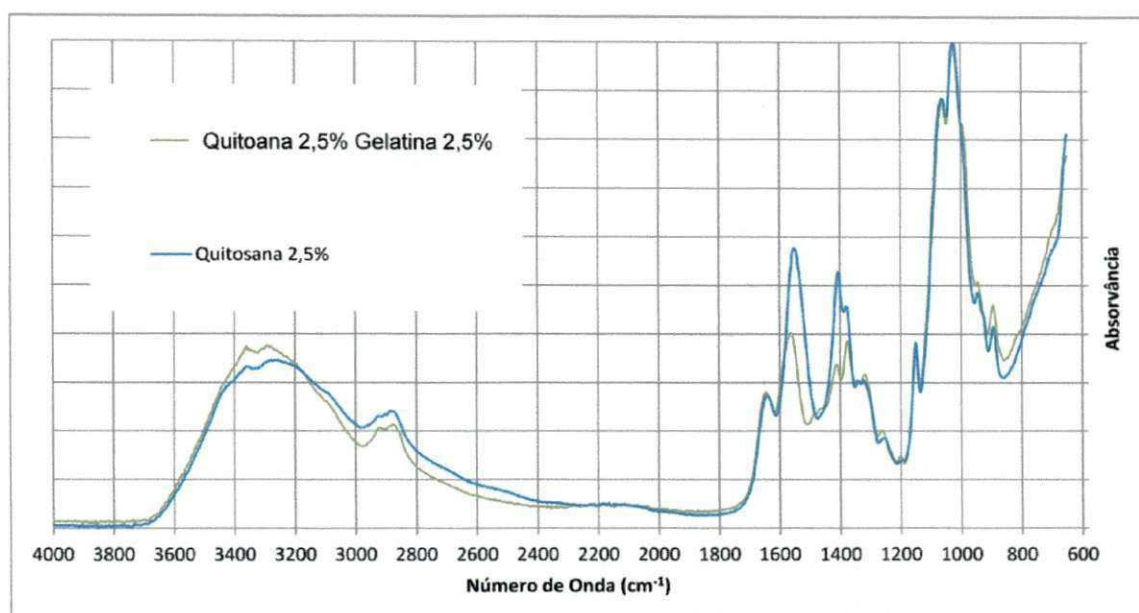
A partir da Figura 39, onde se tem um gráfico comparativo de FTIR dos arcabouços de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25% percebe-se uma semelhança nas bandas características, além da alteração nos picos 1.450cm^{-1} a 1.600cm^{-1} , ilustrando a presença da gelatina em um dos arcabouços.

Figura 39 - Gráfico comparativo de FTIR de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% com gelatina 0,25%.



A partir da Figura 40, onde se tem um gráfico comparativo de FTIR dos arcabouços de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% percebe-se que o FTIR deste é idêntico ao dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, onde tanto as bandas características como os picos estão à mesma faixa, ilustrando também a presença da gelatina.

Figura 40 - Gráfico comparativo de FTIR de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% com gelatina 2,5%.



Observando e discutindo os espectros das Figuras 39 e 40 e comparando-os aos da literatura, pode-se perceber bandas de absorção típicas da vibração de estiramento da ligação $-NH$ e $-OH$ (H_2O) em aproximadamente 3294 cm^{-1} , além da presença da banda em 3060 cm^{-1} , característica da ligação $-CH$. As bandas em 2929 cm^{-1} e 2873 cm^{-1} são atribuídas às vibrações de estiramento assimétrico do grupo $-CH_2$ e simétrico do grupo $-CH_3$ respectivamente (FOOK, 2012). As bandas em 1630 , 1532 e 1233 cm^{-1} são características da amida I ($-NH$), amida II ($-NH_2$) e amida III ($-NH_3^+$), similares ao espectro do colágeno (FICAI et al., 2010). A região em 1334 cm^{-1} apresenta uma banda característica ao grupo COO^- de aminoácidos da estrutura da gelatina. A banda em 1447 cm^{-1} é atribuída às ligações $C-N$ e $C-C$ decorrente do empacotamento do anel pirrolidínico, sugerindo que a gelatina tipo A utilizada nesse estudo é caracterizada pela presença da estrutura de tripla hélice do tropocolágeno,

indicando que processo do tratamento ácido para a hidrólise seletiva dos grupos carboxiamidas não a desnaturou totalmente, uma vez que apresentaram uma relação de absorbâncias $1233/1447 \text{ cm}^{-1}$ próxima da unidade (CHAUDRY et al., 1997). A banda de absorção na região de 1080 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento das ligações glicosídicas (C-O-C). Baseado nessa observação estrutural confirma-se que a gelatina, mesmo desnaturada do colágeno, manteve considerável número de grupos orgânicos característicos, especialmente aminoácidos.

3.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Como já enfatizado anteriormente, o MEV é uma técnica que possibilita a observação da estrutura morfológica. Para a Etapa II evidenciou-se mudanças de características de amostras de quitosana e quitosana – gelatina, bem como, avaliou-se a diferença no comportamento de amostras a partir da modificação das metodologias de recobrimento superficial por imersão.

Primeiramente comprovou-se a presença da gelatina nos arcabouços de quitosana, devido ao brilho característico que a gelatina possui e que é bastante nítido nas microscopias, ao aumento no tamanho e quantidade de poros, além da sua distribuição mais homogênea pela extensão da amostra.

As imagens da Figura 41 ilustram as micrografias obtidas para os arcabouços de quitosana 2,5% com recobrimento superficial de gelatina líquida 0,25% por imersão, submetidos à taxa de congelamento lento, de -20°C , onde consegue-se perceber uma estrutura porosa, com variados tamanhos de poros e interconectividade entre estes. Pode-se também identificar, tanto a partir das micrografias como também pelos dados do gráfico da Figura 42, que em relação aos tamanhos de poros, os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% apresentam aumento significativo, visto que, antes da associação da quitosana à gelatina, os tamanhos de poros tinham uma variação de 0-80 μm e agora estão variando entre 0-200 μm .

Figura 41 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, submetidos à taxa de congelamento de -20°C e liofilizados.

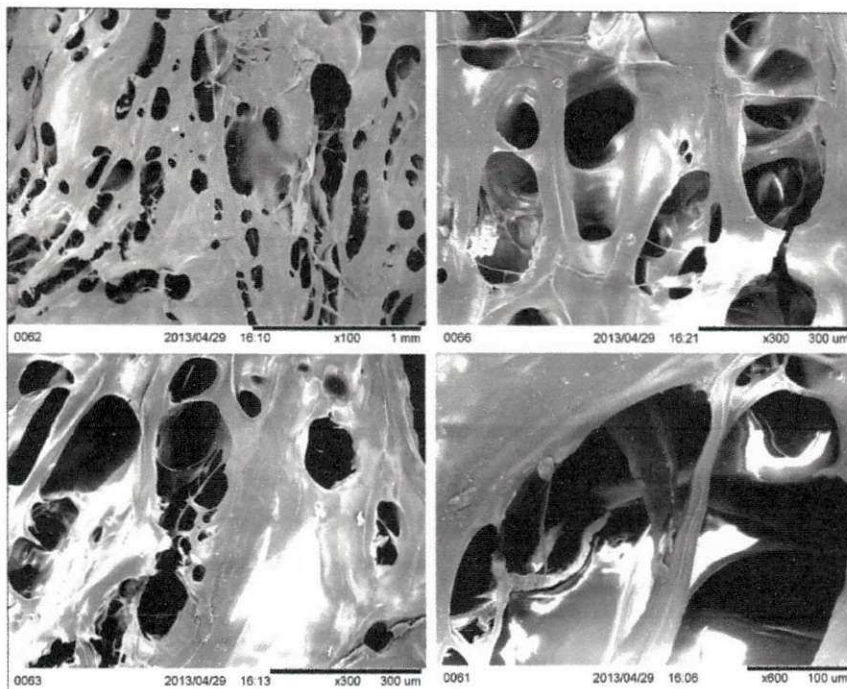
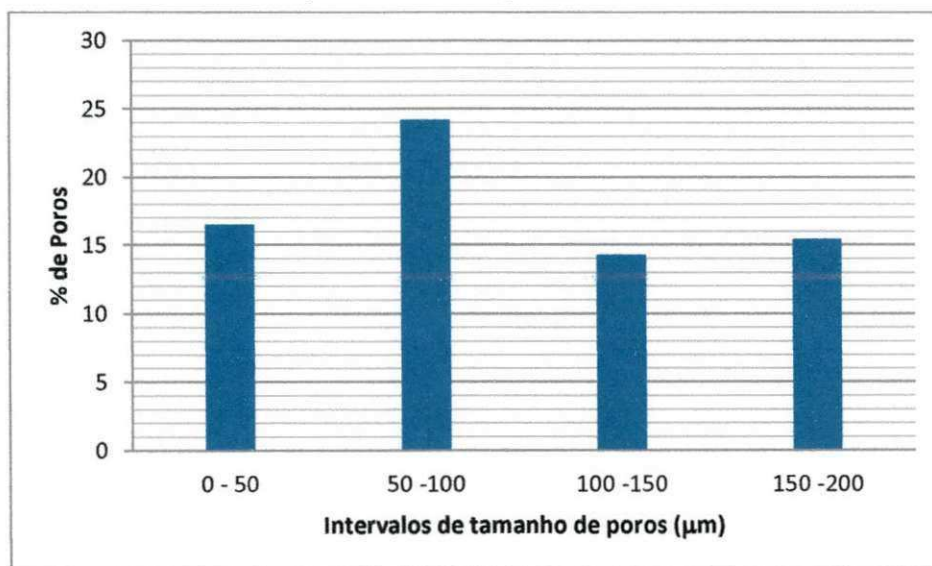


Figura 42 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2,5% - gelatina 0,25.



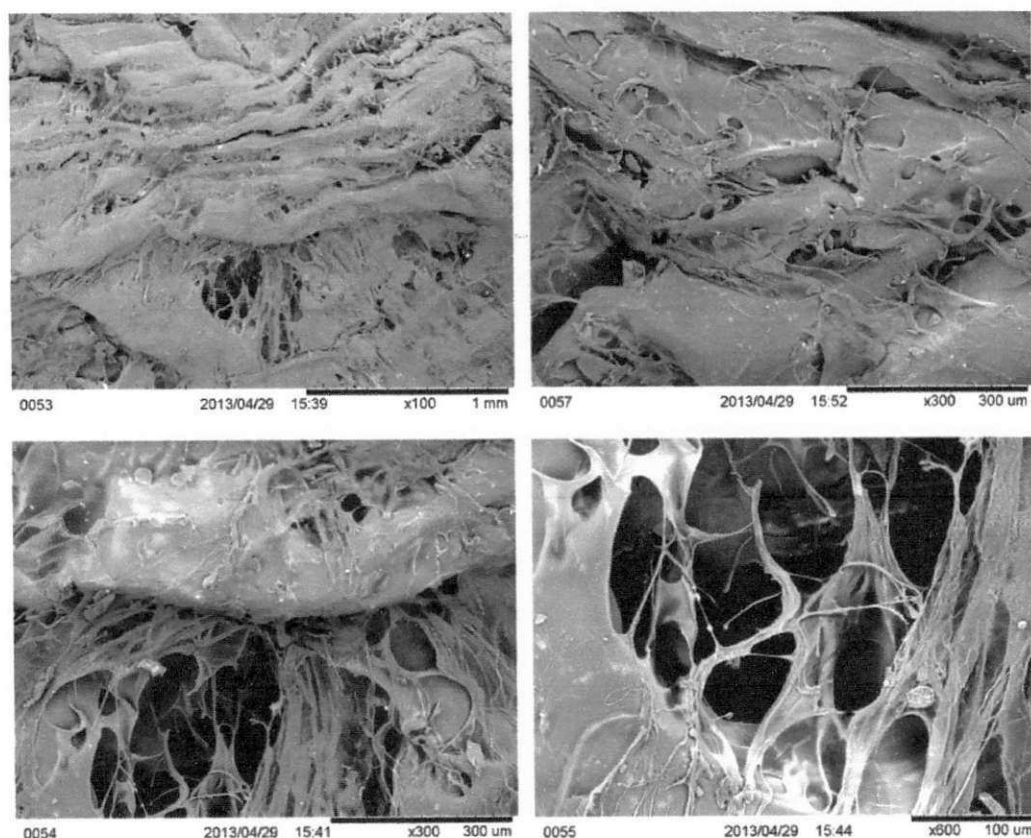
Em percentagem, calcula-se 15% para tamanhos de poros que vão de 0-50 μm , 22% de 50-100 μm , 13% entre 100-150 μm e 13% para uma escala de 150-200 μm . Estes percentuais são bastante satisfatórios à proliferação e adesão celular, desejadas na aplicação em regeneração tecidual de pele.

Comparando as amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% com as amostras de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%, observa-se que a metodologia é determinante nas características morfológicas, e como consequência, em seu comportamento funcional.

Este resultado pode ser atribuído à metodologia aplicada ser diferenciada, onde para a concentração de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% a amostra é totalmente mergulhada na gelatina, e posteriormente liofilizada, permitindo assim que a sublimação ocorra de maneira mais efetiva, deixando a estrutura mais porosa e também retirando algumas impurezas contidas na amostra,

Verifica-se ao analisar as micrografias da Figura 43, referentes aos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%, que estes apresentaram tamanho de poros menores do que os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.

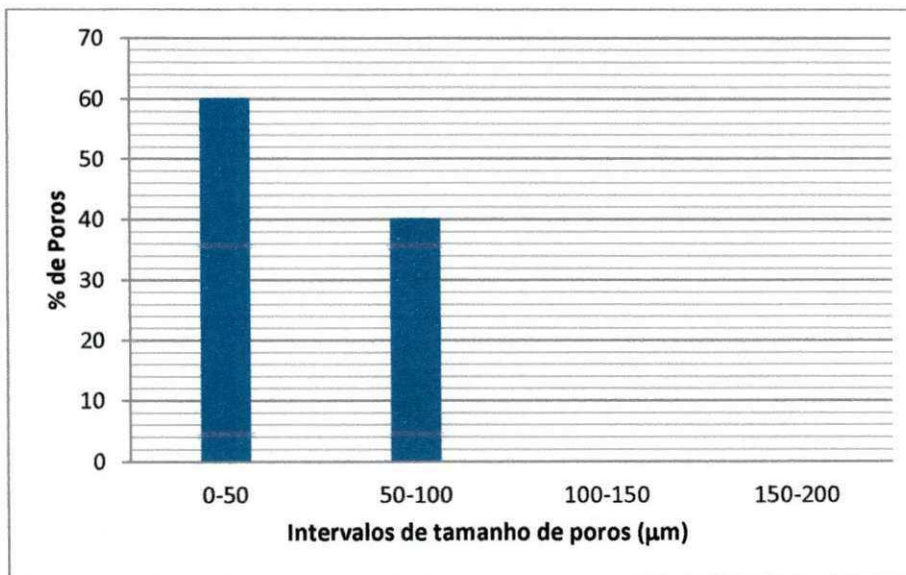
Figura 43 - Micrografias (MEV) das secções longitudinais dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%, submetidos à taxa de congelamento de -20°C e liofilizados.



Percebe-se a partir da observação das micrografias, que apesar de comparativamente a porosidade destes arcabouços serem proporcionalmente menores aos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, a estrutura apresentou-se porosa, com algumas regiões densas, além da aparente interconectividade dos poros.

Pode-se identificar, a partir dos dados do gráfico da Figura 44, que em relação aos tamanhos de poros dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% houve um pequeno aumento se comparados aos arcabouços de quitosana 2,5%. Antes da associação da quitosana à gelatina, os tamanhos de poros tinham uma variação de 0-80 μm , e agora estão variando entre 0-100 μm .

Figura 44 - Histogramas para dispersão do tamanho de poros para a concentração de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.



Comparando-se os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% com os arcabouços de quitosana 2,5% - 0,25%, percebe-se que ambos tiveram suas características morfológicas melhoradas em relação aos arcabouços de quitosana 2,5% sem a gelatina. Porém quando se compara uma concentração com outra de quitosana - gelatina, considera-se como mais promissora a concentração de quitosana 2,5% - 0,25%. Isto ocorreu devido à metodologia

aplicada, onde em uma delas há imersão total da amostra na solução de gelatina e em outra não.

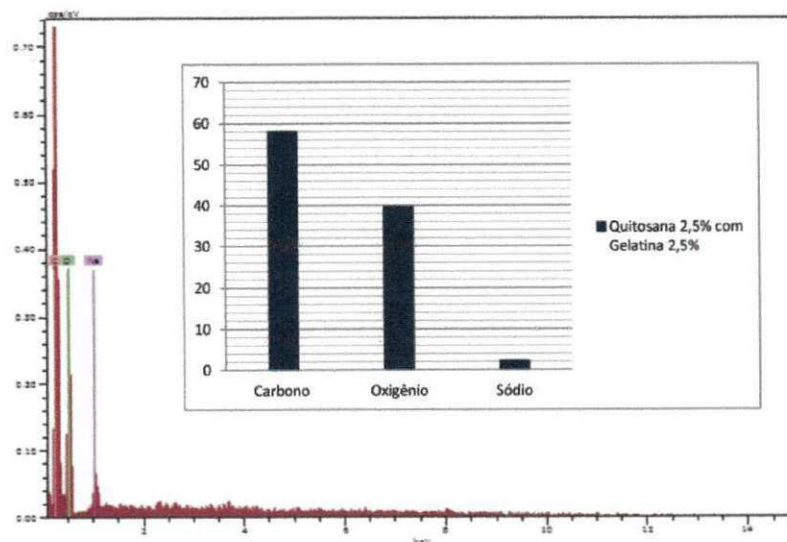
Conclui-se a partir de uma análise em âmbito geral, que foi confirmada a otimização dos arcabouços de quitosana quando associados à gelatina, modificando para melhor as suas características morfológicas. Porém a metodologia de recobrimento superficial com imersão total do arcabouço em solução líquida se apresentou mais viável à aplicação almejada, de curativo biodegradável para tratamento de queimados.

3.3 ESPECTROSCOPIA DE ENERGIA DISPERSIVA DE RAIOS X (EDS)

Essa técnica foi utilizada na Etapa II com o intuito de detectar se o elemento químico diferenciado, o NaOH, identificado nos arcabouços de quitosana na Etapa I permaneciam, e qual a sua porcentagem. Para tal, foi utilizado um dispositivo de energia dispersiva que é acoplado ao equipamento MEV, TM-1000, HITACHI.

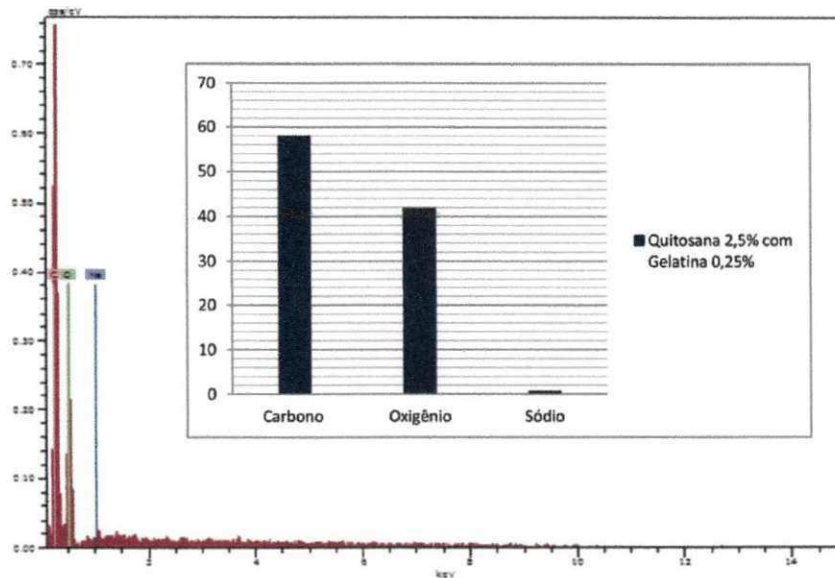
A partir dos gráficos das Figuras 45 e 46, respectivamente, observa-se que o sódio foi detectado nas duas concentrações quitosana – gelatina, onde na concentração de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% foi encontrada uma maior porcentagem de sódio nos arcabouços, de aproximadamente 4,0%, enquanto que nos arcabouços de quitosana 2,5% sem associação da gelatina, este valor era de aproximadamente 0,4%.

Figura 45 - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.



Nos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, ilustrados na Figura 46, verifica-se uma porcentagem inferior de NaOH, de aproximadamente 0,6%, o que pode indicar que com a associação da gelatina de maneira homogênea na superfície da amostra, há diminuição da quantidade de sódio na extensão dos arcabouços em relação as amostras de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.

Figura 46 - Espectroscopia de energia dispersiva de raios X (EDS) da quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.



Quando se compara amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% com amostras de quitosana 2,5% sem a associação da gelatina se observa um leve aumento percentual de aproximadamente 0,2% de sódio em uma região pontual. Porém em outras regiões foi detectado um percentual de 0% de sódio, o que pode indicar uma maior concentração de sódio em uma determinada região e eliminação total em outras, de modo que em âmbito geral, a quitosana 2,5% - gelatina 0,25% possui menos resíduos de sódio do que as amostras de quitosana 2,5%.

3.4 ENSAIO DE INTUMESCIMENTO

Para o ensaio de intumescimento da Etapa II utilizou-se a mesma metodologia da Etapa I, onde as amostras foram seccionadas em 1cm², pesadas quando secas e pesadas depois de imersas em água deionizada, em uma variação progressiva de tempo de 2 minutos. Além do comprimento e espessura, cada amostra – tanto de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% como a de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% - foi medida em sua espessura, volume e densidade, como se pode ver na Tabela 13.

Tabela 13 - Tabela 7 - Médias da espessura, volume e densidade de amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.

	Quitosana 2,5% Gelatina 0,25%	Quitosana 2,5% Gelatina 2,5%
Espessura	1,94mm	3,19 mm
Volume	194,0mm ³	319,0mm ³
Densidade	0,18299 g/cm ³	0,12121 g/cm ³

Para realização dos cálculos nesta Etapa II, utilizou-se os valores verificados após a imersão em água deionizada em uma variação progressiva de tempo de 2 minutos, resultando no total de 81 minutos tanto para as amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, quanto para as amostras de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%. Aplicou-se a mesma equação utilizada na Etapa I, onde:

$$\%Intumescimento = \frac{Peso_{total} - Peso_{Seco}}{Peso_{Seco}} \times 100$$

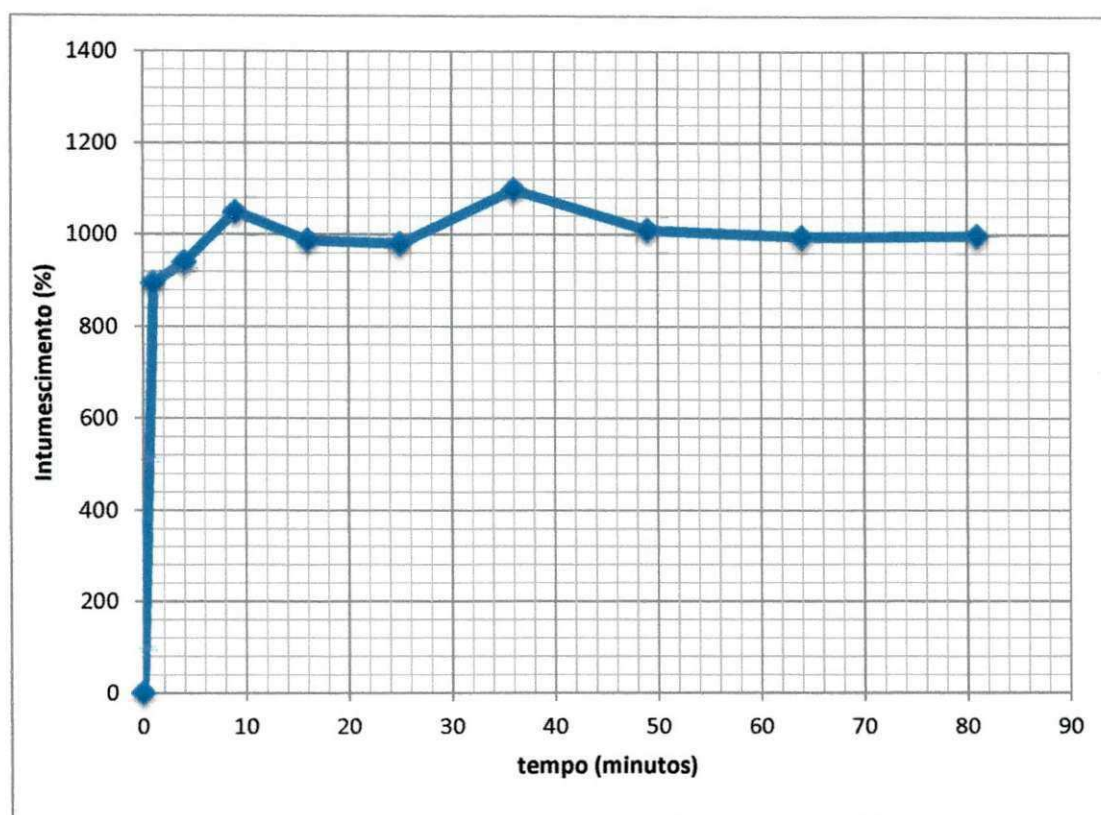
Após obtenção dos valores, fez-se um gráfico a partir dos dados para verificação da curva que representa o intumescimento em porcentagem (%) versus o tempo em minutos.

Ao observar o gráfico da Figura 47, percebe-se uma mudança bastante elevada do valor do peso inicial para o primeiro minuto de imersão na água deionizada, mostrando que sua capacidade de absorção é elevada, chegando a 895%. Os tempos seguintes mostram uma pequena oscilação entre aumento e perda na capacidade de absorção, até atingir a estabilidade. Percebe-se que

a maior oscilação acontece entre o tempo de 5 minutos a 49 minutos, com dois aumentos – 5 minutos a 16 minutos e 25 minutos a 49 minutos – e estabilidade próxima de 50 minutos.

Verifica-se ainda que o pico máximo atingido é de aproximadamente 1.100% e o mínimo de aproximadamente 895%.

Figura 47 - Ensaio de intumescimento das amostras de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.

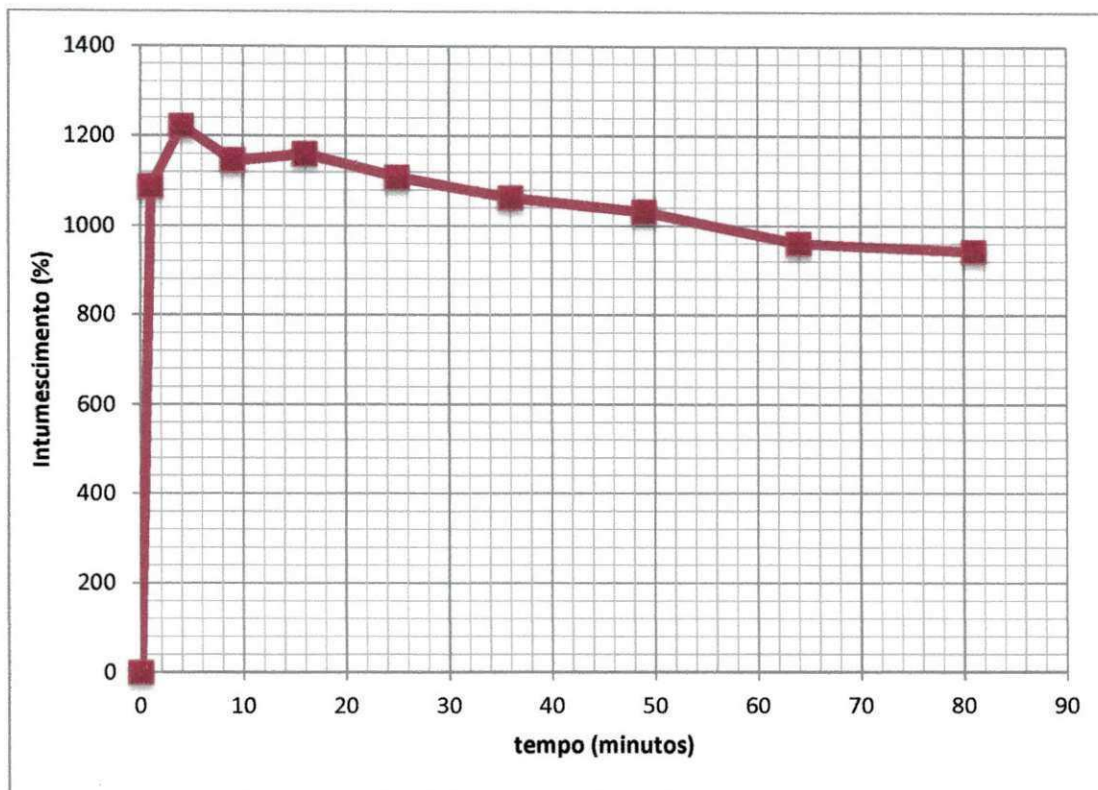


Quando comparados aos arcabouços de quitosana sem a associação de gelatina 0,25%, tem-se uma perda da capacidade de absorção, onde apenas o arcabouço de quitosana 2,5% atinga aproximadamente 1.200% para o primeiro minuto. Este fenômeno pode ser atribuído a uma possível dissolução de parte da gelatina em água, gerando essa diminuição no peso da amostra durante o tempo.

Já quando se compara os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% com os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%, observa-se uma absorção maior para o primeiro minuto, onde se vê que a porcentagem (%) é

de aproximadamente 1.100, assim como nos arcabouços de quitosana 2,5% sem associação da gelatina 2,5%, e superior aos arcabouços quitosana 2,5% - gelatina 2,5%, como se pode verificar na Figura 48.

Figura 48 - Ensaio de intumescimento das amostras de quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.



Os tempos seguintes mostram apenas uma pequena oscilação entre aumento e perda na capacidade de absorção, que vai de 1 minuto a 9 minutos, e depois havendo perda até atingir a estabilidade. Percebe-se que a perda gradativa é mais acentuada que na amostra de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, além de maior porcentagem do pico máximo e do pico mínimo, sendo o primeiro de 1.110% e o segundo de 940%, aproximadamente.

A perda de absorção gradativa em maior proporção para a quitosana 2,5% - gelatina 2,5% pode ser atribuída ao fato desta ter menor quantidade de gelatina em sua superfície, visto que, a sua metodologia é diferenciada e fica em apenas uma das superfícies da amostra, possibilitando assim um maior inchamento do lado que não possui gelatina. Faz-se pertinente ainda, frisar que diferente do que se imaginaria a camada de gelatina não se soltou da camada

de quitosana, mostrando-se aderente a mesma, apesar do tempo de exposição em meio aquoso durante o ensaio.

De referir ainda que apesar destas estruturas serem mais porosas têm menor capacidade de inchamento, possivelmente devido a dois motivos: um a possibilidade da interconectividade ser menor, e outro relacionado com a estrutura ser mais rígida e por isso menor capacidade de deformação aquando da entrada de água. Um destes dados será confirmado através dos ensaios mecânicos.

3.5 ENSAIO DE PERMEABILIDADE

Conforme já mencionado na presente pesquisa, as queimaduras prejudicam a função normal da pele no que toca o balanço de fluídos corpóreos, o que pode resultar na alta perda destes através da evaporação. Deste modo, os curativos são importantes no controle da perda destes fluidos corpóreos por auxiliar na obtenção de um ambiente local úmido, adequado à aceleração do processo de cicatrização.

Para que isto seja possível, os curativos devem apresentar taxas de transmissão de vapor de água adequadas. Um curativo ideal deve possuir permeabilidade ao vapor de água de $1.200 \text{ g/m}^2 \text{ dia}$, já que a pele humana normal possui permeabilidade de $204 \pm 12 \text{ g/m}^2 \text{ dia}$ e a pele lesada por queimaduras de primeiro grau possuem permeabilidades de 279 ± 26 e $5.138 \pm 202 \text{ g/m}^2 \text{ dia}$, respectivamente (RUIZ et al., 1996). Entretanto, de acordo com outros pesquisadores o valor de permeabilidade ao vapor de água de um curativo ideal deve ser superior ao descrito, sendo sugerido o valor ideal de $2.500 \text{ g/m}^2 \text{ dia}$ (MI et al., 2001; WU et al., 2004). Deve-se ressaltar ainda que, alguns dos curativos disponíveis comercialmente apresentam valores de permeabilidade ao vapor de água que variam de 90 a $2.892 \text{ g/m}^2 \text{ dia}$ (WU, 1995).

Neste sentido, os valores obtidos no ensaio de permeação em solução aquosa dos arcabouços de quitosana e quitosana-gelatina, comparados aos valores da literatura acerca da permeabilidade da pele são bastante

importantes, visto que, é a partir dessa comparação que se pode avaliar qual desses arcabouços possuem melhor resultado para aplicação em engenharia de tecido, para regeneração tecidual de pele.

O experimento foi realizado em uma estufa a 36,5°C a fim de mimetizar a temperatura do corpo humano e determinar a permeabilidade dos arcabouços como se estivessem à superfície da pele humana.

A partir da Tabela 14, verifica-se que ocorre perda de peso durante os dias de ensaio, ficando nítido, inclusive a olho nu, que o vapor de água deionizada permeou do interior do *ependorf* e atravessou o arcabouço e libertou-se na atmosfera da estufa.

Tabela 14 - Média em porcentagem (%) das perdas de água durante 336 horas, das diferentes concentrações de quitosana-gelatina.

	0 horas	72 horas	144 horas	168 horas	192 horas	240 horas	336 horas
Quitosana 2,5% Gelatina 0,25%	100%	84,7%	71,6%	59,1%	51,4%	18,4%	0%
Quitosana 2,5% Gelatina 2,5%	100%	84,5%	70,8%	58,2%	49,5%	15,3%	0%

As médias das concentrações de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% demonstram que o vapor d'água permeou totalmente durante 336 horas, totalizando 14 dias de experimento, quatro dias a mais quando comparados aos arcabouços de quitosana 2,5%. Isto demonstra que a velocidade de permeação quando a quitosana é associada à gelatina é mais lenta.

Pode-se atribuir a este fato alguns fatores. Um deles pode estar relacionado à espessura do arcabouço de quitosana ser maior quando sofre recobrimento da gelatina, além da sua característica morfológica, que faz com que apesar do aumento no número e na quantidade de poros após o recobrimento, a interconectividade deles não seja suficiente para o vapor de água atravessar uma camada mais espessa na mesma velocidade quando sem a camada de gelatina.

Além deste fator, o valor obtido para a velocidade de permeação do arcabouço de quitosana – gelatina foi mais aproximado ao valor ideal que o

curativo deve possuir - maior que $2.500 \text{ g/m}^2 \text{ dia}$ - possivelmente devido à uma maior similaridade da gelatina em relação ao colágeno da matriz extracelular que constitui a pele.

A velocidade de permeação foi determinada, assim como no Capítulo I, a partir da seguinte equação:

$$WVP = \frac{\Delta w}{A \cdot \Delta t}, \text{ em que:}$$

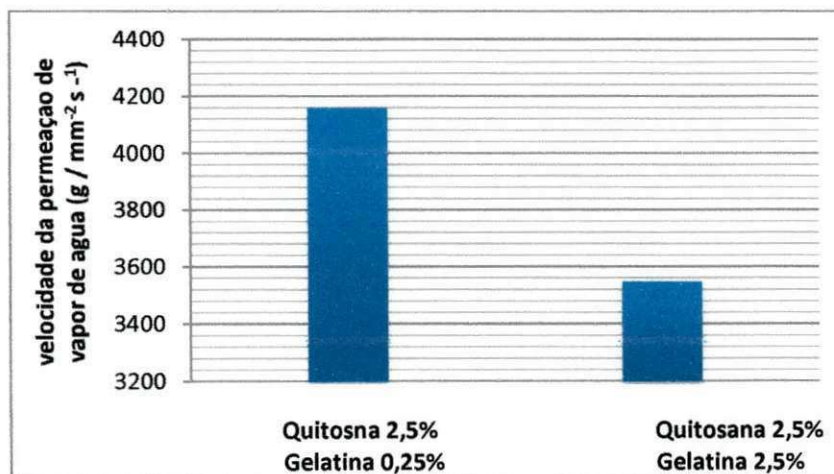
Δw - é a variação da massa de água;

A - é a área de permeação;

Δt - é a variação de tempo.

Na Figura 49 pode-se observar os resultados de velocidade de permeação para as duas concentrações de quitosana – gelatina.

Figura 49- Velocidade de permeação de vapor de água das três concentrações de quitosana - gelatina.



Comparando os resultados de velocidade de permeação dos arcabouços de quitosana – gelatina é possível perceber que as duas amostras apresentaram velocidade de permeação de vapor de água superior ao valor ideal sugerido pela literatura e inferior ao do arcabouço de quitosana 2,5%.

Avaliando todos os resultados obtidos para este ensaio, foi constatado que as duas concentrações se apresentaram de maneira satisfatória para a aplicação almejada. Foi verificada novamente a melhoria das propriedades dos arcabouços de quitosana quando associado à gelatina, onde os valores obtidos ficaram mais próximos da pele humana, tornando o produto de pesquisa mais viável aos requisitos propostos.

3.6 ENSAIOS MECÂNICOS

Foram realizados ensaios mecânicos de tração uniaxial sobre os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5% a fim de compará-los com os resultados dos arcabouços de quitosana 2,5%, obtidos no Capítulo I.

Os corpos de provas foram seccionados em formatos retangulares e submetidos a um esforço que tendeu a alongá-los até a sua ruptura. Estes tiveram suas dimensões padronizadas, de modo que os resultados pudessem ser comparados de modo mais eficiente. O objetivo do presente ensaio é comparar as propriedades mecânicas das amostras obtidas com as propriedades mecânicas da pele humana.

Assim como já explicado anteriormente no Capítulo I, as amostras foram fixadas em uma máquina de ensaios que exerce esforços crescentes na sua direção axial, sendo medidas as deformações correspondentes. Os esforços ou cargas foram mensurados na própria máquina, e os valores médios foram observados para as duas concentrações dos arcabouços de quitosana – gelatina, bem como para quitosana sem a gelatina, e comparados na Tabela 15, para tensão máxima, alongamento máximo e módulo de Young (módulo de elasticidade), respectivamente.

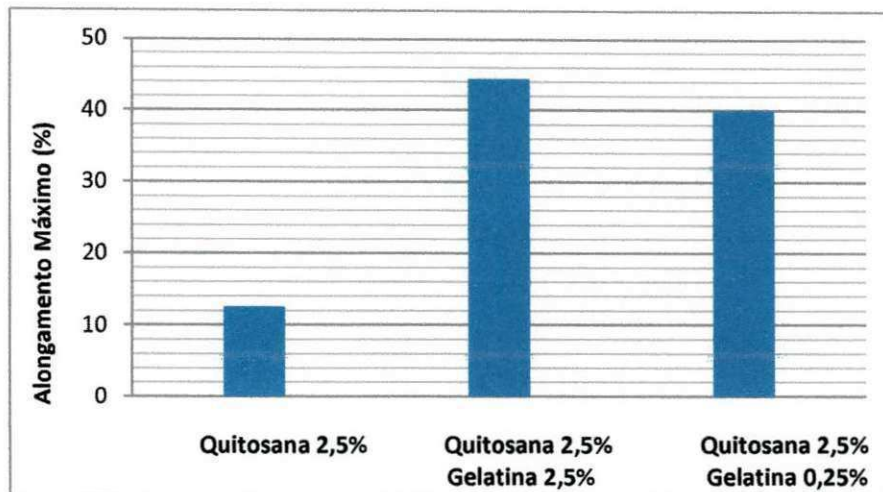
Tabela 15 - Compara os valores obtidos para ensaios de tensão máxima, alongamento máximo e módulo de Young dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 0,25% e quitosana 2,5% - gelatina 2,5%.

	Tensão Máxima	Alongamento Máximo	Módulo de Young
Amostras	MPa	%	MPa
Quitosana 2,5%	0,51	12,61	16,92
Quitosana 2,5% Gelatina 0,25%	0,19	40,05	8,01
Quitosana 2,5% Gelatina 2,5%	1,37	44,42	27,50

A partir da Tabela 15 e dos gráficos das Figuras 49, 50 e 51 que mostram valores obtidos para ensaios de tensão, alongamento e módulo de Young, respectivamente, comparando os arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25% se percebe que com a associação da gelatina à quitosana, houve uma melhoria significativa dos arcabouços para a destinação almejada, onde em âmbito geral, os arcabouços ficaram com maior elasticidade, característica interessante para curativos para aplicação para regeneração tecidual de pele.

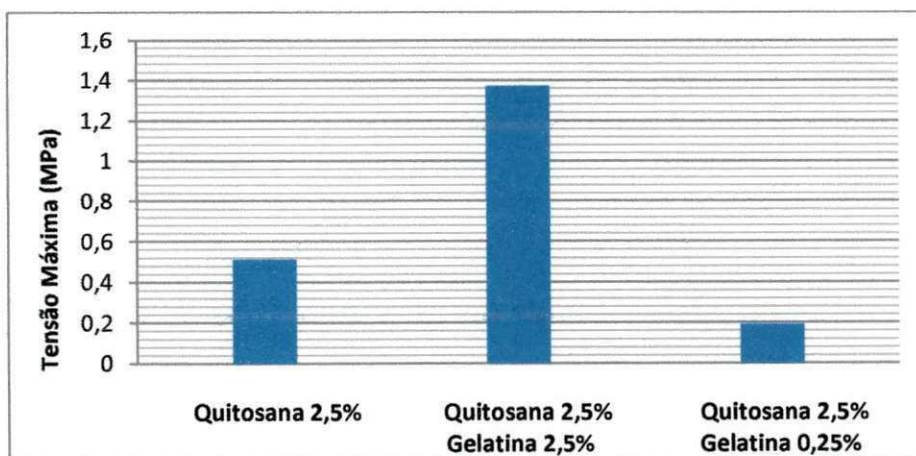
Para o alongamento máximo observa-se que com a associação da gelatina à quitosana houve um aumento da porcentagem quase quatro vezes maior, tanto para a concentração de gelatina 2,5% quanto para 0,25%. O alongamento da quitosana 2,5% que antes era de 12,6%, agora é de 40,0% para a quitosana 2,5% - gelatina - 2,5% e 44,4% para quitosana 2,5% - gelatina - 0,25%, como ilustrado no gráfico da Figura 50.

Figura 50 - Comparativo do alongamento máximo dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.



Já para o ensaio de tensão máxima, observou-se que a quitosana 2,5% - gelatina 2,5% apresentou uma resistência maior do que a quitosana 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%. Os arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, porém, apresentaram uma resistência menor que os arcabouços de quitosana 2,5%, como se verifica no gráfico da Figura 51.

Figura 51 - Comparativo da tensão máxima dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.

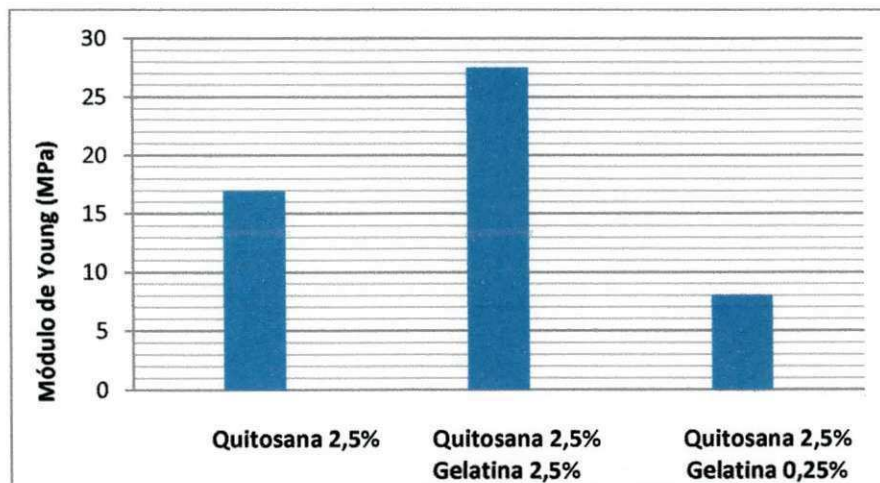


A partir do gráfico da Figura 52, ilustrando o módulo de Young ou módulo de elasticidade, comparativamente aos gráficos da Figura 49 e 50, de

alongamento e tensão máxima, se observa que tensão da quitosana 2,5% - gelatina 0,25% teve que ser inferior a das outras amostras comparativas para se tornar mais elástica que as demais.

O gráfico da Figura 52 mostra ainda que a quitosana 2,5% - gelatina 2,5% possuiu maior módulo de elasticidade que a amostra de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, onde a primeira possui 27,5 MPa, a segunda 16,9 Mpa e terceira 8,1 MPa. O valor obtido pelos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, porém, é o mais aproximado ao valor de elasticidade da pele humana, que é de aproximadamente 9,3 MPa (GENNISSON, 2004).

Figura 52 - Comparativo de módulo de Young dos arcabouços de quitosana 2,5%, quitosana 2,5% - gelatina 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%.

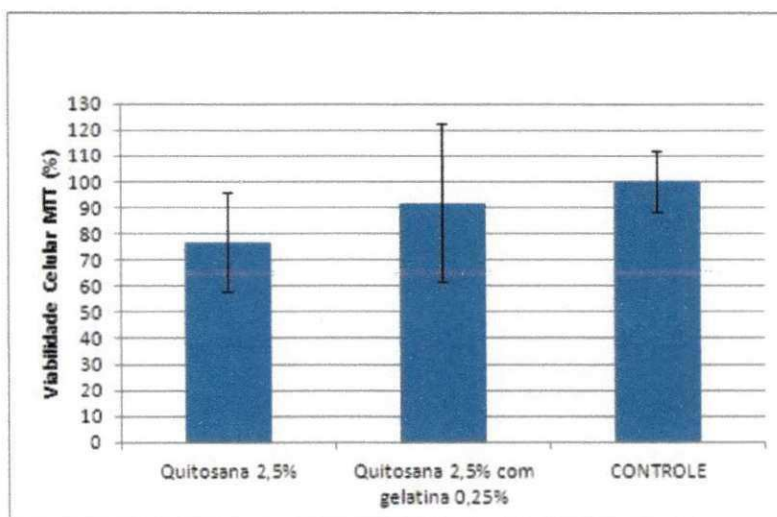


4 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Este teste foi realizado de modo comparativo entre os arcabouços de quitosana 2,5%, escolhidos na conclusão dos ensaios da Etapa I, e dos arcabouços quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, metodologia de recobrimento superficial, que apesar de ainda necessitar de estudos, foi a que apresentou os melhores resultados ao objetivo almejado em âmbitos gerais.

O intuito foi de avaliar se a viabilidade das células aumentaria com a presença da gelatina, além é claro, de analisar a viabilidade do estudo em vivos. Os percentuais comparativos de viabilidade celular, obtidos para os arcabouços podem ser observados na Figura 53.

Figura 53 - Viabilidade de macrófagos de camundongos na presença dos arcabouços de quitosana 2,5% e quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, além do controle.



As células em meio de cultura (RPMI-16400) foram utilizadas como controle, equivalendo a 100 % de viabilidade e estão representadas na última coluna (controle). Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de cinco animais e três arcabouços de cada composição por animal.

A resposta foi bastante satisfatória, onde se observou que os percentuais dos arcabouços quitosana 2,5% - gelatina 0,25% foram superiores em aproximadamente 20% aos de quitosana 2,5%. Os dois arcabouços se

apresentaram viáveis a estudos mais aprofundados em vivos, visto que o mínimo de porcentagem que comprova a viabilidade celular é de 50%, e os arcabouços em questão apresentaram percentual superior a 75%.

Vale salientar, que para o presente trabalho estes resultados são bastante importantes e satisfatórios, tendo em vista os objetivos propostos. Porém, torna-se pertinente uma avaliação mais aprofundada da viabilidade celular através de outros métodos em trabalhos futuros.

5 CONCLUSÕES PARCIAIS

Através da Etapa II, referente à produção e caracterização dos arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 0,25% e quitosana 2,5%- gelatina 2,5%, tornou-se possível investigar, comparar e analisar qual das metodologias se adequa e propicia amostras com propriedades morfológicas e químico-físicas para aplicação em curativos que promovam a regeneração tecidual de pele.

As caracterizações realizadas de maneira comparativa entre as duas concentrações de gelatina associadas à quitosana 2,5% através de metodologias diferenciadas, mostraram de maneira pontual a importância do cruzamento de informações dos resultados para viabilizar o produto de maior eficiência aos requisitos necessários para uma aplicação de sucesso.

A partir dos resultados de todos os ensaios, pode-se concluir no Capítulo II, que arcabouços de quitosana 2,5% - gelatina 2,5% não atendem a todos os requisitos necessários para aplicação em regeneração tecidual de pele, pois se apresentou mais frágil em alguns aspectos, principalmente no que toca a estrutura morfológica, ensaios mecânicos e ensaio de MTT, que não foi possível realizar, devido à separação física da quitosana com a gelatina, quando houve a tentativa de secção da amostra, para enviá-la para análise.

A amostra de quitosana 2,5% - gelatina 0,25%, porém, se apresentou bastante interessante e com resposta satisfatória aos ensaios. Demonstrou melhoria nas propriedades morfológicas, químicas e mecânicas, ficando bastante próxima aos dados referentes aos da pele, o que é bastante satisfatório ao objetivo geral e os específicos da pesquisa.

6 CONCLUSÕES FINAIS

O presente trabalho alcançou a proposta de desenvolver arcabouços de quitosana através da técnica de *freeze drying* e incorporar gelatina a estes a partir do recobrimento superficial. Bem como, de caracterizá-las de modo detalhado a fim de realizar de maneira abrangente uma avaliação sobre a possibilidade de utilização do produto de pesquisa para aplicação em regeneração tecidual de pele. A análise dos resultados das caracterizações propostas permitiu chegar às seguintes conclusões:

- As análises de espectroscopia na região do infravermelho confirmaram as alterações sofridas nas amostras de quitosana com a adição da gelatina, além da não efetividade da neutralização da Etapa I, ter sido eliminada, comprovando o sucesso da associação.
- O estudo morfológico dos arcabouços realizado por Microscopia Eletrônica de Varredura revelou a formação de uma arquitetura tridimensional com poros interconectados. Os arcabouços quando associados à gelatina tiveram seus poros aumentados, assim como a quantidade dos mesmos, ficando majoritariamente entre 100- 200 μm , sendo, portanto, considerados materiais em potencial para aplicação em engenharia tecidual de pele.
- Os arcabouços apresentaram alta capacidade de intumescimento, e ainda que com a adição da gelatina este tenha diminuído, provavelmente por maior hidrofobicidade da gelatina, o resultado permaneceu viável a aplicação proposta.
- Para os ensaios de permeação de água a vapor, os arcabouços apresentaram uma alta velocidade de permeação, que baixou quando adicionadas à gelatina, porém continuaram superiores aos dados ideais sugeridos pela literatura. Esta resposta foi bastante positiva, visto a comparação diretamente à velocidade de permeação da pele humana e confirmando a potencialidade a aplicação desejada.

- Os ensaios mecânicos também foram bastante positivos, demonstrando a partir do cruzamento de informações dos ensaios de alongamento máximo, tensão máxima de módulo de elasticidade, a característica mais elástica dos arcabouços e quitosana quando recobertos pela gelatina.
- Os ensaios de MTT revelaram que os arcabouços de quitosana e quitosana-gelatina são biocompatíveis, e que os arcabouços de quitosana-gelatina possuem maior viabilidade celular do que os arcabouços de quitosana, em mais de 20%.

Dessa forma, a técnica de *freeze-drying* utilizada demonstrou ser efetiva para a obtenção de estruturas porosas de quitosana, e versátil devido à possibilidade de manipulação de variáveis experimentais. Os resultados mostraram que a alteração da concentração da solução de quitosana e adição da gelatina modificam as propriedades gerais dos arcabouços produzidos.

As metodologias propostas foram utilizadas com sucesso, demonstrando a eficiência dos processos escolhidos para execução. Contudo, naturalmente que com a existência de equipamentos específicos para realização de alguns ensaios que tiveram adaptados às normas, os resultados poderiam ter sido ainda melhores e mais efetivos. Tornando-se importante, a possibilidade de posterior continuidade das investigações em futuras pesquisas, no que toca o ensaio de permeabilidade e outros métodos de ensaios de viabilidade celular e adesão celular.

Conclui-se por fim, a importância do estudo realizado para o grupo CERTBIO, da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, contribuindo de forma efetiva com o cruzamento das informações, de técnicas de caracterização e resultados bastante satisfatórios que motivaram diversas investigações em pesquisas paralelas a este estudo.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Percebendo-se que o referido projeto teve cunho colaborativo para às pesquisas que estão sendo desenvolvidas a cerca de curativos biodegradáveis para regeneração tecidual de pele, vê-se a pertinência de pontuar questões que devem ser mais profundamente examinadas, a fim de elaborar um produto para ser colocado e vendido no mercado. Alguns destes pontos são:

- Pesquisar outras concentrações de quitosana – gelatina com fim comparativo;
- Realizar mais ensaios biológicos nomeadamente *in vivo*;
- Realizar estudos sobre o efeito da esterilização e biodegradação;
- Elaborar uma proposta de design de produto, quanto à questão semântica do curativo (forma), para sua melhor aderência à pele;
- Elaborar uma embalagem para o produto desenvolvido.

REFERÊNCIAS

BIGI, A.; COJAZZI, G.; PANZAVOLTA, S.; ROVERI, N.; RUBINI, K. **Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin.** *Biomaterials*, v.23, p. 4827-4832, 2002.

CHAUDRY, Z., ROCHA, J.L., PLEPIS, A. M. G., ROSSI, M., GOISSIS, G. **Preparação e caracterização de colágeno aniônico por hidrólise seletiva de grupos carboxamida internos.** *Polímeros*, v.7, pp. 40-46, 1997.

FOOK, A.C.B.M. **Desenvolvimento de arcabouços compostos hidroxiapatita-biopolímero para engenharia de tecidos.** 2012. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande. Campina Grande, 2012.

GENNISSON, L., BALDEWECK, T., TANTER, M., CATHELIN, S., FINK, M., L., S., CORNILLON, C., QUERLEUX, B. **Assessment of elastic parameters of human skin using dynamics elastography.** *IEEE Trans Ultrason Ferroelectr Freq Control*. p. 980–989, 2004.

LAUDAU, L., LEVICH, B., 1942. **Dragging of a liquid by a moving plate.** *Acta Physicochimica U.R.S.S.* 17 (1–2), 42–54.

LIEN, S.-M., KO, L.-Y., HUANG, T.-J. **Effect of crosslinking temperature on compression strength of gelatin scaffold for articular cartilage tissue engineering.** *Materials Science and Engineering C*, v.30, p. 631-635, 2010.

LIU, W.B. *et al.* **Influence of pH values on preparation of hydroxyapatite/gelatin composites.** *J. Mater. Sci.*, v.41, p. 1851-1853, 2006.

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

PEÑA, C D., CABA, K. ECEIZA, A. RUSECKAITE, R., MONDRAGON, I. **Enhancing water repellence and mechanical properties of gelatin films by tannin addition.** *Bioresource Technology*, v. 101, p. 6836–6842, 2010.

RUIZ-CARDONA, L.; SANZGIRI, Y.D.; BENEDETTI, L.M.; STELLA, V.J. e TOPP, E.M. **Application of benzyl hyaluronate membranes as potential wound dressings: evaluation of water vapour and gas permeabilities.** *Biomaterials*, v.17, n.16, p.1639-1643, 1996.

SAMPAIO, G. Y. H. **Desenvolvimento de arcabouços biodegradáveis para regeneração de tecidos cartilagosos.** Dissertação. 136p. Universidade Federal de Campina Grande, Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais. Campina Grande, 2012.

STAINSBY, G. Gelatin gels. In A. M. Pearson, T. R. Dutson, & A. J. Bailey (Eds.), **Advances in meat research, collagen as a food**. v. 4 (pp. 209 e 222). New York: Van Nostrand Reinhold Company Inc, 1987.

WAINSWRIGHT, F. W. **Physical tests for gelatin and gelatin products**. In A. G. Ward, & A. Coutts (Eds.), *The science and technology of gelatin* (pp. 507e534). New York: Academic Press, 1977.

WU, P.; FISHER, A.C.; FOO, P.P.; QUEEN, D. e GAYLOR, J.D.S. **In vitro assessment of water vapour transmission of synthetic wound dressings**. *Biomaterials*, v.16, n.3, p.171-175, 1995.

WU, Y-B.; YU, S-H.; MI, F-L.; WU, C-W.; SHYU, S-S.; PENG, C-K. e CHAO, A-C. **Preparation and characterization on mechanical and antibacterial properties of chitosana/cellulose blends**. *Carbohydrate Polymers*, v.57, p.435-440, 2004.