

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

Glauber de Sousa Moraes

DESENVOLVIMENTO DE TUBOS BIOABSORVÍVEIS DE GELATINA/QUITOSANA

Campina Grande – PB

2018

Glauber de Sousa Moraes

DESENVOLVIMENTO DE TUBOS BIOABSORVÍVEIS DE GELATINA/QUITOSANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Vinícius Lia Fook

Agência Financiadora: CAPES

Campina Grande – PB

2018

Ficha catalográfica

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECÁRIA SEVERINA SUELI DA SILVA OLIVEIRA CRB-15/225

M827d Moraes, Glauber de Sousa.
Desenvolvimento de tubos bioabsorvíveis de gelatina/quitosana /
Glauber de Sousa Moraes. – Campina Grande-PB, 2018.
72 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia,
2018.
"Orientação: Prof. Dr. Marcos Vinícius Lia Fook".
Referências.

1. Biopolímeros. 2. Biopolímeros – Gelatina e Quitosana.
3. Gelatina e Quitosana – Bioabsorção. 4. Gelatina e Quitosana –
Propriedades Mecânicas. I. Fook, Marcos Vinícius Lia Fook. II. Título.

CDU 678.7(043)

VITAE DO CANDIDATO

- Iniciação científica PIBIC/CNPq/UFPB (2002 – 2003)
- Estágio em engenharia de produção na Alpargatas S.A. (2004)
- Estágio em engenharia de produto na Braskem S.A. (2005)
- Engenheiro de Materiais pela UFCG (2006)
- Assistente Técnico na Inbra-Pack LTDA (2006 – 2012)
- Coordenador Técnico na Incoplast LTDA (2013)
- Assistente Técnico na Henkel LTDA (2014 – 2015)

Glauber de Sousa Moraes

DESENVOLVIMENTO DE TUBOS BIOABSORVÍVEIS DE GELATINA/QUITOSANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais como requisito parcial à obtenção do título de **Mestre em Ciência e Engenharia de Materiais**.

Aprovado em: 24/05/2018



Dr. Marcus Vinicius Lia Fook
Orientador
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG



Dr. Rossemberg Cardoso Barbosa
Examinador Externo
UAEMA/UFCG/PNPD/CAPES



Dr.ª Laura Hecker de Carvalho
Examinadora Interna
PPG-CEMat/UAEMa/UFCG

A Deus, força motriz do universo, que nos deu o dom da vida e do entendimento, a capacidade de se reconstruir, se reinventar, desafiar nossos medos e alcançar objetivos, na certeza que em todos esses momentos Ele esteve ao nosso lado.

DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Maria Solange de Sousa Moraes** e **Adelmar Fernando da Silva Moraes** pelo homem que sou, pelo apoio, amor e dedicação em todos os momentos da minha caminhada pela vida.

A minha família e amigos pelo companheirismo, amizade e incentivo, em especial ao meus avós **Severino Domingos de Sousa** e **Maria José da Silva** (in memoriam) que me ensinaram os primeiros valores.

A meu orientador, professor **Marcus Vinícius Lia Fook** pela confiança e apoio sem medida, além das palavras motivacionais e ensinamentos, sejam profissionais ou pessoais, sempre oportunos.

As professoras **Laura Hecker de Carvalho** e **Ana Cristina Figueiredo** pelo incentivo inicial quando retornei após doze anos afastado da academia com o intuito de ingressar nesta pós-graduação.

Aos pesquisadores **Rossemberg Cardoso Barbosa** e **Milena Costa da Silva** pelo compartilhamento de conhecimentos que foram essenciais para o êxito de nossa pesquisa.

A toda equipe do **CERTBIO**, parceiros de trabalho e amigos que me receberam tão honradamente, sempre dispostos ajudar de forma altruísta, com quais compartilhamos bons momentos e certamente terão minha admiração e amizade pelo resto da vida.

A **UFCG** e ao **PPG-CEMat** pela oportunidade facultada de cursar esta pós-graduação tão importante para minha carreira profissional.

A fundação **CAPES** pelo auxílio financeiro concedido neste período.

“Não há nada de nobre em sermos superiores ao próximo. A verdadeira nobreza consiste em sermos superiores ao que éramos antes”

Esopo

RESUMO

Biopolímeros como gelatina e quitosana têm se mostrado como matérias-primas importantes para diversas aplicações na medicina. O motivo principal se deve a singularidades como, disponibilidade, biocompatibilidade, bioatividade e bioabsorção. Essa pesquisa teve por objetivo desenvolver um método para produzir tubos à base de blendas gelatina/quitosana com possibilidade de controle de suas dimensões. Características e comportamentos físicos foram avaliados através de análises dimensionais, intumescimento, biodegradação, ensaios mecânicos por compressão, microscopia ótica e de varredura e termogravimetria. Três tipos de tubos foram produzidos através deste processo, possibilitando controle de suas dimensões, com variações médias menores que 5%. A biodegradação ocorreu inicialmente por dissolução parcial, seguida por mudanças químicas que resultaram em perdas de propriedades mecânicas e tendência ao amarelamento. Amostras avaliadas na presença de lisozima e fabricadas com adição de glicerina apresentaram melhores propriedades mecânicas e/ou estabilidade térmica. Tubos fabricados pelo processo de liofilização exibiram estrutura esponjosa lamelar com superfície rugosa. De forma geral, o processo desenvolvido se mostrou promissor para fabricação desses produtos, principalmente pela facilidade e baixo custo, flexibilidade de parâmetros e as possibilidades de aplicação.

Palavras-chave: Tubos. Gelatina. Quitosana. Bioabsorção. Propriedades mecânicas

ABSTRACT

Biopolymers such as gelatin and chitosan are important raw materials for various medical applications. The main reasons are their availability, biocompatibility, bioactivity and bioabsorption. This research aimed to develop a method to manufacture tubes based on gelatin/chitosan blends with controlled dimensions. Characteristics and physical behaviors were evaluated by swelling, biodegradation, mechanical compression tests, optical and scanning electron microscopy, and thermogravimetry. Three types of tubes were produced by this process with excellent dimension control, as their average variations in dimension were smaller than 5%. Biodegradation occurred initially by partial dissolution followed by chemical changes that resulted in decreased mechanical properties and tendency to yellowing. Samples evaluated in the presence of lysozyme and manufactures with glycerin displayed better mechanical properties or thermal stability. Tubes manufactured by lyophilization had lamellar spongy structures with a rough surface. In general, the process developed is promising for the manufacture of these products, mainly due to the easy processing and low cost, flexibility of parameters and the possibilities of application.

Keywords: Tubes. Gelatine. Chitosan. Bioabsorption. Mechanical properties

PUBLICAÇÕES

MORAES, G. S.; FOOK, M. V. L.; BARBOSA, R. C.; SILVA, M. C. **Método para obtenção de estruturas tubulares bioabsorvíveis à base de blendas gelatina-quitosana para aplicações em dispositivos médicos.** Patente depositada no INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Categoria: Processo. Natureza: Patente de invenção. Nº do pedido: BR 10 2018 006887 3. Protocolo: 870180027350. Data: 05/04/18. Depositante: Glauber de Sousa Moraes CPF:008.224.714-50. Publicado na RPI - Revista da Propriedade Industrial, nº 2467, p. 356, 2018.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(%Bd) - Índice de biodegradação

(%D) - Variação das dimensões

(%Int) - Grau de intumescimento

DTG - Derivada da TG

E - Módulo de elasticidade

ED - Diâmetro externo

GD - Grau de desacetilação

GQ - Blendas gelatina/quitosana

GRAS - Geralmente reconhecido como seguro (tradução)

ID - Diâmetro interno

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (tradução)

L - Comprimento

LIZ - Lisozima

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MM - Massa molecular

MO - Microscopia ótica

n - Número de amostras

nr – Não rompeu

PBS - Tampão fosfato-salino

PR - Parede do tubo

TF - Tubos flexíveis

TG - Termogravimetria

TP - Tubos porosos

TS - Tubos secos

TSa - TS intumescidos em água

UFCG - Universidade Federal de Campina Grande

X - Aumento em vezes

LISTA DE SÍMBOLOS

°C - Unidade de temperatura graus Celcius
g - Unidade de massa gramas
h - Unidade de tempo Horas
KDa - Unidade de massa molar Kilodalton
KHz - Unidade de frequência Kilohertz
KPa - Unidade de tensão mecânica Kilopascal
KV - Unidade de tensão elétrica Kilovolt
M - Concentração molar
min – Unidade de tempo Minutos
m/v - Concentração massa (g)/volume (mL)
mL - Unidade de volume Mililitros
mm - Unidade de comprimento Milímetros
N - Unidade de força Newton
nm - Unidade de comprimento Nanômetros
pH - Potencial hidrogeniônico
pI - Ponto isoelétrico
v/v - Concentração volume (mL)/volume (mL)
 ϵ - Razão de deflexão do ED
 ϵ_b - Deflexão na ruptura
 σ_y - Tensão de escoamento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Grupos hidrolisáveis de alguns biopolímeros.....	24
Figura 2 – Cristais tetragonais de lisozima.....	27
Figura 3 – Dois modos de bioabsorção dos polímeros	28
Figura 4 – Representação do formato espiral das cadeias- α de colágeno proporcionado pelas pontes de hidrogênio entre as ligações amino (NH) e carboxila (COOH), estruturas químicas das cadeias e dos seus principais aminoácidos.....	29
Figura 5 – Formação do tropocolágeno e estruturas fibrilares a partir das cadeias- α	29
Figura 6 – Mudança estrutural do colágeno para gelatina devido ao processo de desnaturação hidrolítica, e propriedade termoreversível da gelatina	31
Figura 7 – Pontes de hidrogênio formadas entre a água e aminoácidos constituintes das cadeias- α da gelatina	35
Figura 8 – Esquema da reação de N-desacetilação em meio alcalino para produção da quitosana a partir da quitina pela remoção dos grupos acetila.....	37
Figura 9 – Estrutura química da molécula de glicerol.....	40
Figura 10 – Representação da espessura da parede do tubo formada pelo tempo de reação ácido-base entre a amostra cilíndrica e a solução	44
Figura 11 – Fluxograma do processo para obtenção dos tubos GQ.....	45
Figura 12 – Identificação das dimensões medidas nos tubos	46
Figura 13 – Representação gráfica típica de uma curva de compressão lateral de um tubo	48
Figura 14 – Diagrama esquemático para a compressão lateral de um tubo	49
Figura 15 – Medidas da formação dimensional dos tubos GQ em função do tempo de reação de neutralização/coagulação, em NaOH 1M à 23°C	50
Figura 16 – Amostras de TS na sua forma final	52

Figura 17 – Amostras de TF na sua forma final	53
Figura 18 – Grau de intumescimento dos TS pelo tempo de imersão em PBS à 37°C	54
Figura 19 – Variação dimensional dos TS durante o intumescimento em PBS à 37°C	55
Figura 20 – Biodegradação e intumescimento dos TS em PBS à 37°C.....	56
Figura 21 – Biodegradação e intumescimento dos TS em PBS à 37°C, com a presença de lisozima (1,0 g/L)	56
Figura 22 – Tendência ao amarelamento ocasionada pelo tempo de biodegradação nos tubos GQ após secagem.....	57
Figura 23 – Mudança superficial das amostras intumescidas ocasionada pelo tempo de biodegradação. Aumento de 50X por MO	57
Figura 24 – Curvas típicas de compressão lateral de tubos para as amostras ensaiadas.....	59
Figura 25 – Curvas TG/DTG da amostra TS intumescida com água 24h. Taxa 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.....	60
Figura 26 – Curvas TG/DTG da amostra TF. Taxa 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.....	60
Figura 27 – Amostras de TP na sua forma final.	62
Figura 28 – Conformação física da secção de um TP observada por MO	63
Figura 29 – Conformação física da superfície lateral de um TP observada por MO e MEV	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de referência de algumas enzimas presentes no s�rum humano	25
Tabela 2 – Análise estatística das dimensões obtidas na fabrica�o de TS	52
Tabela 3 – Análise estatística das dimensões obtidas para os TS intumescidos (24h em PBS 37�C).....	52
Tabela 4 – Análise estatística das dimensões obtidas para os TF.....	53
Tabela 5 – Propriedades mecânicas dos TS intumescidos submetidos a biodegrada�o e dos TF	58

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	Biomateriais poliméricos	20
2.1.1	Polímeros bioabsorvíveis em dispositivos médicos.....	20
2.2	Biodegradação em ambientes biológicos	22
2.2.1	Biodegradação hidrolítica	23
2.2.2	Biodegradação enzimática	24
2.2.2.1	Lisozima	26
2.2.3	Bioabsorção de polímeros	27
2.3	Gelatina	28
2.3.1	Colágeno como matéria-prima da gelatina	28
2.3.2	Produção da gelatina	30
2.3.2.1	Pré-tratamento ácido	32
2.3.2.2	Pré-tratamento alcalino	32
2.3.2.3	Extração e processamento finais	32
2.3.3	Propriedades da gelatina	33
2.3.3.1	Composição e características anfotéricas	33
2.3.3.2	Solubilidade e características gerais	34
2.3.3.3	Formação do gel termorreversível	34
2.3.3.4	Conservação e vida útil	35
2.3.3.5	Características e aplicações biomédicas.....	36
2.4	Quitosana	36
2.4.1	Produção da quitosana	37
2.4.2	Propriedades da quitosana	38
2.4.2.1	Grau de desacetilação e Massa molar	38

2.5	Blendas Gelatina/Quitosana	39
2.6	Plastificantes	39
2.6.1	Plastificantes em biopolímeros.....	40
2.6.1.1	Glicerol	40
2.7	Estado da arte	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1	Materiais	43
3.2	Metodologia	43
3.2.1	Preparação das amostras	44
3.2.2	Caracterização das amostras	45
3.2.2.1	Dimensionamento	46
3.2.2.2	Intumescimento ou absorção de umidade	46
3.2.2.3	Biodegradação	47
3.2.2.4	Propriedades mecânicas	47
3.2.2.7	Termogravimetria (TG)	49
3.2.2.8	Microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV)	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES PARCIAIS.....	50
4.1	Cinética da reação de neutralização/coagulação	50
4.2	Dimensionamento	51
4.3	Intumescimento	54
4.4	Biodegradação	55
4.5	Propriedades mecânicas	58
4.6	Análise termogravimétrica	59
4.7	Análise estrutural por microscopia	61
5	CONCLUSÃO	65
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

1 INTRODUÇÃO

Polímeros bioabsorvíveis têm sido alvo de inúmeros estudos que visam sua utilização no campo da medicina. A razão deste crescente interesse é basicamente seu suporte inicial seguido de sua total dissipação, característica importante quando se trata de dispositivos de liberação controlada de medicamentos ou na regeneração de tecidos, já que não necessitam de reintervenção cirúrgica para removê-los quando não mais necessários (Domb et al., 1997; Reis e Román, 2005). Outra vantagem é que sua biodegradabilidade pode contornar alguns dos problemas relacionados com a segurança a longo prazo de dispositivos permanentes, tais como respostas imunológicas, inflamações ou trombos. No entanto, há uma preocupação potencial relacionada com a biocompatibilidade e a toxicidade dos produtos gerados na sua degradação (Ratner et al., 2004).

Pertencentes a classe dos polímeros de origem natural (biopolímeros), a gelatina e a quitosana ganharam espaço em aplicações como materiais bioabsorvíveis (Domb et al., 1997; Ratner et al., 2004).

A gelatina é uma proteína obtida pela hidrólise parcial do colágeno, principal componente da pele, ossos, couro e dos tecidos conjuntivos dos animais (Domb et al., 1997). Como biomaterial, possui muitas propriedades atraentes, tais como: biocompatibilidade, baixa imunogenicidade, promotor de adesão e crescimento celular, além de sua abundância e baixo custo. Dentre diversas aplicações, é usada em cápsulas de fármacos, peles artificiais, agente hemostático, regeneração de nervos e enxertos ósseos. Sua principal limitação é a rápida dissolução em meios aquosos (Ratner et al., 2004; Kim et al., 2005; Chiono et al., 2007; Pulieri et al., 2008).

A quitosana é um biopolímero produzido a partir da desacetilação da quitina, o polissacarídeo natural de maior abundância na natureza depois da celulose, extraído de crustáceos, insetos e certos fungos. Suas características singulares como, biocompatibilidade, bioabsorção, atoxicidade, analgésica, antitumoral, hemostática, hipocolesterolêmica, antimicrobianas e antioxidantes, a tornam um material de alto interesse nos campos biomédico e farmacêutico. Desta forma, tem sido utilizada numa vasta gama de aplicações, incluindo carreadores de fármacos, agentes de cicatrização e regeneração de tecidos (Kim, 2014).

No entanto, como natural de um polissacarídeo, a quitosana não funde ou amolece quando submetida ao aquecimento, ao invés disso se carboniza, como

também não é facilmente dissolvida em solventes comuns, e tem apenas uma solubilidade limitada em soluções ácidas, o que inviabiliza seu processamento através dos métodos convencionais para polímeros, como extrusão, injeção, expansão de espumas ou impressão tridimensional (Wang et al., 2005).

Devido às características anteriormente citadas, a combinação da gelatina com a quitosana pode ter efeitos sinérgicos para as características finais, principalmente com o melhoramento das propriedades mecânicas e de solubilidade (Cheng et al., 2003). Essas blendas têm sido utilizadas e estudadas para algumas áreas específicas, como carreamento de fármacos, fios de sutura, curativos, medicina regenerativa e engenharia de tecidos (Cheng et al., 2003; Kim et al., 2005; Pulieri et al., 2008; Oryan et al., 2016; Wang et al., 2016; Badhe et al., 2017).

Tubos à base de quitosana e seus compósitos vem sendo alvo de alguns estudos nas últimas décadas (Itoh et al., 2003; Wang et al., 2006; Patel et al., 2008; Rothwell et al., 2008; Wang et al., 2008; Chen et al., 2009; Gegel et al., 2014; Badhe et al., 2017). Entretanto, são poucos os trabalhos que diretamente trataram da produção e avaliação de tubos a partir de blendas gelatina/quitosana. Portanto estudos adicionais são necessários para ampliar os conhecimentos sobre esses produtos.

Considerando a comum aplicação de dispositivos tubulares na medicina, como por exemplo em cateteres, drenos, sondas uretrais, cânulas de traqueostomia, tubos de timpanotomia, endopróteses vasculares (*stents*) ou ainda como suportes para crescimento celular (*scaffolds*) na engenharia de tecidos e medicina regenerativa (Cesaretti e Saad, 2002; Basu e Ludlow, 2011; Saksena et al., 2016; Battiston et al., 2017), este trabalho teve por objetivo desenvolver um novo processo para obtenção de tubos à base de blendas gelatina/quitosana, com a possibilidade de controle de suas dimensões. Para tanto foram utilizadas formulações pré-definidas e avaliadas suas características físico-químicas, comportamento mecânico e de biodegradação, com a finalidade de viabilizar aplicações em dispositivos médicos ou na medicina regenerativa.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biomateriais poliméricos

Biomateriais são definidos como materiais sintéticos ou naturais que podem ser utilizados em contato com sistemas biológicos sem causar reações adversas. Podem ser de origem metálica, cerâmica, polimérica ou de compósitos (Ratner *et al.*, 2004).

Biomateriais poliméricos podem ser divididos em dois grupos: bioestáveis ou bioabsorvíveis. Polímeros bioestáveis devem manter suas características por anos ou décadas causando repostas mínimas aos tecidos circundantes. Eles tem sido utilizados como materiais constituintes em órgãos artificiais, implantes e em dispositivos médicos descartáveis. Típicos polímeros bioestáveis são, por exemplo, polietileno (PE), polipropileno (PP), poli(metacrilato de metila) (PMMA), polioximetileno (POM) e poliéter-éter-cetona (PEEK). No entanto, há casos em que os tecidos necessitam apenas da presença temporária do polímero como suporte para seu aumento, substituição ou para guiar sua regeneração. Nestes casos, os polímeros bioabsorvíveis aparecem como melhor alternativa, por exemplo, em fios de sutura, dispositivos de fixação de fraturas ósseas, guias de ligamentos, tendões ou nervos, *stents* urológicos ou cardiovasculares, *scaffolds*, etc. Típicos polímeros bioabsorvíveis são, por exemplo, a gelatina, a quitosana, o polihidroxibutirato (PHB), o poli(ácido láctico) (PLA) e o poli(ácido glicólico) (PGA) (Tormala *et al.*, 1998).

O principal problema para seleção de materiais com estas finalidades está relacionado às reações de corpo estranho com o organismo, seja a longo ou curto prazo. Apesar de inertes, os polímeros bioestáveis podem apresentar deterioração oxidativa, resultando em inflamações, da mesma maneira os oligômeros e monômeros gerados na biodegradação dos polímeros bioabsorvíveis (Suzuki e Ikada, 2012).

2.1.1 Polímeros bioabsorvíveis em dispositivos médicos

Biologicamente, quando um dispositivo é implantado num organismo ocorre uma série de eventos. O tecido lesionado é acompanhado por uma reação de inflamação que atrai células fagocitantes como macrófagos e monócitos para a localização do implante. Posteriormente, ocorre o processo de cicatrização, que se

caracteriza pela proliferação de células endoteliais e fibroblastos. Como alternativa à cicatrização pode ocorrer a formação de granulomas, provenientes das reações de corpo estranho, onde os macrófagos cobrem a superfície do material seguido do encapsulamento com fibroblastos referentes à fibrose (Domb *et al.*, 1997).

Como mencionado anteriormente, dispositivos à base de polímeros bioabsorvíveis permanecem implantados num organismo enquanto são funcionais, sendo biologicamente consumidos durante este período, e tornando desnecessária uma nova intervenção cirúrgica para sua remoção após a reparação da disfunção. Podem auxiliar na cura quando utilizados como carreadores de fármacos, além de permitir a interação e crescimento celular na estrutura em degradação. Apesar destas vantagens, esses materiais ainda não são extensivamente usados em procedimentos médicos. O principal obstáculo é a difícil compreensão das características da degradação, como, cinética, evolução das propriedades mecânicas e identificação de produtos liberados. Sendo estas cruciais na seleção e concepção de materiais para aplicações específicas, uma vez que o processo de degradação pode afetar uma série de eventos como o crescimento celular, regeneração de tecido, liberação do fármaco, resposta do hospedeiro e a própria função do material (Reis e Román, 2005; Suzuki e Ikada, 2012).

Para casos de regeneração de tecidos, por exemplo, o maior desafio está relacionado em encontrar a equivalência entre a taxa de regeneração e a taxa de bioabsorção do dispositivo. Caso o material se degrade prematuramente, a regeneração será comprometida. Em contrapartida, um material residual poderá interferir na fisiologia do tecido. Além disso, as propriedades mecânicas do dispositivo devem ser suficientes para suportar o tecido durante o período de regeneração. Estas características se tornam ainda mais complexas quando se leva em consideração a diferente capacidade de regeneração de cada indivíduo. Outro problema é a possível toxicidade dos produtos liberados durante a degradação do polímero (Reis e Román, 2005; Suzuki e Ikada, 2012).

O uso destes dispositivos é regulado e, no caso dos materiais bioabsorvíveis, a segurança dos metabolitos liberados deve ser testada cuidadosamente. Além disso, deve haver cuidados durante a fabricação e o armazenamento de polímeros hidrolisáveis para evitar sua degradação precoce devido à exposição à umidade. Outro ponto que requer atenção é a esterilização, pois em algumas situações pode

interferir nas características dos materiais (Reis e Román, 2005; Suzuki e Ikada, 2012).

2.2 Biodegradação em ambientes biológicos

Apesar de ser comumente utilizada como referência a materiais que se degradam rapidamente com a ação do meio ambiente, biodegradação é tecnicamente definida como a cisão química dos materiais pela ação natural de microrganismos vivos, seguida de mudanças nas suas propriedades físico-químicas (De_Paoli, 2009).

Três termos diferentes são utilizados para indicar que um determinado material ou dispositivo desaparecerá depois de ter sido introduzido num organismo vivo, são eles: biodegradação, bioerosão, bioabsorção. No entanto, na literatura não há distinções claras no sentido desses termos. De maneira geral, o termo bio-“degradação” é usado como referência ao processo químico de cisão de cadeias, bio-“erosão” à perda de massa do material, e bio-“absorção” quando os produtos gerados durante a degradação são absorvidos como nutriente para o organismo (Domb *et al.*, 1997; Ratner *et al.*, 2004).

O ambiente biológico é surpreendentemente agressivo e pode levar a uma deterioração rápida ou gradual de muitos materiais. Aparentemente, pode se pensar que o pH neutro, o baixo teor de sais e a temperatura moderada do corpo constituem um ambiente ténue. No entanto ele possui muitos mecanismos especializados que evoluíram ao longo de milênios para livrar o organismo vivo de substâncias estranhas invasoras e que agora atacam os biomateriais contemporâneos. Neste cenário, os materiais expostos aos fluidos corporais podem sofrer alterações nas suas propriedades físico-químicas como resultado de interações químicas, físicas, mecânicas e biológicas entre o material e o ambiente circundante. Isto ocorre em um meio aquoso e iônico que pode ser eletroquimicamente ativo para metais e plastificante para polímeros. Quando um corpo estranho entra em contato com um sistema biológico estes mecanismos especiais são invocados. Proteínas se adsorvem ao material e podem aumentar a taxa de corrosão, células secretam poderosos agentes oxidantes e enzimas que são direcionadas para digerir o material (Ratner *et al.*, 2004; Reis e Román, 2005).

Tanto polímeros naturais como sintéticos podem ser degradados em ambientes biológicos. Os polímeros naturais incluem polipeptídeos e polissacarídeos,

enquanto a maioria dos sintéticos são poliésteres α -alifáticos. Polímeros bioabsorvíveis num ambiente biológico geralmente se degradam por hidrólise. Para entender esse mecanismo, algumas características devem ser consideradas, por exemplo, o microfibrilamento (*crazing*), fissuras associadas ao tensionamento, que podem expandir a área superficial promovendo reações químicas; o intumescimento e a absorção de água, que podem igualmente aumentar o número de sítios reativos pela introdução de grupos funcionais hidrolisáveis na cadeia polimérica, os quais geram mais espécies hidrofílicas levando ao inchamento e facilitando a entrada de compostos degradantes para o interior do polímero; produtos de degradação podem alterar o pH local estimulando reações adicionais e fissuras podem servir como locais de iniciação para calcificações (Ratner *et al.*, 2004; Suzuki e Ikada, 2012).

2.2.1 Biodegradação hidrolítica

Hidrólise é a quebra molecular de grupos funcionais suscetíveis à reações com a água. A palavra é derivada do grego: *hidro-* (água) e *-lise* (quebra). Pode ser catalisada por ácidos, bases, sais ou enzimas (The_Balance, 2018).

A susceptibilidade de um polímero à hidrólise é o resultado de sua estrutura química, morfologia, dimensões e o ambiente no qual está submetido. Basicamente, os biomateriais poliméricos hidrolisáveis têm ligados à sua cadeia principal grupos funcionais carbonila (C=O) e elementos como oxigênio (O), nitrogênio (N) e enxofre (S). Exemplos incluem ésteres, amidas, uretanos, carbonatos e anidridos (Ratner *et al.*, 2004). A Figura 1 apresenta de forma esquemática como ocorrem essas reações.

Esses grupos funcionais podem exibir diferentes taxas de degradação, que dependem das suas propriedades intrínsecas e de outras características moleculares e morfológicas. A taxa de hidrólise tende a aumentar com, uma alta proporção de grupos hidrolisáveis na cadeia polimérica, grupos polares hidrofílicos, baixa cristalinidade, ausência ou baixa densidade de ligações cruzadas, aumento da área superficial, pH do meio e tensões mecânicas (Domb *et al.*, 1997; Ratner *et al.*, 2004).

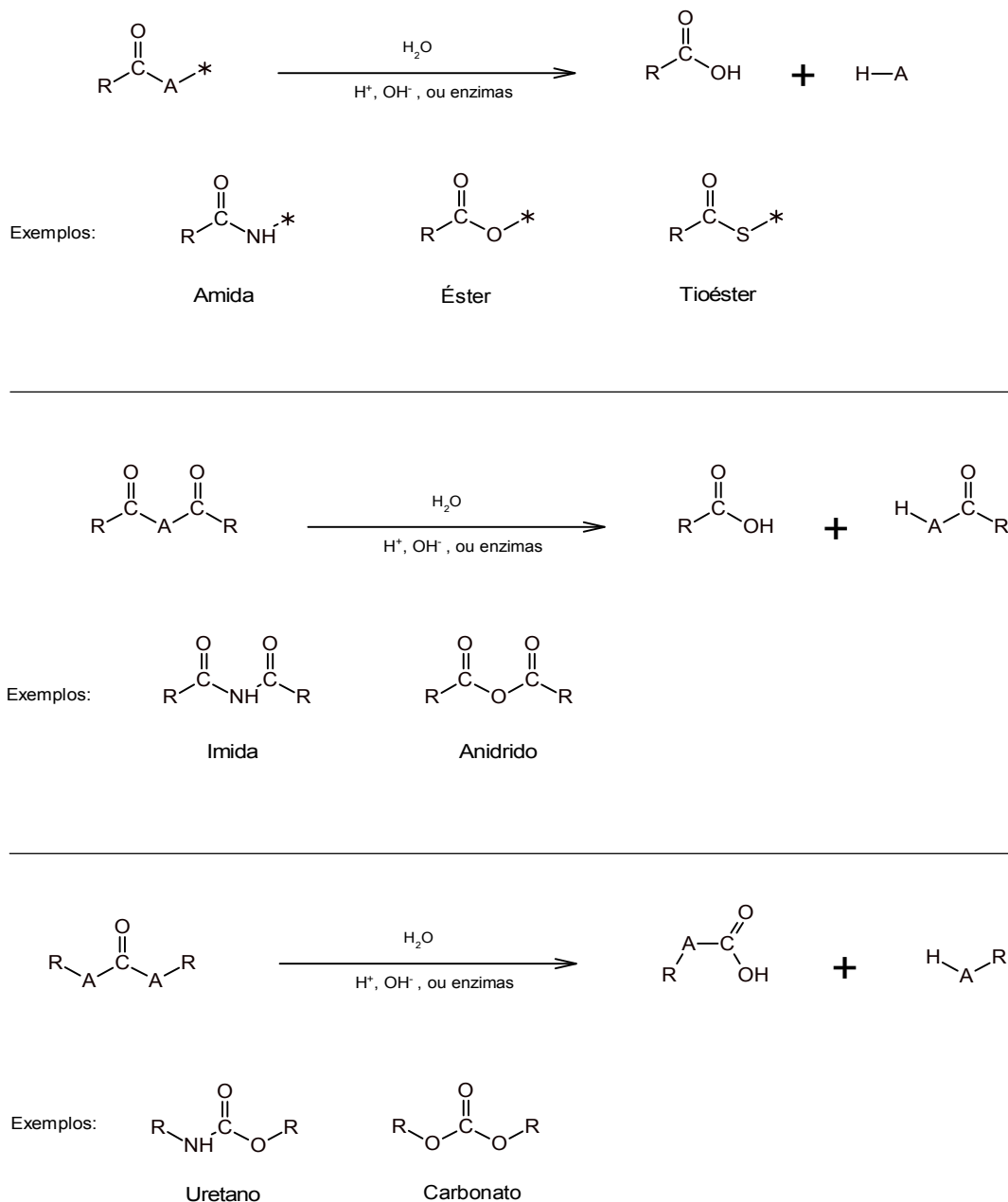


Figura 1 – Grupos hidrolisáveis de alguns biopolímeros. Adaptada de (Ratner *et al.*, 2004).

2.2.2 Biodegradação enzimática

Enzimas são catalisadores biológicos, ou seja, elas aceleram as reações nos organismos vivos sem alterá-los. Na verdade, na ausência de enzimas, a maioria das reações do metabolismo celular não ocorreria (Reis e Román, 2005).

As reações de hidrólise podem ser catalisadas por enzimas conhecidas como hidrolases, que incluem proteases, esterases, glicosidases e fosfatases, dentre outras. Elas são proteínas derivadas de células, que atuam como catalisadores altamente específicos para a cisão de grupos funcionais susceptíveis à água. São responsáveis pela catálise de várias reações no corpo humano. Por exemplo, as enzimas hidrolíticas que estão presentes na membrana e no lúmen do trato gastrointestinal e no epitélio tubular dos rins, onde asseguram a hidrólise eficiente de diferentes substratos para facilitar a absorção de nutrientes e solutos (Reis e Román, 2005).

As enzimas presentes no *sérum* humano podem ser divididas em duas categorias: específicas do plasma e não específicas do plasma. As primeiras são enzimas cuja função normal está relacionada à coagulação do sangue, à ativação complementar e ao metabolismo das lipoproteínas. As últimas são enzimas que não têm função fisiológica no plasma, cujos cofatores ou mesmo substratos não estão normalmente presentes no plasma. Esta categoria inclui enzimas que são segregadas por tecidos, por exemplo, amilase, lipase, fosfatases, e também enzimas associadas ao metabolismo celular. A Tabela 1 apresenta a concentração de referência para algumas enzimas presentes no *sérum* humano. Elas podem desempenhar um papel importante na degradação dos biomateriais catalisando sua hidrólise (Reis e Román, 2005).

Tabela 1 – Concentrações de referência de algumas enzimas presentes no *sérum* humano.

Enzima	Concentração
Lisozima	4 – 13 mg/L
α -amilase	46 – 244 U/L
Lipase	30 – 190 U/L
Fosfatase alcalina óssea	11 mg/L

Fonte: Reis e Román (2005)

A hidrólise enzimática de biopolímeros é um processo heterogêneo que é afetado pelo modo de interação entre as enzimas e as cadeias poliméricas, isto envolve tipicamente quatro etapas:

- (1) Difusão da enzima em solução para a superfície sólida;
- (2) Adsorção da enzima no substrato, resultando na formação do complexo enzima-substrato;
- (3) Catálise da reação de hidrólise;
- (4) Difusão dos produtos de degradação do substrato solubilizado para solução (Reis e Román, 2005).

A adsorção e a velocidade de reação são afetadas pelas propriedades físico-químicas do substrato, como, massa molar, composição, cristalinidade, área superficial, e também pelas características inerentes da enzima, tais como, atividade, estabilidade, concentração local, composição de aminoácidos e conformação estrutural. Também é muito importante levar em consideração as condições de pH e temperatura, pois influenciam tanto as propriedades do substrato quanto da enzima. As características químicas dos polímeros, como, reticulação e copolimerização também afetam a velocidade de degradação enzimática, uma vez que essas características podem comprometer interação da enzima com o substrato (Reis e Román, 2005).

2.2.2.1 Lisozima

A lisozima é uma N-acetil muramoil hidrolase de peptidoglicano (E.C 3.2.1.17) também conhecida como muramidase. É uma enzima que faz parte do sistema imunológico dos animais, atacando peptidoglicanos presentes nas paredes celulares das bactérias, especialmente as gram-positivas, como também auxiliando na hidrólise de ligações glicosídicas em açúcares complexos. É abundante em secreções, incluindo, lágrimas, saliva, leite materno e muco, em concentrações que variam de 4 a 13 mg/L no *sérum* e 450 a 1230 mg/L na lágrima. Pode ser encontrada em grandes quantidades na clara de ovos. Sua cristalização gera cristais perfeitos de estrutura tetragonal (Figura 2) (Nordtveit *et al.*, 1996; Masschalck e Michiels, 2003; Wikipedia_Lyzosyme, 2018).

É a principal enzima envolvida na biodegradação dos derivados da quitina, com a capacidade de romper suas ligações glicosídicas por hidrólise das frações acetiladas da cadeia (Nordtveit *et al.*, 1996; Laranjeira e Fávere, 2009).

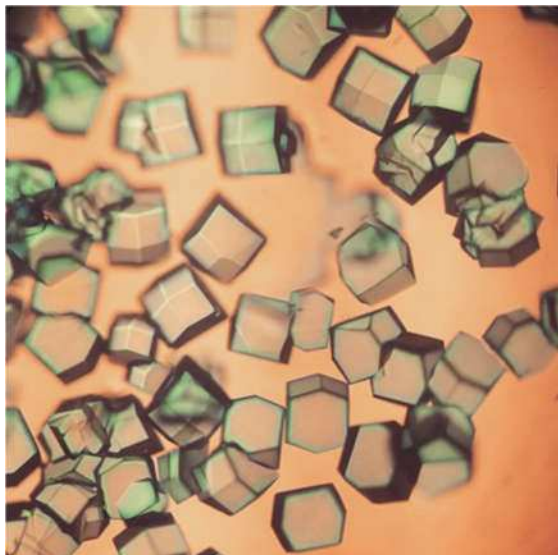


Figura 2 – Cristais tetragonais de lisozima. Adaptada de (Wikipedia_Lyzosyme, 2018).

Relacionado à gelatina, diversos trabalhos a apresentaram como carreador de lisozima em sistemas de liberação controlada (Kuijpers *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2008; Dekina *et al.*, 2016). Bower *et al.* (2006) estudaram o efeito da aditivação de lisozima em géis e filmes de gelatina para fins alimentícios. Os resultados mostraram algumas mudanças em propriedades como transparência e força do gel, além do aumento da vida útil do alimento provocado pelas características antibacterianas da lisozima.

2.2.3 Bioabsorção de polímeros

Existem dois grupos de polímeros bioabsorvíveis, um degradável e o outro solúvel (Suzuki e Ikada, 2012). A Figura 3 esquematiza os mecanismos moleculares de bioabsorção polimérica.

O termo degradável não significa necessariamente que serão bioabsorvidos via hidrólise enzimática. A hidrólise físico-química de um polímero num pH neutro sem a contribuição de enzimas também pode resultar em degradação, tal como ocorre com o PLA e o PGA. Por outro lado, os solúveis são bioabsorvidos sem degradação como resultado da sua dissolução em meio aquoso. Isso indica que os polímeros originais deste grupo devem ser bastante solúveis em água em pH 7,4 e 37°C, que são as condições normais do corpo humano (Suzuki e Ikada, 2012).

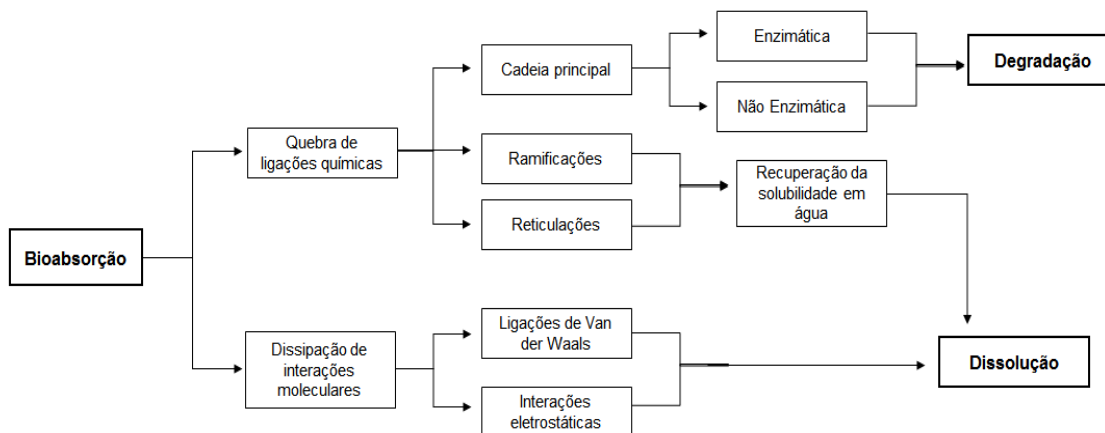


Figura 3 – Dois modos de bioabsorção dos polímeros. Adaptada de (Suzuki e Ikada, 2012).

2.3 Gelatina

A gelatina é um polipeptídeo derivado da desnaturação proteica do colágeno através de uma hidrólise térmica parcial. É um biopolímero biodegradável de ampla aplicação industrial, farmacêutica, alimentícia e biomédica (Gme, 2018; Gmia, 2018).

2.3.1 Colágeno como matéria-prima da gelatina

O colágeno é a proteína mais comum encontrada nos animais, representando cerca de 30% da proteína total presente nos seus corpos. É o principal componente dos tecidos conjuntivos, como a pele, ossos, cartilagens, tendões e vasos sanguíneos. É sintetizado pelos fibroblastos, que são células do tecido conjuntivo responsáveis pela produção e regeneração tecidual (Gorgieva e Kokol, 2011).

A estrutura primária do colágeno é composta por aminoácidos regularmente ordenados constituindo cadeias *alfa* (α) polipeptídicas espirais. Apesar de inúmeras variantes, a sequência básica é geralmente glicina/prolina/hidroxiprolina (Figura 4) (Paul e Bailey, 2003).

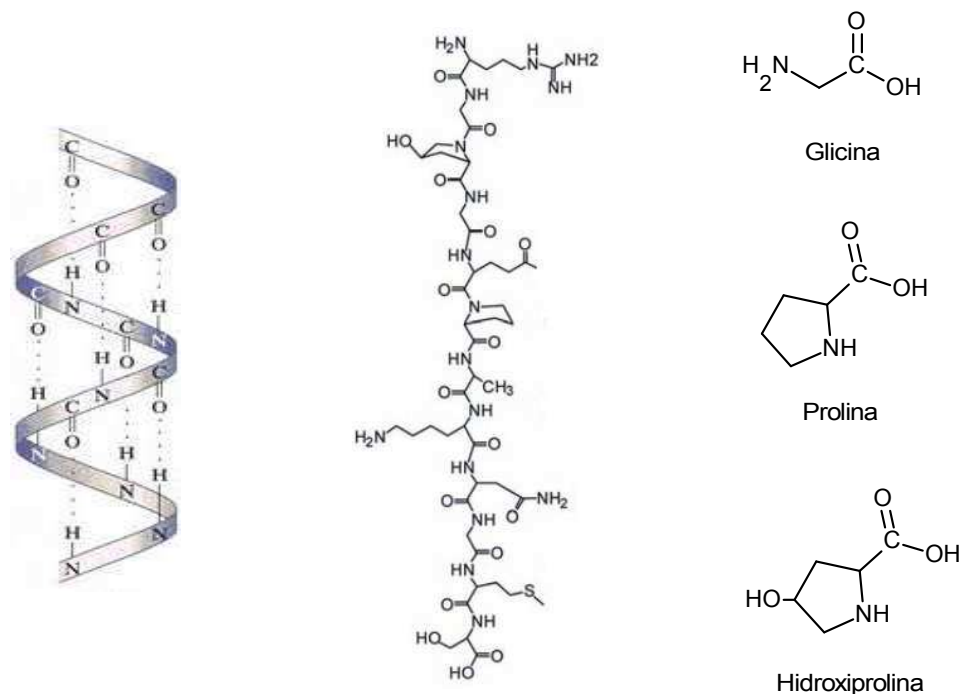


Figura 4 – Representação do formato espiral das cadeias- α de colágeno proporcionado pelas pontes de hidrogênio entre as ligações amino (NH) e carboxila (COOH), estruturas químicas das cadeias e dos seus principais aminoácidos. (Editada pelo autor).

As moléculas de colágeno são formadas por triplas hélices de cadeias- α , também conhecidas como tropocolágenos. Esses se organizam entre si, através de ligações cruzadas, formando estruturas fibrilares de maiores dimensões (Paul e Bailey, 2003). A Figuras 5 representa estrutura do tropocolágeno e a conformação das fibras.

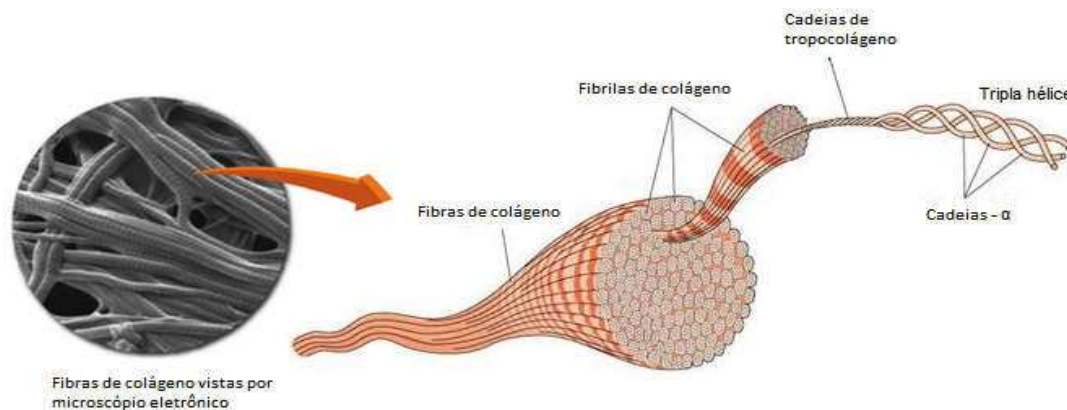


Figura 5 – Formação do tropocolágeno e estruturas fibrilares a partir das cadeias- α . (Editada pelo autor).

Foram identificados e descritos 29 tipos de colágeno. Os cinco mais comuns e suas origens são:

- Tipo I: pele, tendão, ligadura vascular, órgãos, ossos (componente principal da parte orgânica do osso);
- Tipo II: cartilagens (componente principal da cartilagem);
- Tipo III: reticulado (componente principal das fibras reticulares), comumente encontrado ao lado do tipo I;
- Tipo IV: forma a lâmina basal;
- Tipo V: superfícies celulares, cabelo e placenta (Ratner *et al.*, 2004)

Mais de 90% do colágeno no corpo humano é do Tipo I. No entanto, na formação de tecido cicatricial, como resultado da idade ou lesões, há uma alteração na proporção entre colágeno Tipo I e III (Ratner *et al.*, 2004; Gorgieva e Kokol, 2011).

Assim como a gelatina, o colágeno também possui características importantes para seu uso como biomaterial. É facilmente isolado e purificado, abundante, tem propriedades estruturais, físicas, químicas e imunológicas bem conhecidas, é bioabsorvível, biocompatível, não citotóxico, permite suporte ao crescimento celular e pode ser processado numa ampla variedade de formas. Sendo utilizado na medicina, como agente hemostático, curativos, sistemas carreadores de fármacos, em cirurgias plásticas, regeneração de nervos, dentre outras (Lee *et al.*, 2001).

A gelatina tem praticamente a mesma composição química do colágeno, uma vez que ele é sua matéria-prima fundamental. A diferença básica é que o colágeno possui uma estrutura química predominantemente cristalina, enquanto a da gelatina é amorfa. Enquanto a gelatina é facilmente dissolvida em água aquecida e possui a capacidade de formar géis termorreversíveis (Figura 6), o colágeno é insolúvel e nas mesmas condições simplesmente encolhe e perde sua capacidade de absorver água (Phillips e Williams, 2009; Gorgieva e Kokol, 2011).

2.3.2 Produção da gelatina

A gelatina na sua conformação usual não é encontrada naturalmente no meio-ambiente. Como mencionado anteriormente, ela é originada de um processo de desnaturação do colágeno via hidrólise térmica (Gme, 2018; Gmia, 2018).

A conversão hidrolítica de colágeno em gelatina produz moléculas de vários tamanhos. Portanto, a gelatina é uma mistura de frações de cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas para formar polímeros de massa molecular que varia entre 15.000 a 400.000 g/mol. A Figura 6 também mostra a mudança da conformação estrutural do colágeno para produção da gelatina (Gmia, 2018).

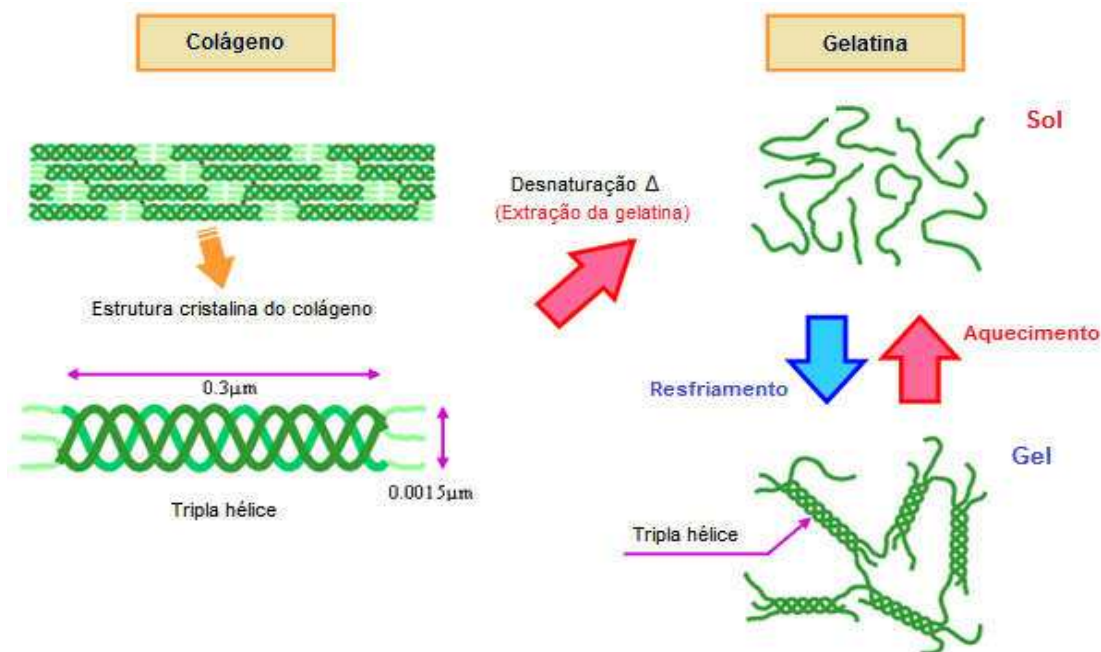


Figura 6 – Mudança estrutural do colágeno para gelatina devido ao processo de desnaturação hidrolítica, e propriedade termoreversível da gelatina. (Editada pelo autor).

Apesar das diversas formas de colágeno, a gelatina é derivada apenas de fontes ricas em colágeno Tipo I, que geralmente não contém o aminoácido cisteína. Industrialmente as principais matérias-primas são ossos de gado, peles de gado e de suínos. Fontes alternativas incluem aves e peixes (Gme, 2018; Gmia, 2018).

Iniciando-se o processo, substâncias não desejadas, tais como minerais (do ossos), gorduras e albuminoides (das peles), são removidas química e fisicamente para purificar o colágeno. Logo após, dois diferentes métodos de pré-tratamento (ácido e alcalino) podem ser aplicados dependendo da origem da matéria-prima e a sua utilização final (Gme, 2018; Gmia, 2018).

2.3.2.1 Pré-tratamento ácido

O pré-tratamento ácido é preferencialmente usado em peles de suínos, e peixes, e dá origem a gelatinas do Tipo A. Nesse processo, a matéria-prima já purificada é imersa numa solução ácida fria (pH 1,5 – 3,0) por várias horas, até ocorrer o seu inchamento máximo. Os ácidos hidrocloreto e sulfúrico são os mais utilizados. Durante esse tratamento a desnaturação do colágeno é condicionada à hidrólise térmica das ligações peptídicas, e apenas uma pequena quantidade de material é solubilizado. O ácido então é drenado e o material é lavado várias vezes com água fria. O material resultante segue para extração da gelatina com água aquecida (Phillips e Williams, 2009).

2.3.2.2 Pré-tratamento alcalino

O pré-tratamento alcalino é usado para produção das gelatinas Tipo B. Ossos e couro de gado são as principais matérias-primas. Nesse processo, o material é imerso numa solução aquosa alcalina (pH 12) à temperatura ambiente por várias semanas. As bases hidróxido de sódio e de cálcio são as mais usadas. Durante o processamento, o álcali quebra uma das ligações cruzadas iniciais do colágeno (piridinolina), e como resultado, ao aquecê-lo ocorre a liberação de cadeias- α desnaturadas. Porém, a presença ligações cruzadas de pentosidina limita o processo de desnaturação por hidrólise térmica das ligações peptídicas. Após esse condicionamento o material é lavado várias vezes, tem o pH ajustado e segue para a extração da gelatina em água aquecida (Phillips e Williams, 2009).

2.3.2.3 Extração e processamentos finais

Como já descrito, para se extrair a gelatina do material pré-tratado é necessário banhá-lo em água aquecida, catalisando desta forma as reações hidrolíticas. Tempo, temperatura e o número de extrações variam, dependendo das necessidades do produto, tipo de equipamento e do custo (Gme, 2018; Gmia, 2018).

Os procedimentos de extração influenciam na qualidade e quantidade do produto gerado, e embora a extração contínua seja usada por alguns processadores,

a maioria dos métodos ainda empregam frações de pequenos lotes (Gme, 2018; Gmia, 2018).

A extração é normalmente realizada em recipientes de aço inoxidável equipados com aquecedores e controle de temperatura. O número de extrações varia entre 3 e 6. A primeira extração geralmente ocorre de 50 a 60°C, sendo feitas extrações subsequentes com sucessivos aumentos de temperatura de 5 a 10°C. A extração final é realizada perto do ponto de ebulição. Após isso, os extratos são mantidos separados, analisados e subsequentemente misturados para atender às diversas especificações. A extração inicial geralmente fornece um produto de qualidade superior em comparação com as extrações subsequentes. Os produtos das primeiras extrações possuem massas molares mais elevadas, maior viscosidade, maior resistência do gel e cor mais clara (Gme, 2018; Gmia, 2018).

As soluções diluídas de gelatina provenientes das várias extrações são então, filtradas, deionizadas e concentradas por filtração em membrana de fluxo cruzado (*cross-flow filtration*) e/ou evaporação à vácuo. A gelatina é então arrefecida e cortada em tiras ou extrusada como macarrão, e depositada numa esteira circulante, que passa através de uma estufa de secagem com temperaturas variando de 30 a 70°C. O tempo de secagem varia entre 1 e 5 horas, dependendo da qualidade e concentração do material, e a taxa de secagem é cuidadosamente controlada para evitar sua fusão ou endurecimento. A gelatina deixa o secador com um teor de umidade de aproximadamente 10%. O produto é então quebrado em pedaços que são triturados no tamanho de partícula requerido. A gelatina seca é testada de acordo com as normas estabelecidas (Gme, 2018; Gmia, 2018).

2.3.3 Propriedades da gelatina

2.3.3.1 Composição e características anfotéricas

A gelatina, em termos de composição elementar tem 50,5% de carbono, 6,8% de hidrogênio, 17,0% de nitrogênio e 25,2% de oxigênio. Em sua forma seca consiste de 98 a 99% de proteína. Os aminoácidos predominantes são glicina (26-34%), prolina (10-18%) e hidroxiprolina (7-15%). Outros aminoácidos significativos incluem: alanina (8-11%); arginina (8-9%); ácido aspártico (6-7%) e ácido glutâmico (10-12%) (Schrieber e Gareis, 2007).

As cargas presentes na molécula de gelatina e seu ponto isoelétrico (pI) são principalmente decorrentes dos grupos carboxila, amino e guanidino nas cadeias laterais, que promovem propriedades anfotéricas. A gelatina de Tipo A tem 78 – 80 mol⁻⁶ de grupos carboxila livres por 100 g de proteína e um pI de 7,0 – 9,0. A do Tipo B tem 100 – 115 mol⁻⁶ de grupos carboxila livres por 100 g de proteína e um pI de 4,7 – 5,2. O pH de uma solução com 1,5% à 25°C é de 3,8 – 5,5 para o Tipo A, e 5,0 – 7,5 para Tipo B (Gmia, 2018; Sigma_Aldrich, 2018).

2.3.3.2 Solubilidade e características gerais

A gelatina seca é praticamente insípida e inodora, frágil e de cor levemente amarelada. Tem uma densidade relativa de 1,3 – 1,4 g/cm³. Quando suas partículas são imersas em água fria, intumescem discretamente, e ao serem aquecidas, se hidratam e se dissolvem para formar uma solução. Esse é o principal método de preparação de soluções, especialmente quando são desejadas altas concentrações. Ela também é solúvel em álcoois poli-hídricos como glicerol e propilenoglicol, e em ácido acético. É praticamente insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, como álcool, clorofórmio, tetracloreto de carbono, éter, benzeno, acetona e óleos. O comportamento das soluções é influenciado pela temperatura, pH, método de fabricação, história térmica e concentração (Gmia, 2018; Sigma_Aldrich, 2018).

2.3.3.3 Formação do gel termorreversível

A gelatina na sua forma convencional (em partículas), é facilmente dissolvida em água aquecida (>37°C). Quando uma solução aquosa de gelatina com concentração superior a 0,5% (m/v) é resfriada, em torno de 37°C começa a ocorrer um aumento progressivo da viscosidade, e em seguida forma-se um gel. Essa propriedade gelificante é uma das suas características mais importantes. Quando a solução esfria, as moléculas tendem a se associar e recuperar algumas das estruturas helicoidais originais do colágeno (Figura 6). O gel consiste em uma rede tridimensional de moléculas, ligada por zonas de junção, que é capaz de aprisionar grandes quantidades de água através de forças capilares. Este gel tem características sólidas, embora seja na realidade um material viscoelástico. A rigidez ou a resistência do gel, denominada de *Bloom Number*, depende da concentração, do pH, temperatura,

presença de aditivos e das forças intrínsecas da gelatina, que estão relacionadas com sua estrutura e massa molar (Gmia, 2018; Sigma_Aldrich, 2018)

A propriedade gelificante é termorreversível, ou seja, se o gel for reaquecido irá converter-se para líquido e vice-versa, pois as forças que favorecem o estado amorfo (principalmente a entropia configurável) superam aquelas que favorecem o estado agregado (principalmente pontes de hidrogênio) (Scientific_American, 2018). As possíveis interações da água com a gelatina são demonstradas na Figura 7.

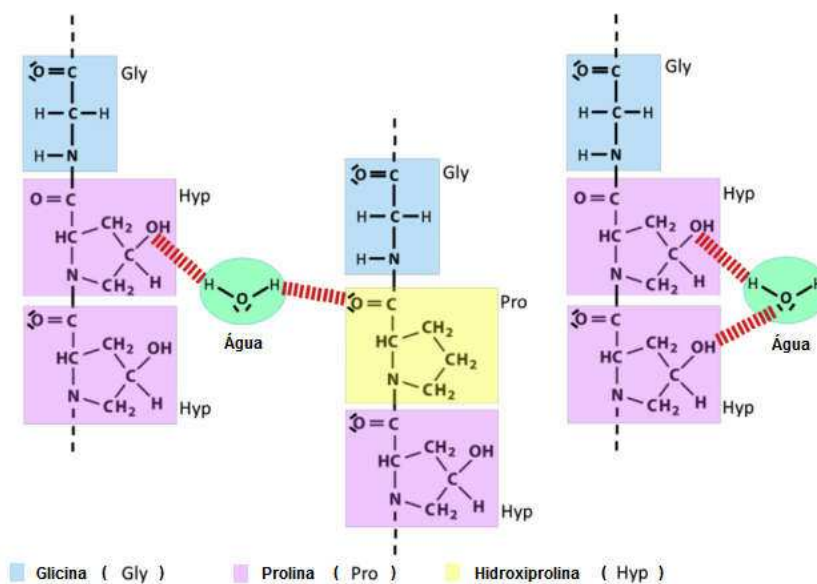


Figura 7 – Pontes de hidrogênio formadas entre a água e aminoácidos constituintes das cadeias-α da gelatina. Adaptada de (Duconseille *et al.*, 2015).

2.3.3.4 Conservação e vida útil

A gelatina, quando armazenada em recipientes herméticos à temperatura ambiente, permanece inalterada por longos períodos de tempo. Quando seca e aquecida acima de 45°C no ar com umidade relativa elevada (acima de 60%) perde gradualmente sua capacidade de hidratação e dissolução (Gmia, 2018).

Soluções estéreis de gelatina quando armazenadas à frio são estáveis indefinidamente, mas à temperaturas elevadas são suscetíveis à hidrólise. Duas das propriedades mais úteis da gelatina, a resistência e a viscosidade do gel são gradualmente reduzidas sob aquecimento prolongado, acima de aproximadamente 40°C. A degradação também pode ser provocada por extremos de pH e por enzimas

proteolíticas, incluindo as que podem resultar da presença de microrganismos (Domb *et al.*, 1997; Gmia, 2018).

2.3.3.5 Características e aplicações biomédicas

A gelatina é um material importante e versátil para aplicações biológicas. Sua utilização em produtos farmacêuticos e dispositivos médicos deve-se a várias propriedades, tais como:

- Não tóxico, não alergênico;
- *GRAS status* (Produto reconhecido como seguro pela FDA);
- Excelente biocompatibilidade;
- Alta pureza;
- Baixa atividade imunológica;
- Parâmetros físicos controláveis (Phillips e Williams, 2009).

Na medicina, é utilizada como substitutos de plasma em cirurgias de emergência, peles artificiais, curativos, inserções oculares, além de diversas aplicações em sistemas carreadores de fármacos e engenharia e regeneração de tecidos. No campo farmacêutico, para cápsulas de comprimidos, supositórios glicerinados, na produção de pomadas e na formulação de novas vacinas (Reis e Román, 2005; Phillips e Williams, 2009).

Implantes à base de colágeno e seus derivados são normalmente degradados por colagenases, enzimas naturais presente nos mamíferos, que atacam as cadeias- α . A fragmentação das cadeias da gelatina gera oligopéptidos, que podem ser degradados por outras enzimas proteolíticas naturais (Ratner *et al.*, 2004).

2.4 Quitosana

A quitosana é um polissacarídeo originado da N-desacetilação parcial ou total da quitina. A incidência de quitosana na natureza é rara, exceto em poucas espécies de fungos. A quitina por sua vez é sintetizada por uma enorme quantidade de organismos vivos, sendo extraída de exoesqueletos de crustáceos, insetos e alguns

fungos, o que a torna o segundo polissacarídeo de maior incidência na natureza, ficando apenas atrás da celulose (Domb *et al.*, 1997; Kim, 2014).

2.4.1 Produção da quitosana

Para obtenção da quitosana, os grupos acetamida da quitina sofrem um processo de hidrólise, e a remoção de grupos acetila (CH_3CO) torna a molécula solúvel na maioria dos ácidos diluídos. Este processo, denominado de desacetilação, ativa dos grupos amino (NH) e concede à quitosana características catiônicas. O método mais comum de desacetilação é em meio alcalino, outros métodos também citados são o enzimático e irradiação de micro-ondas (Domb *et al.*, 1997; Kim, 2014; Jennings e Bumgardner, 2017). A Figura 8 apresenta o esquema de reação para obtenção da quitosana.

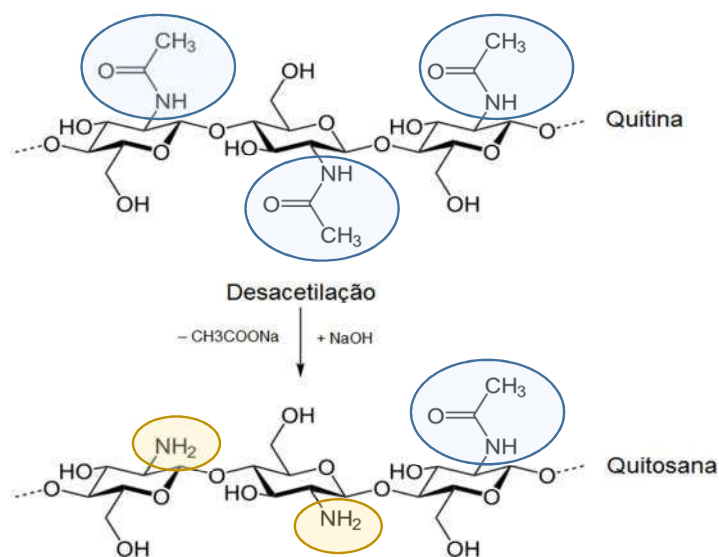


Figura 8 – Esquema da reação de N-desacetilação em meio alcalino para produção da quitosana a partir da quitina pela remoção dos grupos acetila. Adaptada de (Jennings e Bumgardner, 2017)

A quitina natural e a quitosana geralmente coexistem como um copolímero de glucosamina e glucosaminas acetiladas. O grau de desacetilação é, portanto, um parâmetro estrutural determinante para elas. Quando este parâmetro alcança o valor de aproximadamente 50%, a quitina torna-se solúvel em soluções ácidas, e assim converte-se em quitosana (Domb *et al.*, 1997; Rinaudo, 2006; Kim, 2014).

2.4.2 Propriedades da quitosana

A presença de grupos hidroxila e a reatividade dos grupos amino propiciam características químicas e biológicas importantes para a quitosana. A alta hidroflicidade, permite sua utilização como biomaterial na forma de géis, membranas, como veículo de liberação de fármacos, bandagens, etc. Grupos amino distribuídos na cadeia polimérica permitem inúmeras modificações químicas, tais como imobilização de agentes quelantes e formação de complexos polieletrólíticos. Além de excepcionais propriedades biológicas como, não-toxicidade, biocompatibilidade, bioabsorção, bactericida, fungicida, hemostática e efeitos regenerativos e cicatrizantes (Laranjeira e Fávere, 2009; Jennings e Bumgardner, 2017).

2.4.2.1 Grau de desacetilação e Massa molar

O grau de desacetilação (GD) é expresso pelo percentual de grupos glucosamina presentes na cadeia polimérica. Ele influencia nas características físicas, químicas e biológicas dos derivados da quitina (Gonsalves *et al.*, 2011).

Na maioria dos casos, um aumento no GD resulta num aumento das propriedades mecânicas, como resistência à tração, módulo de elasticidade e de compressão e uma redução no alongamento na ruptura. Este comportamento é geralmente atribuído a um aumento da cristalinidade da quitosana, que tipicamente aumenta com GD, pois há menos grupos laterais volumosos acetila, o que leva a um empacotamento mais eficaz devido à maior regularidade das cadeias poliméricas. Embora o aumento da cristalinidade proporcione a melhoria da resistência mecânica e rigidez, também causará fragilidade ao material (Jennings e Bumgardner, 2017).

Quitosanas de GD maiores também exibem taxas de degradação mais lentas e diminuição do intumescimento em comparação com as de GD menores. Estas características, até certo ponto, também dependem da cristalinidade. Quanto maior a cristalinidade mais fechada será a microestrutura, o que limita a absorção e a permeação da água, e reduz o intumescimento (Jennings e Bumgardner, 2017).

No estudo de Mao *et al.* (2004), o GD se mostrou um fator importante para a adesão celular. Maiores GD proporcionaram maior adesão de fibroblastos em membranas de quitosana.

A Massa molar (MM) também é considerada um parâmetro determinante para as propriedades físico-químicas da quitosana. Em geral, maiores MM acarretam num aumento das propriedades mecânicas, e aceleram a degradação. Tanto MM como o GD podem ser usados para manipular estas propriedades, no entanto é de sumária importância considerar o resultado das interações entre eles (Jennings e Bumgardner, 2017).

2.5 Blendas Gelatina/Quitosana

Devido às suas propriedades individuais, a combinação desses dois biopolímeros também tem efeitos benéficos e sinérgicos sobre as características finais dos seus compostos. Diversos estudos mostraram excelentes interações entre eles. A adição de quitosana pode modificar as características de solubilidade e bioabsorção da gelatina, enquanto a gelatina melhora as características mecânicas da quitosana, em especial diminuindo sua rigidez. Além disso, os compostos também mostraram melhorias em propriedades biológicas como a proliferação celular (Cheng *et al.*, 2003; Mao *et al.*, 2004; Pulieri *et al.*, 2008; Gorgieva e Kokol, 2011; Hosseini *et al.*, 2013).

A explicação para essas interações estão relacionadas às propriedades anfotéricas da gelatina, que interagem com o caráter aniônico da quitosana podendo formar complexos polieletrólíticos ou interações polares como pontes de hidrogênio (Kim *et al.*, 2005; Reis e Román, 2005).

Blendas de gelatina/quitosana ou colágeno/quitosana foram estudadas para algumas aplicações, que incluem carreamento de fármacos, curativos, fios sutura, lentes de contato, condutores de nervos e matrizes para engenharia de tecidos (Cheng *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Xin-Yuan e Tian-Wei, 2004; Zhang *et al.*, 2006; Oryan *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016; Badhe *et al.*, 2017).

2.6 Plastificantes

Plastificantes são aditivos empregados em alguns tipos de materiais poliméricos com a finalidade de melhorar o processamento e a flexibilidade do material. Eles atuam como solventes provocando a separação e a redução das forças de atração entre as macromoléculas, facilitando a mobilidade molecular, e assim propiciando a flexibilidade. Geralmente são líquidos de alto ponto de ebulição, baixa

massa molar, oligoméricos ou poliméricos, que possuem excelente afinidade química com o polímero plastificado (Rabello, 2000; Andrade *et al.*, 2001).

2.6.1 Plastificantes em biopolímeros

Os biopolímeros podem apresentar propriedades mecânicas que limitam sua processabilidade e aplicações finais, principalmente relacionadas à rigidez e fragilidade. Para superar este problema, plastificantes são adicionados à sua formulação. Esses aditivos se tornam mais atrativos quando possuem propriedades biodegradáveis, baixa toxicidade e boa compatibilidade com vários plásticos substituindo os plastificantes convencionais. Podem ser citados os polióis como, glicerol, etileno glicol, polietileno glicol e sorbitol; os ácidos gordurosos; monossacarídeos como glicose, frutose e sacarose; assim como, etanolamina, uréia, óleos vegetais, ceras, surfactantes e a própria água (Vieira *et al.*, 2011).

Biopolímeros e seus plastificantes são geralmente higroscópicos, além disso a água é um dos meios solventes e plastificantes mais importantes nos sistemas biológicos. Os plastificantes também podem afetar a capacidade de retenção de água do polímero (Vieira *et al.*, 2011; Fundo *et al.*, 2014).

2.6.1.1 Glicerol

Quimicamente o glicerol é um tri-álcool com 3 carbonos, tendo como nome sistemático (IUPAC) 1,2,3-propanotriol (Figura 9). É líquido à temperatura ambiente (25°C), higroscópico, inodoro, viscoso e de sabor adocicado, pode ser derivado de fontes naturais ou petroquímica. O nome origina-se da palavra grega *glykos*, que significa doce. O termo “glicerina” refere-se ao produto na forma comercial (Beatriz *et al.*, 2010).

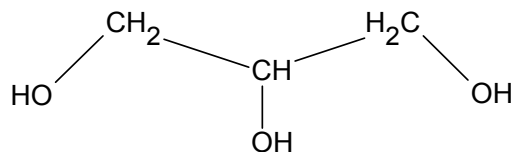


Figura 9 – Estrutura química da molécula de glicerol (Editada pelo autor).

O glicerol está presente em todos os óleos e gorduras de origem animal e vegetal. Também está presente em todas as células animais e vegetais, fazendo parte de sua membrana celular na forma de fosfolípidios. A importância biológica do glicerol advém do fato deste ser um dos precursores dos triglicerídeos, uma forma de lipídeos especializada no armazenamento de energia (Wikiciencias, 2018).

A presença de três grupos hidroxila na estrutura do glicerol é responsável pela solubilidade em água e sua natureza higroscópica. É uma molécula altamente flexível formando ligações de hidrogênio tanto *intra*- como intermoleculares (Beatriz *et al.*, 2010).

O glicerol é reconhecido como seguro para o consumo humano desde 1959, podendo ser utilizado em diversos produtos alimentícios e farmacêuticos. Os níveis de DL₅₀ em ratos são de 470 mg/kg e em porquinhos-da-índia de 7750 mg/kg. Em humanos, uma grande quantidade de glicerol (sintético ou natural) pode ser administrada sem aparecimento de qualquer efeito adverso à saúde (Infinitypharma, 2018).

Para a quitosana, o glicerol é o plastificante mais usado devido a sua eficiência de plastificação, grande disponibilidade e baixa migração. E tal como mencionado anteriormente, é um solvente para gelatina (Epure *et al.*, 2011; Sigma_Aldrich, 2018).

2.7 Estado da arte

Para este tópico foram avaliados os trabalhos relacionados à fabricação e estudo de estruturas tubulares, à base de quitosana, gelatina, colágeno ou compósitos associados.

Itoh *et al.* (2003) estudaram um tubo de quitosana/hidroxiapatita em formato triangular obtido a partir de um tendão do crustáceo *Macrocheira Kaempferi*. Eles sugeriram que sua forma e a camada de hidroxiapatita podem beneficiar a regeneração de nervos.

Wang *et al.* (2005) e Zhang *et al.* (2006) produziram tubos de quitosana em forma porosa a partir de um tubo pré-fabricado com fibras trançadas de quitosana, seguidos de processos imersão em soluções de quitosana ou quitosana/gelatina, e de liofilização. Eles sugeriram que as propriedades mecânicas e biológicas obtidas tornam produto promissor para a engenharia de tecidos.

Patel *et al.* (2008) desenvolveram tubos de colágeno/quitosana utilizados como guias para reparação de nervos periféricos, a partir da injeção da solução num molde tubular concêntrico, seguidos de processos de coagulação e liofilização. Os resultados indicaram que estes tubos podem ser aplicados para regeneração de nervos periféricos rompidos.

Wang *et al.* (2008) fabricaram tubos em malha com micro-nanofibras de quitosana pelo método de *electrospinning*. Posteriormente, Matsumoto *et al.* (2010) investigaram a utilização desses tubos para a regeneração de nervos torácicos danificados. Os resultados mostraram que eles podem ser usados de forma segura, auxiliando a regeneração de nervos simpáticos e periféricos, reestabelecendo suas funções originais.

Rothwell *et al.* (2008) sugerem a utilização de um tubo produzido a partir de filetes de quitosana enrolados num bastão metálico e unidos com uma nova camada de solução, para o tratamento de vazamentos anastomóticos após cirurgias gastrointestinais.

Chen *et al.* (2009) produziram stents em formato espiral a partir de tiras de quitosana reticuladas com genipina, e enroladas num mandril. Foram avaliadas propriedades mecânicas e biológicas, bem como a liberação controlada de um fármaco antiploriferativo *in vivo*. Os resultados se mostraram atrativos para a finalidade proposta.

Gegel *et al.* (2014) propuseram um método simples para produção de tubos de quitosana, consistindo na imersão de um bastão de vidro diretamente numa solução de quitosana, seguido de um banho com soluções alcalinas.

Mais recentemente, Badhe *et al.* (2017) desenvolveram um *scaffold* de quitosana/gelatina com arquitetura tubular macroporosa, pela combinação de processos de lixiviação de partículas e liofilização.

Atualmente a empresa alemã Mendovent GmbH fornece neurotubos de quitosana com a marca Reaxon® para tratamento de lesões em nervos periféricos, em conformidade com a norma internacional DIN EN ISO 13485 (*Medical devices -- Quality management systems -- Requirements for regulatory purposes*). Eles são fabricados por um processo de extrusão especial seguidos de lavagens e hidrólises (Haastert-Talini *et al.*, 2013; Bak *et al.*, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

Gelatina Tipo A produzida a partir de peles de suínos adquirido da Sigma Aldrich; quitosana oriunda de cascos de camarão, com grau de desacetilação de 89 a 94% e massa molar entre 260 e 280 KDa produzida pelo laboratório Certbio/UFCG; glicerina teor $\geq 99,7\%$, hidróxido de sódio e ácido acético glacial adquiridos da Neon Comercial Ltda.; lisozima e solução tampão fosfato-salino (PBS) adquiridos da Sigma Aldrich.

3.2 Metodologia

Este trabalho foi realizado integralmente no Laboratório de Avaliação e Desenvolvimento de Biomateriais do Nordeste - CERTBIO, localizado na Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Foram produzidos três tipos de tubos: um rígido e higroscópico, que se torna flexível ao absorver umidade, denominado – Tubos Secos (TS); um flexível de aspecto elastomérico e estável a temperatura ambiente, pela adição de glicerina, denominado – Tubos Flexíveis (TF); e um de estrutura interna esponjosa lamelar e superfície rugosa, com utilização da técnica de liofilização, denominado – Tubos Porosos (TP). Inicialmente foram utilizadas três formulações de blendas gelatina/quitosana (GQ): 4/1, 3/1 e 2/1 para produção de TS. A escolha de tais formulações, assim como alguns parâmetros de processo foram baseadas em alguns dos trabalhos referenciados nos tópicos 2.5 e 2.7. No entanto, quando as formulações com maior percentual de quitosana foram utilizadas, vários corpos-de-prova foram perdidos na etapa final de desmoldagem devido à fragilidade, o que acarretou na escolha da formulação 4/1 como padrão. Todavia, é preciso esclarecer que a utilização das outras formulações pode ser viável, principalmente para produção de TF e TP, mas tal investigação não foi objeto dessa pesquisa.

Antes da definição de todos os parâmetros e métodos para a preparação das amostras, vários testes preliminares foram realizados. Estes incluem desde modos de conformação (extrusão, moldagem, reação), até a alteração de variáveis (tempo, temperatura, concentração, componentes). A diretriz foi sendo construída paulatinamente em paralelo com os resultados. Durante este período, também foi

prospectado a utilização de agentes reticulantes como o glutaraldeído, genipina e TPP (Tripolifosfato de Sódio). Como também plastificantes como glicerol, polietilenoglicol, e o seu respectivo método de incorporação (mistura em massa, imersão em solução). Ao final foi desenvolvido o método apresentado no tópico 3.2.1 a seguir.

3.2.1 Preparação das amostras

Uma solução de quitosana 2% (m/v) em ácido acético 1% (v/v) foi misturada e homogeneizada à 50°C com gelatina em pó na proporção GQ de 4/1 em massa presente na solução. A blenda resultante foi então vertida num molde de cavidade cilíndrica com diâmetro interno de 12,5 mm e mantida sob refrigeração (5°C) até ocorrer a gelificação. Após a remoção do molde, a amostra (bastão) de natureza ácida foi imersa numa solução de hidróxido de sódio 1M (23°C) induzindo a reação de neutralização/coagulação, obtendo-se um perfil tubular com espessura de parede dependente do tempo, uma vez que a reação ocorre a partir da superfície de contato para o centro (Figura 10). Após o corte transversal das extremidades do bastão, o resíduo interno de material não reagido foi removido com auxílio de um equipamento de banho-ultrassônico modelo USC-1400 com frequência 40 KHz e temperatura de 60°C por 30 minutos (min). A amostra tubular resultante foi imersa novamente na solução de hidróxido de sódio 1M por metade do tempo da primeira imersão, e em seguida, lavada diversas vezes com água deionizada. A partir desta etapa os tubos pré-formados foram direcionados à fabricação de TS ou TP.

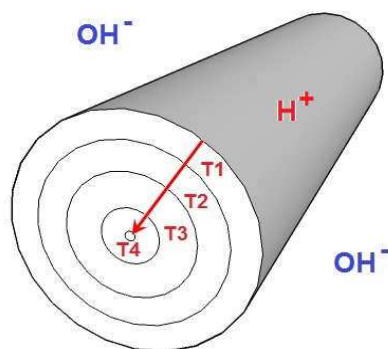


Figura 10 – Representação da espessura da parede do tubo formada pelo tempo (T) de reação ácido-base entre a amostra cilíndrica e a solução (Editada pelo autor).

Para a fabricação de TS foram introduzidos nos tubos pré-formados um bastão flexível de diâmetro equivalente ao diâmetro interno do tubo, e em seguida submetidos à secagem por 24 horas (h) em estufa à 50°C com circulação de ar.

Para a fabricação de TP foram introduzidos nos tubos pré-formados um bastão flexível de diâmetro equivalente ao diâmetro interno do tubo, e em seguida congelados (-15°C) por 24h e submetidos à liofilização por 48h.

Os TF foram produzidos a partir do intumescimento dos TS, imergidos numa solução aquosa de glicerina 50% (v/v) por 24h à temperatura ambiente (25°C) e posterior lavagem e secagem em estufa à 50°C por 24h.

Para as amostras fabricadas nesta pesquisa foi utilizado um tempo de 10 min para 1ª reação, e um bastão interno flexível de diâmetro 5 mm em concordância com os resultados de cinética de reação apresentados no tópico 4.1 adiante. Sinteticamente, a metodologia descrita é ilustrada no fluxograma da Figura 11.

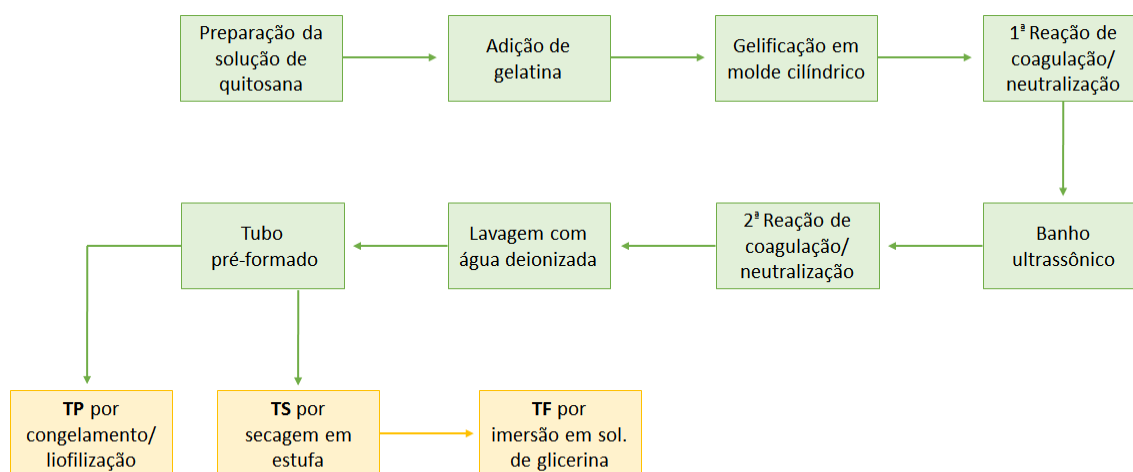


Figura 11 – Fluxograma do processo para obtenção dos tubos GQ (Editada pelo autor)

3.2.2 Caracterização das amostras

A maioria das análises e caracterizações foram direcionadas aos TS, no entanto algumas análises específicas foram realizadas nos TP e TF visando elucidar comportamentos cruciais e suas estruturas físicas. O direcionamento tomado nas análises serão descritos de acordo com os subtópicos a seguir.

3.2.2.1 Dimensionamento

Realizado nos TS e TF. As amostras foram medidas com auxílio de um paquímetro digital nas seguintes dimensões: comprimento (L), diâmetro externo (ED) e diâmetro interno (ID), conforme a Figura 12. A espessura de parede do tubo (PR), quando mencionada no texto, se refere a diferença entre os raios externo e interno.

A mesma metodologia foi utilizada na avaliação da cinética de reação para formação dos tubos.

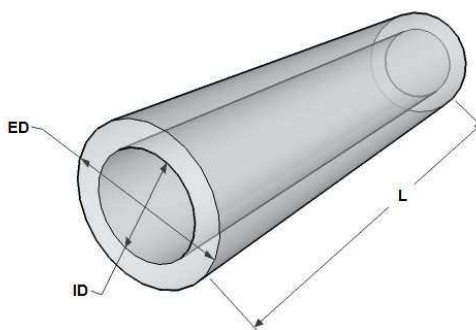


Figura 12 – Identificação das dimensões medidas nos tubos (Editada pelo autor)

3.2.2.2 Intumescimento ou absorção de umidade

Realizado nos TS. As amostras secas e previamente pesadas foram imersas numa solução de PBS, com pH 7,4 à 37°C, e removidas para análise nos seguintes tempos: 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 300, 420, 600 e 1440 min. O grau de intumescimento (%Int) foi calculado a partir da massa absorvida conforme a Equação 1, onde m_i é a massa inicial seca e m_{f1} a massa intumescida no tempo de retirada. As amostras foram suavemente enxutas com papel toalha absorvente, e então pesadas numa balança analítica de precisão 10^{-4} g. O teste foi replicado quatro vezes.

$$\%Int = \frac{(m_{f1} - m_i)}{m_i} \times 100 \quad (1)$$

A variação das dimensões (%D), de acordo o tópico anterior (3.2.2.1), também foi avaliada juntamente com intumescimento, conforme a Equação 2, onde

D_i é a dimensão inicial da amostra seca e D_f a dimensão com a amostra intumescida no tempo de retirada.

$$\%D = \frac{(D_f - D_i)}{D_i} \times 100 \quad (2)$$

3.2.2.3 Biodegradação

Realizado nos TS. O ensaio foi baseado na norma ASTM F1635-16 (*Standard test Method for in vitro Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants*). As amostras secas e previamente pesadas foram imersas numa solução de PBS, com pH 7,4 à 37°C, e removidas para análise nos seguintes tempos: 4, 11, 18, 25, 32, 39 e 46 dias. Após a secagem dos corpos de prova (24 h à 50°C), o índice de biodegradação ($\%Bd$) foi determinado pela perda de massa em função do tempo, conforme a Equação 3, onde m_i é a massa inicial seca e m_{f2} a massa final no tempo de retirada após secagem. As amostras foram pesadas numa balança analítica de precisão 10⁻⁴g. O teste foi replicado cinco vezes. Uma análise análoga também foi realizada na presença de lisozima (1,0 g/L de PBS) nos tempos: 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias. As soluções do meio degradante foram trocadas de 7 em 7 dias. O ($\%Int$) também foi avaliado nos respectivos tempos de retirada.

$$\%Bd = \frac{|m_{f2} - m_i|}{m_i} \times 100 \quad (3)$$

3.2.2.4 Propriedades mecânicas

Realizado nos TS e TF. As propriedades mecânicas foram avaliadas num equipamento de Ensaio Mecânico Universal Instron modelo 3360 *Series Dual Column Tabletop Testing Systems*, com célula de carga de 500 N, em temperatura ambiente. Ensaio de compressão lateral dos tubos foram realizados baseados na norma ASTM D 2412-02 (*Determination of External Loading Characteristics of Plastic Pipe by Parallel-Plate Loading*), com velocidade de deformação de 1 mm/min até 50% de

deflexão do ED ou a falha do tubo. O ensaio foi replicado no mínimo três vezes por variante de amostra, para corpos de prova intumescidos. Os resultados foram expressos em curvas de Força (mN) x Deflexão do ED (ϵ) (mm/mm).

Para o cálculo da tensão de escoamento (σ_y) foi utilizada a Equação 4 desenvolvida por Reddy e Reid (1979).

$$\sigma_y = 0,866 \frac{P_c r_0}{t^2 l} \quad (4)$$

Onde r_0 é o raio externo inicial do tubo, t é a espessura da parede e l o comprimento. P_c é a força de colapso inicial, ponto onde a curva inicial se desvia teoricamente da zona elástica, obtida pela intersecção das retas geradas pela zona elástica e plástica (Figura 13).

O módulo de elasticidade (E) pôde ser deduzido a partir da Equação 5 desenvolvida por Deruntz e Hodge (1963).

$$E = \frac{12 P_e r_0^3}{\delta_e t^3 l} \left(\frac{\pi}{4} - \frac{2}{\pi} \right) \quad (5)$$

Onde P_e e δ_e são respectivamente a força e a deflexão do ED na zona elástica.

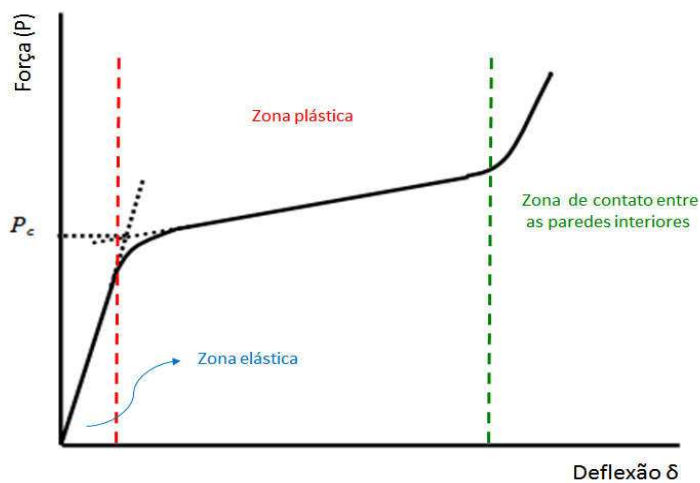


Figura 13 – Representação gráfica típica de uma curva de compressão lateral de um tubo. Adaptada de (Nemat-Alla, 2003; Shen *et al.*, 2015).

A Figura 14 demonstra esquematicamente o ensaio de compressão lateral de um tubo.

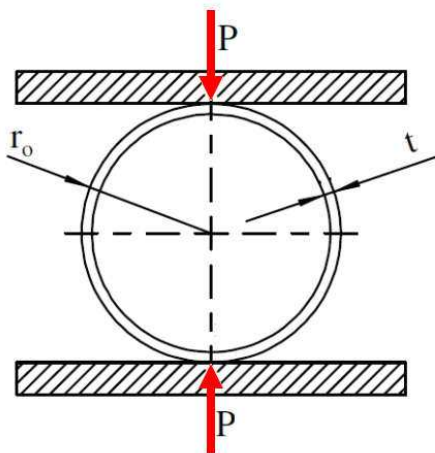


Figura 14 – Diagrama esquemático para a compressão lateral de um tubo. Adaptada de (Rathnaweera *et al.*, 2011)

3.2.2.5 Termogravimetria (TG)

O equipamento utilizado foi um Pyris 1 TGA da Perkin Elmer, com fluxo de nitrogênio de 20 mL/min, taxa de aquecimento de 10°C/min e massa inicial aproximada de 5 mg. Esta técnica possibilita conhecer as alterações que o aquecimento pode provocar na massa das substâncias.

A análise foi focada nos TF com a finalidade de avaliar a estabilidade térmica da amostra proporcionada pela glicerina.

3.2.2.6 Microscopia ótica (MO) e eletrônica de varredura (MEV)

A MO foi realizada através de um microscópio óptico de reflexão e transmissão Hirox, com capacidade de promover aumentos de 50X-400X. A técnica foi empregada principalmente nos TP, mas também em alguns TS intumescidos durante o ensaio de biodegradação.

A MEV foi usada nos TP, através de um microscópio eletrônico de bancada Phenom-World, modelo Pro-X, com aumento máximo de 45.000X, tensão de aceleração 10 KV e resolução <10 nm, sem recobrimento metálico.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Cinética da reação de neutralização/coagulação

Como mencionado na metodologia (3.2.1), inicialmente foram levantados gráficos para avaliar a cinética da reação de neutralização/coagulação, que permitiram a escolha do tempo ideal para a obtenção das dimensões almejadas. A Figura 15 apresenta as variações dimensionais em função do tempo de reação dos bastões gelificados, com as respectivas formulações GQ de acordo com o tópico 3.2.

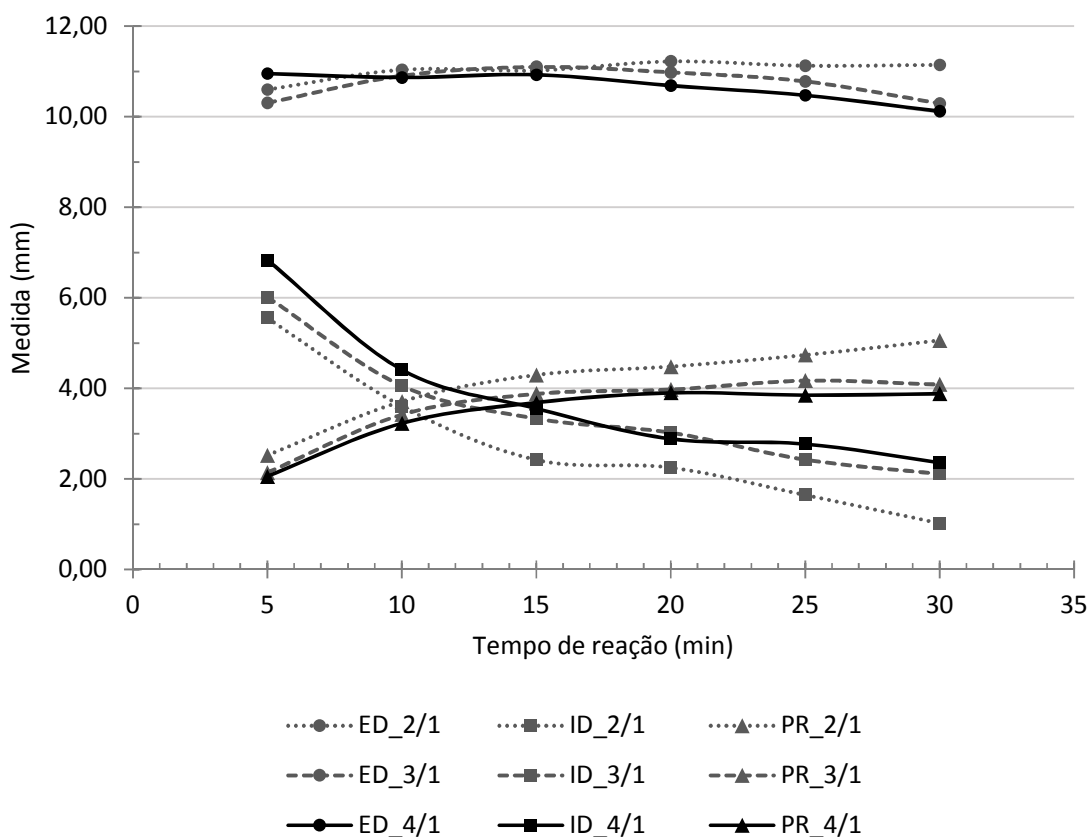


Figura 15 – Medidas da formação dimensional dos tubos GQ em função do tempo de reação de neutralização/coagulação, em NaOH 1M à 23°C.

Os dados mostram que, de maneira geral, independente da composição, o diâmetro externo (ED) é relativamente pouco afetado, enquanto o diâmetro interno (ID) diminuiu e por consequência a espessura de parede (PR) aumenta com o tempo de reação.

O aumento da concentração de quitosana promoveu a aceleração da reação de coagulação. Num tempo de reação equivalente, as medidas de ID são menores, quando comparadas às formulações de menor concentração de quitosana. Este comportamento está associado ao fato da coagulação ocorrer devido a neutralização da solução ácida, responsável pela condição protonada e solúvel da quitosana.

Com relação ao ED observou-se que, logo após a desmoldagem, as formulações com maior concentração de quitosana apresentaram valores ligeiramente menores, entretanto no decorrer da reação o comportamento tende a se inverter. Isso pode ser explicado pela função dos componentes na mistura. A gelificação ocorre devido à gelatina presente na solução e a quantidade de quitosana pode influenciar tanto no espaço da rede tridimensional, quanto no volume coagulado.

Acerca da formulação GQ 4/1 (padrão), a escolha do tempo de 10 minutos proporcionou um tubo pré-formado com as seguintes dimensões aproximadas: ED=10,87 mm; ID=4,41 mm; PR=3,23 mm. Utilizando estas condições, o processo de fabricação das amostras transcorreu normalmente, quase sem perdas e com dimensões uniformes, como apresentado no tópico 4.2 a seguir.

É importante ressaltar, que além da formulação, as condições de temperatura, concentração e natureza das soluções ácida e alcalina influenciam diretamente na cinética da reação mencionada.

4.2 Dimensionamento

Logo após a secagem livre (sem bastão interno) em estufa (24h à 50°C) observou-se que os tubos pré-formados perdem por desidratação $93,9 \pm 1,4\%$ de sua massa, $55,6 \pm 0,6\%$ de ED, e $58,4 \pm 3,7\%$ de PR.

As dimensões resultantes da fabricação dos TS estão apresentadas na Tabela 2, enquanto sua forma final é mostrada na Figura 16.

A uniformidade dimensional das amostras de TS se mostrou satisfatória com variações menores que 5%, apesar da fabricação ter sido executada em bancada laboratorial, o que sugere a possibilidade de ser ainda melhorada num processo automatizado.

Tabela 2 – Análise estatística das dimensões obtidas na fabricação de TS. Número de amostras (n) = 40.

	L (mm)	ED (mm)	ID (mm)
Média	27,75	5,84	5,23
Desvio Padrão	1,24	0,11	0,09
Variância	4,48%	1,89%	1,82%



Figura 16 – Amostras de TS na sua forma final.

Os TS absorvem umidade e intumescem com facilidade. Na Tabela 3 são apresentadas as dimensões resultantes após o intumescimento (24h em PBS 37°C).

Tabela 3 – Análise estatística das dimensões obtidas para os TS intumescidos (24h em PBS 37°C). n = 40.

	L (mm)	ED (mm)	ID (mm)
Média	29,01	7,88	5,27
Desvio Padrão	0,77	0,19	0,18
Variância	2,67%	2,46%	3,39%

Como esperado, as amostras de TS intumescidos tiveram acréscimo nas suas dimensões, no entanto, as variações ainda permaneceram baixas. Outros detalhes sobre esse comportamento são apresentados no tópico 4.3 a seguir.

Os resultados dimensionais dos TF se mostraram análogos aos TS intumescidos, inclusive o aspecto físico é semelhante. Em média, houve um acréscimo de $234 \pm 32\%$ de massa absorvida, e ambos possuem flexibilidade mecânica propiciada pelo efeito plastificante da água, assim como do glicerol para os TF. As diferenças principais entre eles estão relacionadas às propriedades mecânicas e estabilidade térmica, discutidas nos tópicos 4.5 e 4.6 a seguir.

As dimensões das amostras de TF são apresentadas na Tabela 4, assim como a sua forma final na Figura 17.

Tabela 4 – Análise estatística das dimensões obtidas para os TF. n = 7.

	L (mm)	ED (mm)	ID (mm)
Média	30,81	6,96	5,49
Desvio Padrão	0,95	0,34	0,13
Variância	3,10%	4,89%	2,44%



Figura 17 – Amostras de TF na sua forma final.

4.3 Intumescimento

A análise do grau de intumescimento dos TS está apresentada na Figura 18. Para melhor visualização do comportamento inicial, o gráfico foi limitado à 12h (720 min) no entanto o último ponto foi obtido com 24h (1440 min) = $202 \pm 12\%$.

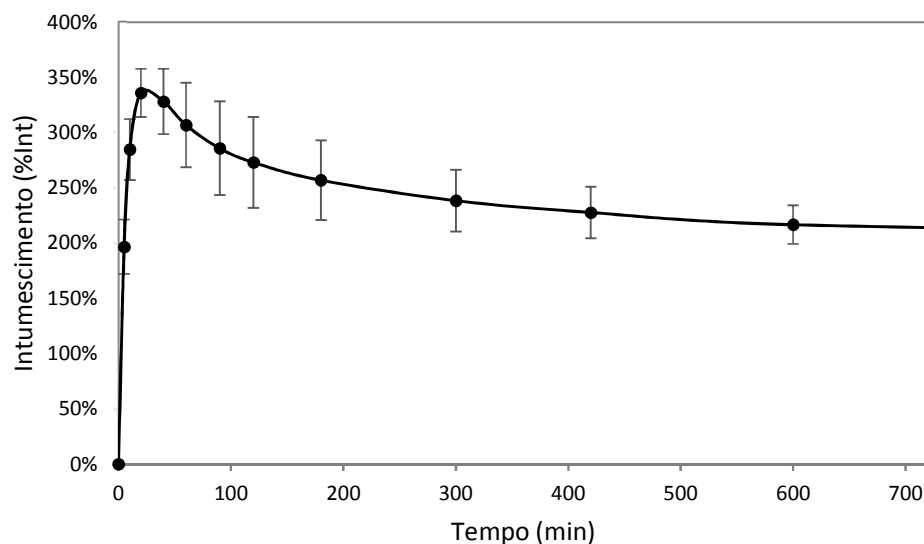


Figura 18 – Grau de intumescimento dos TS pelo tempo de imersão em PBS à 37°C.

A análise mostrou uma rápida absorção de líquido alcançando seu máximo (336% em média) com aproximadamente 20 min de imersão, seguido de uma redução gradual tendendo à estabilidade após 600 min.

Tal comportamento confirma a característica hidrofílica do sistema, como também sugere, que a redução gradual no grau de intumescimento, após seu ápice, na realidade está relacionada com a perda de massa por dissolução parcial da gelatina.

A Figura 19 apresenta a variação dimensional das amostras durante o ensaio de intumescimento. Percebe-se que, a absorção de líquido altera todas as dimensões do tubo, com maior intensidade para ED. Após 420 min, algumas amostras apresentaram valores de ID ligeiramente menores que o inicial, porém a média sempre foi positiva.

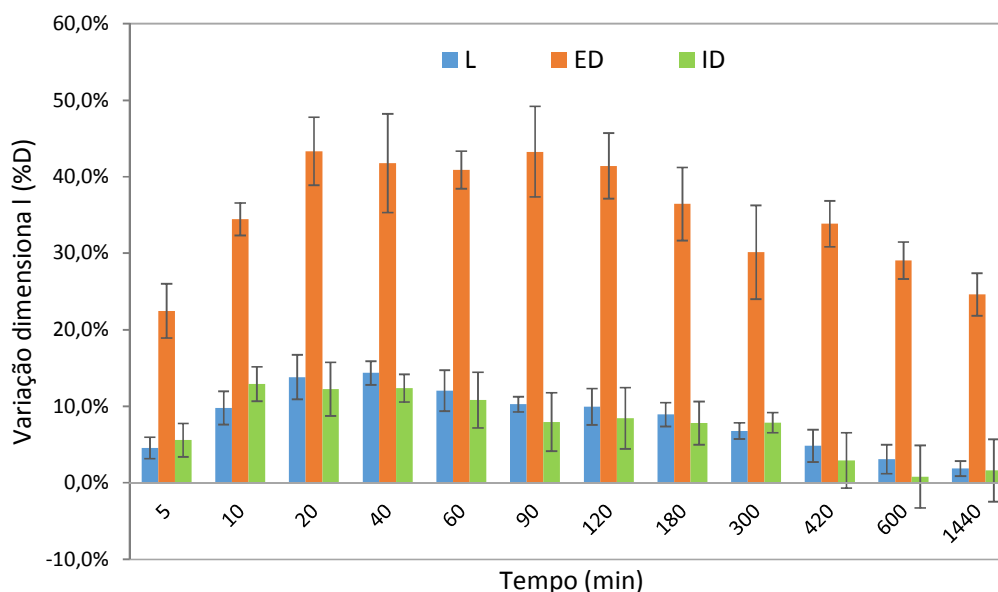


Figura 19 – Variação dimensional dos TS durante o intumescimento em PBS à 37°C.

O conhecimento desse comportamento é relevante, pois tais variações podem influenciar na aplicação do tubo, quando em contato com um meio biológico aquoso. Também é possível observar, que o comportamento das dimensões segue tendência da variação mássica apresentada pelo grau de intumescimento.

4.4 Biodegradação

A biodegradação (%*Bd*) das amostras foi avaliada durante mais 40 dias nas condições citadas no tópico 3.2.2.3. Os resultados mostrados nas Figuras 20 e 21 referem-se respectivamente aos ensaios sem e com a presença de lisozima. Também são apresentados nos mesmos gráficos o grau de intumescimento (%*Int*) em cada tempo de retirada.

Nas primeiras 24h as amostras perderam em torno de 66% de sua massa por dissolução em PBS. No decorrer dos dias ocorreu apenas uma ligeira perda de massa, bem mais expressiva nas amostras testadas sem presença de lisozima, o que pode indicar uma possível proteção bacteriológica da amostra pela enzima, semelhantemente ao relatado por Bower *et al.* (2006), no qual constatou-se um aumento da vida útil do alimento testado, provocado pelas características antibacterianas da lisozima.

Vale salientar, que não houve indução proposital de qualquer tipo de bactéria durante o ensaio, o qual foi realizado com os devidos cuidados para se evitar possíveis contaminações, relacionadas principalmente com a manutenção semanal do meio degradante. Porém, por se tratar de substâncias orgânicas de origem animal, a possibilidade de decomposição e atuação bacteriológica não foi descartada, apesar desse comportamento não ter sido avaliado diretamente neste trabalho.

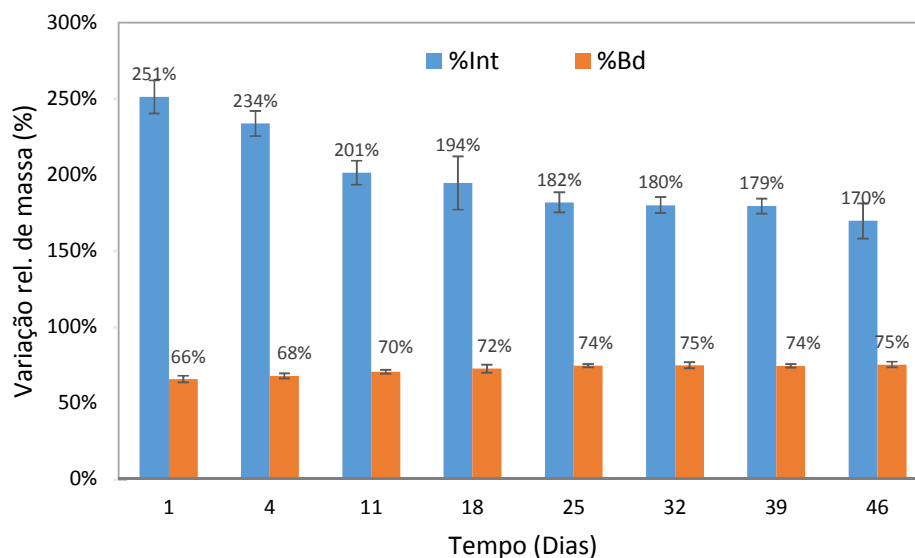


Figura 20 – Biodegradação e intumescimento dos TS em PBS à 37°C.

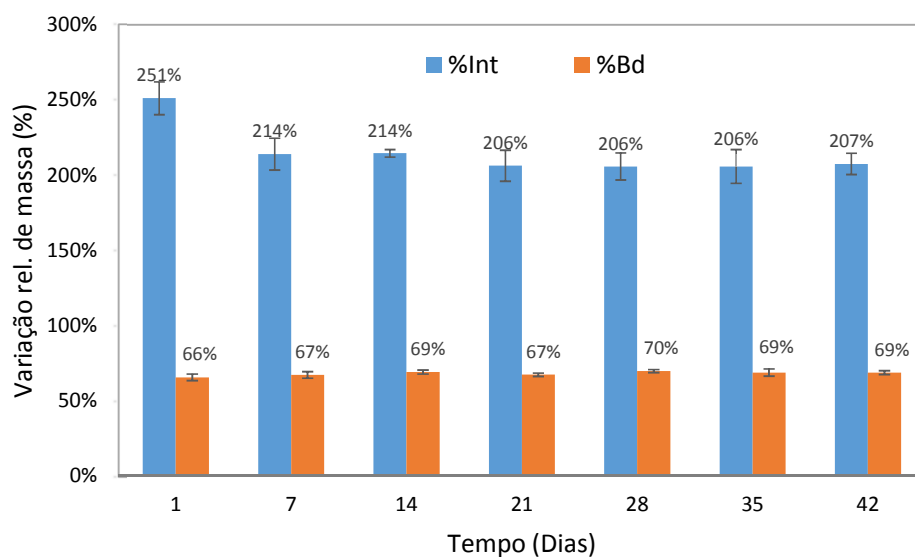


Figura 21 – Biodegradação e intumescimento dos TS em PBS à 37°C, com a presença de lisozima (1,0 g/L).

Durante toda a análise, as amostras se mantiveram estáveis na forma de tubo, no entanto algumas mudanças físicas foram evidentes. A Figura 22 mostra o resultado visual da biodegradação nos corpos de prova já desidratados. Tanto as amostras testadas com a presença de lisozima como as em PBS puro apresentaram tendência ao amarelamento com intensidades semelhantes, o que também sugere mudanças químicas nas suas estruturas.

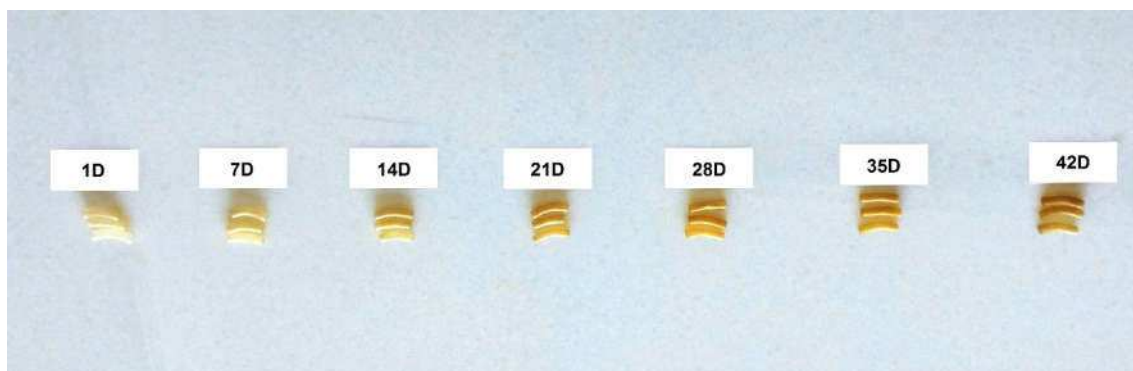


Figura 22 – Tendência ao amarelamento ocasionada pelo tempo de biodegradação nos tubos GQ após secagem.

Também foram perceptíveis mudanças físicas na superfície das amostras ainda intumescidas (Figura 23). De uma superfície lisa e brilhosa passou a uma superfície rugosa cheia de cavidades.

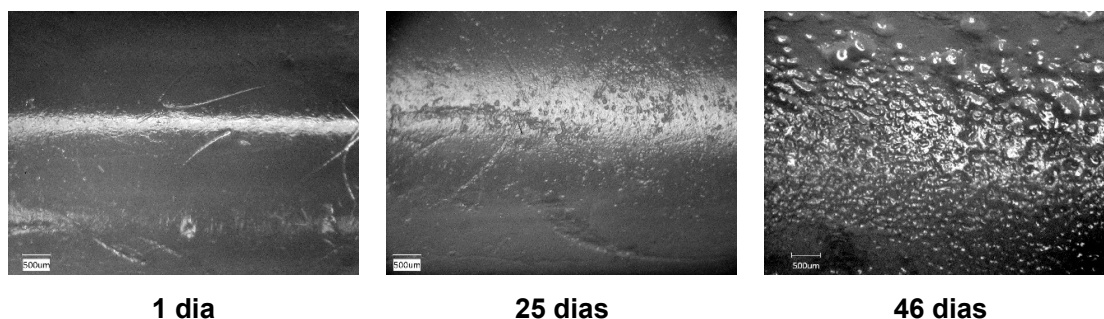


Figura 23 – Mudança superficial das amostras intumescidas ocasionada pelo tempo de biodegradação. Aumento de 50X por MO.

Mudanças consideráveis foram percebidas nas propriedades mecânicas das amostras ao decorrer do ensaio. O cuidado no manuseio teve que ser redobrado, pois as mesmas apresentaram aumento considerável da fragilidade logo nos primeiros dias de ensaio. Mais detalhes são mostrados no tópico 4.5 a seguir

4.5 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas foram obtidas de acordo com as informações expressas no tópico 3.2.2.4. Análises iniciais e no decorrer do ensaio de biodegradação foram efetuadas com o intuito de perceber as variações ocasionadas pelo envelhecimento, como também definir as características básicas de cada amostra.

De maneira geral, as amostras dos TS intumescidos 24h em PBS e as dos TF apresentaram comportamento elastomérico, ou seja, exibindo flexibilidade e deformação reversível. A Tabela 5 sumariza as propriedades mecânicas das amostras avaliadas. Naquelas sujeitas à biodegradação, a análise foi possível até o 7º dia (7D) para as envelhecidas apenas pela imersão em PBS, e até o 14º dia (14D) nas com presença de lisozima (LIZ). A partir daí, a fragilidade dos corpos de prova inviabilizou os ensaios mecânicos, como se pode perceber pelos resultados de deflexão na ruptura (ϵ_b), essas amostras falharam precocemente.

Tabela 5 – Propriedades mecânicas dos TS intumescidos submetidos a biodegradação e dos TF.

Identificação	E (KPa)	σ_y (KPa)	ϵ_b (mm/mm)
TF	599 - 957	18,8 - 23,6	*nr
1D_PBS	73 - 95	2,32 - 3,32	*nr
4D_PBS	94 - 159	2,66 - 5,45	*nr
7D_PBS	95 - 206	2,31 - 5,13	0,18 - 0,38
7D_LIZ	157 - 338	5,89 - 10,73	*nr
14D_LIZ	101 - 159	4,46 - 8,23	0,15 - 0,33

*nr – não rompeu antes do encontro das paredes internas do tubo (deflexão total)

Ao contrário do esperado, as amostras envelhecidas na presença de lisozima apresentaram propriedades mecânicas superiores àquelas apenas imersas em PBS, mesmo com tempos de degradação maiores. Isso reforça a hipótese de proteção da amostra pela enzima, apesar desta ser comumente conhecida como degradante da quitosana, sua ação é focada apenas nas frações acetiladas da cadeia, e a quitosana utilizada nesta pesquisa possuía alto grau de desacetilação (89-94%).

Já em outro contexto, os TF demonstraram melhor potencial mecânico, com valores de E e σ_y praticamente 10 vezes maiores que os dos TS intumescidos. Embora ambos, água e glicerol, atuem como plastificantes, há uma melhor interação do material constituinte com glicerol, o que pode explicar esse comportamento. No estudo sobre mobilidade molecular realizado por Fundo *et al.* (2014) em filmes de quitosana plastificados com glicerol, foi postulado sobre a ocupação preferencial do glicerol nas ligações com a quitosana, cabendo à água uma ocupação secundária, caso não haja glicerol suficiente.

Com o objetivo de representar os comportamentos já mencionados, curvas típicas de cada teste foram selecionadas e estão exibidas na Figura 24.

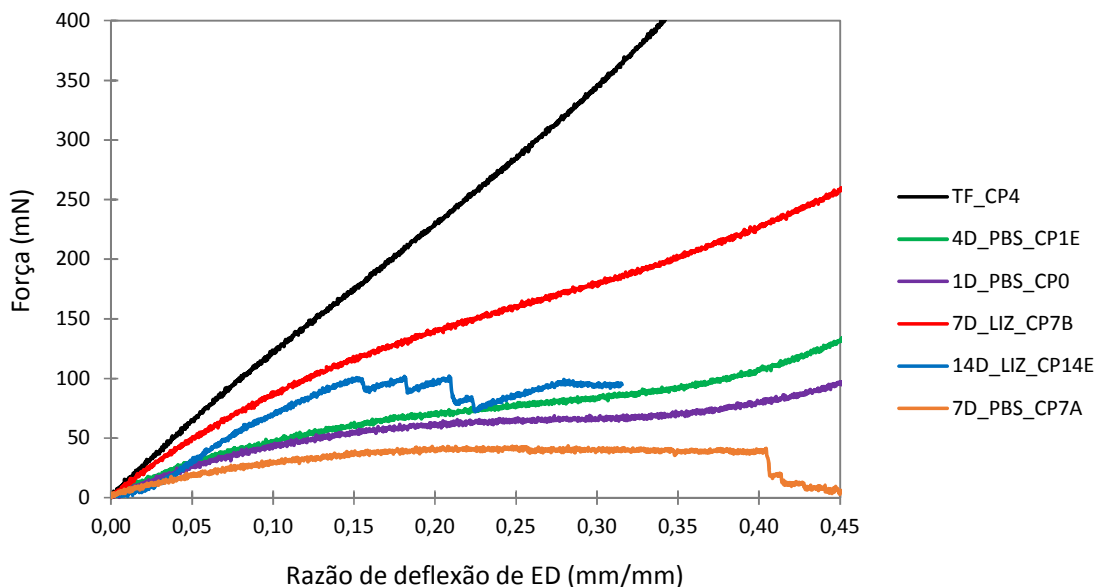


Figura 24 – Curvas típicas de compressão lateral de tubos para as amostras ensaiadas.

4.6 Análise termogravimétrica

Uma característica importante dos TF é sua estabilidade e flexibilidade em temperatura ambiente (25°C) e mesmo na temperatura de secagem (50°C). Diferentemente dos TS intumescidos em água (TSa) que rapidamente desidratam nas mesmas condições.

A análise termogravimétrica foi proposta justamente para elucidar esse comportamento. As Figuras 25 e 26 mostram respectivamente as curvas TG/DTG das amostras TSa 24h, e TF.

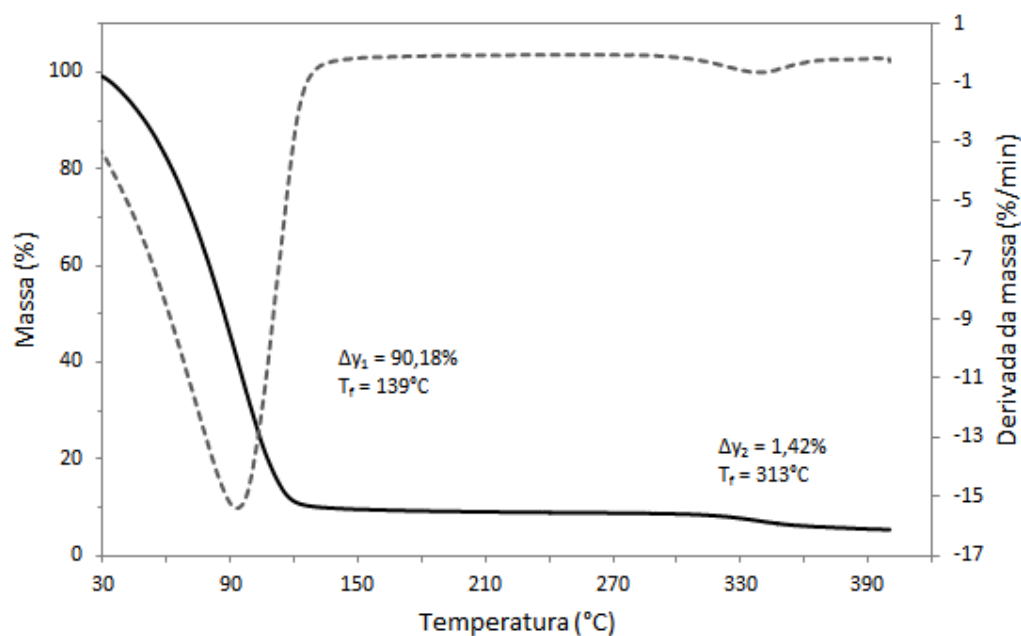


Figura 25 – Curvas TG/DTG da amostra TS intumescida com água 24h. Taxa 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.

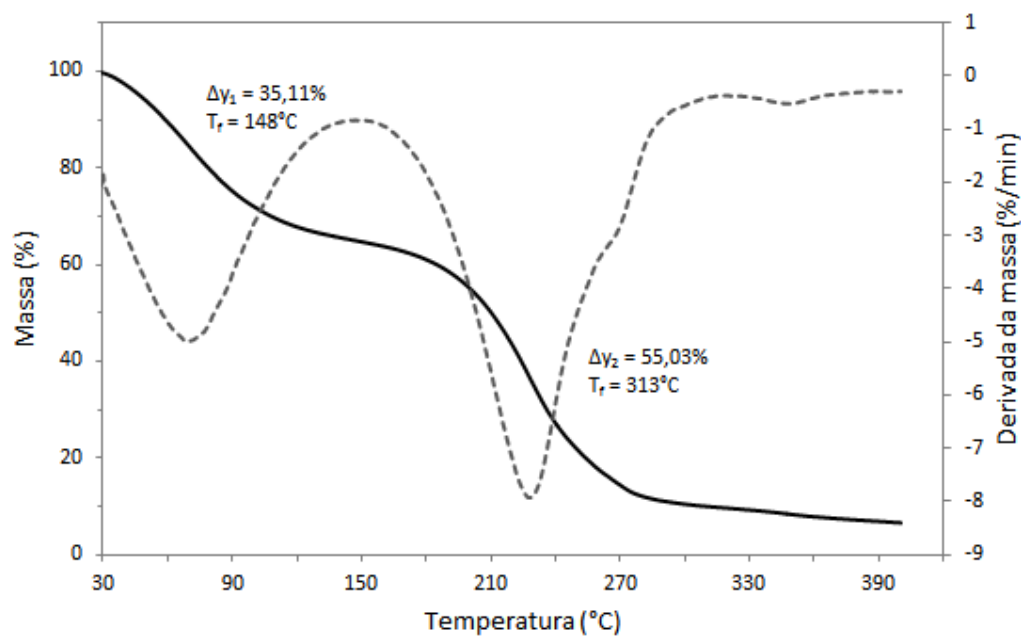


Figura 26 – Curvas TG/DTG da amostra TF. Taxa 10°C/min em atmosfera de nitrogênio.

Pode-se claramente observar a diferença de comportamento proporcionado pela adição de glicerina na estrutura, tanto retardando a saída de umidade, quanto permanecendo na amostra em temperaturas muito superiores às requeridas para um biomaterial.

Na amostra TSa a taxa de desidratação aumenta rapidamente logo após o início da análise (-3,4%/min em 30°C) chegando a -15,4%/min em 93°C. O processo termina na temperatura de 139°C com uma perda de massa equivalente a 90,18% da inicial, que representa toda água absorvida pela amostra.

Já na amostra TF a desidratação começa mais lenta (-2,0%/min em 30°C) chegando no máximo de apenas -5,0%/min em 69°C. O processo termina na temperatura de 148°C, praticamente 10°C a mais que na amostra TSa, com uma perda de massa equivalente a 35,11% da inicial, que representa toda água absorvida pela amostra. Esses resultados comprovam a atuação da glicerina como retardante da perda de umidade do composto, justificado por sua elevada higroscopicidade. Além disso, é aproximadamente na temperatura 148°C que se inicia a volatilização da glicerina, terminando em 313°C com uma perda de massa equivalente a 55,03% da inicial. A soma das duas massas perdidas resulta exatamente em 90,14%, o que comparando com os dados obtidos com o TSa, sugere que numa solução aquosa com 50% de glicerina, ela ocupa cerca de 61% dos sítios que seriam ocupados pela água se não houvesse glicerina presente, ou seja, a amostra TS tem preferência química pela glicerina. No entanto a água se mostrou importante como um carreador de glicerina para o interior da amostra, visto que a glicerina pura foi incapaz de intumescer por si só os TS com eficiência.

4.7 Análise estrutural por microscopia

Os tubos porosos (TP) são produtos com potencial aplicação na engenharia de tecidos. Sendo assim, é importante conhecer sua conformação física, que age como suporte para a proliferação celular. A análise por microscopia foi proposta com essa finalidade e a forma final dos TP é apresentada na Figura 27.



Figura 27 – Amostras de TP na sua forma final.

O processo de liofilização utilizado para confecção dos TP consiste de uma desidratação em baixas temperaturas, e envolve o congelamento do produto e a redução da pressão do sistema. O gelo presente na estrutura é removido por sublimação, promovendo uma estrutura porosa interconectada correspondente aos espaços vazios, onde os cristais de gelo foram uma vez formados.

O aspecto geral das amostras é esponjoso e apresenta certa flexibilidade. A superfície externa é irregular e, como descrito na metodologia (3.2.1), o orifício do tubo é conformado por um bastão interno, e desta forma, possui boa regularidade.

A análise de MO permitiu observar a conformação esponjosa lamelar interconectada da secção transversal de uma amostra de TP, ocasionada pela cristalização do gelo no interior da amostra e posterior liofilização (Figura 28).

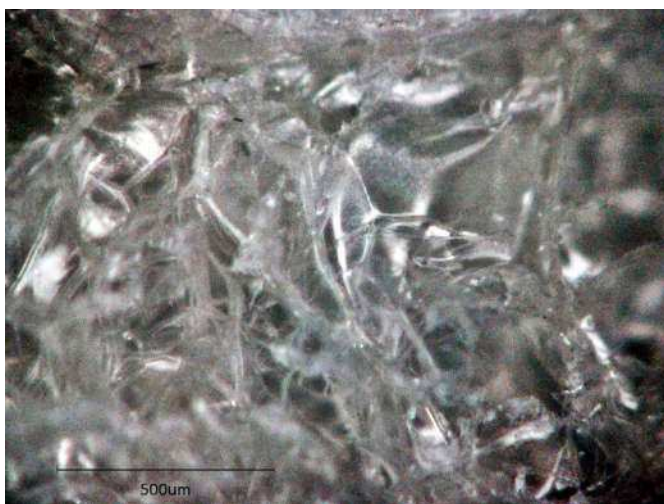
Estruturas semelhantes foram obtidas a partir de blendas gelatina/quitosana nos recentes trabalhos de Suarez *et al.* (2016), Huang *et al.* (2016) e Badhe *et al.* (2017), inclusive análises realizadas mostraram bons resultados de adesão e proliferação celular, sugerindo que tais estruturas tem potencial utilidade para engenharia de tecidos.



Aumento de 50X



Aumento de 100X



Aumento de 200X

Figura 28 – Conformação física da secção de um TP observada por MO.

Pelas análises de MO e MEV também foi possível observar a estrutura da superfície lateral do TP, formada por uma camada microporosa de aspecto rugoso (Figura 29).

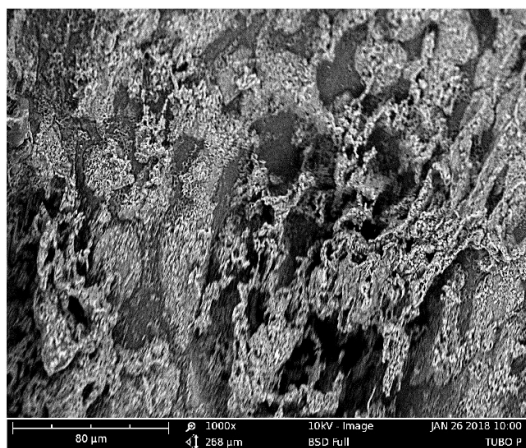
A rugosidade também é um aspecto importante para culturas celulares, pois pode influenciar na adesão e desenvolvimento das células.



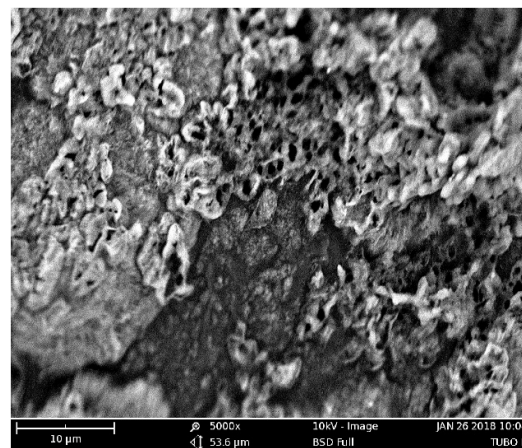
Aumento de 50X por MO



Aumento de 300X por MO



Aumento de 1000X por MEV



Aumento de 5000X por MEV

Figura 29 – Conformação física da superfície lateral de um TP observada por MO e MEV.

5 CONCLUSÃO

O novo processo proposto possibilitou a produção de três tipos de tubos a partir de blendas gelatina/quitosana. As dimensões das amostras fabricadas se mostraram uniformes, com variações médias inferiores a 5%, o que evidencia um bom controle, mesmo se tratando de um processo de manufatura em escala laboratorial. As análises físicas apresentaram detalhes sobre a biodegradação hidrolítica e o intumescimento, tais como, o ganho de volume preferencialmente na dimensão radial externa do tubo, e a dissolução gradual da amostra logo nas primeiras horas de imersão, chegando a perder mais da metade de sua massa inicial nas primeiras 24 horas, porém mantendo-se em formato tubular, mesmo após 40 dias de imersão em solução de PBS. A perda de massa foi pouco expressiva após essa dissolução inicial, mostrando que num segundo momento a biodegradação ocorre preferencialmente por alterações químicas, evidenciadas pela tendência ao amarelamento das amostras e alterações no seu comportamento mecânico. Relacionado às propriedades mecânicas, foi observado que as amostras começaram a apresentar falhas de resistência com aproximadamente 7 dias de imersão em PBS, no entanto, na presença de lisozima a estabilidade física foi melhor, possivelmente devido a uma proteção biológica proporcionada pela enzima. Os tubos plastificados com glicerina apresentaram melhor comportamento mecânico e estabilidade térmica dentre os testados, e a análise estrutural dos tubos liofilizados mostrou uma estrutura interna esponjosa lamelar interconectada e superficialmente rugosa. Tais resultados e características físicas demonstram que, o método desenvolvido para produção dos tubos é reproduzível, e sugerem potencial utilidade desses produtos em diversas aplicações no campo da medicina.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Utilizar os tubos fabricados em testes *in vivo* avaliando a capacidade de interação com o corpo, bioatividade, regeneração do tecido e bioabsorção. Uma aplicação sugerida seria como tubos guia para regeneração de nervos.

Avaliar variantes que possam modificar a capacidade de biodegradação, como reticulação e meio aquoso degradante. A sugestão é utilizar a genipina ou glutaraldeído como reticulante e avaliar a biodegradação em água ou solução salina fisiológica.

Estudar a morfologia esponjosa dos TP a partir da formação dos cristais de gelo, variando as condições de taxa e temperatura durante congelamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, C. T.; COUTINHO, F. M. B.; DIAS, M. L.; LUCAS, E. F.; OLIVEIRA, C. M. F.; TABAK, D. **Dicionário de Polímeros**. Interciência, 2001. ISBN 85-7193-052-X.
- BADHE, R. V.; BIJUKUMAR, D.; CHEJARA, D. R.; MABROUK, M.; CHOONARA, Y. E.; KUMAR, P.; DU TOIT, L. C.; KONDIAH, P. P.; PILLAY, V. A composite chitosan-gelatin bi-layered, biomimetic macroporous scaffold for blood vessel tissue engineering. **Carbohydrate Polymers.**, v. 157, p. 1215-1225, 2017.
- BAK, M.; GUTKOWSKA, O. N.; WAGNER, E.; GOSK, J. The role of chitin and chitosan in peripheral nerve reconstruction. **Polymers in Medicine**, v. 47, n. 1, p. 43-47, 2017.
- BASU, J.; LUDLOW, J. W. Tissue Engineering of Tubular and Solid Organs, An Industry Perspective. In: WISLET-GENDEBIEN, S. (Ed.). **Advances in Regenerative Medicine**. Rijeka: InTech, 2011. cap. 11, p. 235-260.
- BATTISTON, B.; TITOLO, P.; CICLAMINI, D.; PANERO, B. Peripheral Nerve Defects: Overviews of Practice in Europe. **Hand Clinics.**, v. 33, n. 3, p. 545-550, 2017.
- BEATRIZ, A.; ARAÚJO, Y. J. K.; LIMA, D. P. D. Glicerol: um breve histórico e aplicação em sínteses estereosseletivas. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 306-319, 2010.
- BOWER, C. K.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C. W.; MCHUGH, T. H.; BECHTEL, P. J. Characterization of Fish-Skin Gelatin Gels and Films Containing the Antimicrobial Enzyme Lysozyme. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, p. M141-M145, 2006.
- CESARETTI, I. U. R.; SAAD, S. S. Drenos Laminares e Tubulares em Cirurgia Abdominal: Fundamentos Básicos e Assistência. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 15, n. 3, p. 97-106, 2002.
- CHEN, M. C.; LIU, C. T.; TSAI, H. W.; LAI, W. Y.; CHANG, Y.; SUNG, H. W. Mechanical properties, drug eluting characteristics and in vivo performance of a genipin-crosslinked chitosan polymeric stent. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5560-5571, 2009.
- CHENG, M.; DENG, J.; YANG, F.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Study on physical properties and nerve cell affinity of composite films from chitosan and gelatin solutions. **Biomaterials**, v. 24, n. 17, p. 2871-2880, 2003.
- CHIONO, V.; PULIERI, E.; VOZZI, G.; CIARDELLI, G.; AHLUWALIA, A.; GIUSTI, P. Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, p. 889-898, 2007.
- DE_PAOLI, M. A. **Degradação e Estabilização de Polímeros**. São Paulo: Artliber, 2009. ISBN 9788588098442.

DEKINA, S.; ROMANOVSKA, I.; OVSEPYAN, A.; TKACH, V.; MURATOV, E. Gelatin/carboxymethyl cellulose mucoadhesive films with lysozyme: Development and characterization. **Carbohydrate Polymers.**, v. 147, p. 208-215, 2016.

DERUNTZ, J. A.; HODGE, P. G. Crushing of a Tube Between Rigid Plates. **Journal of Applied Mechanics**, n. 30, p. 391-395, 1963.

DOMB, A. J.; KOST, J.; WISEMAN, D. M. **Handbook of Biodegradable Polymers.** CRC Press, 1997. ISBN 90-5702-153-6.

DUCONSEILLE, A.; ASTRUC, T.; QUINTANA, N.; MEERSMAN, F.; SANTE-LHOUTELLIER, V. Gelatin structure and composition linked to hard capsule dissolution: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 360-376, 2015.

EPURE, V.; GRIFFON, M.; POLLET, E.; AVÉROUS, L. Structure and properties of glycerol-plasticized chitosan obtained by mechanical kneading. **Carbohydrate Polymers.**, v. 83, n. 2, p. 947-952, 2011.

FUNDO, J. F.; FERNANDES, R.; ALMEIDA, P. M.; CARVALHO, A.; FEIO, G.; SILVA, C. L.; QUINTAS, M. A. Molecular mobility, composition and structure analysis in glycerol plasticised chitosan films. **Food Chemistry.**, v. 144, p. 2-8, 2014.

GEGEL, N. O.; SHIPOVSKAYA, A. B.; VDOVYKH, L. S.; BABICHEVA, T. S. Preparation and Properties of 3D Chitosan Microtubes. **Journal of Soft Matter**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

GME. Gelatine Manufacturers of Europe. 2018. Disponível em: < <http://www.gelatine.org/> >.

GMIA. The Gelatin Handbook. 2018. Disponível em: < <http://www.gelatin-gmia.com/gelatinhandbook.html> >.

GONSALVES, A. D. A.; ARAÚJO, C. R. M.; SOARES, N. A.; GOULART, M. O. F.; ABREU, F. C. D. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GORGIEVA, S.; KOKOL, V. Collagen- vs. Gelatine-Based Biomaterials and Their Biocompatibility: Review and Perspectives. In: PIGNATELLO, R. (Ed.). **Biomaterials Applications for Nanomedicine.** Croácia: InTech, 2011. p. 17-52.

HAASTERT-TALINI, K.; GEUNA, S.; DAHLIN, L. B.; MEYER, C.; STENBERG, L.; FREIER, T.; HEIMANN, C.; BARWIG, C.; PINTO, L. F.; RAIMONDO, S.; GAMBAROTTA, G.; SAMY, S. R.; SOUSA, N.; SALGADO, A. J.; RATZKA, A.; WROBEL, S.; GROTHE, C. Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects. **Biomaterials**, v. 34, n. 38, p. 9886-9904, 2013.

HOSSEINI, S. F.; REZAEI, M.; ZANDI, M.; GHAVI, F. F. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. **Food Chemistry.**, v. 136, n. 3-4, p. 1490-5, 2013.

HUANG, F.; CUI, L.; PENG, C. H.; WU, X. B.; HAN, B. S.; DONG, Y. D. Preparation of three-dimensional macroporous chitosan-gelatin B microspheres and HepG2-cell culture. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine.**, v. 10, n. 12, p. 1033-1040, 2016.

INFINITYPHARMA. Literatura: Glicerina vegetal umectante. 2018. Disponível em: < https://infinitypharma.com.br/uploads/insumos/pdf/g/Glicerina_2.pdf >.

ITOH, S.; YAMAGUCHI, I.; SHINOMIYA, K.; TANAKA, J. Development of the chitosan tube prepared from crab tendon for nerve regeneration. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 4, n. 3, p. 261-268, 2003.

JENNINGS, J. A.; BUMGARDNER, J. D. **Chitosan Based Biomaterials: Fundamentals**. Cambridge: Woodhead Publishin, 2017. ISBN 978-0-08-100257-5.

KIM, S.-K. **Chitin and Chitosan Derivatives, Advances in Drug Discovery and Developments**. CRC Press, 2014. ISBN 13-978-1-4665-6632-3.

KIM, S.; NIMNI, M. E.; YANG, Z.; HAN, B. Chitosan/gelatin-based films crosslinked by proanthocyanidin. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 75, n. 2, p. 442-450, 2005.

KUIJPERS, A. J.; VAN_WACHEM, P. B.; VAN_LUYN, M. J. A.; ENGBERS, G. H. M.; KRIJGSVELD, J.; ZAAË, S. A. J.; DANKERT, J.; FEIJEN, J. In vivo and in vitro release of lysozyme from cross-linked gelatin hydrogels: a model system for the delivery of antibacterial proteins from prosthetic heart valves. **Journal of Controlled Release**, v. 67, p. 323-336, 2000.

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

LEE, C. H.; SINGLA, A.; LEE, Y. Biomedical applications of collagen. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 221, p. 1-22, 2001.

LIU, H.; MAO, J.; YAO, K.; YANG, G.; CUI, L.; CAO, Y. A study on a chitosan-gelatin-hyaluronic acid scaffold as artificial skin in vitro and its tissue engineering applications. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 15, n. 1, p. 25-40, 2004.

MAO, J. S.; CUI, Y. L.; WANG, X. H.; SUN, Y.; YIN, Y. J.; ZHAO, H. M.; DE YAO, K. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis. **Biomaterials**, v. 25, n. 18, p. 3973-81, 2004.

MASSCHALCK, B.; MICHIELS, C. W. Antimicrobial Properties of Lysozyme in Relation to Foodborne Vegetative Bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 29, n. 3, p. 191-214, 2003.

MATSUMOTO, I.; KANEKO, M.; ODA, M.; WATANABE, G. Repair of intra-thoracic autonomic nerves using chitosan tubes. **Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery.**, v. 10, n. 4, p. 498-501, 2010.

NEMAT-ALLA, M. Reproducing hoop stress–strain behavior for tubular material using lateral compression test. **International Journal of Mechanical Sciences**, v. 45, n. 4, p. 605-621, 2003.

NORDTVEIT, R. J.; VÅRUM, K. M.; SMIDSRØD, O. Degradation of partially N-acetylated chitosans with hen egg white and human lysozyme. **Carbohydrate Polymers.**, v. 29, p. 163-167, 1996.

ORYAN, A.; ALIDADI, S.; BIGHAM-SADEGH, A.; MOSHIRI, A. Comparative study on the role of gelatin, chitosan and their combination as tissue engineered scaffolds on healing and regeneration of critical sized bone defects: an in vivo study. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 27, n. 10, p. 155-169, 2016.

PATEL, M.; VANDEVORD, P. J.; MATTHEW, H. W.; DE SILVA, S.; WU, B.; WOOLEY, P. H. Collagen-chitosan nerve guides for peripheral nerve repair: a histomorphometric study. **Journal of Biomaterials Applications.**, v. 23, n. 2, p. 101-121, 2008.

PAUL, R. G.; BAILEY, A. J. Chemical stabilisation of collagen as a biomimetic. **The Scientific World Journal**, v. 3, p. 138-155, 2003.

PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. Second Edition. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009. ISBN 978-1-84569-587-3.

PULIERI, E.; CHIONO, V.; CIARDELLI, G.; VOZZI, G.; AHLUWALIA, A.; DOMENICI, C.; VOZZI, F.; GIUSTI, P. Chitosan/gelatin blends for biomedical applications. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 86, n. 2, p. 311-322, 2008.

RABELLO, M. **Aditivação de Polímeros**. Artliber, 2000. ISBN 8588098016.

RATHNAWEERA, G.; DURANDET, Y.; RUAN, D.; KINOSHITA, S. Characterizing the Material Properties of a Tube from a Lateral Compression Test. **International Journal of Protective Structures**, v. 2, n. 4, p. 465-475, 2011.

RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine**. Elsevier Academic Press, 2004. ISBN 0-12-582463-7.

REDDY, T. Y.; REID, S. R. On obtaining material properties from the ring compression test. **Nuclear Engineering and Design**, n. 52, p. 257-263, 1979.

REIS, R. L.; ROMÁN, J. S. **Biodegradable Systems in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**. CRC Press, 2005. ISBN 0-8493-1936-6.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 31, n. 7, p. 603-632, 2006.

ROTHWELL, R. A.; THOMSON, G. A.; PRIDHAM, M. S. Stent Design for Gastrointestinal Leakage. **IFMBE Proceedings**, v. 22, 2008.

SAKSENA, R.; GAO, C.; WICOX, M.; DE MEL, A. Tubular organ epithelialisation. **Journal of Tissue Engineering**, v. 7, p. 1-16, 2016.

SCHRIEBER, R.; GAREIS, H. **Gelatine Handbook Theory and Industrial Practice**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. ISBN 978-3-527-31548-2.

SCIENTIFIC_AMERICAN. What is Jell-O? How does it turn from a liquid to a solid when it cools? , 2018. Disponível em: < <https://www.scientificamerican.com/article/what-is-jell-o-how-does-it/> >.

SHEN, J.; LU, G.; RUAN, D.; CHIANG SEAH, C. Lateral plastic collapse of sandwich tubes with metal foam core. **International Journal of Mechanical Sciences**, v. 91, p. 99-109, 2015.

SIGMA_ALDRICH. Gelatin from porcine skin – Product Information Sheet (PDF). 2018. Disponível em: < https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/g2500pis.pdf >.

SUAREZ, M. N.; QUINTELA, M. A. L.; LAZZARI, M. Preparation and characterization of crosslinked chitosan/gelatin scaffolds by ice segregation induced self-assembly. **Carbohydrate Polymers.**, v. 141, p. 175-83, 2016.

SUZUKI, S.; IKADA, Y. **Biomaterials for Surgical Operation**. Humana Press, 2012. ISBN 978-1-61779-569-5.

THE_BALANCE. An Explanation of the Process Hydrolysis. 2018. Disponível em: < <https://www.thebalance.com/what-is-hydrolysis-375589> >.

TORMALA, P.; POHJONEN, T.; ROKKANEN, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H**, v. 212, n. 2, p. 101-111, 1998.

VIEIRA, M. G. A.; DA SILVA, M. A.; DOS SANTOS, L. O.; BEPPU, M. M. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. **European Polymer Journal**, v. 47, n. 3, p. 254-263, 2011.

WANG, A.; AO, Q.; CAO, W.; YU, M.; HE, Q.; KONG, L.; ZHANG, L.; GONG, Y.; ZHANG, X. Porous chitosan tubular scaffolds with knitted outer wall and controllable inner structure for nerve tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 79, n. 1, p. 36-46, 2006.

WANG, A.; AO, Q.; CAO, W.; ZHAO, C.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. Fiber-Based chitosan tubular scaffolds for soft tissue engineering: Fabrication and in vitro evaluation. **Tsinghua Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 449-453, 2005.

WANG, K.; LIN, S.; NUNE, K. C.; MISRA, R. D. Chitosan-gelatin-based microgel for sustained drug delivery. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 27, n. 5, p. 441-453, 2016.

WANG, W.; ITOH, S.; MATSUDA, A.; ICHINOSE, S.; SHINOMIYA, K.; HATA, Y.; TANAKA, J. Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 84, n. 2, p. 557-566, 2008.

WIKICIENCIAS. Glicerol. 2018. Disponível em: <
<http://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/index.php/Glicerol> >.

WIKIPEDIA_LYZOSYME. Lysozyme. 2018. Disponível em: <
<https://en.wikipedia.org/wiki/Lysozyme> >.

XIN-YUAN, S.; TIAN-WEI, T. New Contact Lens Based on Chitosan/Gelatin Composites. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 19, n. 6, p. 467-479, 2004.

YANG, D. Z.; LONG, Y. H.; NIE, J. Release of lysozyme from electrospun PVA/lysozyme-gelatin scaffolds. **Frontiers of Materials Science in China**, v. 2, n. 3, p. 261-265, 2008.

ZHANG, L.; AO, Q.; WANG, A.; LU, G.; KONG, L.; GONG, Y.; ZHAO, N.; ZHANG, X. A sandwich tubular scaffold derived from chitosan for blood vessel tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 77, n. 2, p. 277-284, 2006.